

Untersuchungen zur transkriptionellen Regulierung des VEGF-Rezeptors 2 (Flk-1)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Gerd Elvert

aus Bad Hersfeld

Druck: copy team cologne, Köln

2001

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Paulsson
PD Dr. S. Waffenschmidt
Prof. Dr. H. Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1997 bis November 2000 in der Nachwuchsgruppe I des Zentrums für Molekulare Medizin der Universität zu Köln unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. M. Paulsson und der Anleitung von Herrn PD Dr. I. Flamme durchgeführt.

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Das Blutgefäßsystem	9
1.2	Entstehung des Blutgefäßsystems	11
1.3	Klinische Bedeutung der Angiogenese	12
1.4	Bedeutung des VEGF/VEGFR-Systems bei der Regulation des Blutgefäßwachstums	13
1.5	Regulatorische Elemente im Flk-Promotor	17
1.6	Hypoxie und der hypoxieinduzierbare Faktor HIF-1 α	19
1.7	Der hypoxieinduzierbare Faktor HIF-2 α	21
1.8	Ziele dieser Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien	23
2.1.2	Enzyme	23
2.1.3	Antikörper	23
2.1.4	Fertige Reagenzienansätze	24
2.1.5	Oligonukleotide, Vektoren	25
2.1.6	Lösungen	27
2.1.6.1	Pufferlösungen	27
2.1.6.2	Medien	28
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	29
2.1.8	Geräte	29
2.2	Methoden	31
2.2.1	Bakterien	31
2.2.1.1	Verwendete Bakterienstämme	31
2.2.1.2	Vermehrung und Lagerung	31
2.2.1.3	Herstellung und Transformation kompetenter E.coli-Zellen	32
2.2.1.3.1	Temperaturkompetente Bakterien	32
2.2.1.3.2	Elektrokompetente Bakterien	33
2.2.2	Arbeiten mit einer Phagen-cDNA-Bank	34
2.2.2.1	Ausplattieren einer Phagenbank	35
2.2.2.2	Durchsuchen einer ausplattierten Phagenbank	35
2.2.2.3	Präparation von Phagen-DNA ("Maxi-Präp")	36
2.2.3	Arbeiten mit RNA	38
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	38

2.2.3.2	Northern blot-Analyse	39
2.2.3.2.1	RNA-Elektrophorese im denaturierenden Formamid-Agarosegel	39
2.2.3.2.2	Transfer von RNA auf Nylonmembranen durch Kapillar-Blotting	40
2.2.3.2.3	Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Sonden	40
2.2.4	Arbeiten mit DNA	42
2.2.4.1	Plasmid-DNA-Präparationen	42
2.2.4.1.1	Plasmidisolierung (analytischer Maßstab)	42
2.2.4.1.2	Plasmidisolierung (präparativer Maßstab)	43
2.2.4.2	Aufreinigung von DNA	44
2.2.4.2.1	Präzipitation von DNA mit Ethanol oder Isopropanol	44
2.2.4.2.2	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	44
2.2.4.2.3	DNA-Isolation aus Agarose-Gelen	45
2.2.4.2.4	Adsorptionschromatographie	46
2.2.4.2.5	Anionen-Austauschchromatographie	46
2.2.4.3	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	46
2.2.4.4	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.4.5	Sequenzspezifische Mutation durch PCR	48
2.2.4.5.1	Deletionen	48
2.2.4.5.2	Fusionen	48
2.2.4.5.3	Austauschmutationen	48
2.2.4.6	Punktmutation	50
2.2.4.7	Enzymatische Modifikation von DNA	50
2.2.4.7.1	Sequenzspezifische DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	50
2.2.4.7.2	Generierung glatter Enden aus 5'- und 3'-Überhängen	51
2.2.4.7.3	Dephosphorylierung von 5'-Enden	52
2.2.4.7.4	Ligation	52
2.2.4.8	Sequenzierung von DNA	53
2.2.4.9	Markierung von DNA-Molekülen	53
2.2.4.9.1	Radioaktive Markierung mittels T4 Polynukleotid-Kinase	53
2.2.4.9.2	Radioaktive Markierung mittels Klenow-Polymerase	54
2.2.5	Arbeiten mit Proteinen	55
2.2.5.1	Herstellung eines polyklonalen Antiserums	55
2.2.5.2	in vitro-Translation	55
2.2.5.3	Western blot-Analyse	56
2.2.5.3.1	Auftrennung durch ein denaturierendes Polyacrylamidgel	56
2.2.5.3.2	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	57
2.2.5.3.3	Antikörpernachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	57
2.2.5.4	GST-Pulldown	58
2.2.5.5	Immunpräzipitation	59
2.2.5.6	Extraktion von Kernproteinen	60
2.2.5.7	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	61

2.2.6	DNA-Protein-Interaktion	62
2.2.6.1	Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	62
2.2.6.2	in vitro DNase I footprint	63
2.2.6.2.1	chemische Sequenzierung nach Maxam und Gilbert	64
2.2.6.2.2	DNase I-Titration	65
2.2.6.2.3	footprint:	66
2.2.7	Kultur eukaryotischer Zellen	66
2.2.7.1	verwendete Zelllinien	66
2.2.7.2	Medien und verwendete Lösungen	67
2.2.7.3	Vermehrung, Haltung und Lagerung eukaryotischer Zellen	68
2.2.7.4	Transiente Transfektion	68
2.2.7.5	Simulierung hypoxischer Bedingungen	69
2.2.8	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf Gewebeschnitten	69
2.2.8.1	Entnahme, Fixierung und Einbettung von Gewebeproben	69
2.2.8.2	Anfertigung von Semidünnschnitten	70
2.2.8.3	Nachweis von Proteinen auf Semidünnschnitten mit spezifischen Antikörpern	71
2.2.9	Proteinnachweis durch Immunfluoreszenz	72
2.2.10	Nachweis von Transkripten auf Gewebeschnitten durch in situ-Hybridisierung	72
2.2.10.1	in vitro Transkription	72
2.2.10.1.1	Proteinase K-Verdau der Template-DNA	73
2.2.10.1.2	Run off-Transkription	73
2.2.10.1.3	Größenabschätzung der Dig-RNA-Transkripte	74
2.2.10.1.4	Mengenabschätzung der Dig-RNA-Transkripte	75
2.2.10.2	in situ-Hybridisierung	76
2.2.11	Reportergen-Analysen	78
2.2.12	Transgene Mäuse	80
3	Ergebnisse	82
3.1	Flk-1 und HIF-2 α sind in der Entwicklung gleichzeitig detektierbar	82
3.2	HIF-2 α und HIF-1 α zeigen eine unterschiedliche Wirkung auf den Flk-1-Promotor	85
3.3	Die unterschiedliche Aktivierung des Flk-1-Promotors durch HIF-2 α und HIF-1 α beruht auf Unterschieden im Carboxy-Terminus	89
3.4	Die HIF-2 α -Bindung erfolgt an HRE-verwandte Sequenzen im Flk-1-Promotor	98
3.5	HIF-2 α und Ets-1 kooperieren bei der Aktivierung des Flk-1-Promotors	102
3.6	HIF-2 α und Ets-1 interagieren in vitro physikalisch miteinander	106
3.7	Das Element EBS3/HBS1 aus dem Flk-1-Promotor überträgt die starke Induzierbarkeit durch HIF-2 α und Ets-1 auf heterologe Promotoren	108
3.8	Die Deletion der Bindestellen für HIF-2 α und Ets-1 im Flk-1-Promotor führt zum Verlust der gewebespezifischen Expression des Proteins	112

3.9	Der Aktivierungsmechanismus von HIF-2 α und Ets-1 stimuliert auch Promotoren anderer endothelial exprimierter Gene	116
3.10	Die Aktivierung von KDR durch VEGF führt über das HBS/EBS-Element zur transkriptionellen Autoaktivierung des Rezeptors	119
4	Diskussion	121
4.1	Der Flk-1-Promotor wird durch einen Synergismus von HIF-2 α und Ets-1 aktiviert	121
4.2	HIF-2 α und Ets-1 interagieren in vitro physikalisch miteinander	123
4.3	Die Transaktivierungsdomäne TAD N im C-Terminus von HIF-2 α ist an der Kooperation mit Ets-1 bei der Aktivierung des Flk-1-Promotors beteiligt	125
4.4	Die Exon VII-Domäne von Ets-1 vermittelt die Interaktion mit HIF-2 α	127
4.5	Im Gegensatz zu HIF-2 α kann HIF-1 α bei der Aktivierung von Flk-1 nicht mit Ets-1 interagieren	128
4.6	Über die Signaltransduktionskaskade übt Flk-1 einen autoregulatorischen Effekt aus	130
4.7	Hypoxie reguliert über die Stabilisierung des HIF-2 α -Proteins die Transkription von Flk-1	131
4.8	Ausblick	134
5	Zusammenfassung	135
6	Literaturverzeichnis	137
7	Anhang	151
7.1	Basenpaarsequenz der Wachtel-HIF-2 α -cDNA	151
7.2	Basenpaarsequenz der Flk-1- Mutationen	152
7.3	Basenpaarsequenz der HIF-2 α -Mutationen	152
7.4	Abkürzungen	159
7.5	Danksagung	162
7.6	Erklärung	163
7.7	Kurzzusammenfassung	164
7.8	Abstract	165
7.9	Lebenslauf	167

1 Einleitung

1.1 Das Blutgefäßsystem

Die Versorgung der Organe höherer Organismen wird durch das Blutgefäßsystem sichergestellt. Dieses Röhrensystem transportiert Gase, Flüssigkeiten, Salze, Immunzellen und Botenstoffe von und zu den Zellen (zur Übersicht s. Ruggeri, 1993).

Bei Säugetieren besteht das Blutgefäßsystem aus zwei geschlossenen Kreisläufen, die einander nachgeschaltet sind. Im Lungenkreislauf wird das Blut mit Sauerstoff angereichert und das Stoffwechselprodukt Kohlendioxid abgegeben. Vom Herz aus wird das Blut dann durch die großen arteriellen Gefäße in die Kapillaren der verschiedenen Organe gepumpt. Hier findet erneut ein Austausch statt. Der benötigte Sauerstoff und die mitgeführten Nährstoffe werden an das Gewebe abgegeben, Kohlendioxid ins Blut aufgenommen und durch die venösen Gefäße wieder zum Herzen geführt.

Die Wände der größeren Gefäße und des Herzens sind dreischichtig aufgebaut (Abb. 1-1): die *tunica interna*, ein einschichtiges Plattenepithel aus Endothelzellen, kleidet die Gefäße aus. Daran schließt sich die *tunica media* an, die aus glatten Muskelzellen sowie aus Bindegewebe besteht. Zwischen Gefäßwand und umgebendem Bindegewebe liegt schließlich die *tunica externa* (auch *tunica adventitia*), die ihrerseits kleine Gefäße enthält, durch die die äußeren Gefäßschichten versorgt werden. Die herznahen Arterien können so mit ihren muskulösen und elastischen Wandungen als Druckreservoir den stoßweisen Blutausschlag des Herzens in eine gleichmäßige Blutströmung durch die Kapillarnetze überführen. Dort sinken aufgrund des geringen Durchmessers und der großen Querschnittsfläche der Kapillaren Blutdruck und Strömungsgeschwindigkeit ab, so daß ein Stoff- und Gasaustausch stattfinden kann. Die Kapillaren haben einen einfacheren Aufbau als die größeren Arterien. Ein einschichtiges Endothel steht auf der dem Lumen abgewandten Seite mit der Basalmembran in Verbindung. In den Venen wird das Blut schließlich mit niedrigem Druck aber aufgrund der Querschnittsverhältnisse mit zunehmender Geschwindigkeit zum Herzen zurückgeführt. Die Venen ähneln vom Aufbau her wieder mehr den Arterien, die Gefäßwände sind aber deutlich dünner und weniger elastisch.

Allen Blutgefäßtypen gemein ist die innere Auskleidung durch Endothelzellen. Dieser Zelltyp spielt bei den Regulierungsmechanismen des Gefäßwachstums eine besondere Rolle.

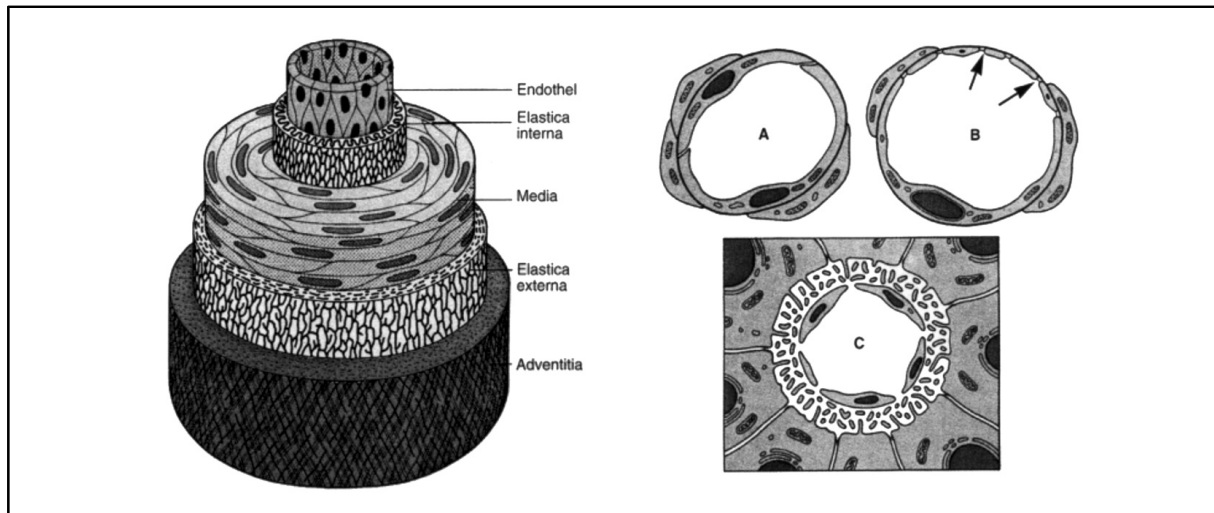


Abbildung 1-1: Aufbau von Blutgefäßen. links: Schematische Darstellung der Wandschichten einer Arterie. rechts: Kapillaren. A: geschlossene Kapillare mit überlappenden Endothelzellen. B: Kapillare mit Poren (Pfeile). C: Kapillare ohne Basalmembran (Sinusoide). Nach C. Thomas 1998; Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie; 12. Auflage; Schattauer/Stuttgart.

Die Endothelschicht hat je nach Gewebe sehr unterschiedliche Eigenschaften.

Die sogenannte "Blut-Hirn-Schranke" wirkt bei der Versorgung des Gehirns als Filter. Durch das Endothel der Hirnkapillaren können Blutgase, lipophile Substanzen und Glukose praktisch ungehindert diffundieren, es gibt spezifische Transportsysteme für Ionen und (Lipo-) Proteine. Dagegen werden andere Proteine, Aminosäuren und Zellen zurückgehalten (Steward und Hayakawa, 1987; Wolburg *et al.*, 1994).

In anderen Organen, wo ein starker Austausch von Zellen und Partikeln stattfindet, existiert ein diskontinuierliches Endothel mit Lücken (z.B. in Leber, Knochenmark und Milz) (Bankston und Pino, 1980).

Ein weiterer Endotheltyp findet sich in endokrinen Drüsen oder den Nierenglomeruli. Es ist das sogenannte fenestrierte Endothel, das aufgrund intrazellulärer Poren den Austausch kleiner Moleküle zwischen Gewebe und Kapillaren erleichtert (Koriyama *et al.*, 1992).

1.2 Entstehung des Blutgefäßsystems

In der Embryogenese entwickelt sich das Blutgefäßsystem schon sehr früh. Die Endothelzellen, die sich zuerst ausdifferenzieren, stammen vermutlich zusammen mit den Blutzellen von gemeinsamen Vorläufern ab, den Hämangioblasten (His, 1900; Murray, 1932; Sabin, 1920). Die Hämangioblasten bilden Aggregate im frühen Mesoderm, deren periphere Zellen sich zu Angioblasten, den direkten Vorläufern der Endothelzellen entwickeln (zur Übersicht s. Suda *et al.*, 1999). Die zentraler gelegenen Zellen beginnen mit der Produktion von Hämoglobin und entwickeln sich so zu embryonalen Blutzellen. Daher werden die beschriebenen Aggregate auch Blutinseln genannt. In der weiteren Entwicklung bildet sich innerhalb der Blutinseln ein Lumen, benachbarte Aggregate fusionieren und es entstehen primitive vaskuläre Kanäle. Man spricht bei dieser *de novo*-Synthese von Gefäßen von Vaskulogenese (von Schulte, 1914; Risau und Lemmon, 1988; Risau und Flamme, 1995).

Neben der vollständigen Neubildung von Blutgefäßen kommt es zur Aussprossung aus schon bestehenden Gefäßen. Dieser Vorgang wird Angiogenese genannt (Hertig, 1935; Risau, 1997) und bewirkt beispielsweise die Vaskularisierung von Geweben ektodermalen Ursprungs wie dem ZNS (Bär, 1980), in dem selbst keine Gefäße *de novo* gebildet werden. Nach der Embryonalentwicklung ist die Angiogenese der Hauptmechanismus der Gefäßneubildung.

Im Anschluß an die Entstehung eines Gerüsts aus embryonalen Blutgefäßen erfolgt die Reifung, bei der die Gefäße durch Rekrutierung von Perizyten, glatten Muskelzellen und Bindegewebszellen ihre endgültige Form erhalten (Lindahl *et al.*, 1997). Die organspezifische Differenzierung des Endothels erfolgt vermutlich über die Steuerung durch parakrine Faktoren (Steward und Wiley, 1981; Esser *et al.* 1998). Die Endothelzellen behalten jedoch auch nach der Ausdifferenzierung zeitlebens ihre Fähigkeit, erneut in der Angiogenese aktiv zu werden (Hobson und Denekamp, 1984).

Einer der Hauptstimuli, die dafür sorgen, daß Endothelzellen im adulten Organismus erneut in angiogenen Prozessen durch Zellteilung und Migration neue Gefäße bilden, ist die Hypoxie, also die Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff. Sie spielt in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle.

1.3 Klinische Bedeutung der Angiogenese

Angiogenese ist essentiell im Reproduktionszyklus, Wachstum und in der Wundheilung. Bei diesen Prozessen ist sie genau reguliert, sie wird für kurze Zeit initiiert und anschließend komplett inhibiert.

Viele Krankheiten, besonders in den westlichen Industrienationen, haben direkt oder indirekt mit dem Blutgefäßsystem zu tun und die normale Steuerung der Angiogenese ist teilweise außer Kraft gesetzt. Neben typischen "Wohlstandserkrankungen" wie Herzinfarkt und Schlaganfall, die durch einen Ausfall von Arterien verursacht werden, sind z.B. diabetische Retinopathie, Schuppenflechte und rheumatoide Arthritis eng mit Veränderungen des Gefäßsystems und einer unerwünschten Neubildung von Blutgefäßen assoziiert (zur Übersicht s. Folkman, 1995).

Von besonderem Interesse ist die Vaskularisierung solider Tumoren (Folkman *et al.*, 1971; zur Übersicht s. Rak *et al.*, 1995). Bis zu einer Größe von wenigen Millimetern reicht die einfache Diffusion zur Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen aus (Abb. 1-2). Ab dieser Tumorgöße werden die vom Blutgefäß abgewandt liegenden Zellen hypoxisch. Dadurch werden sie zur Ausschüttung verschiedener Angiogenesefaktoren angeregt, die zur Aussprossung von Kapillaren und damit zur Neubildung von Gefäßen führen (Folkman und Klagsbrun, 1987; Ferrara und Henzel, 1989). Die nun wieder ausreichend versorgten Tumorzellen können sich weiter teilen und der Tumor damit wachsen.

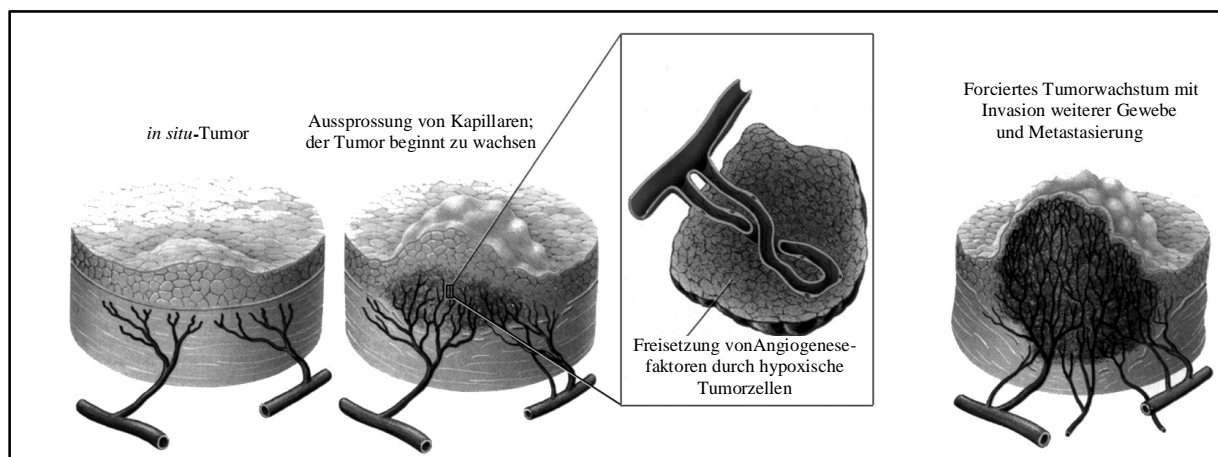


Abbildung 1-2: Tumorangio-genese. Hypoxische Tumorzellen lösen Angiogenese aus und ermöglichen so die Vaskularisierung des Tumorgewebes. Modifiziert nach: Judah Folkman, 1996; Spektrum der Wissenschaft, Spezial 5: Krebsmedizin; Spektrum der Wissenschaft Verlags GmbH/Heidelberg.

Die gezielte Verhinderung dieser Neovaskularisierung stellt ein attraktives Ziel in der Krebsforschung dar. Dabei sind Tumorendothelzellen ein scheinbar ideales Ziel. Zum einen zeichnen sie sich, im Gegensatz zu den eigentlichen Krebszellen, durch eine große genetische Stabilität aus, was die Resistenzbildung gegenüber chemotherapeutischen Maßnahmen verhindert. Zum anderen sind sie für Medikamente, die in die Blutbahn appliziert werden, sehr gut zugänglich. Dazu kommt noch, daß sehr viele Tumorzellen durch verhältnismäßig wenige Kapillaren versorgt werden, so daß ein multiplikativer Effekt der Therapie erwartet werden kann. Außerdem unterscheiden sich die Zellen des Tumorendothels u.a. durch ihre hohe Mitoserate von normalem Endothel, was eine spezifische und damit wenig toxische Therapie ermöglicht (zur Übersicht s. Rak *et al.*, 1995; Denekamp, 1993; Bicknell *et al.*, 1992).

1.4 Bedeutung des VEGF/VEGFR-Systems bei der Regulation des Blutgefäßwachstums

Im adulten Organismus weisen Endothelzellen nur eine sehr geringe Teilungsrate auf (Wagner, 1980). Die Reaktivierung der Endothelzellproliferation während des Menstruationszyklus, der Schwangerschaft und unter verschiedenen pathologischen Bedingungen hängt von den sogenannten Angiogenesefaktoren ab. Zu diesen Regulationsfaktoren gehören u. a. Angiopoietine, PDGF, die Fibroblasten-wachstumsfaktoren (FGFs) und TGF- β (zur Übersicht s. Folkman und Shing, 1992; Suda *et al.*, 2000). Letztere wirken sowohl in malignen Tumoren als auch in der Embryonalentwicklung angiogen (Seed *et al.*, 1988; Risau *et al.*, 1988; Hanneken *et al.*, 1989; Schulze Osthoff *et al.*, 1990). Über ihre Heparinbindefähigkeit wurden sie nach Aufreinigung durch Heparinaffinitätschromatographie entdeckt. Diese Affinität zu Heparin ermöglicht ihre Bindung an die Extrazellulärmatrix im Endothel. FGFs wirken stark mitogen auf zahlreiche Zelltypen und können *in vivo* die Bildung neuer Blutgefäße hervorrufen (Gospodarowicz und Bialecki, 1979; Moscatelli *et al.*, 1986; Baird und Walicke, 1989; Burgess und Maciag, 1989; Thompson *et al.*, 1989).

Ein spezifisches Mitogen für Endothelzellen ist der Vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor VEGF (zur Übersicht s. Neufeld *et al.*, 1999; Frelin *et al.*, 2000). VEGF spielt bei der Bildung neuer Blutgefäße während vieler physiologischer und pathophysiologischer Prozesse wie Embryogenese, Wundheilung und Tumorwachstum eine zentrale Rolle (Folkman, 1995; Risau, 1997). Es wirkt stark mitogen und chemotaktisch auf Endothelzellen (Ratajskaja *et al.*, 1995; Breier und Risau, 1996) und wurde aufgrund der permeabilitätserhöhenden Wirkung

auch VPF (vascular permeability factor) genannt (Senger *et al.*, 1983; Conolly, 1989). Neben dem zuerst bekannten VPF (VEGF-A) wurden noch vier weitere Familienmitglieder der VEGF-Familie identifiziert (VEGF-B, -C, -D und PlGF, der Plazenta-Wachstumsfaktor) (Olofsson *et al.*, 1996; Joukov *et al.*, 1996; Farnebo *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1994).

VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kD. Durch alternatives Spleißen entstehen die fünf Isoformen, die in Proteine mit 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren translatiert werden können (Houck *et al.*, 1991; Leung *et al.*, 1989; Tischer *et al.*, 1991; Ferrara, 1992). Sie werden von verschiedenen Zelltypen zum Teil simultan sezerniert. Über Domänen innerhalb der größeren Isoformen wird die Affinität zu Heparin und damit die Bindung an die Extrazellulärmatrix vermittelt. So beeinflussen diese Domänen die Löslichkeit der VEGF-Isoformen im Gewebe (Park *et al.*, 1993).

Die wichtige Rolle von VEGF in der Blutgefäßentwicklung zeigt sich darin, daß schon die Mutation eines VEGF-Allels embryonal letal wirkt, da die Formierung von Gefäßen massiv gestört ist (zur Übersicht s. Risau, 1997). Die Inaktivierung eines oder beider Allele des VEGF-Gens führt zu abnormen vaskulären Strukturen und zum Absterben des Embryos am Tag 10,5 der Entwicklung (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996).

Durch die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren, die fast ausschließlich auf Endothelzellen vorkommen und dadurch die Endothelspezifität von VEGF festlegen, wird das Signal ins Zellinnere transduziert (Ferrara und Henzel, 1989, Abb. 1-3).

Der VEGF-Rezeptor 3 wird vor allem in lymphatischem Endothel exprimiert (Kaipainen *et al.*, 1995) und kann nach seiner Aktivierung die Angiogenese lymphatischer Gefäße auslösen (Jeltsch *et al.*, 1997).

Bei den niedrigaffinen VEGF-Rezeptoren Neuropilin-1, Neuropilin-2 und Heparansulfat-Proteoglykan wurde bisher keine Signaltransduktion nach Bindung des Liganden festgestellt. Sie scheinen eine Rekrutierung des Liganden VEGF an die Rezeptortyrosinkinasen zu unterstützen (Soker *et al.*, 1998).

Die hochaffinen VEGF-Rezeptoren 1 und 2, Flt-1 (*fms-like tyrosin kinase*) und Flk-1 (*fetal liver kinase receptor*) zählen wie die FGF-Rezeptoren zu den Rezeptortyrosinkinasen (De Vries *et al.*, 1992; Terman *et al.*, 1992; Millauer *et al.*, 1993). Die Bindung des Liganden führt bei diesem Rezeptortyp zur Homodimerisierung. Die Tyrosinkinasedomänen phosphorylieren dann wechselseitig Tyrosinreste der Intrazellulärdomänen, was als Transphosphorylierung bezeichnet wird. An diese Phosphotyrosinreste binden über ihre SH2-Domänen intrazelluläre Moleküle der verschiedenen Signalübermittlungsketten. Viele Rezeptortyrosinkinasen, darunter der VEGF-Rezeptor 1 (Hiratsuka *et al.*, 1998), aktivieren

auf diese Weise die Phospholipase- γ , die über den Phosphatidylinositol-Weg die Proteinase C aktiviert, die nun ihrerseits zahlreiche Substrate phosphoryliert. Ein anderer Signalübermittlungsweg verläuft über die Phosphorylierung des GTP-bindenden Proteins RAS, was die Aktivierung der Kinasen des MAP-Kinaseweges nach sich zieht. Dieser Signalpfad spielt bei der Signaltransduktion über den VEGF-Rezeptor 2 eine Rolle (Hiratsuka *et al.*, 1998).

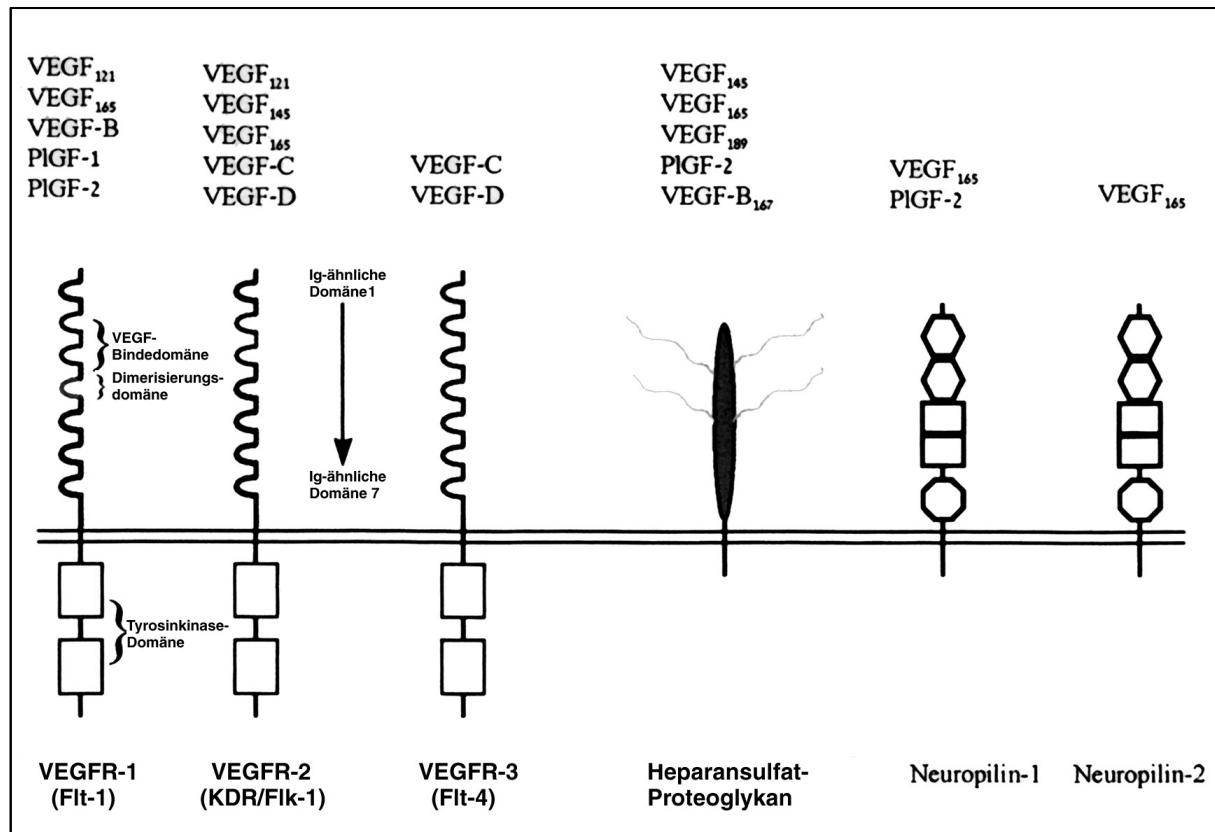


Abbildung 1-3: Mitglieder der VEGF-Familie und ihre Rezeptoren. Die drei Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, die isoformspezifischen Rezeptoren Neuropilin-1 und Neuropilin-2 und das VEGF-bindende Heparansulfat-Proteoglykan sind mit ihren Hauptstrukturmerkmalen dargestellt. Nach Neufeld *et al.*, 1999.

Während die Rolle des VEGF-Rezeptors 2 gut untersucht ist, ist immer noch unklar, wie Flt-1, der VEGF-Rezeptor 1, im Endothel wirkt (Hiratsuka *et al.*, 1998). Er scheint nicht essentiell für die frühe Differenzierung und die Proliferation von Endothelzellen zu sein. Eine Nullmutation von VEGFR-1 führt jedoch zu einer beeinträchtigten Organisation der Blutinseln, zur Bildung von nicht geschlossenen Blutgefäßen und desorganisiertem Zusammenschluß der Endothelzellen. Dies weist auf eine wichtige Rolle von Flt-1 bei der

Migration der Zellen hin. Die Mausembryonen mit diesem Defekt sterben am Embryonaltag 9,0 (Fong *et al.*, 1995). Interessanterweise kann der Ausfall der Tyrosinkinasedomäne von Flt-1 kompensiert werden. Mutanten, denen nur diese Intrazellulärdomäne fehlt, zeigen keine Abnormalität der Blutgefäße (Hiratsuka *et al.*, 1998). Da Flt-1 mit einer Affinität von 10-100 pM VEGF etwa 10mal stärker bindet, als der VEGF-Rezeptor 2/Flk-1, scheint dieser Rezeptor eine negativ-regulatorische Wirkung auf die Menge des zur Verfügung stehenden Liganden auszuüben.

Der VEGF-Rezeptor 2/Flk-1, bzw. sein humanes Homologes KDR (*kinase insert domain containing receptor*) spielt eine essentielle Rolle bei der Differenzierung von Hämangioblasten in Endothelzellen (Shalaby *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1997). Damit ist Flk-1 der früheste bekannte Marker für Endothelzellen und vermutlich auch für deren Vorläufer, die Hämangioblasten (Yamaguchi *et al.*, 1993). Die Aktivierung von VEGFR-2 wirkt auf Endothelzellen mitogen und chemotaktisch (Waltenberger *et al.*, 1994) und ist in der embryonalen, postnatalen sowie pathologischen Angiogenese von Bedeutung (Yamaguchi *et al.*, 1993; Millauer *et al.*, 1993; Plate *et al.*, 1993; Kabrun *et al.*, 1997). Das Ausschalten des Flk-1-Gens führt in der Maus zu Embryonen, die keine Endothelzellen und eine stark reduzierte Anzahl von hämatopoetischen Zellen aufweisen. Die Expression von Flk-1 ist in späteren Entwicklungsstadien und dem adulten Organismus auf proliferierendes Endothel beschränkt und ansonsten weitgehend herunterreguliert. In sich neu bildenden Blutgefäßen wird sie jedoch reaktiviert (Plate *et al.*, 1994). Von wesentlicher Bedeutung bei der Regulation der Flk-1-Expression scheint die Menge an verfügbarem Liganden VEGF zu sein, der von dem vaskularisierten Gewebe sezerniert wird (Flamme *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1998). Dieser Regulationsweg spielt möglicherweise auch bei der hypoxieinduzierten Angiogenese eine Rolle, da unter Sauerstoffmangel einer direkten Induktion von VEGF die Hochregulation von Flk-1 folgt (Kremer *et al.*, 1997).

Das VEGF/VEGFR-System ist für die Regulation der Vaskulogenese und der frühen Angiogenese zuständig. Dagegen steht die Reifung des Endothels unter der Kontrolle des Angiopoetin-Systems (zur Übersicht s. Mustonen und Alitalo, 1995).

Der Angiopoetin-Rezeptor Tie-2 (*Tunica Interna* Endothelzellkinase, auch TEK genannt) wird im Endothel und in hämatopoetischen Zellen während der Embryogenese exprimiert und ist im Endothel adulter Mäuse nachweisbar. Generell wird Tie-2 in wachsenden Gefäßen, also auch während der postnatalen und Tumorangiogenese exprimiert (Dumont *et al.*, 1992; Schnürch und Risau, 1993; Wong *et al.*, 1997). Bei Inaktivierung des Tie-2-Gens kommt es zu einer normalen Vaskulogenese, jedoch ist die Reifung der Gefäße durch einen fehlerhaften Kontakt mit dem subendothelialen Gewebe stark gestört. In der Maus führt das Fehlen des Genproduktes von Tie-2 zum Absterben der Embryonen am Embryonaltag 10,5 (Dumont *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995). Darüber hinaus ist feststellbar, daß eine Inaktivierung von Tie-2 eine Reduktion der Tumorangiogenese zur Folge hat (Lin *et al.*, 1997). Die Aktivierung von Tie-2 erfolgt über den Liganden Angiopoetin-1, dessen Inaktivierung in Mutationsexperimenten einen ähnlichen Phänotyp wie die Mutation des Rezeptors hervorruft (Davis *et al.*, 1996; Suri *et al.*, 1996).

Ebenfalls essentiell für die Ausbildung funktioneller Gefäße ist Tie-1, eine endothelspezifische Rezeptortyrosinkinase, die während der Tumorangiogenese verstärkt exprimiert wird (Puri *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995; Hatva *et al.*, 1995). Bei inaktiviertem *Tie-1*-Gen zeigt sich eine starke Ödembildung und die mutierten Mäuse neigen zu Blutungen, was zum Tod der Neugeborenen führt. Ein Ligand wurde bislang nicht identifiziert.

1.5 Regulatorische Elemente im Flk-Promotor

Durch Klonierung der Promotoren verschiedener endothelspezifischer Gene wie Flk-1/KDR (Patterson *et al.*, 1995; Röncke *et al.*, 1996), Flt-1 (Morishita *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1996), Tie-1 (Korhonen *et al.*, 1995), Tie-2 (Schlaeger *et al.*, 1995) und c-Ets-1 (Jorcyk *et al.*, 1997) konnte gezeigt werden, daß einige dieser Promotoren in transfizierten Endothelzellen eine deutlich höhere Aktivität besitzen als in anderen Zellen.

Dabei kommt neben den 5'-flankierend gelegenen Promotorelementen auch innerhalb des Gens liegenden Elementen eine Rolle bei der Festlegung der Zellspezifität zu. Es konnten beispielsweise im ersten Intron von Tie-2 und auch c-Ets-1, die beide endothelzellspezifisch exprimiert werden, Verstärkerelemente identifiziert werden, die jeweils mit den Promotoren zusammenwirken.

Bei der Analyse der regulatorischen Elemente des *Flk-1*-Gens zeigte sich, daß ein 947 bp großes Fragment aus dem 5'-flankierenden Bereich zusammen mit einem 430 bp langen Minimalenhancer aus dem ersten Intron im transgenen Mausembryo für eine endothelspezifische Expression eines *lacZ*-Reportergenkonstrukts sorgten (Kappel *et al.*, 1999, Kappel *et al.*, 2000).

Innerhalb der regulatorischen Sequenzen von *Flk-1* liegen potentielle Bindestellen für Mitglieder der Transkriptionsfaktorfamilien SCL/TAL-1, GATA und Ets.

Diese Transkriptionsfaktoren, die als wichtige Regulatoren in der Hämatopoese identifiziert wurden (Orkin *et al.*, 1995), werden in Endothelzellen exprimiert und sind an der embryonalen Entwicklung des Gefäßsystems und der Tumorangio-genese beteiligt. SCL wird als einer der Hauptregulatoren in der Hämatopoese angesehen. Es konnte auch gezeigt werden, daß SCL an der frühen Endothelzellentwicklung beteiligt ist und in der Regulationskaskade oberhalb von *Flk-1* wirkt (Kallianpur *et al.*, 1994; Gering *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 1998; Visvader *et al.*, 1998).

GATA-2 wird in Endothelzellen exprimiert. Es aktiviert *in vitro* die Promotoren der endothelspezifischen Gene *Endothelin-1* und *PECAM-1* (Tsai *et al.*, 1994)

Von den Ets-Transkriptionsfaktoren ist bekannt, daß sie die Expression vieler endothelspezifischer Gene stimulieren, die Wachstum und Aussprossung von Gefäßen steuern, wie die Urokinase, Metalloproteinkinasen, Flt-1, Tie-1 und Tie-2 (Iwasaka *et al.*, 1996; Wakiya *et al.*, 1996; Schlaeger *et al.*, 1997; Watabe *et al.*, 1998; Dube *et al.*, 1999; Iljin *et al.*, 1999).

Ets-1 wird zum Zeitpunkt der beginnenden Flk-1-Expression in den Vorläufern der Endothelzellen stark exprimiert (Pardanaud und Dieterlen-Lievre, 1993). Zusätzlich korreliert die Hochregulation von Ets-1 in Endothelzellen invasiver Tumoren mit der Reexpression von VEGF-Rezeptoren (Wernert *et al.*, 1992).

Die Daten über die transkriptionelle Regulierung von Flk-1 durch Hypoxie sind widersprüchlich (Truder *et al.*, 1995; Detmar *et al.*, 1997; Gerber *et al.*, 1997; Marti und Risau, 1998). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Expression von Flk-1 durch Hypoxie induziert wird (Takagi *et al.*, 1996; Kremer *et al.*, 1997). Ob diese Induktion wie bei anderen hypoxieabhängigen Genen über die Bindung des hypoxieinduzierbaren Faktor HIF-1 an hypoxiesensible Elemente im Promotor, die sogenannten HREs (*hypoxia responsible elements*), vermittelt wird, ist nicht bekannt.

1.6 Hypoxie und der hypoxieinduzierbare Faktor HIF-1 α

Es gibt im Säugerorganismus viele physiologische Systeme, die auf die Sauerstoffhomöostase angewiesen sind. Um eine gleichmäßige Versorgung aller Zellen mit Sauerstoff zu gewährleisten, hat sich ein komplexes Blutgefäßsystem entwickelt. Während sich eine Unterversorgung während der Embryonalentwicklung oft letal auswirkt, hat der weiter entwickelte Organismus verschiedene Möglichkeiten, auf zellulärer und systemischer Ebene darauf zu reagieren. Durch physiologische Antworten wie beispielsweise Glykolyse, Erythropoese und Angiogenese kann der akute Sauerstoffmangel kompensiert bzw. die ausreichende Sauerstoffversorgung wieder hergestellt werden (zur Übersicht s. Guillemin und Krasnow, 1997).

Hypoxie ist einer der potentesten Stimuli, die die Expression von VEGF und damit die Angiogenese auslösen können (Shweiki *et al.*, 1992; Ladoux und Frelin, 1993; Brogi *et al.*, 1994; Damert *et al.*, 1997; Veikkola und Alitalo, 1999). Durch das *cis*-aktive Element HRE im Promotor des VEGF-Gens erhöht sich die Transkriptionsrate des VEGF-Gens (Levy *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Damert *et al.*, 1997). Hinzu kommt, daß die mRNA von VEGF unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert wird, so daß insgesamt eine deutlich verstärkte Expression von VEGF feststellbar ist. Das HRE im Promotor von VEGF dient als Bindungsstelle für den *hypoxia inducible factor* (HIF-1), der seinerseits hypoxieabhängig reguliert ist (Wang und Semenza, 1993; Wang und Semenza, 1995; Wang *et al.*, 1995). Ursprünglich wurde HIF-1 durch seine Bindung an ein HRE im Gen des humanen Erythropoetins (EPO) entdeckt, das für die transkriptionelle Reaktion auf eine sinkende Sauerstoffkonzentration wichtig ist (Semenza und Wang, 1992). Nachfolgend wurden Hypoxie-sensitive Elemente mit der Konsensussequenz 5'-RCGTG-3' in verschiedenen Genen entdeckt. Deren Proteine steigern entweder die Verfügbarkeit an Sauerstoff, wie VEGF (Angiogenese), EPO (Erythropoese) und Transferrin (am Eisentransport zum Knochenmark zur Bildung von Hämoglobin beteiligt), oder ermöglichen die Synthese von ATP unter anaeroben Bedingungen in der Glykolyse. Ein weiteres Zielgen für den Transkriptionsfaktor HIF-1 ist die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) die über die Synthese von NO den Blutdruck reguliert (zur Übersicht s. Wenger und Gassmann, 1997 und Semenza, 1998). Diesen Zielgenen von HIF-1 ist gemeinsam, daß ihre Aktivierung dazu führt, daß der Körper einerseits den Sauerstofftransport zu den unterversorgten Zellen optimiert und andererseits durch verstärkte Nutzung der anaeroben Glykolyse die Energieversorgung dieser Zellen unter

Sauerstoffmangel sicherstellt. Darüberhinaus interagiert HIF-1 mit CBP/p300, einem generellen Koaktivator vieler Transkriptionsfaktoren (Arany *et al.*, 1996; Kamei *et al.*, 1996). HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer α -Untereinheit (120 kDa) und einer β -Untereinheit (etwa 90 kDa) besteht, die beide in direkten Kontakt mit der großen Furche der DNA treten können (Wang und Semenza, 1993). Die beiden Untereinheiten wurden nach ihrer Aufreinigung als der strikt hypoxieabhängige basische Helix-Schleife-Helix-PAS-Domänen-Transkriptionsfaktor HIF-1 α und das konstitutiv exprimierte HIF-1 β /Arnt (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) identifiziert (Wang *et al.*, 1995).

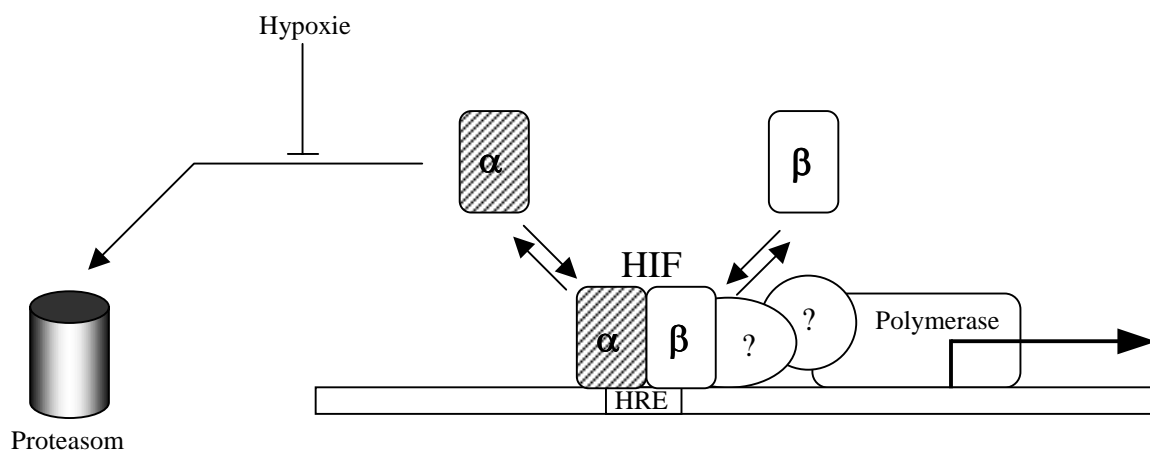


Abbildung 1-4: Nach Heterodimerisierung mit HIF-1 β bindet HIF-1 α an das HRE und ermöglicht über verschiedene Kofaktoren die Transkription des Zielgens. Hypoxie verhindert den schnellen Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg.

Unter Hypoxie wird das ansonsten schnell über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaute Protein stabilisiert, was in einer stärkeren Zielgenaktivierung resultiert (Salceda und Caro, 1997; Huang *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1999; Tanimoto *et al.*, 2000). Unter Normoxie wird der Abbau durch das Genprodukt des Tumorsuppressorgens *VHL* (Von Hippel-Lindau) vermittelt. Die Von Hippel-Lindau-Krankheit wird durch eine Mutation dieses Gens verursacht und führt über die gesteigerte VEGF-Expression zur Bildung von hypervaskularisierten Tumoren (Tanimoto *et al.*, 2000).

In Säugern heterodimerisiert das Kernprotein HIF-1 β /ARNT auch mit dem Aryl-Hydrocarbonrezeptor AHR (Dolwick *et al.*, 1993). Dieser Rezeptor wird durch Bindung von xenobiotischen Liganden wie Dioxin und anderen Hydrocarbonverbindungen aktiviert.

Während HIF-1 α und HIF-1 β in vielen Geweben detektiert werden können (Wenger *et al.*, 1996; Wiener *et al.*, 1996; Talks *et al.*, 2000), wird ein weiterer Dimerisierungspartner von HIF-1 β , das HIF-1 α -Homologe HIF-2 α endothelspezifisch exprimiert.

1.7 Der hypoxieinduzierbare Faktor HIF-2 α

Der HIF-1 α -verwandte Transkriptionsfaktor HIF-2 α (Wenger und Gassmann, 1997), der auch EPAS-1 (Tian *et al.*, 1997), HLF (Ema *et al.*, 1997), MOP-2 (Hogenesch *et al.*, 1997) oder HRF (Flamme *et al.*, 1997) genannt wird, ist wie HIF-1 α in hypoxischen Zellen stark hochreguliert (Wiesener *et al.*, 1998; Talks *et al.*, 2000).

Die Aminosäurereste von HIF-2 α sind zu 48% mit denen von HIF-1 α identisch. HIF-2 α ist in der Lage, über die Bindung an eine 6 bp lange Konsensussequenz, das hypoxiesensible Element (HRE), die Transkription von hypoxieinduzierbaren Genen wie VEGF und EPO zu aktivieren (Tian *et al.*, 1997; Ema *et al.*, 1997). Darüber hinaus induziert HIF-2 α auch die Expression endothelspezifischer Rezeptortyrosinkinasen wie Flk-1 und Tie-2 (Tian *et al.*, 1997; Kappel *et al.*, 2000). Allerdings ist in deren Promotoren, im Gegensatz zu denen von VEGF und EPO, bislang kein HRE nachgewiesen worden. Es findet auch keine signifikante Aktivierung durch HIF-1 α statt.

Neben der ähnlichen Aminosäuresequenz finden sich in der Organisation weitere Parallelen zwischen HIF-1 α und HIF-2 α . So unterscheiden sich die N-terminalen, aus basischen Aminosäuren bestehenden DNA-Bindungsregionen (basische Domäne) nur in einer Aminosäure (Lando *et al.*, 2000). Daran schließt eine Domäne an, die aus zwei α -Helices besteht, welche durch eine Schleife getrennt sind (Helix-Schleife-Helix-Domäne, bHLH) und für Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich ist. Weiter C-terminal liegen die sogenannten PAS-Domänen A und B, benannt nach den ersten bekannten Molekülen mit diesem Motiv: *periodic*, dem Aryl-Hydrocarbonrezeptor (AHR) und *single minded* (Huang *et al.*, 1993). Sie sind bei der Dimerisierung mit anderen Proteinen beteiligt und vermittelt zusammen mit der basischen DNA-Binderegion die Spezifität für die entsprechenden Zielgene (Huang *et al.*, 1993; Coumailleau *et al.*, 1995; Zelzer *et al.*, 1997). Innerhalb dieser Regionen besteht die höchste Homologie zwischen HIF-1 α und HIF-2 α (bHLH: 85%, PAS A: 68% und PAS B: 73%, Tian *et al.*, 1997). Beide Vertreter der HIF-Familie besitzen mindestens zwei transaktivierende Domänen, von denen eine intern, die andere C-terminal liegt (Li *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1996; Pugh *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998; O'Rourke *et al.*, 1999).

HIF-2 α wird hauptsächlich in den Endothelzellen von Hirnkapillaren und anderen Blutgefäßen, sowie im embryonalen und adulten Bronchialepithel exprimiert. Zusätzlich ist es in glatten Muskelzellen des Uterus, in Neuronen, braunem Fettgewebe und verschiedenen epithelialen Geweben zu finden (Flamme *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1997; Ema *et al.*, 1997; Talks *et al.*, 2000). Damit zeigt HIF-2 α ein vergleichbares Expressionsmuster wie VEGF. Die Aktivierung von VEGF und Flk-1 durch HIF-2 α zeigt, daß HIF-2 α in der Endothelzellproliferation eine wichtige Rolle als dualer Regulator spielt. Die widersprüchlichen Beobachtungen der Auswirkungen von HIF-2 α -Nullmutationen, daß entweder kein signifikanter vaskulärer Phänotyp oder ernste Störungen der Angiogenese in Mäusen auftreten (Tian *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2000), weisen auf eine mögliche Redundanz des Aktivierungsmechanismus hin.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Das VEGF/VEGFR-2-Signaltransduktionssystem spielt eine zentrale Rolle in der Gefäßentwicklung. Dies wird u.a. dadurch deutlich, daß eine Inhibition des Flk-1-Signalweges die Gefäßentwicklung von Anfang an verhindert und Tumorangiogenese inhibiert (Risau, 1997). Daher ist die Untersuchung der Flk-1-Expressionsregulation und der Endothelspezifität entscheidend für das grundlegende Verständnis von Mechanismen der Gefäßentwicklung.

Der Hauptstimulus der postnatalen Gefäßentwicklung ist die Hypoxie. Es stellt sich somit die Frage, ob hypoxieinduzierbare Faktoren für die Expression von Flk-1 wichtig sind.

Die Korrelation der HIF-2 α -Expression mit der von VEGF und Flk-1 machten diesen Transkriptionsfaktor zum Ziel weiterer Untersuchungen. Durch Vergleiche mit dem nahen Verwandten HIF-1 α und daran anschließende Mutationen verschiedener funktioneller Bereiche sollten die für die Aktivierung des Flk-1-Promotors relevanten Domänen in Reporteranalysen identifiziert werden.

Im nächsten Schritt sollte auf dem Flk-1-Promotor nach Bindestellen für HIF-2 α gesucht und deren Relevanz durch Mutationen in transgenen Mäusen *in vivo* getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *pro analysi* von folgenden Firmen bezogen: Difco/Augsburg, Gibco BRL/Eggenstein, Merck/Darmstadt, Riedel-de-Haen/Seelze, Roth/Karlsruhe, Serva/Heidelberg und Sigma/Deisenhofen. Sofern die Chemikalien von anderen Firmen bezogen wurden, wird im Text darauf hingewiesen.

Radioaktive Chemikalien wie [α - 32 P]-dATP, [α - 32 P]-dCTP, [α - 32 P]-dGTP (je 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), [γ - 32 P]-ATP (5000 Ci/mol, 10 mCi/ml) und [35 S]-Methionin (1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) wurden von Amersham/Braunschweig bezogen.

2.1.2 Enzyme

Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs/Bad Schwalbach bezogen. Folgende modifizierende Enzyme wurden benutzt: Klenow-Fragment der DNA-Polymerase, RNase A, DNase I, T4 Polynukleotid-Kinase, T4 DNA-Ligase und T4 DNA-Polymerase von der Firma Boehringer/Mannheim, Taq DNA-Polymerase von Promega/Heidelberg, RNAguard RNase Inhibitor und alkalische Phosphatase (Calf Intestinal Mucosa) von Pharmacia/Uppsala (Schweden), TaKaRa ExTaq von TAKARA SUZO Co. Ltd./ Otsu (Japan).

2.1.3 Antikörper

Monoklonale Antikörper: α -Flag[®]M2 (Maus, Eastman Kodak Comp/Rochester N.Y., USA)

α -Ets1 (Maus, Novus Biologicals, Littleton, GB)

α -HIF-1 α (Maus, Novus Biologicals, Littleton, GB)

Polyklonale Antikörper: α -HIF-2 α (Kaninchen, Labor Dr. Flamme, diese Arbeit)

α -Ets-1 (N-276, Kaninchen, Santa Cruz Biotech., CA, USA)

α -Ets-1 (C-20, Kaninchen, Santa Cruz Biotech, CA, USA)

α -Ets-1/Ets-2

(C-275, Kaninchen, Santa Cruz Biotech, CA, USA)

α -HIF-1 β (Kaninchen, Novus Biologicals, Littleton, GB)
 α -VEGF (Kaninchen, Santa Cruz Biotech, CA, USA)

Zweitantikörper: Schwein- α -Kaninchen IgG
(Peroxidase-konjugiert, DAKO Glostrup, Dänemark)
Kaninchen- α -Maus IgG
(Peroxidase-konjugiert, DAKO Glostrup, Dänemark)
Kaninchen- α -Maus IgG
(TRITC-konjugiert, DAKO Glostrup, Dänemark)
Ziege- α -Kaninchen IgG
(FluoroLinkTMCyTM2 konjugiert, Pharmacia, Little Chalfont GB)

2.1.4 Fertige Reagenzienansätze

Zum Nachweis Peroxidase-gekoppelter sekundärer Antikörper in "Western Blot"-Analysen wurden "ECL Western blotting detection reagents" von Amersham Life Science/Little Chalfont (GB) verwendet.

Die Bestimmung der Luziferaseaktivität in Reporteranalysen wurde mit Hilfe des "Dual-Luciferase[®] Reporter Assay" Systems von Promega/Heidelberg vorgenommen.

In vitro-Translationen wurden mit dem "TNT[®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System" von Promega/Heidelberg durchgeführt.

2.1.5 Oligonukleotide, Vektoren

Oligonukleotid	Basensequenz (5' → 3')	Anwendung
QHRF	GAATCGCTCTTCAAGCCTCAC	Sequenzierung
QHRF 1326	GACCAAACGGAATCGCTCTTC	Sequenzierung
QHRF 1840	CCTTGGCTCCTTACATTCTAT	Sequenzierung
QHRF 1842	TTGGCTCCTTACATTCTATGG	Sequenzierung
QHRF 2126	CACTCCGCTG TCTTCGATGG	Sequenzierung
QHRF 823	TTTTGCACTGCACTGGACAAG	Sequenzierung
QHRF stop	CCCTGGACCAGACAACCTGA	Sequenzierung
QHRF d1	TGAAGGTCTTGCTGTCCAGAGG	Sequenzierung
QHRF d2	CATGGAGTGTCCGCTGAGCACG	Sequenzierung
QHRF u1	TTCACTCATCCATGTGATCATGAG	Sequenzierung
QHRF u2	CTGTCTGAGAACGTCAGCAGGC	Sequenzierung
ets down rc	TGGATGAAGGCGAGCGTGC	Klonierung
ets up	CTTACGGAAGCTCATGGCTG	Klonierung
flt down rc	GAGGAGTGTCCGCCTGGC	Klonierung
flt up	CTCCGTAGCCGCAGGGAAGC	Klonierung
KDR down rc	GGACTCAGTGCAGGGTGGGA	Klonierung
KDR up	GCTCAGCGCCCCTTACCG	Klonierung
flk HRF down rc	TTAATTTGTC CTGAGGACTCAGGGC	Footprint-PCR
flk HRF up not	AATTAAGCGGCCCGCCAGATTTGCTCTCAGATGCG	Footprint-PCR
flk HRF 2ens	CCAGTGGGGGGCGTGGCATTGCGCAGGGAG	EMSA
flk HRF 2 ns	CCAGTGGGGCAGAGAGCCGACGCAGGGAG	EMSA
flk HRF 2	CCAGTGGGGGGCGTGGCCGACGCAGGGAG	EMSA
flk HRF 2 ns/ets ns	CCAGTGGGGCAGAGAGCATTGCGCAGGGAG	EMSA
flk HIF	AGTGGGGGAGTGTACGTGGGAAACCGGGAA	EMSA
flk HRF	AGTGGGGGAGTGGGCGTGGGAAACCGGGAA	EMSA
flk HRF CA	AGTGGGGGAGTGGGAGTGGGAAACCGGGAA	EMSA
flk HRF GA	AGTGGGGGAGTGGGCATGGGAAACCGGGAA	EMSA
flk HRF ns/ets ns	GCCCGGCACAGTCAATGGGTAGTGGGGGAGTGCAGAG AGGAAACCGGGAA	EMSA
flk HRF/ets	GCCCGGCACAGTTCCGGGGTAGTGGGGGAGTGGGCGT GGGAAACCGGGAA	EMSA
flk HRF/ets kurz	GCACAGTTCCGGGGTAGTGGGGGAGTGGGCGTGGGAA ACC	EMSA
flk HRF/ets ns	GCCCGGCAAGACCTTAAAATAGTGGGGGAGTGGGCGT GGGAAACCGGGAA	EMSA
flk HRF ns/ets kurz	GCACAGTTCCGGGGTAGTGGGGGAGTGCAGAGAGGAA ACC	EMSA
flk HRF ns/ets ns kurz	GCACAGTCAATGGGTAGTGGGGGAGTGCAGAGAGGAA ACC	EMSA
flk ns	AGTGGGGGAGTGCAGAGAGGAAACCGGGAA	EMSA
HIF 1021 rev	GGCTGCAGAAAATTCATATCGAGGC	Sequenzierung
HIF 1173 rev	AAGCGGCCGCTGTCTGTGGTGACTTGTCC	Sequenzierung
HIF 1179	GGGAATTCACCACAGGACAGTACAGGATGC	Sequenzierung
HIF 1432 rev	CCGGATCCTTAAGCTTATCAAAAAGGCAGC	Sequenzierung
HIF 1797	GGGGATCCTAGTGCTTCCATCAGAAG	Sequenzierung
HIF 318 (ATG)	GGGAATTCACCATGAGTTCTGAACGTCGAAAAG	Sequenzierung
HIF 360	GGGAATTCACCATGGGATCTCGGCCGAAGCAAAGAG	Sequenzierung
HIF 378	GGGAATTCACCATGGAGTCTGAAGTTTTTATGAGC	Sequenzierung
HIF 732	GGGAATTCATGGCCAGTGAGAAAAGGG	Sequenzierung
HIF Flag stop	AAGCGGCCGCTCATTTATCGTCATCGTCCTTGTAAATCGT TAACTTGATCCAAAGCTCTG	Fusions-PCR
HIF ID down	CGCCTGACACATAGTAGGTGCACAGTCA	Fusions-PCR
HIF ID up	CCATCTGCCAGAGGTGAATATTGCTTTGATGTGG	Fusions-PCR
HIF PAS d1 hyb	TCTCCGTGTTTGGCTAGCATCCTGTACTGTCTGTGG	Fusions-PCR

HIF PAS d2 hyb	CAGTTGTTGTAGACTCTCACTGGCCCCGTGCAGTGAAGC	Fusions-PCR
HIF PAS u1	GTACCTGAAAGCCCTAGATGGCTTTG	Fusions-PCR
HIF PAS u2	CCTGCACTGCACGGGCCATATTC	Fusions-PCR
HRF 1634	CTGAGGACTACTATTCATCC	Sequenzierung
HRF 1982 rev	TGCTCAGACT CTGTCTTCC	Sequenzierung
HRF 2016 rev	TTCCAAGTGCATGACCCC	Sequenzierung
HRF ID down	CACTCGTTTCCAGGAAAGTGACCTTTTGAGCTCCTGGA GGACC	Fusions-PCR
HRF ID up	CCTGAGCCTAACAGTCCCAGAGCCGCTCATGCCAGAGA G	Fusions-PCR
dTAD N HRF	ACGGAGCCGAGGGACCCGGGGGCCACCCACGGC	Deletions-PCR
dTAD2N	CTGTCTCCATGCTGTGGCCATTTTCGGCCCTACTAAGTGG	Deletions-PCR
dTADC flag Not	CCAGGAGCTCAAAGGTGGACTATAAGGACGACGACG ATAAGTGAGCGGCCGCTA	Deletions-PCR

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pB KSII (+)	Klonierungsvektor	Stratagene
pcDNA3	eukariotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pGL2 Basic	Expressionsvektor mit Luziferase-Reportergen	Promega
pGL3 Basic	Expressionsvektor mit Luziferase-Reportergen	Promega
pGLacZ	pGL-2 mit LacZ-Reportergen	Dr. V. Rönicke
pRL Tk	HSV Tk-Promotor in Luziferasevektor	Promega
pcDNA HIF-1 FLAG	murine HIF-1 α cDNA in pcDNA3, FLAG-Tag	Dr. A. Kappel
pcDNA Arnt	murine HIF-1 β cDNA in pcDNA3	diese Arbeit
pcDNA HIF-2 FLAG	murine HIF-2 α cDNA in pcDNA3, FLAG-Tag	Dr. I. Flamme
pcDNA HIF-2 dnB	pcDNA HIF-2 FLAG, Deletion der basischen Domäne	Dr. I. Flamme
pcDNA HIF-2 dn	pcDNA HIF-2 FLAG, Deletion von basischer Domäne und 5'-Bereich	Dr. I. Flamme
pcDNA HIF-2 Δ TAD N	pcDNA HIF-2 FLAG mit deletierter N-terminaler Transaktivierungsdomäne	diese Arbeit
pcDNA HIF-2 Δ TAD 2 N	pcDNA HIF-2 FLAG mit deletierter 2. N-terminaler Transaktivierungsdomäne	diese Arbeit
pcDNA HIF-2 Δ TAD C	pcDNA HIF-2 FLAG mit deletierter C-terminaler Transaktivierungsdomäne	diese Arbeit
pcDNA HIF-1 PAS A HIF-2	Hybrid: 5'-Bereich bis PAS A von HIF-1 α , 3'-Bereich von HIF-2 α in pcDNA3, FLAG-Tag	diese Arbeit
pcDNA HIF-1 PAS B HIF-2	Hybrid: 5'-Bereich bis PAS A von HIF-1 α , 3'-Bereich von HIF-2 α in pcDNA3, FLAG-Tag	diese Arbeit
pcDNA HIF-2 dnB Δ TAD C	pcDNA HIF-2 dnB mit deletierter C-terminaler Transaktivierungsdomäne	diese Arbeit
pcDNA HIF-2 dnB Δ TAD	pcDNA HIF-2 dnB mit deletierter N- und C-terminaler Transaktivierungsdomäne	diese Arbeit
pcDNA Ets-1	murine Ets-1 cDNA in pcDNA3	Dr. D.v.d.Ahe
pLacZ	LacZ-Kassette in pcDNA3	Dr. A. Kappel
pGL Tie-1	muriner Tie-Promotor in pGL3 basic	Dr. K. Iljin
pGL HIF	muriner HIF-1 α -Promotor in pGL3 basic	Dr. Wenger
pGL VEGF	humaner VEGF-Promotor in pGL2 basic	Dr. G Breier
flk 69	flk-Promotor bp -642/+299 in pGL-2	Dr. V. Rönicke
flk 70	flk-Promotor bp -642/+299 in pGLacZ	Dr. V. Rönicke
flk 124	2.3 kb BamHI/XhoI flk-1-Enhancerfragment in flk 70	Dr. A. Kappel
flk 69 HBS1 ns	flk 69 mit mutierter HIF-2 α -Bindungsstelle 1	diese Arbeit
flk 69 HBS2 ns	flk 69 mit mutierter HIF-2 α -Bindungsstelle 2	diese Arbeit
flk 69 HBS1/EBS3 ns	flk 69 mit mutierter HIF-2 α -Bindungsstelle 1 und mutierter Ets-1-Bindungsstelle 3	diese Arbeit
flk 69 HBS1+2/EBS3+6 ns	flk 69 mit mutierten HIF-2 α -Bindungsstellen 1 und 2 und mutierten Ets-1-Bindungsstellen 3 und 6	diese Arbeit

ptkLuc	tk-Promotor in pGL-2	Dr. A. Kappel
ptkLuc HIF RE2	Promotorfragment aus dem Promotor von HIF-1 α in ptkLuc	Dr. I. Flamme
ptkLuc hEts-1	Promotorfragment aus dem Promotor von hEts-1 in ptkLuc	diese Arbeit
ptkLuc hKDR	Promotorfragment aus dem Promotor von hKDR in ptkLuc	diese Arbeit
ptkLuc hFlt	Promotorfragment aus dem Promotor von hFlt in ptkLuc	diese Arbeit
ptkLuc flk HBS2ns (s/as)	Promotorfragment aus dem flk-Promotor mit mutierter HIF-2 α -Bindungsstelle 2 (sense und antisense) in ptkLuc	diese Arbeit
ptkLuc flk HBS 2 (s/as)	Promotorfragment aus dem flk-Promotor mit doppelter HIF-2 α -Bindungsstelle 2 (sense und antisense) in ptkLuc	diese Arbeit
ptkLuc flk HBS 2 EBS6ns (s)	Promotorfragment aus dem flk-Promotor mit HIF-2 α -Bindungsstelle 2 und mutierter Ets-1-Bindungsstelle 6 (sense) in ptkLuc	diese Arbeit
ptkLuc flk HBS1 EBS3 (s/as)	Promotorfragment aus dem flk-Promotor mit doppelter HIF-2 α -Bindungsstelle 1 und Ets-1-Bindungsstelle 3 (sense und antisense) in ptkLuc	diese Arbeit
ptkLuc flk HBS1ns EBS3ns (s/as)	Promotorfragment aus dem flk-Promotor mit doppelter mutierter HIF-2 α -Bindungsstelle 1 und mutierter Ets-1-Bindungsstelle 3 (sense und antisense) in ptkLuc	diese Arbeit
ptkLuc flk HBS1ns EBS3 (s/as)	Promotorfragment aus dem flk-Promotor mit doppelter mutierter HIF-2 α -Bindungsstelle 1 und Ets-1-Bindungsstelle 3 (sense und antisense) in ptkLuc	diese Arbeit
ptkLuc flk HBS1 EBS3ns (s/as)	Promotorfragment aus dem flk-Promotor mit doppelter HIF-2 α -Bindungsstelle 1 und mutierter Ets-1-Bindungsstelle 3 (sense und antisense) in ptkLuc	diese Arbeit

2.1.6 Lösungen

2.1.6.1 Pufferlösungen

100 x Denhardt´s Puffer:	2% (w/v) Ficoll (Typ 400, Pharmacia/Uppsala) 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon 2% (w/v) BSA, Fraktion V in DEPC-H ₂ O
6 x DNA Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 40% (w/v) Saccharose 10 mM EDTA
Formamid-Ladepuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol Formamid
PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ PO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄

20 x SSC (NaCl-Natriumzitat):	175,3 g NaCl (3 M) 88,2 g Natriumzitat (0,3 M) lösen in 800 ml H ₂ O pH auf 7,0 einstellen, ad 1 l H ₂ O
1 x TAE (Tris-Azetat-EDTA):	40 mM Tris-Azetat 1 mM EDTA
1 x TE (Tris-EDTA):	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA
SM-Puffer:	5,8 l NaCl 2 g MgSO ₄ (x 7 H ₂ O) 5 ml 2% (w/v) Gelatine ad 1 l H ₂ O

2.1.6.2 Medien

LB-Medium:	2% (w/v) LB-Broth (Gibco BRL/Eggenstein) in H ₂ O
LB-Agar:	2% (w/v) LB-Broth 1,5% (w/v) Bacto-Agar (Difco/Augsburg) in H ₂ O
Phagen-LB-Medium:	21 g NZYDT-Broth (Gibco BRL/Eggenstein) ad 1 l H ₂ O
Phagen-Bottom-Agar:	1 l Phagen-LB-Medium 15 g Bacto-Agar (Difco/Augsburg)
Phagen-Top-Agar:	1 l Phagen-LB-Medium 8 g Agarose (Gibco BRL /Eggenstein)

Die Medienlösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert. Zur Selektion plasmidtragender Bakterien nach Transfektionen wurden 50 bis 100 µg Ampizillin (Boehringer/Mannheim) zugesetzt.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Filme: Kodak Scientific Imaging Film X-OMAT LS und BioMax MR (Eastman Kodak Comp./Rochester N.Y., USA), Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech/Little Chalfont, GB)

Gewebekulturgefäße (Greiner/Frickenhausen, Nunc/Wiesbaden)

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Eppendorf/Hamburg, Starlab/Helsinki, Finnland)

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf/Hamburg, Starlab/Helsinki, Finnland)

Reaktionsgefäße 0,2 ml (Biozym/Hess. Oldendorf)

15 und 50 ml-Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson/Heidelberg)

Sterilfilter, Faltenfilter, sowie Blottingmembranen und Whatman-Filterpapier 3 mm (Schleicher&Schuell/Dassel)

2.1.8 Geräte

Heizblöcke: Dry Block Heater (Starlab/Helsinki, Finnland)

Thermomixer 5436 (Eppendorf/Hamburg)

Inkubatoren: Brutschrank für Bakterienkultur BD53 (Binder/Tuttlingen)

CO₂-begasbarer Brutschrank für Zellkultur EC-CO2 (Heraeus/Hanau)

CO₂-begasbarer Brutschrank für Zellkultur NU-4500E

(Nuair/Plymouth MN, USA)

Schüttelinkubator Certomat HK + U (Braun/Melsungen)

Mikroskope: Axioskop mit Photoanlage MC80 (Zeiss/Jena)

Axiovert135 (Zeiss/Jena)

Netzgeräte: Modell E833 (Consort/Turnhout, Belgien)

Modell E865 (Consort/Turnhout, Belgien)

PCR-Geräte: GeneAmpPCR System 9600 (Perkin Elmer/Überlingen)

PCR Block Primus (MWG/Ebersberg)

Photometer: Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech/Little Chalfont, GB)

Pipetten: Pipettensatz Eppendorf Research (Eppendorf/Hamburg)

Schüttler: Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc/Bohemia N.Y., USA)

Waagen: Feinwaage Analytic AC210S (Sartorius/Göttingen)

Laborwaage EW600-2M (Kern/Albstadt)

Wasserbad: Julabo U2 (Julabo Labortechnik GmbH/Seelbach)

- Zentrifugen: Kühlzentrifuge 3K15 (Sigma/Deisenhofen)
 Kühlzentrifuge Biofuge Fresco (Heraeus/Hanau)
 Kühlzentrifuge Varifuge RF (Heraeus/Hanau)
 Tischzentrifuge Biofuge Pico (Heraeus/Hanau)
- Sonstige: Elektroporator *E.coli* pulser (BioRad/Hercules CA, USA)
 Entwicklermaschine für Röntgenfilme Modell Curix 60 (Agfa/Köln)
 Gel-Dokumentationsanlage GelDoc1000 (BioRad/Hercules CA, USA)
 Heizrührer VarioMag Electronicrührer Monotherm
 (H+P Labortechnik/München)
 Luminometer MikroLumatPlus LB96V (EG&G Berthold/Wildbad)
 Hybridisierungsöfen Mini-Hybi (Sauer/Reutlingen)
 Szintillationszähler Tri-Carb1600TR (Packard/Canberra, Australien)
 UV-Lichttisch UVT-20LE (Herolab/Wiesloch)
 UV-Stratalinker 1800 (Stratagene/La Jolla CA, USA)
 Vacuum Concentrator UniVapo100H (UniEquip/Martinsried)

2.2 Methoden

Die Versuchsvorschriften der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente richteten sich in erster Linie nach der Methodensammlung von Ausubel *et al.*, 1994.

2.2.1 Bakterien

Durch den Transfer von zirkulärer DNA in transformationskompetente Bakterien und anschließende Kultivierung ist es möglich, Plasmide zu vermehren, die eine entsprechende Replikationsstart-Sequenz besitzen. Durch einen Selektionsvorteil (Antibiotikaresistenz) wird sichergestellt, daß nur die Bakterien vermehrt werden, die die gewünschte DNA enthalten.

In dieser Arbeit wurde zur Selektion transformierter Bakterien Ampizillin mit einer Konzentration im Medium von 100 µg/ml eingesetzt.

2.2.1.1 *Verwendete Bakterienstämme*

In dieser Arbeit wurden zwei *Escherichia Coli*-Stämme eingesetzt:

DH5α

Produktinformation Gibco BRL/Eggenstein: Langsam wachsender recA⁻ Stamm, der sich für Transformation und Vermehrung von Plasmiden und Cosmiden eignet (Hanahan, 1983)

C600hfc

Abgeleitet vom Stamm ED8654, zur Vermehrung von Bakteriophagen λ Vektoren geeignet (Borck *et al.*, 1976)

2.2.1.2 *Vermehrung und Lagerung*

Die Anzucht von *E.coli*-Zellen erfolgte durch Animpfen von LB-Medium mit einer Einzelkolonie und Vermehrung durch Inkubation in einem Schüttler über Nacht bei 37°C.

Für Dauerkulturen zur längeren Lagerung wurden 800 µl Bakteriensuspension mit 150 µl sterilem Glycerin vermischt. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen bei -20°C gelagert.

Um die Bakterien erneut in Kultur zu nehmen, wurde mit einer sterilen Impföse ein Abstrich der tiefgefrorenen Lagerkultur auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen.

2.2.1.3 Herstellung und Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

In einer frühen Wachstumsphase ist es möglich, die Membran von Bakterien für Fremd-DNA durchlässig zu machen. Derart vorbehandelte Bakterienzellen werden kompetente Zellen genannt.

2.2.1.3.1 Temperaturkompetente Bakterien

Durch einen kurzfristigen Hitzeschock wird die Bakterienmembran permeabilisiert, so daß beispielsweise DNA-Moleküle in die Zelle gelangen können.

Material:

Bakterienstamm:	DH5 α
LB-Medium	
Calciumchlorid-Lösung:	0,1 M CaCl ₂
Magnesiumchlorid-Lösung:	0,1 M MgCl ₂
Glyzerin:	100%

Durchführung:

100 ml steriles LB-Medium wurden aus einer Übernachtskultur von *E. coli*-Zellen (DH5 α) angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (bei einer Wellenlänge von 590 nm) von 0,375 inkubiert. Die Zellen befanden sich nun in einer Wachstumsphase, in der sie für die folgende Behandlung besonders empfindlich waren.

Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und für 15 min im HB-4 Rotor bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterienniederschläge vorsichtig in je 100 ml Magnesiumchlorid-Lösung resuspendiert und 5 min bei 2500 rpm und 4°C im HB-4 Rotor zentrifugiert. Die Bakterienniederschläge wurden in 50 ml eiskalter Calciumchlorid-Lösung aufgenommen und erneut zentrifugiert. Schließlich wurden die Bakterien in 5 ml Calciumchlorid-Lösung resuspendiert, 880 μ l Glyzerin zugegeben und in 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so präparierten Zellen konnten direkt für Transformationen verwendet, oder bei -80°C zwei bis drei Monate gelagert werden. Alle Inkubationsschritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt.

Zur Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Plasmidlösung vermischt und 30 min auf Eis, 2 min bei 42°C und erneut 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz 60 bis 90 min bei 37°C inkubiert und dann auf Amp/Agarplatten ausgestrichen. Nach kurzem Antrocknen wurden die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bis zur weiteren Bearbeitung konnten die Platten bei 4°C gelagert werden.

Es wurden mehrere Kontrollen durchgeführt:

- Negativkontrolle:

Als Negativkontrolle wurden anstatt des Vektors 10 µl H₂O verwendet. So behandelte kompetente Zellen sollten auf Amp/Agarplatten nicht wachsen.

- Ligationskontrolle:

Wurde bei einer Ligation ein neuer Vektor eingesetzt, so mußte dieser bei der anschließenden Transformation getestet werden. Um zu überprüfen, ob in der Vektorpräparation noch ungeschnittene Vektor-DNA vorhanden war, wurde der Vektor ohne vorherige Ligation transformiert.

2.2.1.3.2 Elektrokompetente Bakterien

Eine andere Methode, um die Zellmembran zu permeabilisieren ist, die Bakterien kurzzeitig einem starken elektrischen Feld auszusetzen. Dabei ist es wichtig, daß in der Lösung keine Ionen vorhanden sind, da es sonst zu einem Kurzschluß kommen würde.

Material:

Bakterienstamm:	DH5α
LB-Medium	
Glyzerin-Lösung:	10% (v/v) in sterilem H ₂ O

Durchführung:

Ein Liter einer Bakterienkultur mit der optischen Dichte von 0,56 bei 590 nm wurde in Eiswasser abgekühlt und bei 4000 x g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet vorsichtig in 1 l eiskalter Glyzerin-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500 ml, 250 ml und schließlich mit 3 ml wiederholt.

Die Bakteriensuspension wurde in 100 μl Aliquots aufgeteilt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, davon 40 μl mit 2 μl DNA-Lösung gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert. In einer gekühlten Küvette wurden die Bakterien einem Puls von 2,5 kV mit einer Halbwertszeit von etwa 5 msec (bei 200 Ω und 25 μF) ausgesetzt. Es wurde sofort 1 ml LB-Medium zugegeben, der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf Amp/Agarplatten ausgestrichen.

2.2.2 Arbeiten mit einer Phagen-cDNA-Bank

In einer cDNA-Bibliothek ist die fragmentierte cDNA eines Organismus in einen Vektor kloniert. Es gibt verschiedene Vektoren, die hierfür verwendet werden können. Je nach Größe des zu klonierenden Fragmentes werden Phagen (bis 2×10^4 bp), Cosmide (bis 5×10^4 bp) oder YAC-Vektoren (yeast artificial chromosomes, bis 10^6 bp) verwendet.

Um eine Phagenbank nach einem bestimmten Gen zu durchsuchen, werden *E. coli*-Zellen mit den rekombinanten Phagen infiziert, vermehrt, die verschiedenen Klone vereinzelt und schließlich durch Hybridisierung mit der entsprechenden DNA-Sonde identifiziert. Die Kultivierung erfolgt in einem maltose- und magnesiumhaltigen Medium, durch das die Expression des Maltoserezeptors, der die Andockstelle für die Phagen darstellt, induziert und dieser stabilisiert wird.

Die Bakteriophagen werden auf Phagen-Agar ausplattiert, auf Nitrozellulosemembranen transferiert, lysiert und die denaturierte DNA auf der Membran fixiert. Durch Hybridisierung der Membran mit einer spezifischen Sonde und anschließende autoradiographische Auswertung werden die gesuchten Phagenklone identifiziert, die dann isoliert und genauer analysiert werden können.

2.2.2.1 Ausplattieren einer Phagenbank

Material:

Phagen-LB-Medium

Phagen-Bottom-Agar

Phagen-Top-Agar

Magnesiumsulfatlösung: 10 mM

Bakterienstamm: C600

Durchführung:

10 ml einer Übernachtskultur von *E.coli* des Stammes C600hfc in Phagen-LB-Medium wurden bei 4000 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 4 ml Magnesiumsulfatlösung aufgenommen. Diese Suspension sollte eine OD_{600nm} von 2 haben, was einer Bakterienkonzentration von $1,6 \times 10^9$ Bakterien/ml entspricht.

Die Phagenbank wurde zur Titerbestimmung 1:1000 verdünnt, 1 µl, 10 µl und 100 µl Aliquots mit je 100 µl Bakterienlösung vermischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien-Phagen-Suspension wurde mit 3 ml Top-Agar, das auf 47°C vorgewärmt worden war, gemischt und auf eine angewärmte Bottom-Agarplatte gegossen. Nach 12 bis 16 Stunden bei 37°C waren bei ausreichender Verdünnung der Phagen auf dem Bakterienrasen Lyse-Plaques zu erkennen, die jeweils von einem Phagenklon stammten. Nach Auszählen der Plaques konnte der Titer der Phagenbank berechnet werden.

2.2.2.2 Durchsuchen einer ausplattierten Phagenbank

Material:

Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4)

1,5 M NaCl

SM-Puffer

Nitrozellulosefilter: Schleicher&Schuell/Dassel

Durchführung:

500 µl der wie oben beschrieben kultivierten Bakterien wurden mit 20000 pfu (phage forming units) gemischt, 30 min bei 37°C inkubiert und jeweils auf einer 10 cm-Schale ausplattiert (s. 2.2.2.1). Nach 12 bis 16 Stunden Inkubation bei 37°C und einer Stunde bei 4°C wurden von jeder Platte zwei Nitrozellulosefilter abgezogen, indem sie nacheinander 60 sek aufgelegt, durch Nadelstiche die Position markiert und die Filter vorsichtig entfernt wurden. Anschließend wurden die Filter erst für 2 min mit der Rückseite auf ein mit Denaturierungslösung und dann 5 min auf ein mit Neutralisierungslösung getränktes Papiertuch gelegt. Nach dreiminütiger Inkubation mit 2 x SSC und Lufttrocknung wurde die Phagen-DNA durch zweistündiges Backen bei 80°C kovalent an die Membran gebunden.

Die Identifizierung der gesuchten Phagenklone erfolgte analog 2.2.3.2.3. Der zweite Nitrozellulosefilter dient dabei als Kontrolle, um falsch positive Signale zu erkennen.

Da die Position der Filter beim Abziehen durch Nadelstiche markiert worden war, konnten die positiven Signale auf den Filmen den entsprechenden Phagenklonen zugeordnet werden. Die so identifizierten Plaques wurden mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette aus der Agarose ausgestochen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml SM-Puffer und 20 µl Chloroform für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die in den Puffer diffundierten Phagen konnten bei 4°C gelagert werden.

Da bei dem Ausstechen eines Plaques mehrere Phagenklone gepickt worden sein konnten, sollte der positive Klon vereinzelt werden. Zu diesem Zweck wurden 1 µl, 10 µl und 100 µl der Phagensuspension ausplattiert und erneut hybridisiert. Traten neben positiven Lysisplaques auch solche auf, die nicht mit der Sonde hybridisierten, wurde wiederum ein positiver Phagenklon ausgestochen und die Prozedur solange wiederholt, bis die auftretenden Lysisplaques vollständig mit der spezifischen Sonde hybridisierten.

2.2.2.3 Präparation von Phagen-DNA ("Maxi-Präp")

Material:

Puffer L1:	20 mg/ml RNase A, 6 mg/ml DNase I, 0,2 mg/ml BSA, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl (pH 7,5)
Puffer L2:	30% (w/v) Polyethylenglycol (PEG 6000), 3 M NaCl
Puffer L3:	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 7,5)
Puffer L4:	4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Puffer L5:	2.55 M Kaliumazetat (pH 4,8)

$2,5 \times 10^7$ Phagen (pfu) wurden mit 5×10^9 Bakterienzellen C600hfc gemischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 250 ml Phagen-LB-Medium damit angeimpft und über Nacht bei 30°C geschwenkt. Mit Hilfe des „Lambda DNA Maxi preparation kit“ von Qiagen/Hilden wurde die genomische DNA gewonnen.

Zu der Übernachtskultur wurden 400 μl Puffer L1 gegeben und das Gemisch 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 ml Puffer L2 und 60minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension 10 min bei $10000 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspendierung in 9 ml Puffer L3 und Zugabe von 9 ml Puffer L4 wurde 20 min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. Es wurden 9 ml Puffer L5 zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min bei $15000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei $15000 \times g$ und 4°C für 10 min zentrifugiert.

Analog zu der Präparation von Plasmid-DNA (s. 2.2.4.1.2) erfolgte anschließend die Aufreinigung über Qiagen-tip 500 Säulchen, Fällung mit Isopropanol und Waschen mit 70% (v/v) Ethanol. Die kurz getrocknete DNA wurde in 100 μl H_2O aufgenommen.

Zur Identifizierung der präparierten DNA wurden Abschnitte davon, die durch PCR-Reaktionen und Restriktionen erhalten wurden, sequenziert.

2.2.3 Arbeiten mit RNA

RNA ist hochempfindlich für den Abbau durch RNasen, so daß Kontaminationen ausgeschlossen werden müssen. Dies erreicht man, indem man alle nicht-denaturierenden wäßrigen Lösungen mit 0,2% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, gut durchmischt und anschließend autoklaviert.

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Material:

PBS

D-Lösung:	4 M Guanidiniumthiocyanat 0,5% Natriumlaurylsarcosin 25 mM Natriumcitrat (pH 7,0) 0,1 M Mercaptoethanol
Natriumazetatlösung:	2 M NaAc (pH 4,0)
Phenol:	wassergesättigtes Phenol (pH 4,3)
Chloroform/Isoamylalkohol:	25:1
DEPC-H ₂ O	
Ethanol:	70% in DEPC-H ₂ O

Durchführung:

Die in einer 10 cm-Schale konfluent gewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 10 ml kalter D-Lösung wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden 1 ml Natriumazetat und 10 ml Phenol zugegeben und gut gemischt. Nach Zusatz von 2 ml Chloroform/Isoamylalkohol und erneutem Mischen wurde der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C wurde die obere, wäßrige Phase mit 10 ml Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gut gemischt und die Zentrifugation wiederholt. Die wäßrige Phase wurde wieder abgenommen, die RNA darin mit 0,7 VT Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Der RNA-Niederschlag wurde zweimal mit Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Schließlich wurde die RNA in 100 µl DEPC-H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.3.2 Northern blot-Analyse

2.2.3.2.1 RNA-Elektrophorese im denaturierenden Formamid-Agarosegel

Analog zur DNA lassen sich RNA-Fragmente verschiedener Länge im elektrischen Feld aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten im Gel auftrennen. Als Marker, vor allem zur Mengenabschätzung, wird eine Referenz-RNA-Lösung mit auf das Gel aufgetragen.

Material:

RNA-Gellaufpuffer:	20 mM MOPS
(10 x)	8 mM NaAc
	1 mM EDTA
Elektrophoresepuffer:	einfach konzentrierter Gellaufpuffer
Auftragspuffer:	1 mM EDTA
(10x)	0,4% Bromphenolblau (w/v)
	0,4% Xylencyanol (w/v)
	50% Glyzerin (v/v)
Agarose	
Färbelösung:	0,1 M NH ₄ Ac
	10 µg/ml Ethidiumbromid
Entfärbelösung:	0,1 M NH ₄ Ac
Formaldehyd:	37% (v/v)
Formamid	

Durchführung:

0,72 g Agarose wurden mit 44 ml DEPC- H₂O aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Während sie auf 60°C abkühlte, wurden 6 ml Elektrophoresepuffer und 10,8 ml Formaldehyd bei Raumtemperatur gemischt und dann zugegeben. Die Lösung wurde in eine mit einem Kamm versehene, horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Nach Erstarren der Agaroselösung wurde der Kamm entfernt und das Gel mit Elektrophoresepuffer überschichtet. 9 µl der entsprechenden RNA-Lösung wurden mit 4 µl 10 x Gellaufpuffer, 7 µl Formaldehyd und 20 µl Formamid versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurden 4 µl Auftragspuffer zugegeben.

Die vorbehandelten Proben wurden in die durch den Kamm im Gel entstandenen Taschen pipettiert. Nach 60 min Elektrophoresedauer bei 90 V wurde das Gel 15 min in Färbelösung geschwenkt und anschließend 30 min in Entfärbelösung inkubiert. Auf einem Transilluminator konnten die RNA-Banden betrachtet und dokumentiert werden.

2.2.3.2.2 Transfer von RNA auf Nylonmembranen durch Kapillar-Blotting

Die nach Größe fraktionierte RNA wurde auf eine Nylonmembran überführt, wo durch Hybridisierung mit spezifischen, markierten Sonden (s. 2.2.4.9) genaue Analysen durchgeführt werden konnten.

Material:

SSC-Lösung

Hybond N Nylonmembran

Durchführung:

RNA-Gele wurden nach Ethidiumbromidfärbung mit anschließender gründlicher Entfärbung mit einem Lineal fotografiert und waren dann für den Transfer auf Membranen („Northern blot“) bereit. Für den Kapillarblot wurden die Gele mit der Oberseite nach unten auf drei Lagen Whatman-Filterpapier gelegt, die beidseitig in ein Reservoir mit SSC-Lösung eintauchten. Darauf wurden luftblasenfrei eine Hybond N Nylonmembran, drei mit SSC-Lösung angefeuchtete Whatman-Filterpapiere und eine etwa 5 cm dicke Schicht saugfähiges Papier aufgelegt, die allesamt auf Gelgröße zurechtgeschnitten waren. Beschwert wurde der Aufbau mit ungefähr 150 g. Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Beendigung des Transfers wurde der Membranfilter zur Entfernung eventuell anhaftender Gelreste in zweifach konzentrierter SSC-Lösung geschwenkt, luftgetrocknet, zwei Stunden bei 80°C gebacken und bis zur weiteren Bearbeitung in Folie eingeschweißt.

2.2.3.2.3 Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Sonden

Zur Auswertung des RNA-Blots wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert und anschließend die gebundene Sonde durch Autoradiographie detektiert.

Material:

Hybridisierungspuffer:	Formamid, 40% (v/v) bei heterologen Sonden 50% (v/v) bei homologen Sonden 5 x SSC 5 x Denhardt´s Lösung 1% (w/v) SDS 50 µg/ml tRNA aus <i>E. coli</i>
Waschpuffer 1:	2 x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschpuffer 2:	1 x SSC 0,1% (w/v) SDS
radioaktiv markierte Sonde	

Durchführung:

In einer Glasröhre wurde die Membran für drei Stunden bei 60°C in einem Hybridisierungsofen mit dem Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die radioaktive DNA-Sonde wurde für 10 min auf 100°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Dann wurde so viel Sonde zu der Membran in den Hybridisierungspuffer gegeben, daß bei einer spezifischen Aktivität von 10^8 Zerfällen pro µg DNA eine Endkonzentration von 10 ng/ml vorlag. Über Nacht wurde die Membran unter Rotation im Hybridisierungsofen bei 60°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgegossen, durch den Waschpuffer 1 ersetzt und der Blot zwei mal für 15 min bei 42°C unter Rotation gewaschen. Danach folgten zwei Waschschrte mit Waschpuffer 2.

Die Waschlösung wurde entfernt, die Membran mit 2 x SSC bei Raumtemperatur gespült und in Frischhaltefolie eingeschlagen.

Nach Autoradiographie mit einem Röntgenfilm konnte der Blot ausgewertet werden.

2.2.4 Arbeiten mit DNA

2.2.4.1 Plasmid-DNA-Präparationen

Die Plasmid-Präparationen wurden mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits durchgeführt.

2.2.4.1.1 Plasmidisolierung (analytischer Maßstab)

(nach Birnboim und Doly, 1979)

Material:

Puffer P1:	50 mM Tris-HCl (pH8,0)
(Resuspension)	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
Puffer P2:	200 mM NaOH
(Lyse)	1% (w/v) SDS
Puffer P3:	3.0 M Kaliumazetat (pH 5,5)
Isopropanol:	absolut
Ethanol:	70%

Durchführung:

2 ml einer Übernachtskultur von Plasmid-tragenden DH5 α -Zellen wurden 5 min bei 13000 x g abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 300 µl P1 resuspendiert und nach Zugabe von 300 µl P2 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 300 µl P3 zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 4°C und 13000 x g wurde der Überstand mit 0,7 VT Isopropanol versetzt. Die DNA wurde durch erneute Zentrifugation sedimentiert und der Niederschlag mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung wurde die DNA in 50 µl H₂O aufgenommen.

2.2.4.1.2 Plasmidisolierung (präparativer Maßstab)

Material:

Bei der Plasmidisolierung im präparativen Maßstab können, ausgehend von 100 ml (500 ml) Übernachtskultur bis zu 100 µg (500 µg) Plasmid-DNA gewonnen werden.

Es werden dieselben Puffer benutzt wie bei der Plasmidisolierung für analytische Zwecke (s. 2.2.4.1.1).

Zusätzlich:

Qiagen-tip 100 :	Anionen-Austauschsäulen
(oder Qiagen-tip 500)	
Puffer QBT:	750 mM NaCl
(Äquilibrieren)	50 mM MOPS (pH 7,0)
	15% Isopropanol
	0.15% Triton X100
Puffer QC:	1,0 M NaCl
(Waschen)	50 mM MOPS (pH 7,0)
	15% Isopropanol
Puffer QF:	1,25 M NaCl
(Eluieren)	50 mM Tris-HCl (pH 8,5)
	15% Isopropanol

Durchführung:

Mit 100 ml einer Übernachtskultur von Plasmid-tragenden DH5α-Zellen wurde zunächst so wie bei der Plasmidisolierung im analytischen Maßstab verfahren (s. 2.2.4.1.1). Nach der Resuspendierung in 4 ml P1, der Lyse mit 4 ml P2 und der Präzipitation mit 4 ml P3 wurde die DNA-Lösung auf die mit Puffer QBT äquilibrierten Säulen aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml Puffer QC wurde die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 VT Isopropanol gefällt, 30 min bei 13000 x g sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 100 µl H₂O aufgenommen.

2.2.4.2 *Aufreinigung von DNA*

2.2.4.2.1 *Präzipitation von DNA mit Ethanol oder Isopropanol*

DNA wird mit dieser Methode als Natriumsalz aus wäßrigen Lösungen gefällt.

Material:

Natriumazetat-Lsg.:	3 M NaAc (pH 5,0)
Isopropanol	absolut
Ethanol:	absolut
	70% (v/v)

bidestilliertes Wasser (H₂O)

Durchführung:

Die Nukleinsäurelösung wurde nach Zugabe von Natriumazetat mit einer Endkonzentration von 0,3 M NaAc mit 2,5 VT eiskaltem Ethanol (absolut) für mindestens 30 min bei -80°C gefällt. Bei größeren DNA-Mengen wurden 0,7 VT Isopropanol (Raumtemperatur) zugegeben. Danach wurde bei 4 °C und 10000 x g für 30 min abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abdekantiert und durch Resuspendierung in 70% Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation verworfen und das Pellet 1 min unter Vakuum getrocknet, wonach es in H₂O oder in einem geeigneten Puffer gelöst wurde.

2.2.4.2.2 *DNA-Agarose-Gelelektrophorese*

Aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppen im "Rückgrat" der DNA wandert sie im elektrischen Feld zum Pluspol. Da die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente z.B. in einer Agarosematrix in erster Linie von der Größe abhängt, können unterschiedlich große DNA-Fragmente auf diese Art aufgetrennt werden. Ein Marker mit definierten DNA-Fragmentgrößen ermöglicht eine Größenabschätzung. Durch Anfärbung der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid können die DNA-Banden auf einem Transilluminator (Wellenlänge 312 nm) sichtbar gemacht werden.

Material:

Tris-Azetat-Puffer (TAE):	500 mM Tris-HCl; pH 7,8
(10 x)	200 mM NaAc
	20 mM EDTA
Elektrophoresepuffer:	einfach konzentrierter TAE-Puffer
Auftragspuffer:	s. 2.1.6.1
Ethidiumbromidlösung:	1 mg/ml in H ₂ O
Agaroselösung:	0,8% bis 1,5% (w/v) in Elektrophoresepuffer
Standardmarker:	λ-DNA, gespalten mit Hind III
	pSP 64, gespalten mit Hinf I

Durchführung:

Entsprechend der gewünschten Konzentration wurde Agarose mit Elektrophoresepuffer aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Nach Zugabe von 0,01% Ethidiumbromid und Abkühlung auf etwa 60°C wurde diese Lösung in eine mit einem Kamm versehene horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Nach Erstarren der Agaroselösung wurde der Kamm entfernt und das Gel mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Proben und Marker wurden mit jeweils 1/5 Volumenteil Auftragspuffer versetzt und in die im Gel durch den Kamm entstandenen Taschen pipettiert. Die angelegte Spannung richtete sich nach dem Abstand der Elektroden und der Art des Elektrophoresepuffers. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der im Auftragspuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau 2/3 der Gellänge zurückgelegt hatte. Anschließend wurden präparative und analytische Gele zur Dokumentation unter UV-Licht (280 bis 320 nm) fotografiert und bei präparativen Gelen die zu isolierende Bande ausgeschnitten.

2.2.4.2.3 DNA-Isolation aus Agarose-Gelen

Nach Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente auf einem Agarosegel wurde die Bande der richtigen Größe (Vergleich mit dem aufgetragenen Größenmarker) auf einem UV-Schirm ausgeschnitten und in einem chaotropen Puffer gelöst. Anschließend wurde eine Aufreinigung durch Adsorptionschromatographie durchgeführt.

2.2.4.2.4 Adsorptionschromatographie

Mit Hilfe des Qiagen PCR Purification Kits und des Qiagen Gel Extraction Kits wurde DNA aus Reaktionsansätzen bzw. Agarosegelen aufgereinigt. Dabei wurden Säulen mit einer Silica-Gel-Membran benutzt. Material und Durchführung der Aufreinigung entsprachen den Vorgaben des Herstellers.

2.2.4.2.5 Anionen-Austauschchromatographie

Um hochreine DNA, z.B. für Transgen-Experimente, zu erhalten, wurde im Anschluß an die Aufreinigung aus einem Agarosegel (s. 2.2.4.2.3) eine Anionen-Austauschchromatographie durchgeführt.

Material:

AAC-Puffer:	1,5 M NaCl
(2x)	100 mM MOPS (pH7,0)
Qiagen-tip 20-Säulen, Puffer QBT, Puffer QC, Puffer QF	
Isopropanol	absolut
Ethanol	70% (v/v)
T0,1E-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	0,1 mM EDTA

Durchführung:

50 µl DNA-Lösung wurden mit DEPC-H₂O und ACC-Puffer auf 1 ml aufgefüllt, so daß der Puffer einfach konzentriert war. Diese Lösung wurde auf die mit 1 ml Puffer QBT äquilibrierten Tip 20 Säulen aufgetragen, dreimal mit 1 ml Puffer QC gewaschen und mit 800 µl Puffer QF eluiert. Nach Fällung mit 560 µl Isopropanol, dreimaligem Waschen mit Ethanol und Lufttrocknung wurde die DNA in T0,1E-Puffer gelöst.

2.2.4.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA, gegen das Lösungsmittel als Bezugswert gemessen. Dabei entspricht eine Extinktion E_{260} von 1 einer DNA-Konzentration von

50 µg/µl. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Hier ist das Absorptionsmaximum von Proteinen. Der Quotient E_{260}/E_{280} sollte bei 2 liegen.

2.2.4.4 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(nach Saiki *et al.*, 1988)

Folgendes Prinzip liegt der Polymerase-Kettenreaktion zugrunde: Zwei zu den Randbereichen des gewünschten DNA-Fragmentes komplementär synthetisierte Oligonukleotide, eines davon komplementär zum Antisense-Strang, hybridisieren mit der Matrizen-DNA und dienen so als Startpunkt der Polymerase (Primer), die den komplementären Strang synthetisiert. Da die Primer im Überschuß vorliegen und die Polymerase hitzestabil ist, kann die Reaktion nach Denaturierung der entstandenen Doppelstränge erneut beginnen.

Material:

dNTP-Mix:	je 10 mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP
MgCl ₂ :	50 mM
Oligonukleotide (Primer):	100 pmol/µl
Taq-Polymerase:	5 U/µl, Taq
Taq-Reaktionspuffer:	750 mM Tris-HCl (pH 9,0)
(10 x)	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
	0,1% (w/v) Tween 20

Durchführung:

In einem 200 µl-Reaktionsgefäß wurden etwa 50 ng Matrizen-DNA mit 2,5 µl Reaktionspuffer, 1 µl dNTP-Mix, je 1 µl sense- und antisense-Primer, 1,25 µl MgCl₂-Lösung und 0,2 µl Taq-Polymerase mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. In einem Thermo-Cycler wurde zunächst fünf min bei 94°C denaturiert und anschließend der folgende Reaktionszyklus 25 mal durchlaufen:

60 sek Denaturierung bei 94°C
 60 sek Hybridisierung bei 60°C
 60 sek Polymerisation bei 72°C

Danach wurde noch einmal 10 min bei 72°C inkubiert und dann auf 10°C abgekühlt. Die Auswertung erfolgte durch DNA-Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.4.2.2). Die Zyklenzahl und die Zeiten und Temperaturen bei Hybridisierungs- und Polymerisationsschritt wurden je nach Primerpaar und Fragmentgröße der zu amplifizierenden DNA optimiert.

Bei präparativen PCR-Reaktionen, insbesondere bei längeren DNA-Fragmenten, wurde eine Taq-Polymerase mit *proofreading*-Aktivität verwendet. Dabei handelte es sich um das Enzym Ex-Taq der Firma Takara/Otsu (Japan), das zusammen mit passendem Reaktionspuffer und einem dNTP-Mix geliefert wurde und ein Temperaturoptimum von 74°C (Polymerisation) besitzt.

2.2.4.5 Sequenzspezifische Mutation durch PCR

2.2.4.5.1 Deletionen

Um einen Bereich eines DNA-Fragments zu deletieren, wurde eine Mehrschritt-PCR-Reaktion durchgeführt (Abb. 2-1). In einem ersten Reaktionsschritt wurden die 5´ und 3´ des zu deletierenden Bereiches gelegenen Abschnitte amplifiziert. Dabei wurden jeweils etwa 30 Basen zusätzlich angefügt, die zu den Abschnitten jenseits der Deletion komplementär waren. Im zweiten Reaktionsschritt lagerten sich die 5´- und 3´-Fragmente der ersten PCR an diesen 30 Basen aneinander und die Polymerase füllte im Extensionsschritt die Enden auf.

2.2.4.5.2 Fusionen

Die Fusion zweier DNA-Fragmente erfolgt durch eine Mehrschritt-PCR-Reaktion, die ähnlich wie die Deletion verläuft. Der Mutageneseprimer bindet hierbei auf den beiden verschiedenen Fragmenten und fügt diese im zweiten Reaktionsschritt zusammen.

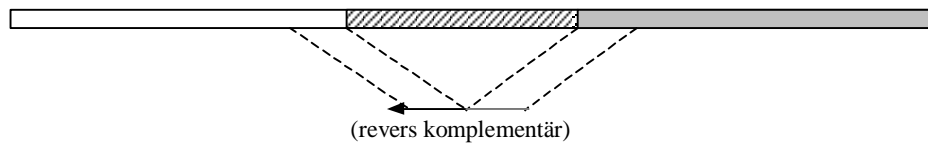
2.2.4.5.3 Austauschmutationen

Diese Mutations-PCR verläuft ähnlich wie die oben beschriebenen Reaktionen. Allerdings handelt es sich hier um eine doppelte Fusions-PCR, bei der an eine DNA-Box des Genes A zunächst der 5´-Bereich des Genes B und anschließend in der zweiten Fusion der 3´-Bereich des Genes B angehängt wird, so daß man ein Konstrukt B-A-B erhält.

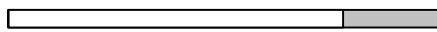
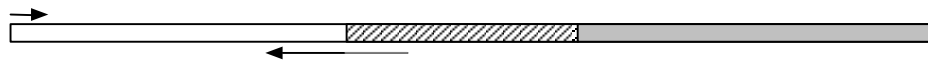


Ausgangs-DNA-Fragment: der schraffierte Bereich soll entfernt werden

Primerdesign: der Mutationsprimer überspannt die Deletion

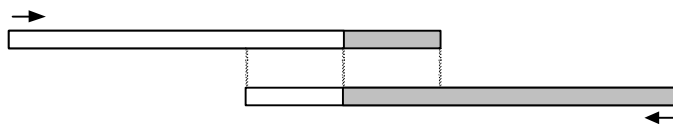


erster Reaktionsschritt: Amplifizierung des 5'-Bereiches mit 5'- und Mutageneseprimer (analog: 3'-Bereich)



3'-Überhang, komplementär zum 5'-Ende des 3'-Fragmentes

zweiter Reaktionsschritt: Fusion von 5'- und 3'-Bereich



Bei diesem Reaktionsschritt muß sichergestellt sein, daß kein Ausgangsfragment mehr als Template für die Polymerase genutzt werden kann. Dies kann zum Beispiel durch einen Restriktionsverdau mit einer Restriktionsendonuklease geschehen, die innerhalb des zu deletierenden Bereiches schneidet.



Abbildung 2-1: Sequenzspezifische Mutation am Beispiel der Deletion. Durch PCR-Reaktionen werden die Bereiche rechts und links des zu deletierenden Abschnittes amplifiziert und über gemeinsame Sequenzen zum erwünschten Produkt fusioniert. Ähnliche Reaktionsprinzipien liegen der Fusion, Austauschmutation und Punktmutation zugrunde

2.2.4.6 Punktmutation

Um Punktmutationen einzuführen, geht man wie bei der Deletions-PCR vor. Der Mutageneseprimer umspannt hierbei nicht einen zu deletierenden Bereich, sondern ist bis auf einige Basen komplementär zur Template-DNA. Diese nichtkomplementären Basen liegen in der Mitte des Primers.

2.2.4.7 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.4.7.1 Sequenzspezifische DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA in Abhängigkeit von spezifischen Erkennungssequenzen hydrolysieren können. Je nach Enzym entstehen bei der Spaltung DNA-Fragmente mit 5'-überhängenden, 3'-überhängenden oder glatten Enden.

Material:

Restriktionsendonukleasen:	(s. 2.1.2), mit zugehörigen 10 x Reaktionspuffern
Auftragspuffer:	70% (w/v) Saccharose
(5 x)	0,001% Bromphenolblau (w/v)
	0,1 M EDTA

Durchführung:

Mengen bis 3 µg DNA werden für gewöhnlich in einem Volumen von 50 µl gespalten; bei größeren DNA-Mengen kann die Spaltung in einem Volumen von bis zu 100 µl durchgeführt werden.

Zu der DNA-Lösung wurden 1/10 VT (bezogen auf das Endvolumen) des entsprechenden Reaktionspuffers und pro µg DNA 1 bis 10 U Enzym hinzugegeben. Bei der Enzymdosierung muß beachtet werden, daß einige Restriktionsendonukleasen bei einer Glycerin-Konzentration über 5% DNA auch unabhängig von den spezifischen Schnittstellen spalten. Da im Aufbewahrungspuffer der Enzyme Glycerin enthalten ist, muß das Endvolumen entsprechend gewählt werden.

Es wurde dann eine bis vier Stunden bei der für das jeweilige Enzym angegebenen Temperatur, meistens bei 37°C, im Wasserbad inkubiert. Bei einem präparativen partiellen Verdau wurde der Restriktionsansatz nur kurz (1 min, 2 min, 4 min) inkubiert. Da in der Regel eine

Auftrennung im Agarosegel folgte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/5 VT Auftragspuffer abgestoppt. Sollten hingegen im Anschluß weitere enzymatische Reaktionen durchgeführt werden, wurde die Restriktionsendonuklease entweder hitzeinaktiviert oder durch Aufreinigung über Säulen (2.2.4.2.4) von der DNA getrennt.

2.2.4.7.2 Generierung glatter Enden aus 5'- und 3'-Überhängen

Wurden für Klonierungen glatte Enden von DNA-Fragmenten benötigt, mußten 5'-Überhänge mit Hilfe der Klenow-Polymerase (C-terminales Fragment der Polymerase I) zum Doppelstrang aufgefüllt werden. Zum Abbauen von 3'überhängenden Einzelsträngen wurde die 3'→5' Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase genutzt.

Material:

One-Phor-All-Buffer	Boehringer/Mannheim
dNTP-Mix	2 mM
Klenow	Klenow-Fragment der Polymerase I (Boehringer/Mannheim)
T4 DNA-Polymerase	Boehringer/Mannheim

Durchführung:

Zum Auffüllen der 5'-Überhänge wurde das DNA-Fragment in One-Phor-All-Buffer aufgenommen und mit 1 µl 2 mM dNTPs und 1 U Klenow je µg DNA versetzt. Die Auffüllreaktion erfolgte für 15 bis 30 min bei 37°C.

Für den Abbau der 3'-Überhänge wurde die DNA in einem Volumen von 20 µl in One-Phor-All-Buffer aufgenommen und mit 1 U T4 DNA-Polymerase für 1 min bei 37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 µl 2 mM dNTPs. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch 10minütiges Erwärmen bei 70°C beendet.

Anschließend wurde das Fragment gelelektrophoretisch aufgereinigt oder präzipitiert und in H₂O aufgenommen.

2.2.4.7.3 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um bei Klonierungen von DNA-Fragmenten über nur eine Schnittstelle in Plasmidvektoren eine Religation des leeren Vektors zu verhindern, wurde der Vektor nach der Restriktionsbehandlung dephosphoryliert.

Dafür wurde die DNA in einmal Dephosphorylierungspuffer mit einer Einheit Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) im mitgelieferten Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA über Adsorptionschromatographie (s. 2.2.4.2.4) aufgereinigt.

2.2.4.7.4 Ligation

Nach einem Restriktionsverdau von Insert und Vektor mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen kann durch Ligation der passenden Enden ein geschlossener Plasmidring hergestellt werden, der anschließend in Bakterien transfiziert und so vermehrt werden kann.

Material:

Ligase-Puffer:	250 mM Tris-HCl (pH 7,6)
(5 x)	5 mM DTT
	50 mM MgCl ₂
	5 mM ATP
	25% (w/v) Polyethylenglykol 8000
T4 DNA-Ligase:	1 U/ml; Gibco BRL/Eggenstein

Durchführung:

Vektor- und Insert-DNA wurden so eingesetzt, daß die zu ligierenden Enden in äquimolaren Konzentrationen vorlagen. Der Gesamtansatz sollte maximal 100 ng DNA betragen, während das Reaktionsvolumen auf 10 µl eingestellt wurde.

Die Ligation wurde in einfach konzentriertem Ligationspuffer und mit 1 U Ligase für mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur, bei 4°C über Nacht oder bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

2.2.4.8 Sequenzierung von DNA

Sämtliche Sequenzierungen dieser Arbeit wurden im Servicelabor des Zentrums für molekulare Medizin Köln mit Hilfe des ABI Prism[®] 377 DNA Sequencers von Perkin Elmer/Überlingen durchgeführt.

2.2.4.9 Markierung von DNA-Molekülen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, DNA-Fragmente radioaktiv zu markieren. Die eine beruht auf der Phosphorylierung der 5'-Enden mit radioaktivem ³²P durch eine Kinase. Bei der anderen wird durch eine DNA-Polymerase ein radioaktives dNTP in die DNA-Kette eingebaut.

2.2.4.9.1 Radioaktive Markierung mittels T4 Polynukleotid-Kinase

Für die Markierung synthetischer Oligonukleotide mußten die einzelsträngigen Desoxy-Oligonukleotide (sense und antisense) zunächst hybridisiert werden. Bei z.B. durch Restriktionsbehandlung gewonnenen DNA-Fragmenten konnten diese direkt für die Markierung eingesetzt werden.

Material:

1 x SSC	s. 2.1.6.1
One-Phor-All-Buffer	Boehringer/Mannheim
γ -ATP (³² P-markiert)	10 μ Ci/ μ l; Amersham/Braunschweig
T4 PNK	Boehringer/Mannheim

Durchführung:

Die einzelsträngigen Desoxy-Oligonukleotide wurden zunächst hybridisiert: je 500 pmol sense- und antisense-Desoxy-Oligonukleotid wurden in 20 μ l 1 x SSC gelöst, 5 min auf 95°C erhitzt und mit dem Heizblock langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Es ergab sich eine Konzentration von 25 pmol Doppelstrang-DNA/ μ l (= 50 pmol 5'-Enden).

5 pmol der doppelsträngigen Desoxy-Oligonukleotide wurden mit 2 μ l One-Phor-All-Buffer, 5 μ l (15 pmol) γ -ATP (50 μ Ci), 2,5 μ l T4 PNK (20 U) versetzt, mit H₂O auf 25 μ l aufgefüllt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung wurde mit *NucTrap Probe Purification Columns* der Firma Stratagene/La Jolla; CA (USA) durchgeführt und die spezifische Aktivität der Probe nach Messung im Szintillationszähler berechnet.

2.2.4.9.2 Radioaktive Markierung mittels Klenow-Polymerase

Mit Hilfe des Klenow-Enzyms können DNA-Fragmente markiert werden, indem radioaktive Desoxynukleotide in den DNA-Strang eingebaut werden. Dabei kann entweder eine Auffüllreaktion von 5'-Überhängen, oder eine Verlängerung gleichmäßig auf dem komplementären DNA-Strang verteilter Hexanukleotide (Boehringer/Mannheim) stattfinden.

Material:

One-Phor-All-Buffer	Boehringer/Mannheim
α -dCTP (32 P-markiert)	10 μ Ci/ μ l, Amersham/Braunschweig
d(AGT)TP	je 100 mM; Promega/Heidelberg
dNTP-Mix	Promega /Heidelberg
Klenow	Boehringer/Mannheim
Random Primers (Hexamere)	Gibco BRL Life Technologies/Eggenstein
EDTA-Lösung	0,5 M

Durchführung:

Für das Auffüllen des 5'-Überhanges wurden in einem Volumen von 50 μ l 5 pmol DNA, 5 μ l One-Phor-All-buffer, 5 μ l (50 μ Ci) α -dCTP, 5 μ l (50 μ Ci) α -dGTP, 25,33 μ l H₂O und 1 μ l Klenow gemischt und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2 μ l 5 mM dNTP-Mix erfolgte eine weitere 15minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Die gleichmäßige Markierung des ganzen DNA-Stranges erfolgte nach der Hybridisierung der Random-Primer mit der Matrizen-DNA. Dazu wurden 25 ng DNA und 5 μ l Primer in einem Volumen von 25 μ l zunächst 5 min bei 95°C denaturiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 5 μ l One-Phor-All-buffer, 5 μ l α -dCTP, 2 μ l nicht-radioaktiven Desoxynukleotiden und 1 μ l Klenow-Enzym gemischt. Nach 20minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 μ l 0,5 M EDTA-Lösung abgestoppt.

Die Aufreinigung wurde mit *NucTrap Probe Purification Columns* der Firma Stratagene/La Jolla; CA (USA) durchgeführt und die spezifische Aktivität der Probe nach Messung im Szintillationszähler berechnet.

2.2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.2.5.1 Herstellung eines polyklonalen Antiserums

Durch Inkubation mit der Restriktions-Endonuklease SacI wurde aus dem Gen von HIF-2 α ein 2310 bp langes Fragment gewonnen, das in einen HIS-Vektor der Firma Qiagen kloniert wurde. Analysen zeigten, daß ein 87,6 kDa großes Protein entstand. Mit Hilfe des QIAexpress-Systems der Firma Qiagen (Hilden) wurde das Protein nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Diese Arbeiten zur Proteinherstellung wurden von Manuel Rauter durchgeführt.

Das aufgereinigte Protein wurde anschließend bei der Firma Eurogentech zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Nach Blutentnahme wurden die festen Blutbestandteile durch Zentrifugation abgetrennt und das auf diese Art gewonnene Serum konnte für Analysen eingesetzt werden.

2.2.5.2 *in vitro*-Translation

Die *in vitro*-Translation von Proteinen, die in einem Plasmidvektor hinter die Bindungsstelle für eine RNA-Polymerase (T3, T7 oder SP6) kloniert waren, wurde mit Hilfe des TNT[®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate Systems der Firma Promega durchgeführt.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 25 μ l TNT[®] Kaninchen-Reticulozyten-Lysat
- 2 μ l TNT[®] Reaktionspuffer
- 1 μ l TNT[®] RNA-Polymerase
- 1 μ l Aminosäuremischung (ohne Methionin; 1 mM)
- 2 μ l [³⁵S]-Methionin
- 1 μ l RNAGuard RNase Inhibitor
- 1 μ g DNA
- ad 50 μ l H₂O

Das Reaktionsgemisch wurde für 90 min bei 30°C inkubiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Zur Analyse wurde das Reaktionsprodukt auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. auch 2.2.5.3.1) und nach Vakuumtrocknung des Gels durch Autoradiographie ausgewertet.

2.2.5.3 Western blot-Analyse

Bei der *Western blot*-Analyse werden Proteine, die über ein denaturierendes Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran über die Bindung spezifischer Antikörper identifiziert.

2.2.5.3.1 Auftrennung durch ein denaturierendes Polyacrylamidgel

Material:

Lower Tris: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,0)

0,4% (w/v) SDS

Upper Tris: 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

0,4% (w/v) SDS

Acrylamid-Mix: 30% (w/v) Acrylamid

0,8% (w/v) Bisacrylamid

Laufpuffer: 30 g Tris-Base

(10x) 144 g Glycin

ad 1 l H₂O

Dem einfach konzentrierten Laufpuffer wurde noch 0,1% (w/v) SDS zugesetzt.

Probenpuffer: 10% (v/v) Glycerin

5% (v/v) β -Mercaptoethanol

3% (w/v) SDS

12,5% (v/v) Upper Tris

0,01% (w/v) Bromphenolblau

ad 100 ml H₂O

APS 100 mg/ml Ammoniumpersulfat

TEMED

Glycerin 50% (v/v)

Durchführung:

In einem Gießstand für Minigele wurden die Glasplatten zusammengesetzt. Pro Gel wurden für das Trenngel 8,7 ml H₂O, 1 ml 50% Glycerol, 5 ml Lower Tris, 5,3 ml Acrylamid, 75 µl APS und 10 µl TEMED gemischt, zwischen die Glasplatten gegossen und mit H₂O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurden für das Sammelgel 3,9 ml H₂O, 1,5 ml Upper Tris, 0,6 ml Acrylamid, 18 µl APS und 6 µl TEMED vermischt, auf das polymerisierte Trenngel gegossen und sofort mit einem Kamm versehen. Nach der Polymerisation wurde der Kamm gezogen, die Taschen gespült und das Gel mit Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit einem VT Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf fand für 30 min bei 90 V und weitere zwei Stunden bei 120 V statt.

2.2.5.3.2 *Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen*Material:

Nitrozellulose-Membran:	0,45 µm; Schleicher&Schuell/Dassel
Whatman-Filterpapier	
Semi-Dry-Blotpuffer:	48 mM Tris
	39 mM Glycin
	13 mM SDS
	20% (v/v) Methanol

Durchführung:

Auf das Minigel wurde eine mit Semi-Dry-Blotpuffer angefeuchtete Nitrozellulosemembran und auf beide Seiten jeweils drei angefeuchtete Whatman-Filterpapierstücke gelegt. Luftblasen wurden durch Rollen mit einer Pasteurpipette entfernt. In der Blot-Apparatur wurde der Blot so aufgebaut, daß die Membran auf der dem Pluspol zugewandten Seite des Gels zu liegen kam. Der Transfer der Proteine fand für 60 min bei 200 mA statt.

2.2.5.3.3 *Antikörpernachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen*

Der Nachweis der Proteine erfolgte über die Bindung des proteinspezifischen Erstantikörpers, der dann seinerseits von einem Peroxidase-gekoppelten, Spezies-spezifischen Zweitantikörper

erkannt wird. Die Peroxidase wurde mit dem "ECL Western blotting detection Kit" von Amersham Life Science/Little Chalfont, GB) nachgewiesen.

Material:

Antikörper	siehe 2.1.3
Magermilchpulver	
TBS	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
TBST	TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
ECL Hyper Film	

Durchführung:

Die Membran wurde kurz mit TBST gespült und dann eine Stunde in 5% (w/v) Milchpulver in TPST geblockt, um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Nach dem Blocken wurde die Membran dreimal 5 min mit TBST gewaschen und anschließend über Nacht mit dem Erstantikörper in TBST bei 4°C inkubiert. Dann wurde fünfmal 5 min mit TBST gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper in TBST inkubiert. Danach wurde die Membran fünfmal 5 min mit TBST und dann dreimal 5 min mit TBS gewaschen. Nach kurzem Abtrocknen wurde der Blot 1 min in ECL-Lösung geschwenkt, trockengetupft und in Klarsichtfolie eingeschlagen. In einer Filmkassette wurde auf den Blot ein ECL-Film aufgelegt. Nach 5 min wurde der Film entwickelt und bei Bedarf ein weiterer Film aufgelegt.

2.2.5.4 **GST-Pulldown**

Zur Untersuchung der physikalischen Interaktion zweier Proteine wurde ein sogenannter *GST-Pulldown* durchgeführt. Hierzu wurden im Labor von Dr. M. Sieweke (Heidelberg) Fusionsproteine aus Glutathion-S-Transferase (GST) und dem einen potentiellen Interaktionspartner hergestellt. Nach einer *in vitro*-Translation dieses Fusionsproteins und des anderen Interaktionspartners mit dem TNT[®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System der Firma Promega in Gegenwart von ³⁵S-Methionin folgte eine einstündige Inkubation der beiden Proteine zusammen mit Glutathion-Agarose (Pharmacia) in Tris-Puffer (pH 7,4) mit 0,3% Nonidet P40. Nach viermaligem Waschen mit Inkubationspuffer wurde das Sediment

mit SDS-Ladepuffer aufgekocht und durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie analysiert.

2.2.5.5 Immunpräzipitation

Material:

Lysispuffer/Waschpuffer I	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1% Nonidet [®] P40 0,5% Na Deoxycholat 1 Tablette complete TM mini protein inhibitor cocktail/10 ml 0,7 mg/ml Pepstatin
Waschpuffer II	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 500 mM NaCl 0,1% Nonidet [®] P40 0,05% Na Deoxycholat
Waschpuffer III	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 0,1% Nonidet [®] P40 0,05% Na Deoxycholat
Protein A/G-Agarose	Boehringer/Mannheim
PBS	
Antikörper	
Ladepuffer	s. 2.1.6.1

Durchführung:

Wie unter 2.2.7.4 beschrieben, wurden subkonfluente Zellen mit den Plasmiden transfiziert, deren Produkte untersucht werden sollten. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugaben von 1 ml Puffer I pro 3,5 cm-Schale, Abschaben und Behandlung mit einem Dounce-Homogenisator lysiert. Die homogenisierte Suspension wurde für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Um unspezifische Adsorption von Zellproteinen an die Protein A/G-Agarose zu verhindern, wurde die Suspension für drei Stunden bei 4°C mit 50 µl Protein A/G-Agarose auf einem Schüttler inkubiert. Durch erneute Zentrifugation wurde die Agarose abgetrennt und das Lysat zunächst eine Stunde mit 5 µg Fällungsantikörper und anschließend über Nacht mit 50 µl Protein A/G-Agarose auf einem

Schüttler bei 4°C inkubiert. Die Agarose mit den daran gebundenen Proteinen wurde sedimentiert, je zweimal mit Waschpuffer I und II und einmal mit Waschpuffer III gewaschen und anschließend in 50 µl Ladepuffer resuspendiert. Nach dreiminütigem Erhitzen auf 100°C folgte die Westernblot-Analyse der gefällten Proteine.

2.2.5.6 Extraktion von Kernproteinen

Material:

hypotonischer Puffer:	10 mM Hepes (pH 7,9)	
	1,5 mM MgCl ₂	
	10 mM KCl	
	0,2 mM PMSF	
	0,5 mM DTT	
Hochsalzpuffer:	20 mM Hepes (pH 7,9)	
	25% Glycerin	
	1,5 mM MgCl ₂	
	1,2 M KCl	
	0,2 mM EDTA	
	0,2 mM PMSF	
	0,5 mM DTT	
Niedrigsalzpuffer:	20 mM Hepes (pH 7,9)	
	25% Glycerin	
	1,5 mM MgCl ₂	
	0,02 M KCl	
	0,2 mM EDTA	
	0,2 mM PMSF	
	0,5 mM DTT	
Dialysepuffer:	20 mM Hepes (pH 7,9)	
	25% Glycerin	
	100 mM KCl	
	0,2 mM EDTA	
	0,2 mM PMSF	(PMSF und DTT wurden erst
	0,5 mM DTT	direkt vor Gebrauch zugegeben).

Trypanblau

Durchführung:

Um zu verhindern, daß die zu extrahierenden Proteine während der Präparation abgebaut werden, wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt.

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen und anschließend in frischem PBS mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 300 x g wurde der Überstand verworfen und das Volumen des Niederschlages (pcv = packet cell volume) bestimmt. Die Zellen wurden schnell in 5 pcv hypotonischem Puffer resuspendiert, 5 min bei 4000 x g abzentrifugiert und in drei pcv hypotonischem Puffer aufgenommen. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis, in der die Zellen anschwellen und zum Teil aufplatzen, wurde die Suspension im Potter homogenisiert. Die Vollständigkeit des Zellaufschlusses wurde unter dem Mikroskop nach Trypanblaufärbung überprüft. Die nun freiliegenden Zellkerne wurden bei 4000 x g für 15 min zentrifugiert und erneut das Niederschlagvolumen (pnv = packet nuclear volume) bestimmt. Das Kernpellet wurde in ½ pnv Niedrigsalzpuffer resuspendiert und unter Rühren langsam mit ½ pnv Hochsalzpuffer versetzt (Endkonzentration KCl = 300 mM). Die Lösung wurde 30 min gemischt, 30 min bei 10000 x g abzentrifugiert und schließlich zweimal eine Stunde gegen Dialysepuffer dialysiert. Nach abschließender Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Kernextrakt aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5.7 Photometrische Bestimmung der ProteinkonzentrationMaterial:

Kupfer(II)Sulfat	4% (w/v) in H ₂ O
Bicinchoninsäure	4,4'-Dicarboxy-2,2'-biquinolin

Durchführung:

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde Kupfer(II)Sulfat-Lösung mit Bicinchoninsäurelösung im Verhältnis 1:50 gemischt und 2 ml dieses Gemisches mit 100 µl einer 1:100 Verdünnung der Kernproteinlösung versetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Proteinmenge photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm mit Hilfe einer Eichgeraden (erstellt mit BSA) bestimmt.

2.2.6 DNA-Protein-Interaktion

2.2.6.1 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

(nach Ausubel *et al.*, 1994 und Kvietikowa *et al.*, 1995)

Mit dem *Elektrophoretic Mobility Shift Assay* (*Bandshift Assay* oder Gelretardierungsanalyse) kann gezeigt werden, daß Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Sequenzen binden. Radioaktiv markierte Oligonukleotide mit den entsprechenden Bindesequenzen zeigen nach Inkubation mit den Transkriptionsfaktoren im nativen Polyacrylamidgel ein anderes Laufverhalten als ohne daran gebundenes Protein. Um die Spezifität einer solchen Bandenverschiebung (Shift) nachzuweisen, kann der Komplex durch Zugabe von Antikörpern vergrößert, oder die detektierbare Bande durch Zugabe von nichtmarkiertem Oligonukleotid geschwächt werden.

Material:

TAE (10 x)

Acrylamid 30% Acrylamid - 2% Bisacrylamid-Mix

APS 100 mg/ml Ammoniumpersulfat

TEMED N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin

Carrier-DNA poly(di-dc)

EMSA-Puffer 100 mmol Tris-HCl (pH 7, 5)

500 mmol KCl

500 mmol NaCl

10 mmol MgCl₂

10 mmol EDTA

50% Glycerin

radioaktiv markiertes Doppelstrang-Desoxy-Oligonukleotid

Kernproteinextrakt

Durchführung:

Für das native Polyacrylamidgel wurden 6 ml TAE (10 x), 11,1 ml 30% Acrylamid-2% Bisacrylamid-Mix und 42,9 ml H₂O zusammengegeben und steril filtriert. Nach Zugabe von 150 µl 30% APS und 70 µl TEMED wurde die Gellösung zwischen mit Abstandhaltern versehene Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesteckt. Die Polymerisation erfolgte in ca.

30 min bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurde die Bindungsreaktion durchgeführt. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,3 µl Carrier-DNA (poly(di-dc); 0,3 µg)
1 µl 10 x EMSA-Puffer
0,5 µl 0,1 M DTT
1 µl radioaktives Oligonukleotid (10000 cpm)
15 µg Kernextrakt
ad 10 µl H₂O

Bei einer Kompetition wurde noch zusätzlich das nicht-radioaktive Oligonukleotid in entsprechender Verdünnung (1:1, 1:10, 1:100, 1:500) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 4°C inkubiert.

Für den spezifischen Nachweis des DNA-bindenden Proteins wurden in Supershift-Analysen anschließend an die Bindungsreaktion etwa 25 µg Antikörper/Präserum bzw. unspezifisches IgG zugegeben und zwei Stunden bei 4°C inkubiert.

Der komplette Ansatz wurde auf das Gel aufgetragen, die Elektrophorese bei 30 mA für etwa eine Stunde durchgeführt und das Gel anschließend zwei Stunden getrocknet. Über Nacht folgte die Autoradiographie bei -80°C.

2.2.6.2 in vitro DNase I footprint

(nach Ausubel *et al.*, 1994; modifiziert nach White RJ, *et al.*, 1989)

Die DNase I *footprint*-Analyse ermöglicht die Untersuchung eines DNA-Abschnittes, in dem potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren liegen. Eine Anlagerung dieser Proteine an die DNA verhindert die statistische Spaltung durch die DNase I, so daß bei der Betrachtung der Restriktionsleiter protegierte Bereiche sichtbar werden, die die funktionellen Bindungsstellen darstellen.

Um beurteilen zu können, wo genau die protegierten Bereiche liegen, wird auf dem Polyacrylamidgel in einer Spur das Produkt einer Sequenzierungsreaktion aufgetragen. Da diese Sequenzleiter einen genau definierten Startpunkt haben muß, kommt hier nur die chemische Sequenzierung nach Maxam und Gilbert in Frage.

Das zu untersuchende Promotorfragment, das laut Sequenzanalyse Bindungsstellen für Transkriptionen enthalten könnte, wurde über eine PCR-Reaktion hergestellt. Der 5'-Primer enthielt eine Not I-Schnittstelle, die mit radioaktivem α -dCTP und α -dGTP durch das

Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt werden sollte (s. 2.2.4.9.2), der 3'-Primer einen AT-Überhang, der eine zufällige Markierung des 3'-Endes verhindern sollte. Im Anschluß an die PCR-Reaktion erfolgte die Aufreinigung über ein Agarosegel und Gelextraktion (s. 2.2.4.2.3).

2.2.6.2.1 chemische Sequenzierung nach Maxam und Gilbert

(nach Maxam und Gilbert, 1977)

Material:

poly(di-dc)	1 µg/µl
Ameisensäure	88% (v/v)
Stopplösung:	0,3 M NaAc (pH 5,5) 100 µg/ml tRNA
Ethanol	100%, 70% (v/v)
NaAc	0,3 M Natriumazetat
Piperidin	1M (frisch 1:10 in H ₂ O verdünnt)

Durchführung:

Da die Sequenz des zu untersuchenden Bereiches bekannt war, reichte hier die Reaktion mit Piperidin aus, die zu einer GA-Leiter führte. Dafür wurde die markierte DNA (100000 cpm) mit 1 µl poly(di-dc) in einem Volumen von 10 µl gemischt, mit 25 µl Ameisensäure versetzt und 7 min bei 20°C inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl eiskalter Stopplösung wurde die Reaktion abgebrochen und die DNA nach Mischen mit 500 µl kaltem Ethanol durch 5 min Inkubation in einem Trockeneis/Ethanol-Gemisch gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13000 x g wurde die DNA in 250 µl 0,3 M NaAc resuspendiert, mit 3 VT Ethanol gefällt und mit kaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung wurde der DNA-Niederschlag in 100 µl 1 M Piperidin resuspendiert und der Ansatz bei 90°C für 30 min inkubiert. Danach erfolgte Abkühlen auf Eis und zweistündiges Trocknen im Vakuum. Um Piperidinreste, die eine Auftrennung der verschiedenen DNA-Fragmente im Polyacrylamidgel stören würden, vollständig zu entfernen, wurde die DNA anschließend noch zweimal in 100 µl H₂O resuspendiert und eine Stunde im Vakuum getrocknet. Schließlich wurde die Probe in 20 µl Ladepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Um die richtige DNase I-Konzentration für die *footprint*-Reaktion zu ermitteln, wurde eine Titration durchgeführt.

2.2.6.2.2 DNase I-Titration:

Material:

poly(di-dc)	1 µg/µl
10 x Mg/Ca	50 mM MgCl ₂ 25 mM CaCl ₂
HNB-Puffer (sterilfiltriert, bei -20°C gelagert)	0,5 M Sucrose 15 mM Tris-HCl (pH 7,5) 60 mM KCl 0,25 mM EDTA (pH 8,0) 0,125 mM EGTA (pH 8,0)
DNase I	Boehringer/Mannheim

Durchführung:

Die markierte DNA (100000 cpm) wurde in einem Volumen von 50 µl zusammen mit 2,5 µl poly(di-dc), 5 µl 10 x Mg/Ca und HNB-Puffer gemischt. Die Lösung wurde mit 1 µl DNase I-Verdünnung (1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000, 1:1200, 1:1500 in HNB) versetzt und 60 sek bei 30°C inkubiert. Die DNA-Spaltung wurde durch Zugabe von 10 µl FA-Ladepuffer, fünfminütige Denaturierung bei 95°C und Abkühlung auf Eis gestoppt. Für die folgenden Analysen wurde die DNase I-Verdünnung eingesetzt, die eine statistisch verteilte Spaltung des eingesetzten DNA-Fragments ergab.

2.2.6.2.3 footprint

Material:

PVA	10% (w/v) Polyvinylalkohol
5 x FPP	50 mM HEPES
	5 mM DTT
	5 mM EDTA
	25 µg poly(di-dc)
	50% Glycerin
	300 mM KCl

Durchführung:

Markierte DNA (100000 cpm) wurde mit 10 µl PVA, 2 µl Kernextrakt (1; 2; 5; 10; 15; 20 µg in HNB, bzw. als Kontrolle: BSA oder H₂O), 2 µl 5 x FPP und H₂O in einem Volumen von 25 µl gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde entsprechend der Titration DNase I in HNB verdünnt, davon 1 µl mit 24 µl HNB versetzt und diese DNase-Lösung zu dem Bindungsansatz gegeben. Nach einminütiger Inkubation bei 30°C wurden 25 µl FA-Ladepuffer zugegeben, 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese wurde für 90 min bei 1500 V durchgeführt.

2.2.7 Kultur eukaryotischer Zellen

2.2.7.1 verwendete Zelllinien

Zelltyp	Referenz	Beschreibung
Cos	Gluzman, 1981	immortalisierte Nierenzellen der grünen Meerkatze
3T3	ATCC	immortalisierte murine Fibroblastenzellen (NIH 3T3 CRL-1658)
Q2nB	Stocker und Bissel, 1981	Wachtelfibroblasten
CEF	Labor Dr.Flamme	primäre Hühnerfibroblasten
BAE	Schwartz 1978	primäre Endothelzellen aus der Rinderaorta
HEK A293	ATCC	humane embryonale Nierenzellen, E1A-transformiert (CTRL1573)
HEP1C4	Gradin <i>et al.</i> , 1996	HIF-1β-defiziente Maus-Hepatomzellen
HUVEC	Gimbrone, 1976	primäre humane Nabelschnurondothelzellen
HUE	ATCC	spontan immortalisierte humane Endothelzellen

2.2.7.2 Medien und verwendete Lösungen

Folgende Grundmedien und Lösungen wurden verwendet:

DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (NUT MIX F-12) mit 4500 mg/ml Glukose; Gibco BRL/Eggenstein), MCDB 131 (Gibco BRL/Eggenstein), FCS (fetales Kälberserum; Firma PAA/Marburg und Boehringer/Mannheim), Chicken Serum (Sigma /Deisenhofen), Pen/Strep. (10000 IU μg / ml Penicillin und 10000 μg / ml Streptomycin; Sigma/Deisenhofen), β -Mercaptoethanol, NEAA-Lösung (nicht-essentielle Aminosäuren; Amimed/Allschwill(CH)), Pyruvat (100 mM $\text{NaCH}_3\text{COCO}_2$, Amimed/Allschwill(CH)), Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA; Firma PAA/Marburg), Glutamin (Gibco BRL/Eggenstein), Geneticin G-418 (Gibco BRL/Eggenstein).

Die Kulturmedien setzten sich folgendermaßen zusammen:

Zelltyp	Medienzusammensetzung
Cos 3T3	10% (v/v) FCS 1% (w/v) Glutamin (200mM) 0,5% (v/v) Pen./Strep. (10000 IU / ml; 10000 μg / ml) DMEM
Q2nB CEF	8% (v/v) FCS 2% (v/v) Chicken Serum 1% (w/v) Glutamin 0,5% (v/v) Pen./Strep. DMEM
BAE ACE	10% (v/v) FCS 1% (w/v) Glutamin 0,5% (v/v) Pen./Strep. 1ml ECGS (0,4%) / 250ml DMEM
HEK HEP1C4	10% (v/v) FCS 2% (w/v) Glutamin 1% Pen./Strep. 1% (v/v) NaPyruvat (100mM) 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) 100 x 1 μl Mercaptoethanol / 250ml DMEM
HUE HUVEC	8% (v/v) FCS 2% (w/v) Glutamin 1% (v/v) Pen./Strp. MCDB 131

2.2.7.3 Vermehrung, Haltung und Lagerung eukariotischer Zellen

In Gewebekulturschalen oder -flaschen wurden die Zellen bis zu etwa 90%iger Konfluenz bei 37°C und Begasung mit 7% (v/v) CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre inkubiert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Durch Zugabe von DMEM wurde die Reaktion abgestoppt und die Suspension durch fünfminütige Zentrifugation bei 1000 x g sedimentiert. Nach Resuspendierung in frischem Nährmedium wurden die Zellen in entsprechenden Verdünnungen (je nach Wachstumsgeschwindigkeit) in neuen Kulturgefäßen ausgesät.

Zur Lagerung der Zellen wurden sie wie oben beschrieben abgelöst, in Gefriermedium (DMEM mit 30% (v/v) fötalem Kälberserum und 10% (v/v) DMSO) resuspendiert und in Kryo-Röhrchen (Greiner/Solingen) bei -80°C gelagert.

Die erneute Kultivierung der Zellen erfolgte, indem der Inhalt eines Kryo-Röhrchens schnell aufgetaut und in einer T25-Zellkulturflasche mit 10 ml Nährmedium verdünnt wurde. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert.

2.2.7.4 Transiente Transfektion

Durch das Einbringen fremder DNA in eukariotische Zellen können gezielt die Eigenschaften der Zellen manipuliert werden. Meist wird diese Fremd-DNA schnell wieder eliminiert, so daß man von einer transienten Transfektion spricht.

Für die transiente Transfektion wurden die Zellen am Vortag so ausgesät, daß sie am Tag des Versuches zu etwa 70% konfluent gewachsen waren. Für die Transfektion in 6 cm-Schalen wurden insgesamt 5 µg DNA mit Grundmedium auf 150 µl aufgefüllt und mit 30 µl SuperFect Reagenz (Qiagen/Hilden) vermischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch zu den Zellen gegeben, die vorher mit 5 ml frischem Nährmedium überschichtet wurden.

Am folgenden Tag wurde das Medium erneuert.

2.2.7.5 *Simulierung hypoxischer Bedingungen*

Durch Zugabe von zweiwertigen Schwermetallionen wie Ni²⁺ oder Co²⁺ oder von Metall-Chelatoren wie Desferroxamin (DFO) ist es möglich, in Säugerzellen eine ähnliche adaptive Antwort zu induzieren, wie sie auch bei Hypoxie auftritt.

Zu diesem Zweck wurden dem Nährmedium 100 µmol CoCl₂ bzw. Natriumdesferroxamin zugesetzt und die Zellen anschließend noch 16 Stunden im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Danach konnte die Genaktivität z.B. durch Reporteranalysen überprüft werden.

2.2.8 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf Gewebeschnitten

Über immunhistochemische Methoden lassen sich spezifisch Proteine in Geweben nachweisen. Der Antigennachweis erfolgt über zwei Antikörperreaktionen, wobei der erste, durch Immunisierung von Kaninchen hergestellte Antikörper das entsprechende Protein erkennt und der zweite gegen Kaninchen-IgGs gerichtet ist. Dieser zweite Antikörper ist außerdem mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert, so daß Farbstoffe zu einem tiefblauen Präzipitat umgesetzt und die Bindungsstellen der Antikörper sichtbar werden.

2.2.8.1 *Entnahme, Fixierung und Einbettung von Gewebeproben*

Material:

Block-Paraffin I:	Smp. = 42-44°C
Block-Paraffin II:	Smp. = 55-57°C
Ethanol:	30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96% (v/v), absolut
Flüssigparaffin	
Isopropanol:	absolut
PBS	
Paraformaldehydlösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
Paraplast:	Smp. = 53-55°C

Durchführung:

Nach fachgerechter Tötung des Versuchstieres wurden die zu untersuchenden Organe vorsichtig entnommen, kurz in eiskaltem PBS gewaschen und etwa 16 Stunden bei 4°C unter leichtem Schwenken in Paraformaldehydlösung fixiert. Die Dehydrierung erfolgte bei adulten Organen für je 12 Stunden nach folgendem Schema (für Embryonen wurden die Inkubationszeiten entsprechend angepaßt):

4°C-Schritte:	aufsteigende Ethanolreihe
	Isopropanol
	Toluol
	Toluol / Flüssigparaffin (1:1)
	Flüssigparaffin
60°C-Schritte:	Blockparaffin I
	Blockparaffin II
	Paraplast

Die Aushärtung und Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.8.2 Anfertigung von Semidünnschnitten

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms werden 5 µm dünne Schnitte auf Objektträger gebracht, die zur besseren Adhäsion vorher mit Poly-L-Lysinlösung behandelt worden waren.

Material:

Poly-L-Lysinlösung: 0,01 % (v/v) Poly-L-Lysin in H₂O

Durchführung:

Die Objektträger wurden 10 min bei Raumtemperatur in Poly-L-Lysinlösung inkubiert, über Nacht getrocknet und auf 40°C vorgewärmt. Es wurden mit dem Rotationsmikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit einem Pinsel auf die Objektträger gelegt, auf denen ein Wassertropfen vorgelegt worden war. Während dieser Wassertropfen langsam eintrocknete, konnte sich das durch den Schneidevorgang gestauchte Gewebe wieder strecken. Nun wurden die Schnitte noch 10 Stunden bei 40°C getrocknet und dann bei 4°C gelagert.

2.2.8.3 Nachweis von Proteinen auf Semidünnschnitten mit spezifischen Antikörpern

Material:

PBS-Puffer

Antikörper-Verdünnungslösung: 2 % Ziegen Serum in PBS

Äquilibrierungspuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 9,5
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂

Blocklösung: 15 % (v/v) Ziegen Serum
3 % (w/v) BSA in PBS

Citratpuffer: 10 mM Natriumcitrat, pH 6,0

Ethanol: 96 %, 90 %, 70 %, 50 %, 30 % (v/v)

Färbelösung: 9 µl NBT, 7 µl X-Phosphat in 2 ml Äquilibrierungspuffer

Glycerin: 87 % (v/v)

Isopropanol: absolut

NBT: 100 mg/ml 4-Nitroblue-tetrazolium-HCl
in 70 % (v/v) Dimethylformamid

sek. Antikörper: Schaf-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper,
konjugiert mit alkalischer Phosphatase

Stopp-Lösung: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

XEM 300: Xylolersatzmittel

X-Phosphat: 50 mg/ml 5-Bromo-4-chlor-3-indoylphosphat
in Dimethylformamid

Durchführung:

Die Schnitte wurden zunächst 30 min auf 60°C erhitzt und dann zur Entparaffinierung zweimal 10 min in XEM geschwenkt. Anschließend wurde rehydriert, indem 5 min in Isopropanol, je 5 min in den verschiedenen Stufen der absteigenden Ethanolreihe und 10 min in PBS inkubiert wurde.

Nun wurden die Träger 14 min lang einer Mikrowellenbehandlung (700 Watt) in Citratpuffer unterzogen, 15 min auf Raumtemperatur abgekühlt und 5 min in PBS inkubiert.

Dann wurden unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch dreistündige Behandlung in einer Feuchtkammer mit 400 µl Blocklösung pro Träger abgesättigt. Die Blocklösung wurde

danach durch Prä- bzw. Immunsersum in gewünschter Verdünnung ersetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden nicht gebundene primäre Antikörper durch zweimaliges fünfminütiges Waschen in PBS entfernt und die Träger für mindestens eine Stunde mit dem sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 überschichtet.

Wiederum wurde zweimal fünf min in PBS gewaschen, fünf min in Äquilibriumspuffer belassen und die Schnitte mit 400 µl Färbelösung pro Träger bedeckt. Nach etwa 5 bis 20 min wurde die Färbung nach mikroskopischer Kontrolle in Stopp-Lösung beendet. Die Gewebeschnitte wurden schließlich mit Glycerin unter Deckgläschen konserviert.

2.2.9 Proteinnachweis durch Immunfluoreszenz

Durch die Immunfluoreszenzanalyse können Proteine direkt in adherent gewachsenen Zellen nachgewiesen werden. Über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper kann die Lokalisation des Proteins in der Zelle betrachtet werden.

Zu diesem Zweck wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zur Fixierung 15 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS inkubiert. Danach wurden sie 5 min mit Methanol behandelt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Je nach Konzentration wurde nun der Erstantikörper bis zu 1:1000 verdünnt, und ein geeignetes Volumen zur Inkubation für 30 min auf die Zellen gegeben. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper in geeigneter Konzentration (Herstellerangaben) 30 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde mit einem Tropfen 50%igem Glycerin (100 mM Tris) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde der Versuch ausgewertet.

2.2.10 Nachweis von Transkripten auf Gewebeschnitten durch *in situ*-Hybridisierung

Dieser Nachweis wurde mit Hilfe von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden durchgeführt. Diese Sonden wurden durch „run-off-Transkription“ *in vitro* synthetisiert.

2.2.10.1 *in vitro* Transkription

Als Matrix für die Transkription diente linearisierte Template-DNA, bei der der Vektor direkt hinter dem Insert mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten und die danach über Agarose-Gelelektrophorese sowie anschließende Extraktion aus dem Gel gereinigt wurde.

Dabei mußte beachtet werden, daß möglichst nur 5'-Überhänge entstanden, damit die RNA-Polymerase keine Startpunkte für unerwünschte Gegenstränge hatte. Gegenstränge wurden als Kontrolle der in situ-Hybridisierung nach entsprechenden Verdauungen der Template-DNA gezielt eingesetzt.

Um unter möglichst RNasefreie Bedingungen zu arbeiten, wurde die Template-DNA anschließend einer Proteinase K-Behandlung unterzogen.

2.2.10.1.1 Proteinase K-Verdau der Template-DNA

Material:

Natriumazetat:	3 M NaAc, DEPC-behandelt
Proteinase K:	10 mg/ml
Proteinase K-Puffer (TE):	100 mM Tris-HCl, pH 8,0
(10fach konz.)	10 mM EDTA
SDS-Lösung:	10 % (w/v) SDS

Durchführung:

Zu 10 µg DNA wurden 30 µl 10xTE-Puffer, 15 µl SDS-Lösung, sowie 1,5 µl Proteinase K zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde eine Phenol/Chloroformextraktion durchgeführt. Nach Präzipitation wurde das DNA-Pellet in 10µl DEPC-H₂O gelöst. Mit 1 µl dieser Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentration photometrisch bestimmt. Desweiteren wurde 1 µl DNA-Lösung durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.10.1.2 Run off-Transkription

Material:

DNase I:	10 U/µl, RNasefrei
DTT:	100 mM
EDTA:	200 mM
Ethanol:	absolut
Labeling-Mix:	je 10 mM ATP, CTP, GTP
(10fach konz.)	6,5 mM UTP
	3,5 mM Dig-UTP

LiCl-Lösung:	4 M LiCl
RNasin:	RNase Inhibitor (101 U/ μ l)
Transkriptionspuffer: (5fach konz.)	200 mM Tris-HCl, pH 7,5 30 mM MgCl ₂ 10 mM Spermidin 50 mM NaCl
T7/Sp6-RNA-Polymerase:	10 U/ μ l

Durchführung:

4 μ l 5xTranskriptionspuffer, 2 μ l Labeling-Mix, 0,5 μ l RNasin und 2 μ l DTT wurden zusammengegeben und mit DEPC-H₂O auf 18 μ l aufgefüllt. Dann wurden 1 μ g Template-DNA und 2 μ l T7- bzw. Sp6-Polymerase hinzugefügt und der ganze Ansatz eine Stunde bei 37°C und nach Zugabe von 1 μ l DNase I weitere 15 min inkubiert. Dazwischen wurde fünf min denaturiert und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Reaktion wurde mit 2,5 μ l EDTA-Lösung gestoppt und die synthetisierte RNA nach Zugabe von 3 μ l LiCl und 83 μ l Ethanol zwei Stunden bei -20°C gefällt. Nach Waschen Trocknen und Lösen konnten die markierten RNA-Sonden getestet und eingesetzt werden.

2.2.10.1.3 Größenabschätzung der Dig-RNA-Transkripte

Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer der RNA-Moleküle auf eine Nylon-Membran konnten die Dig-markierten RNA-Sonden mit Hilfe eines Anti-Dig-Antikörpers, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war, und der schon erwähnten Färbung überprüft werden. Als Marker wurde eine Dig-RNA bekannter Größe eingesetzt.

Material:

Antikörper:	Anti-Dig-Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase
Färbelösung:	s. 2.2.8.3
Puffer 1:	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 0,15 M NaCl
Puffer 2:	1 % Blocking-Reagenz (Boehringer/Mannheim) in Puffer 1
Puffer 3:	Äquilibriumspuffer (s. 2.2.8.3)
Puffer 4:	Stopp-Lösung (s. 2.2.8.3)

Durchführung:

Die Membran wurde eine Minute in Puffer 1 gewaschen und 30 min in Puffer 2 geblockt. Dann wurde zum Puffer 2 der Antikörper zugegeben (1:5000) und 30 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal 15 min in Puffer 1 gewaschen, zwei min in Puffer 3 äquilibriert und im Dunkeln bis zu einer ausreichenden Färbung in Färbelösung inkubiert. Die Färbung wurde in Puffer 4 gestoppt und das Ergebnis fotografiert.

*2.2.10.1.4 Mengenabschätzung der Dig-RNA-Transkripte*Material:

Membran:	Hybond-N-Membran
Puffer 1 bis 4:	s. 2.2.10.1.3
RNA-Verdünnungspuffer:	5 Volumenteile DEPC-H ₂ O 3 Volumenteile 20xSSC 2 Volumenteile Formaldehyd

Durchführung:

Die Membran wurde mit 10xSSC angefeuchtet und von der RNA wurde mit Hilfe des Verdünnungspuffers eine Verdünnungsreihe angefertigt, so daß dann Verdünnungen von 10 ng, 1ng, bis 10 pg vorlagen. Ebenso wurde mit einer RNA bekannter Konzentration verfahren. Die Verdünnungen wurden 10 min bei 65°C denaturiert und eisgekühlt auf die Membran aufgetropft (je 1 µl). Nach Lufttrocknung und zweistündigem Backen bei 80°C folgte die Färbung wie unter 2.2.10.1.3 beschrieben.

2.2.10.2 *in situ*-Hybridisierung

Vorbehandlung der Schnitte

Material:

PBS

PFA-Lösung: 4 % PFA in PBS

Pronase: 10 mg /ml

Pronasepuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,2
1 mM EDTA

20xSSC

Tris-Glycinpuffer: 12,1 g Tris
7,5 g Glycin auf 1 l DEPC-H₂O

Durchführung:

Analog zum Proteinnachweis auf Gewebeschnitten (s. 2.2.8.3) wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert. Dann wurde zweimal fünf min in PBS gewaschen, 30 min in PFA-Lösung fixiert, erneut zweimal gewaschen und fünf min mit 10 µg/ml Pronase in Pronasepuffer inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS und Fixieren in PFA-Lösung wurde noch zweimal fünf min in PBS und dann in 2xSSC geschwenkt und anschließend für 30 min in einem Tris-Glycinpuffer inkubiert.

Hybridisierung der Schnitte

Material:

Hybridisierungspuffer: 40 % (w/v) Formamid
5xSSC
1xDenhardt's-Lösung
100 µg/ml frisch denaturierte Lachssperma-DNA
100 µg/ml frisch denaturierte Hefe-tRNA

Durchführung:

Die markierte RNA-Sonde wurde vier min bei 95°C denaturiert und 1:100 in Hybridisierungspuffer verdünnt. Pro Objektträger wurden 100 µl dieser Lösung aufgetragen und mit einem silanisierten Deckgläschen bedeckt. Es wurde über Nacht bei 65°C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Post-Hybridisierungs-Waschschritte und Antikörper-InkubationMaterial:

Antikörper

NTE-Puffer: 500 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl, pH 7,2
 5 mM EDTA

Puffer 2: s. 3.2.10.1.3

RNase A

Waschlösung: 0,5xSSC
 20 % Formamid

Durchführung:

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläschen zusammen mit der Hybridisierungslösung abgegossen und dreimal 20 min in 5xSSC geschwenkt. Dann wurden die Schnitte 40 min bei 60°C in Waschlösung inkubiert, die Lösung wurde ausgewechselt und die Schnitte auf 37°C abgekühlt. Anschließend wurde je 15 min bei 37°C in NTE, NTE mit 10 µg RNase A und wieder in NTE inkubiert. Danach wurden die Schnitte 30 min bei 60°C in Waschlösung gewaschen und für 30 min in 2xSSC bei Raumtemperatur überführt. Nun wurde für drei Stunden in Puffer 2 geblockt und dann der Antikörper 1:5000 in Puffer 2 verdünnt aufgetragen und über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Post-Antikörper-Waschschritte und Färbung

Material:

NTMT:	Puffer 3 (s. 2.2.10.1.3) mit 0,1 % Tween-20
Färbelösung:	4,5 µl NBT
	3,5 µl X-Phosphat
	10 µl Levamisol
	in 1 ml NTMT 10 % (w/v) Polyvinylalkohol
Glycerin:	87 % (v/v)
Stopp-Lösung:	s. 3.2.5.1.3
TBS-Puffer:	0,8 % NaCl
	0,02 % KCl
	2,5 mM Tris-HCl, pH 7,4

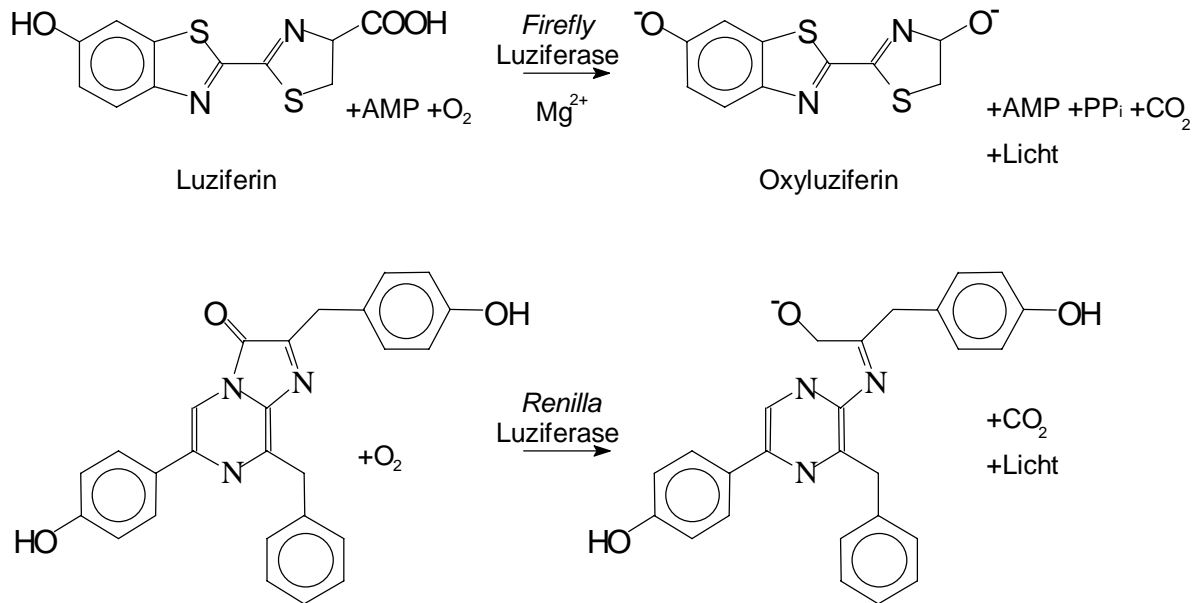
Durchführung:

Nach der Antikörper-Inkubation wurden die Schnitte viermal in TBS-Puffer gewaschen und zweimal 10 min in NTMT inkubiert. Auf jeden Objektträger wurden mindestens 500 µl Färbelösung gegeben und die Schnitte anschließend ein bis vier Tage im Dunkeln gefärbt. Dabei wurde die Färbelösung einmal täglich gewechselt. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Färbung in Stopp-Lösung abgebrochen. Die Schnitte wurden mit Glycerin unter Deckgläschen konserviert.

2.2.11 Reporter-Gen-Analysen

Für die Untersuchung der Aktivierung von Promotorkonstrukten durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wurde der zu untersuchende Promotor in einen Reporter-Genvektor kloniert, in dem das Luziferase-Gen aus *Photinus pyralis* (firefly) als Reporter-Gen fungierte. Über die Quantifizierung der Luziferaseaktivität konnten Rückschlüsse auf die Promotoraktivität gezogen werden. Um die Reporter-Genwerte zu standardisieren und Schwankungen durch ungleiche Zellzahlen oder Transfektionseffizienzen zu eliminieren, wurde ein zweites Reporter-Gen (aus *Renilla reniformis*), das unter der Kontrolle eines TK-Promotors stand, kotransfiziert. Die Reporter-Genanalysen wurden mit Hilfe des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System von Promega/Heidelberg durchgeführt.

Folgende Reaktionen fanden statt:



Um statistische Schwankungen mitteln zu können, wurden alle Experimente dreifach angesetzt.

Material:

Lysispuffer

LAR II-Puffer

Stop&Glow-Lösung

Superfect

z.B. A293-Zellen

Nährmedium

Grundmedium

Reportergenplasmid, Standardisierungsplasmid, Transkriptionsfaktor (kloniert in einen Expressionsvektor)

Bestandteile des

Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System

von Promega/Heidelberg

Qiagen/Hilden

human embryonic kidney (HEK)

Durchführung:

Zur Vorbereitung der Experimente wurden HEK-Zellen in 24-Loch-Platten derart verdünnt, daß sie nach dem Anwachsen etwa 70% der Fläche besetzten (subkonfluent). Die Transfektion sollte erfolgen, solange sich die Zellen nach dem Passagieren noch nicht abgesetzt hatten.

Pro Ansatz für eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte (1,77 cm²) wurden 0,2 µg Reportergenvektor (*firefly*), 0,01 µg Standardisierungsvektor (*renilla*) und 0,2 µg Transkriptionsfaktor-Plasmid zusammengegeben, mit Grundmedium auf 20 µl aufgefüllt, mit 2 µl Superfect versetzt und gut durchmischt. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben und für 48 Stunden bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert.

Die Zellen wurden dann in 100 µl Lysispuffer pro Vertiefung aufgenommen, zur vollständigen Lyse kräftig auf- und abpipettiert und das Lysat bei -80°C gelagert.

Zur Messung wurden 15 µl Lysat pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte in einem Luminometer mit 75 µl LAR II-Puffer (Bestandteil des Promega-Reagenziensatzes) versetzt. Nach zwei sek Verzögerung, die der Durchmischung diente, wurde die Lichtemission 8 sek lang gemessen. Anschließend wurden 75 µl Stop&Glow-Lösung eingespritzt und erneut gemessen.

Für die Auswertung wurde aus den beiden Meßwerten der Quotient gebildet. Die aus den drei verschiedenen Ansätzen pro Probe erhaltenen Quotienten wurden gemittelt, die Standardabweichung errechnet und graphisch ausgewertet.

2.2.12 Transgene Mäuse

nach Palmiter *et al.*, 1982 und Hogan *et al.*, 1994

Zur Charakterisierung eines Promotors gehört die Untersuchung des Expressionsmusters *in vivo*. Zu diesem Zweck wird ein Reportergen-Konstrukt generiert, in dem das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle des Promotors bzw. seiner Mutanten steht. Nach Linearisierung wird die DNA durch Mikroinjektion in einen der Pronukleoli einer befruchteten Mausoozyte gebracht, wo sie an zufälligen Stellen in das Genom integriert wird. Nach dem Transfer in den Eileiter einer pseudoträchtigen Maus kann sich ein transgenes Tier entwickeln, das zu einem bestimmten Anteil aus Zellen besteht, welche die fremde DNA in ihr Genom integriert haben. Die pseudoträchtigen Weibchen wurden aus Verpaarungen mit vasktomierten NMRI-Albino-Männchen gewonnen. Durch Kreuzung kann das Transgen an Nachkommen weitergegeben werden, welche dann heterozygot für das Transgen sind.

Die Etablierung der transgenen Tiere erfolgte als Serviceleistung im Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung in Bad Nauheim.

Die Analyse der transgenen Tiere erfolgte genotypisch und phänotypisch. Für die Genotypisierung wurde die genomische DNA aus Embryonen oder aus den Schwanzspitzen neugeborener Mäuse durch PCR-Reaktionen analysiert.

Die Expression des *lacZ*-Reportergen-Konstrukts wurde durch eine Farbreaktion *in situ* nachgewiesen. Dazu wurden die trächtigen Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Embryonen nach Eröffnung des Bauchraumes aus dem Uterus entnommen und in PBS überführt. Nach Fixierung in 2% Paraformaldehyd in PBS und mehrmaligem Waschen mit PBS wurden sie über Nacht bei 30°C in Färbelösung (s. 2.2.8.3) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Glycerinreihe (30%, 50%, 70%) für die Fotografie vorbereitet.

Diese phänotypischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Regina Heidenreich in Bad Nauheim durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Flk-1 und HIF-2 α sind in der Entwicklung gleichzeitig detektierbar

Die starke endotheliale Expression der mRNA des bHLH-PAS-Domänen-Transkriptionsfaktors HIF-2 α während der Embryogenese der Maus weist auf die Bedeutung dieses Faktors für die Angiogenese hin (Ema *et al.*, 1997; Flamme *et al.*, 1997). Durch *whole-mount in situ*-Hybridisierung eines Wachtelembryos am 4. Embryonaltag konnte das Transkript in den intersomitischen Gefäßen und den Gefäßen der Dottersackmembran nachgewiesen werden (Bild 3-1).

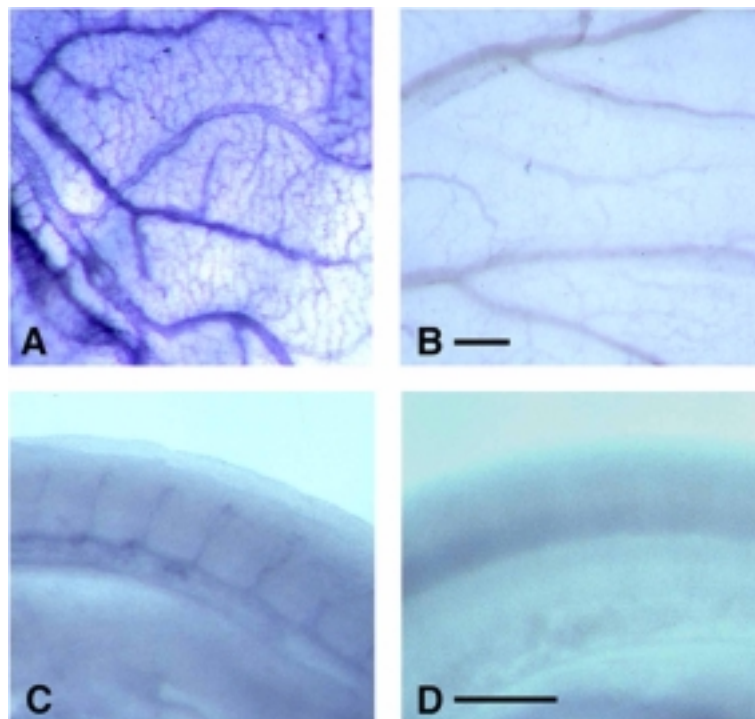


Abbildung 3-1: *Whole-mount in situ*-Hybridisierung eines Wachtelembryos (E4). HIF-2 α -mRNA wird in den Kapillaren der Dottersackmembran (A) stark und in den intersomitischen Gefäßen (C) schwach exprimiert. B und C: Negativkontrolle. Maßstab: 200 μ m.

Die speziesübergreifende Expression von HIF-2 α in den Endothelzellen sich entwickelnder Blutgefäße, die mit der von Flk-1 korreliert, legt die Frage nahe, ob der zentrale Regulator der embryonalen Angiogenese, die Signalübertragung durch den VEGF-Rezeptor 2 (Flk-1/KDR), durch HIF-2 α gesteuert wird. Ist dies der Fall, so sollte das HIF-2 α -Protein in den Zellkernen von Endothelzellen während der Angiogenese detektierbar sein. Es ist eine Kolokalisation von HIF-2 α -Protein und der Flk-1-mRNA bzw. des Proteins zu erwarten.

Um die Proteinexpression und -lokalisierung untersuchen zu können, wurde ein Antikörper gegen HIF-2 α hergestellt. Für die Immunisierung von Kaninchen, die bei der Firma Eurogentech (Belgien) im Auftrag durchgeführt wurde, wurde ein 87,6 kDa großes Proteinfragment eingesetzt. Diesem Fragment fehlten die Sequenzen mit der höchsten Übereinstimmung mit HIF-1 α : die basische DNA-Bindedomäne und die Helix-*loop*-Helix-Domäne, was Kreuzreaktionen des Antikörpers mit HIF-1 α vermindern sollte. Über einen zusätzlich angefügten Bereich aus sechs Histidin-Resten wurde das Protein durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach der Immunisierung der Kaninchen und der Blutentnahme wurde das durch Zentrifugation gewonnene Serum durch Inkubation mit Protein-G-Sepharose affinitätsgereinigt.

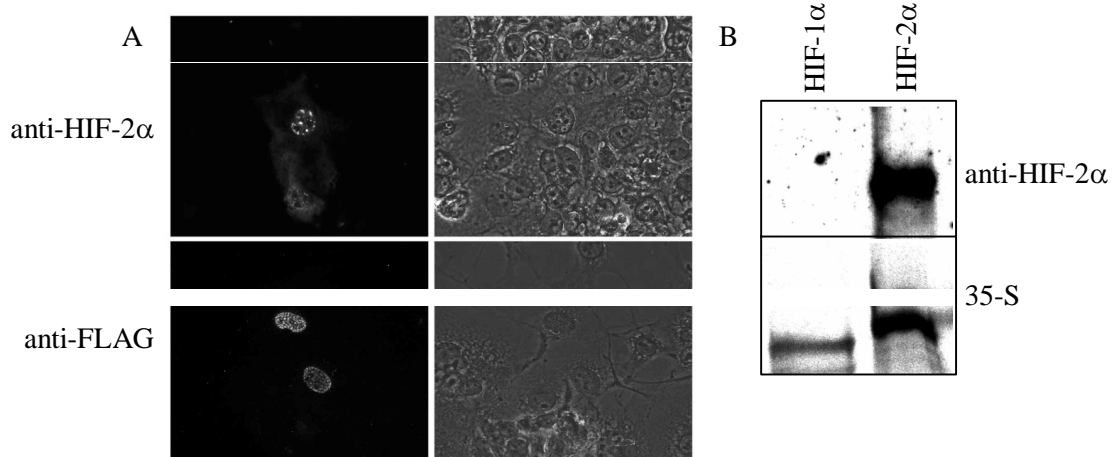


Abbildung 3-2: Proteinnachweis von HIF-2 α . A: Überexpression von HIF-2 α mit anhängem FLAG-*tag*. Oben: Nachweis mit α -HIF-Antiserum. Darunter Nachweis mit α -FLAG-Antiserum. Daneben ist jeweils die Phasenkontrastaufnahme der Zellen zu sehen. Maßstab: 2000:1. B: Western-Blot-Analyse der *in vitro* -translatierten HIF-2 α - und HIF-1 α -Proteine. Unten ist die autoradiographische Analyse der in Gegenwart von 35 S-Methionin translatierten Proteine, darüber die Analyse mit dem α -HIF-2 α -Antiserum zu sehen.

In der Immunfluoreszenzanalyse wurde das FLAG-markierte HIF-2 α in den Zellkernen von überexprimierenden Zellen sowohl vom anti-HIF-2 α -, als auch vom anti-FLAG-Antikörper erkannt (Abb. 3-2A). Darüberhinaus zeigt die Western-Blot-Analyse, daß der Antikörper HIF-2 α , aber nicht das nahe verwandte HIF-1 α erkennt (Abb. 3-2B). Diese Befunde zeigen, daß der hergestellte Antikörper das HIF-2 α -Protein erkennt und nicht mit HIF-1 α kreuzreagiert.

Die Expression von HIF-2 α wurde nun an Gefrierschnitten von Mäusehirnen untersucht. Dieses Organ wurde gewählt, da hier der Verlauf der Angiogenese und die Expression von

Flk-1 genau charakterisiert wurde. (Millauer *et al.*, 1993; Kremer *et al.*, 1997). Die Endothelzellen in den Kapillaren des Mäusehirns besitzen ihr Proliferationsmaximum am Tag 8 nach der Geburt. Ab Tag 21 ist keine Proliferation dieser Zellen mehr feststellbar. Entsprechend wurden Gefrierschnitte von Gehirnen 8 bzw. 30 Tage alter Mäuse angefertigt.

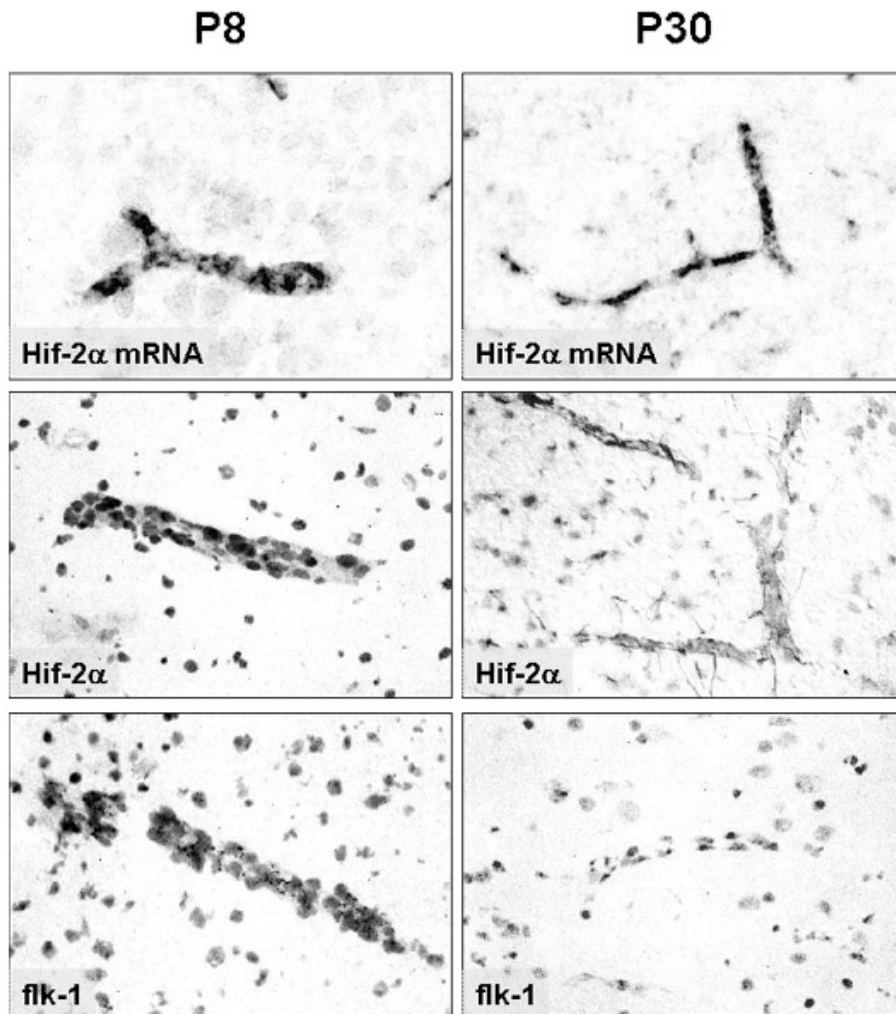


Abbildung 3-3: Expression von HIF-2 α und Flk-1 in Gefrierschnitten von juvenilen (postnatal Tag 8) und adulten Mäusen (postnatal Tag 30). 1000fache Vergrößerung. Oben: *in situ*-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten HIF-2 α -Sonde; darunter: Immunhistochemischer Nachweis von HIF-2 α und Flk-1.

Die *in situ*-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, murinen RNA-Sonde zeigte, daß die HIF-2 α -mRNA konstitutiv in postnatalen Hirnkapillaren exprimiert wird (Abb. 3-3). Dagegen war auf Proteinebene eine parallele Herunterregulierung des HIF-2 α -Proteins und Flk-1 zu sehen, das Protein konnte nur bis zum Tag 20 nach der Geburt detektiert werden. Eine starke Koexpression beider Proteine in Hirnendothelzellen war am Tag 8 zu beobachten, an dem die Proliferationsrate dieser Zellen maximal ist (Robertson *et al.*, 1985). HIF-2 α

befand sich zu diesem Zeitpunkt in den Zellkernen der Kapillarendothelzellen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung konnte die Expression des HIF-2 α -Proteins noch in Astrozyten festgestellt werden; in den Kapillaren war sie stark reduziert und nicht mehr in den Kernen lokalisiert. Am Tag 30 nach der Geburt, wenn die Proliferation der Hirnendothelzellen minimal ist (Robertson *et al.*, 1985), war Flk-1-Protein in den Kapillaren praktisch nicht mehr nachweisbar.

Diese Daten weisen darauf hin, daß die endotheliale Expression sowohl von HIF-2 α als auch von Flk-1 mit dem zeitlichen Verlauf der Proliferation von Endothelzellen der sich entwickelnden Hirnkapillaren korreliert. Damit bietet sich HIF-2 α als Kandidat für eine wichtige Rolle bei der Regulation von Flk-1 an.

3.2 HIF-2 α und HIF-1 α zeigen eine unterschiedliche Wirkung auf den Flk-1-Promotor

Die Ergebnisse aus den morphologischen Untersuchungen lassen es als möglich erscheinen, daß HIF-2 α die Flk-1-Expression reguliert. Im Flk-1-Promotor enthalten die 947 bp, die stromauf des Startcodons von Flk-1 liegen, stark positiv wirkende Elemente, die für eine endothelspezifische Expression eines *lacZ*-Reportergenkonstrukts in transgenen Mausembryonen notwendig sind (Rönicke *et al.*, 1996; Kappel *et al.*, 2000).

Um zu untersuchen, ob Mitglieder der HIF-Familie an der Regulation von Flk-1 beteiligt sein können, wurden HEK/293-Zellen mit HIF-2 α bzw. HIF-1 α und einem Reportergenkonstrukt kotransfiziert (Abb. 3-4). Dieses Konstrukt bestand aus dem Gen der *firefly*-Luziferase unter der Kontrolle des Flk-1-Promotors.

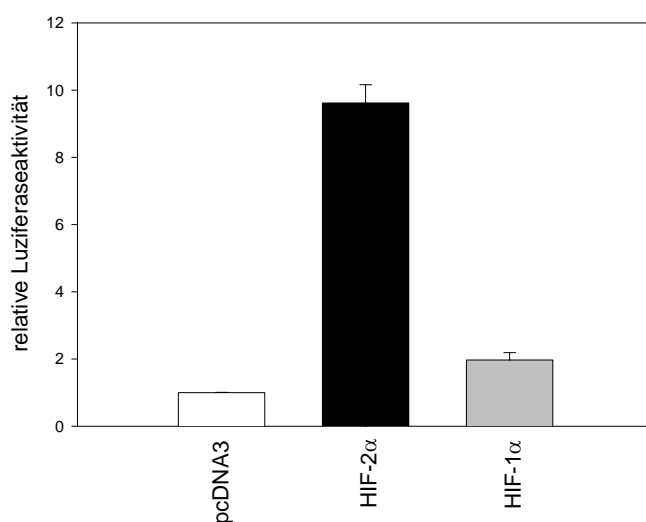


Abbildung 3-4: Aktivierung des Flk-1-Reportergenkonstrukts durch HIF-1 α und HIF-2 α . Dargestellt ist die relative Aktivierung in Bezug auf einen internen Standard. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pcDNA3 eingesetzt.

Das Flk-1-Reportergenkonstrukt wurde durch HIF-2 α um ein vielfaches stärker aktiviert als durch HIF-1 α . Mit einer Aktivierung, die nicht stärker als um den Faktor 2 war, zeigt sich HIF-1 α nur als schwacher Aktivator.

Um zu ermitteln, bei welchen Konzentrationen eine optimale Aktivierung des Reportergens erfolgt, wurden in einer 24-Lochplatte bei der Transfektion DNA-Mengen von 0-400 ng Transkriptionsfaktorplasmid eingesetzt (Abb. 3-5).

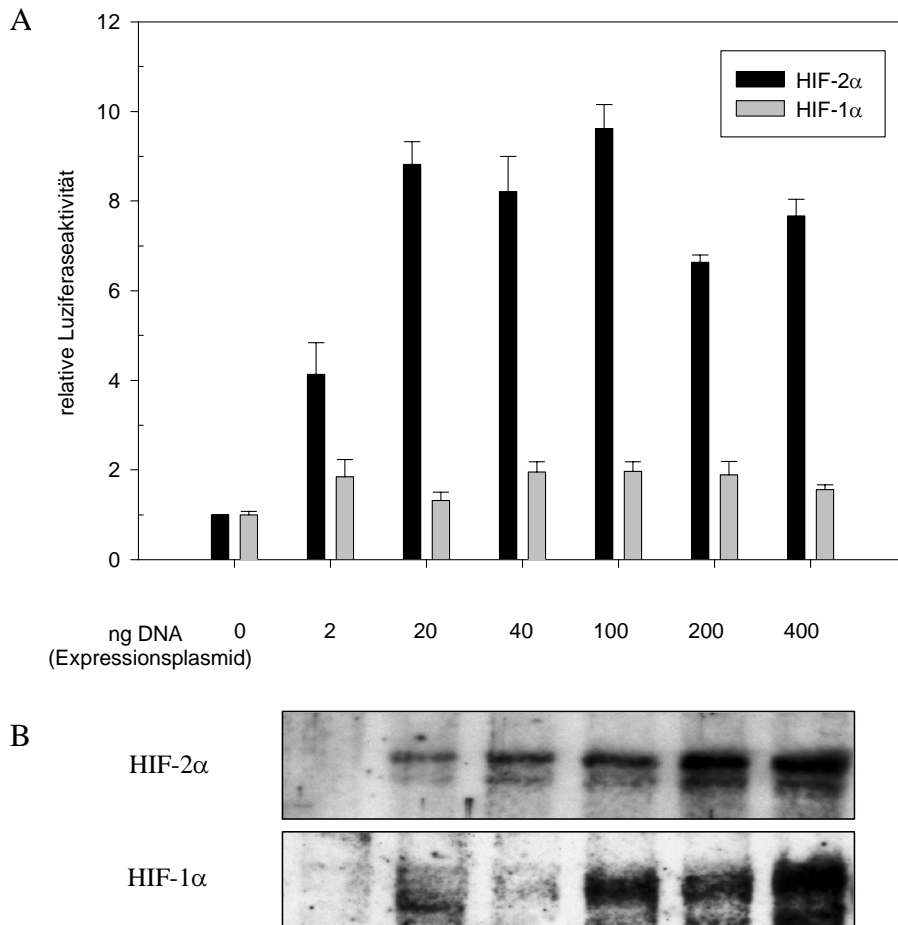


Abbildung 3-5: Aktivierung des Flk-1-Reportergenkonstrukts durch HIF-1 α und HIF-2 α . Dargestellt ist die relative Aktivierung in Bezug auf einen internen Standard (A). Der Western-Blot zeigt den Proteinnachweis in den entsprechenden Lysaten (B).

Wie die relative Luziferaseaktivität zeigte, war bereits ab einer Plasmidmenge von 20 ng eine Sättigung der Aktivierung erreicht (Abb. 3-5A), obwohl die Proteinexpression noch deutlich steigerbar war (Abb. 3-5B). Somit konnte ausgeschlossen werden, daß die geringere Aktivierbarkeit des Flk-1-Promotors durch HIF-1 α auf einem Mangel an Protein beruhte. Für weitere Versuche wurden Plasmidmengen von 100 ng für jeden Transformationsansatz eingesetzt.

Um zu überprüfen, inwieweit die beobachteten Effekte der Flk-1-Aktivierung von Zelllinien-spezifischen Faktoren beeinflusst wurden, wurde der Versuch in verschiedenen Zelllinien durchgeführt (Abb. 3-6).

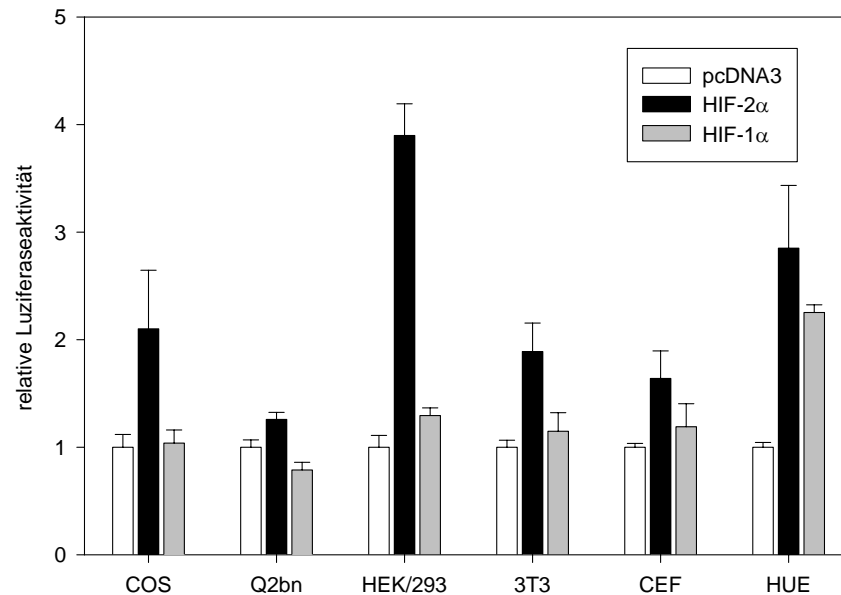


Abbildung 3-6: Relative Aktivierung von Flk-1 durch HIF2- α und HIF-1 α in verschiedenen Zelllinien. Die Werte der Kontrolltransfektion (pcDNA3) wurden willkürlich auf 1 und die anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

Die Aktivierung des Reporter-genkonstrukts durch HIF-2 α war deutlich stärker als die durch HIF-1 α . Das Ergebnis war in allen getesteten Zelllinien sehr ähnlich. Daraus läßt sich schließen, daß der zugrundeliegende Mechanismus der Aktivierung von *Flk-1* unabhängig vom Zelltyp ist. Da neben einer sehr guten Transfektionseffizienz bei HEK/293-Zellen auch eine starke relative Aktivierung des Reporter-genkonstrukts zu beobachten war, wurde diese Zelllinie in den weiteren Untersuchungen verwendet.

Es ist bekannt, daß die hypoxieinduzierbaren Faktoren unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert werden und ihre DNA-Bindefähigkeit verbessert wird (Salceda und Caro, 1997; Wiesener *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1999; Tanimoto *et al.*, 2000). Um nun auszuschließen, daß der gemessene Unterschied in der Aktivität von HIF-2 α und HIF-1 α durch deren unterschiedliche Funktionalität unter normoxischen Bedingungen verursacht wird, wurde ein Kontrollexperiment unter simulierten hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde dem Zellkulturmedium Kobaltchlorid zugesetzt. In Gegenwart des zweiwertigen Schwermetallions Co²⁺, das vermutlich über die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffradikalen hypoxieähnliche Bedingungen schafft, zeigen eukaryotische Zellen eine Genexpression, die der Antwort auf Hypoxie entspricht (Wang und Semenza, 1995; Agani und Semenza, 1998; Chandel *et al.*, 2000).

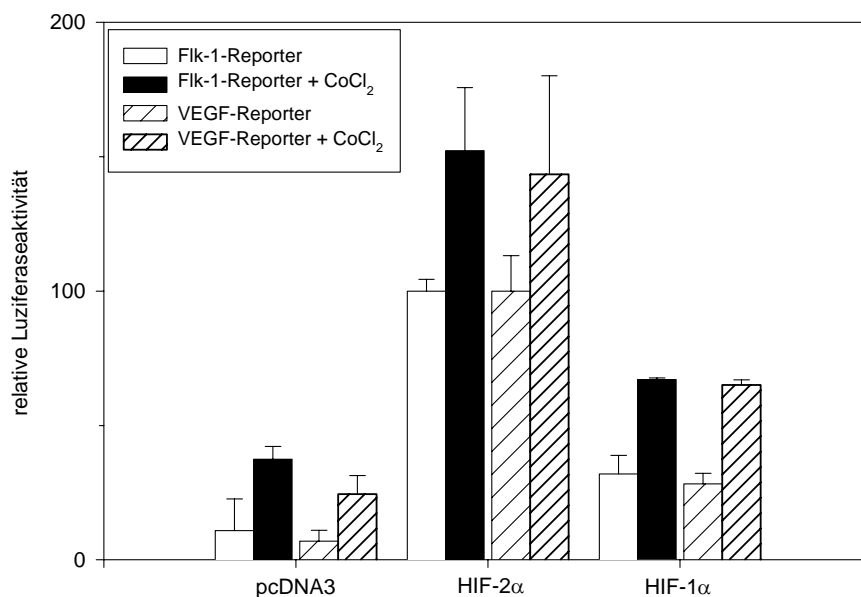


Abbildung 3-7: Aktivierung des Flk-1- und VEGF-Reporterergenkonstrukts durch HIF-2 α und HIF-1 α unter normoxischen und simulierten hypoxischen Bedingungen. Um die relative Aktivierung der beiden Promotoren besser vergleichen zu können, wurde jeweils die Induktion mit HIF-2 α ohne Kobaltchlorid auf 100 und die anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

Die Aktivierung des Flk-1-Reporterergenkonstrukts durch HIF-2 α und HIF-1 α wurde unter CoCl₂-Einfluß nahezu gleich stark gesteigert (Abb. 3-7). Bei HIF-2 α zeigte sich ein Faktor von 1,5 und bei HIF-1 α von 2. Als Kontrolle wurde in diesem Experiment das VEGF-Reporterergenkonstrukt als weiterer hypoxieinduzierbarer Promotor mitgeführt. Es ergaben sich

die gleichen relativen Induktionswerte durch Kobaltchlorid, wobei die absoluten Meßwerte etwa um den Faktor 25 höher waren.

3.3 Die unterschiedliche Aktivierung des Flk-1-Promotors durch HIF-2 α und HIF-1 α beruht auf Unterschieden im Carboxy-Terminus

Verschiedene funktionelle Bereiche innerhalb eines Transkriptionsfaktors sind an der DNA-Bindung, der Transaktivierung und der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren beteiligt (Abb. 3-8). Diese Domänen wurden in HIF-1 α identifiziert und charakterisiert (Jiang *et al.*, 1996; Pugh *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997; Tanimoto *et al.*, 2000). Sie sind auch in HIF-2 α konserviert (Ema *et al.*, 1999; O'Rourke *et al.*, 1999).

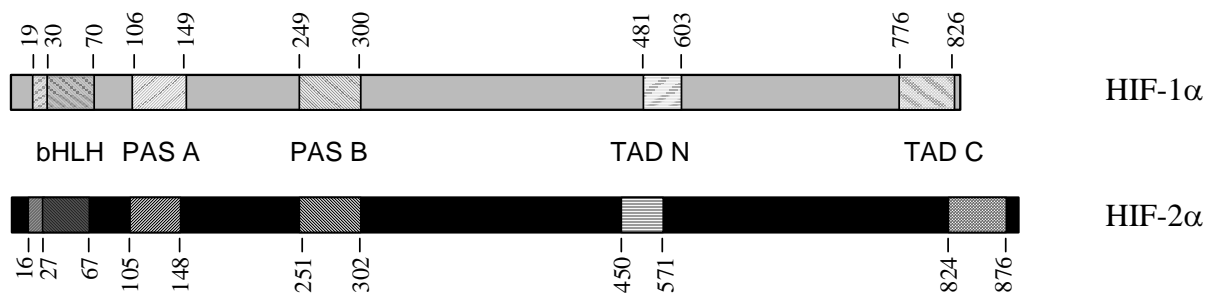


Abbildung 3-8: Funktionelle Domänen im HIF-1 α - (grau) und HIF-2 α -Molekül (schwarz). Die verschiedenen funktionellen Bereiche sind mit den Aminosäurenummern eingezeichnet. bHLH: basische Helix-loop-Helix-Domäne (DNA-Bindung), PAS A und B: PAS-Domänen (Zielgenerkennung und Dimerisierung), TAD N und C: Transaktivierungsdomänen (Wechselwirkung mit Kofaktoren und Transaktivierung des Zielpromotors). Die Positionen der verschiedenen Domänen wurden der Literatur entnommen: Jiang *et al.*, 1996; Flamme *et al.*, 1997; Pugh *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998; Ema *et al.*, 1999; Maemura *et al.*, 1999; O'Rourke *et al.*, 1999.

Der direkte Vergleich der Aminosäuresequenzen von HIF-2 α und HIF-1 α ermöglicht die Eingrenzung dieser Domänen innerhalb von HIF-2 α . Daneben erlaubt die Betrachtung von HIF-2 α -Molekülen evolutionsgeschichtlich weit entfernter Spezies, konservierte Bereiche zu identifizieren, die für HIF-2 α spezifisch sind und als regulatorische Elemente in Frage kommen. Je weiter die Spezies evolutionsgeschichtlich voneinander entfernt sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß mit konservierten Bereichen eines Proteins eine spezifische Funktion verknüpft ist.

Es wurde mit Hilfe von degenerierten Primern, die aus einem Vergleich der murinen und humanen Sequenzen abgeleitet wurden, ein 438 bp großes Fragment einer cDNA aus embryonaler Wachtelleber kloniert. Dieses PCR-Produkt wurde als Sonde eingesetzt, um eine Wachtel-cDNA-Phagenbank zu hybridisieren. Drei Klone wurden isoliert und durch Restriktionsanalysen kartiert. Ein 3 kb langer Klon wurde komplett durchsequenziert (Sequenz s. Anhang).

Der längste offene Leserahmen kodiert für ein 870 Aminosäuren langes Protein, das zu 71% mit dem murinen und zu 73% mit dem humanen HIF-2 α und zu 47% mit dem murinen HIF-1 α identisch ist (Abb. 3-9).

```

qHIF2 $\alpha$  1 MTADKEKKRSSSERRKEKSRDAARCRRSKETEVFYELAHLELPLPHNVSSHLDKASIMRLAISPLRTHKLLSSVCADNENELEADQQMDNL
mHIF2 $\alpha$  1 -----L-----S-----SE--S-A-----
mHIF1 $\alpha$  1 -----M-----S--T-S-----Q-----N-----V--T--Y--VR--DA_GGLD--D-MKA---CR

qHIF2 $\alpha$  91 YLKALEGFIIVVTQDGMIFLSENVNKYMGTLQVELTGHISIFDFTHPDHEEIRENLSLKNPGFSGKKNKEMSTERDFMFMKCTVTRNG
mHIF2 $\alpha$  91 -----IS-F-----T--S--S-DV-----
mHIF1 $\alpha$  80 -----D--VM-L-D-----VYI-D--N-----F--A--V-----M--M--HR--__VR-G-ELN-C-S--L-----L-S--

qHIF2 $\alpha$  181 RTVNLKSATWKLHCTGQVKVYNTCPPHL_LCGYKEPLLTCLIMCEPIQHPSNIDIPLDSKTFMSRHSMDMKFTYCDDRITELIGYHPE
mHIF2 $\alpha$  181 -----R--N--SS--S-----S-----HM-----L-----
mHIF1 $\alpha$  168 --M-I-----HIH--D-_NSNQPQ--Y-K-PM--VLI---P---E-----L---L---S---E---M--E--

qHIF2 $\alpha$  270 ELLGRSVYEFYHALDSENMTKSHQNLCTKGQVVTGQYRMLAKHGGYVWLETQGTVIYNTRNLQPQCIICVNYVLSEIEKNDVVFMSMDQTE
mHIF2 $\alpha$  271 -----A-----S-----P-----M-----
mHIF1 $\alpha$  257 -----I--Y-----DHL--TT-WDMF----T-----R----V--A----TK-S----V----V-G-IQH-LI--LQ--

qHIF2 $\alpha$  360 SLFKPHL_LTIS_TAFENGISRDKSDDLFTKLKEEPEEVAQLAPTPGDALISLDFELHPGI_____QKFEEPPDYTSAVLT_____
mHIF2 $\alpha$  361 -----MAMN-IFDSSDDVAVTE--NY-----L-----S-----N-D--SA-GK-I-P
mHIF1 $\alpha$  347 -VL--VESSQMKMTQLFTK-E_SEDTSC--D---K--DALTL--AA--T-----SDQTETED-QLEDVPL-NDVMFPSSNEKL

qHIF2 $\alpha$  435 _____PNKPWPVEVKSHAAQGETLTP_____SFTMPQ_IPPGNSTPSASSNSSCSTPNSPEDYYSVDDDLKIEVIE
mHIF2 $\alpha$  434 _____GQ--AAGLR--S--S-SGSL-_____A--V--AGT--T-----S-----S--LENP-----
mHIF1 $\alpha$  432 NINLAMSPL-SSET-KPLR---DPALNQEVALKLESSESLEGL-----IQDQPAS-DG-TRQ-SPE----SE-CFD-DS-MVNVF_E

qHIF2 $\alpha$  502 ___KLFAMDTESKQCSNQ_TDFNELDLETLAPYIPMDGEDF_QLSPICQEERPHSESAQNT_QONLSSMSTIFQP_VASASQNQFLPEK
mHIF2 $\alpha$  502 -----PRDPGST-_-S-----P--PLMP--P-P-P-HCF-T-TS----LTPG-THGP-FLD-
mHIF1 $\alpha$  521 LVE---E--A-NPFSTQD-LDLEM-APYIPMDDDFLAS-D---LESNSPSPSPMSTV-CF-QTQLQKPTITATATTTATTTDESKTE

qHIF2 $\alpha$  585 YCPQLSNKNINPGHGLSSVFFNMSRSLPPYHNQASTPLSSMGGRPNTQWPPDPPLEYVPAKWRLMD_KYS_GTL_SSSPSGPPIH
mHIF2 $\alpha$  587 -PQ--ESRKTESE-WPM--I--DAG-KG--S-CCG-----S-----HFG-T--PVG-QSAE-L-A-PVG--QLE--SA
mHIF1 $\alpha$  611 TKDNKEDIKILIASPSSTQV-QETTT__-ASAYSGTHSRASPRAGKRVIEQTDKAHPRSLNLSATLNRNTVPEEELNPKTIA-QNAQ

qHIF2 $\alpha$  670 SPNMPVYKKRLLDGLGQRG_IDINPARIALSNLKLKRLQLDYEEQAMQQLTGGDPSAINPSQLMWKRMKFLKGENCSSLTEKKSLSSTSVL
mHIF2 $\alpha$  677 P-HVSMF-M-SAKDF-A--PYMMS--M-----K-----E-----F-ETS---LPGTSS-H-----S-M-GT-P-MPD-_TI-GNMA
mHIF1 $\alpha$  700 R--KMEHDGSLFQAAGIGTLLQQPDCAPTMSLSWKRKVCFISSEQNGTEQKTIILIP_____

qHIF2 $\alpha$  759 TDFVCNS_RGLSQPMNQLQLQQQQQPTCGSPGENLKAGAFSPQFYSPHYQDYTVQSAHKVSGVTSRLLGSSYEPYLLPELTRYDCEVN
mHIF2 $\alpha$  766 P---TQK-M---G--LRH-P-___P-P-FTRNS--A-T-_P--C-ASQF---GPPG-Q-----A-----P-F-----
mHIF1 $\alpha$  758 _____DLAC----Q-MDVSQ--Q--S-----

qHIF2 $\alpha$  848 VPVLGSSTLLQGSELLRALDQTT
mHIF2 $\alpha$  852 ---P-----RD-----A-
mHIF1 $\alpha$  786 A-IQ--RN----E-----VN
    
```

Abbildung 3-9: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen des murinen HIF-2 α und dem homologen qHIF-2 α aus der Wachtel mit dem murinen HIF-1 α . Sequenzunterschiede sind in den unteren Sequenzen (mHIF-2 α und mHIF1-a) durch die entsprechenden Aminosäuren gekennzeichnet, zusätzliche Aminosäuren in den jeweils anderen Sequenzen sind durch Unterstriche markiert. Grau hinterlegt ist ein Bereich besonders hoher Homologie zwischen qHIF-2 α und mHIF-2 α , der TAD2 N benannt wurde.

Die Sequenz von qHIF-2 α weist auf Aminosäureebene eine Homologie von 71% mit dem murinen und 73% mit dem humanen Homologen auf. Die Homologie mit mHIF-1 α beträgt nur 47%. Innerhalb des Moleküls gibt es Bereiche, die besonders konserviert sind. Diese Übereinstimmungen korrelieren mit bekannten funktionellen Domänen. So findet sich die größte Homologie innerhalb der bHLH-PAS-Domänen (92% Identität innerhalb der Aminosäuren 15–290 zwischen qHIF-2 α und mHIF-2 α und 69% Identität zwischen qHIF-2 α und mHIF-1 α) und innerhalb der Transaktivierungsdomäne TAD C (93% Identität innerhalb der Aminosäuren 824–876 der beiden HIF-2 α -Homologen und 53% zwischen qHIF-2 α und mHIF-1 α) (Ema *et al.*, 1999). Die große Übereinstimmung der DNA-Bindedomänen zwischen den homologen Molekülen verschiedener Spezies und auch zu dem verwandten bHLH-Transkriptionsfaktor HIF-1 α zeigt, daß diese Domänen generell für die Bindung der Mitglieder dieser Transkriptionsfaktor-Familie an DNA genutzt werden und daher speziesunabhängig konserviert werden. Die Spezifität eines Transkriptionsfaktors wird stärker über die transaktivierenden Domänen bestimmt. Dies spiegelt sich in der geringeren Übereinstimmung der TAD C-Domäne wieder, die jedoch bei den Homologen aus Maus und Wachtel stark konserviert ist. Die schon beschriebene Transaktivierungsdomäne TAD N (Aminosäuren 450-571) ist zwischen mHIF-2 α und qHIF-2 α zu 67% identisch, während die Übereinstimmung zum murinen HIF-1 α nur 28% beträgt. Ein Bereich besonders großer Übereinstimmung zwischen mHIF-2 α und qHIF-2 α findet sich zwischen den beschriebenen Domänen TAD N und TAD C (Aminosäuren 619-642, TAD2 N). Während die Aminosäuren der beiden verschiedenen Spezies zu 96% identisch sind, gibt es bei HIF-1 α keine Übereinstimmungen.

Diese Daten legen nahe, daß die Transaktivierungsdomänen, besonders die Domänen TAD N und TAD2 N, für die Spezifität von HIF-2 α bei der Aktivierung der Zielgene von Bedeutung sind.

Um die Domänen innerhalb der HIF-Moleküle zu identifizieren, die für die differentielle Aktivierung des Flk-1-Promotors verantwortlich sind, wurden verschiedene HIF-2 α -Mutanten generiert, indem Bereiche deletiert oder gegen die entsprechenden Bereiche aus HIF-1 α ausgetauscht wurden (Abb. 3-10). Dies wurde mit Hilfe von PCR-Techniken durchgeführt. Dabei wurde in einem ersten Schritt ein Oligonukleotid als Primer eingesetzt, das die gewünschte Mutation enthielt, bzw. den zu mutierenden Bereich überspannte und auf diese Weise ein Teilfragment mit der gewünschten Änderung generierte. In einem zweiten Schritt

wurde dieses Fragment mit dem Rest des Ausgangsfragments fusioniert. Bei diesem Schritt wurde dem Konstrukt noch eine Erkennungssequenz, der sogenannte FLAG-Tag, angehängt. Das von diesem DNA-Abschnitt kodierte Protein-"Anhänger" kann in morphologischen Untersuchungen und Western-Blot- Analysen mit einem anti-FLAG-Antikörper detektiert werden.

Name des Konstrukts	Art und Position der Mutation	Benutzte Primer
HIF-2 α	Wildtyp	
HIF-1 α	Wildtyp	
HIF-2 α /1 α	Chimäre, AS 1-310 von HIF-2 α , AS 311-758 von HIF-1 α	HIF PAS d1 hyb; Vektorprimer
HIF-2 α dnb	Deletion, AS 1-24	HIF 2 tn u1 HIF 2 Flag d1
HIF-2 α dn	Deletion, AS 1-24 und 325-803	HIF 2 tn u1 HIF2 Flag dn2
HIF-2 α Δ TAD N	Deletion, AS 515-559	dTAD N HRF Vektorprimer
HIF-2 α Δ TAD2 N	Deletion, AS 595-617	dTAD2 N HRF Vektorprimer
HIF-2 α Δ TAD C	Deletion, AS 752-809	dTAD C Flag

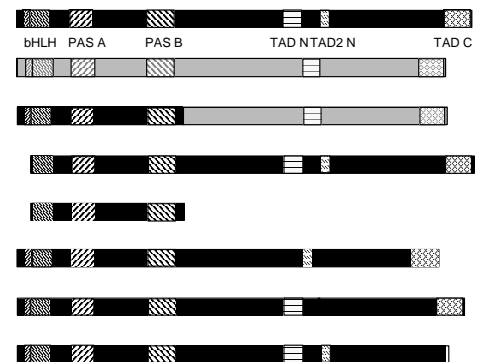


Abbildung 3-10: Identifikation und Mutation funktioneller Domänen. Die Tabelle zeigt die für die jeweilige Mutation verwendeten Primer, die Schemazeichnung den Aufbau der Konstrukte. Aufgeführt sind nur diejenigen Konstrukte, die in den anschließenden Experimenten interessante Effekte zeigten. Weitere Mutationen (z.B. HIF-2 α dnb Δ TAD N) wurden nicht weiter bearbeitet, da keine signifikanten Effekte zu beobachten waren.

Zunächst wurde überprüft, ob diese Konstrukte ohne Leserahmenverschiebung generiert wurden und damit in voller Länge translatiert werden konnten. Zu diesem Zweck wurde eine *in vitro*-Translation in Gegenwart von ³⁵S-markiertem Methionin durchgeführt und die entstandenen Proteine auf einem Polyacrylamidgel mit anschließender Autoradiographie in Hinblick auf ihre Größe ausgewertet (Abb. 3-11).

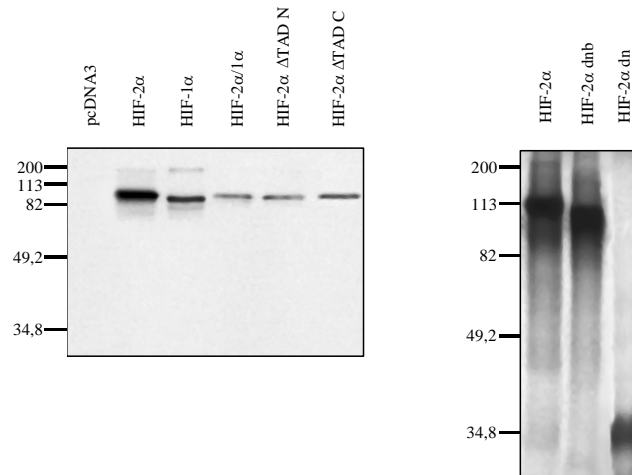


Abbildung 3-11: *in vitro*-Translation von HIF-2 α , HIF-1 α und den Mutationen. Links: Mutationen im C-Terminus, rechts: Mutationen der DNA-Bindedomäne. Die Größen sind in kDa angegeben.

Die Konstrukte wurden alle in Proteine der vorhergesagten Größe translatiert (Daten für HIF-2 α Δ TAD2 N nicht gezeigt). Die zusätzlich durchgeführte DNA-Sequenzierung zeigte keine anderen als die beabsichtigten Mutationen.

Es wurde nun überprüft, ob die Mutanten in eukaryotischen Zellen wie die Wildtyp-Proteine exprimiert und in den Zellkern transportiert werden. Die Lokalisation der Proteine wurde nach einer Immunfluoreszenz-Markierung mit einem gegen HIF-2 α bzw. gegen das C-terminale FLAG-Epitop gerichteten Antikörper unter dem Mikroskop ausgewertet (Abb. 3-12).

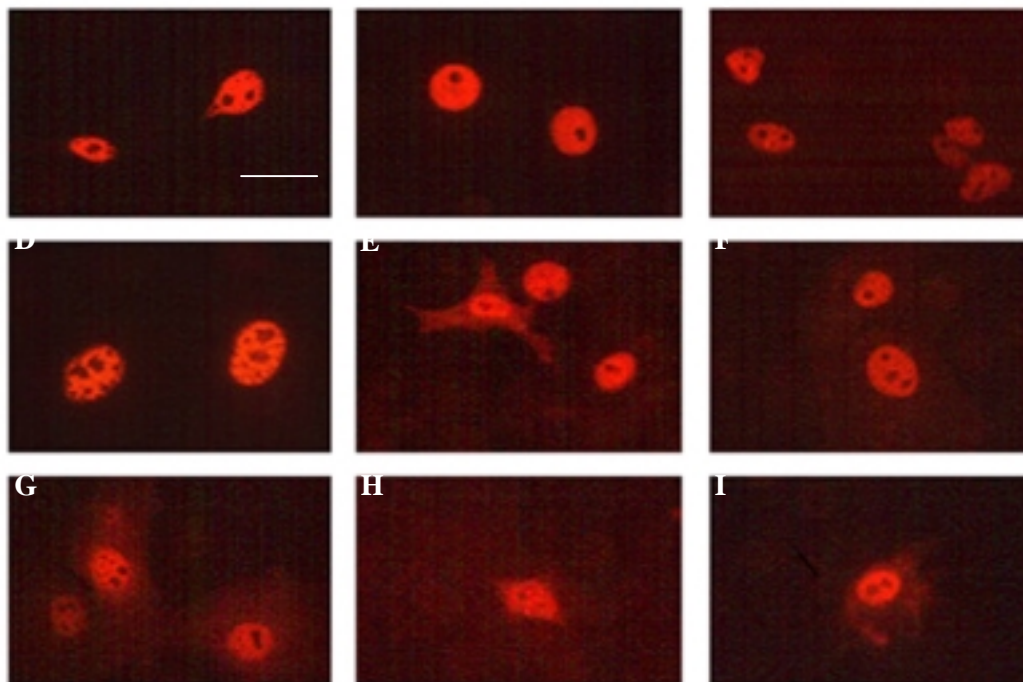


Abbildung 3-12: Nachweis der transfizierten Proteine durch Immunfluoreszenz. Nachgewiesen wurden: A: HIF-2 α (Wildtyp), B: HIF-1 α , C: HIF-1 β /ARNT, D: HIF-2 α /1 α ; E: HIF-2 α dnb; F: HIF-2 α dn; G: HIF-2 α Δ TAD N; H: HIF-2 α Δ TAD2 N; I: HIF-2 α Δ TAD C. Für B, C und F wurde der anti-FLAG-Antikörper (Eastman Kodak Company, New Haven), für die anderen Proteinnachweise der anti-HIF-2 α -Antikörper (diese Arbeit) als Erstantikörper eingesetzt. Maßstab (eingezeichnet in A): 5 μ m.

Alle Varianten der HIF-Proteine waren wie die Wildtyp-Proteine in den Zellkernen lokalisiert. Im Cytoplasma ließ sich vergleichsweise wenig Protein nachweisen. Die Nukleoli waren frei von überexprimiertem Protein.

Die Mutanten von HIF-2 α wurden nun in Reportergenversuchen eingesetzt. Untersucht wurde ihre Fähigkeit, den Flk-1-Promotor zu aktivieren. Darüber hinaus wurde betrachtet, ob sie bei Kotransfektion mit dem Wildtyp-HIF-2 α dessen Aktivität herabsetzen, also dominant negativ wirken (3-13).

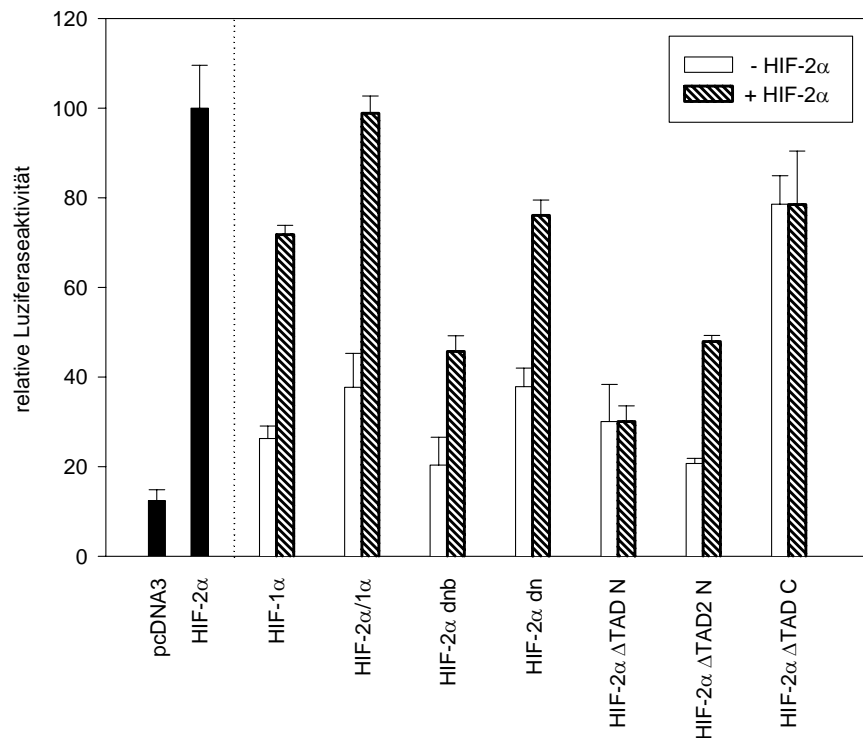


Abbildung 3-13: Aktivierung des Flk-1-Reportergenkonstrukts bei Transfektion von HIF-2 α , HIF-1 α bzw. der Mutanten (weiße bzw. schwarzen Balken). Die schraffierten Balken zeigen das Ergebnis der Kotransfektion von HIF-2 α zusammen mit dem jeweiligen Interaktionspartner. Die Ergebnisse sind relativ zur Aktivierung dargestellt.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß alle Mutanten den Flk-1-Promotor schwächer aktivieren als das Wildtyp-HIF-2 α (weiße Balken). Die Chimäre HIF-2 α /1 α lag dabei in allen durchgeführten Experimenten deutlich niedriger als HIF-2 α , oft auf dem Niveau von HIF-1 α . Das deutet darauf hin, daß die für die Aktivierung wichtigen Bereiche C-terminal zu den PAS-Domänen liegen. Dies wird durch die anderen Ergebnisse bestätigt. Während die Deletion der C-terminalen Transaktivierungsdomäne TAD C nur einen sehr schwachen Effekt hat, führt die Deletion der weiter N-terminal gelegenen Transaktivierungsdomänen TAD N und TAD2 N zu einer stark abgeschwächten Aktivierung von Flk-1. Wird die DNA-Bindung durch Deletion der basischen Domäne unterbunden (HIF-2 α dnb und HIF-2 α dn), zeigt sich ebenfalls eine Abschwächung der Flk-1-Aktivierung.

Um zu untersuchen, ob diese Mutanten mit dem Wildtyp-HIF-2 α um die Bindung auf dem Flk-1-Promotor und die Aktivierung des Zielgens konkurrieren können, wurden sie

zusammen mit HIF-2 α -Wildtyp-Plasmid kotransfiziert. Die Ergebnisse werden durch die schraffierten Balken dargestellt (s. Abbildung 3-12). Eine signifikante Reduktion der Flk-1-Aktivierung verursachen vor allem die Mutationen der DNA-Bindedomäne und der weiter N-terminal gelegenen Transaktivierungsdomänen TAD N und TAD2 N. Daraus läßt sich schließen, daß neben der DNA-Bindung der Bereich, in dem diese Transaktivierungsdomänen liegen, für die Aktivierung des Promotors von Flk-1 benötigt wird.

HIF-1 α setzt bei einer Kotransfektion mit HIF-2 α die Transaktivierung von Flk-1 im Vergleich zur Aktivierung nur durch HIF-2 α herab. Eine mögliche Erklärung für den dominant negativen Effekt der Mutanten könnte also sein, daß sie mit HIF-2 α um den Dimerisierungspartner HIF-1 β /ARNT konkurrieren, der für die DNA-Bindung benötigt wird. Eine Überexpression von HIF-1 β sollte diesen Effekt also aufheben. Daher wurde ein Test durchgeführt, bei dem zusätzlich zu den Komponenten des vorherigen Experimentes noch HIF-1 β -Plasmid kotransfiziert wurde (Abb. 3-14). Von den Mutanten wurde jeweils ein Vertreter der beiden Mutantengruppen (DNA-Bindung und Transaktivierung) eingesetzt.

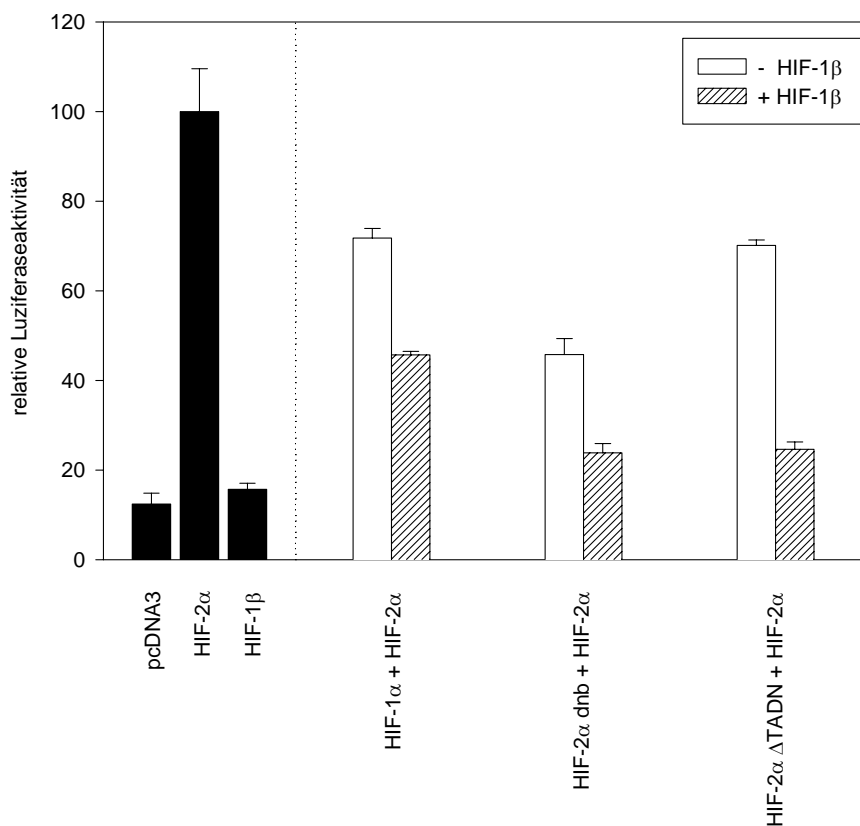


Abbildung 3-14: Einfluß der Kotransfektion von HIF-1 β auf den dominant negativen Effekt der HIF-2 α -Mutanten bei der Aktivierung des Flk-1-Reportergenkonstrukts. Die schwarzen Balken zeigen die Aktivierung von Flk-1 bei der Transfektion von Kontrolle (Leervektor), HIF-2 α (Wildtyp) und HIF-1 β , die weißen Balken die Aktivierung bei Transfektion der Mutanten bzw. von HIF-1 α .

Die verstärkte Überexpression von HIF-1 β /ARNT kann den dominant negativen Effekt der Kotransfektion der Mutanten zusammen mit HIF-2 α nicht kompensieren. Durch Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, daß HIF-1 β in diesen Kotransfektionen überexprimiert wurde (Abb. 3-15).

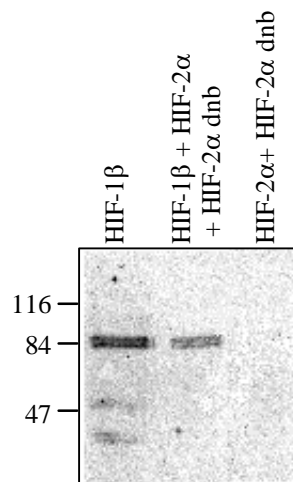


Abbildung 3-15: Western-Blot-Analyse der für die Reporteragen-Messungen eingesetzten Lysate. Als Erstantikörper wurde der anti-HIF-1 β Antikörper der Firma Novus Biologicals eingesetzt.

Daher kann davon ausgegangen werden, daß die verminderte Aktivierung von Flk-1 nicht durch einen Mangel des Dimerisierungspartners verursacht wird. Warum in diesem Experiment die Aktivierung durch Zugabe von HIF-1 β noch zusätzlich geschwächt wird, muß noch genauer untersucht werden, die Ursache hierfür ist unklar.

3.4 Die HIF-2 α -Bindung erfolgt an HRE-verwandte Sequenzen im Flk-1-Promotor

Durch Sequenzanalyse mit dem MatInspector™ Programm (Transfac Datenbank, GBF/Braunschweig) wurde der Flk-1-Promotor auf potentielle Bindestellen für HIF-2 α untersucht.

An den Positionen -140 und -78 wurden zwei GGCGTG-Motive gefunden, die die Bindestequeuz CGTG für HIF-1 β /ARNT beehalten (Wenger und Gassmann, 1997) und damit für das Dimer aus HIF-2 α und HIF-1 β als Bindestelle dienen können (Abb. 3-16). Direkt benachbart zu diesen potentiellen HIF-2 α -Bindestellen (HBS1 und HBS2) liegt jeweils eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Ets-1 (EBS3 und EBS6), die sich bereits in *in vitro* Analysen als funktionell aktiv herausgestellt hatten (Kappel *et al.*, 2000).

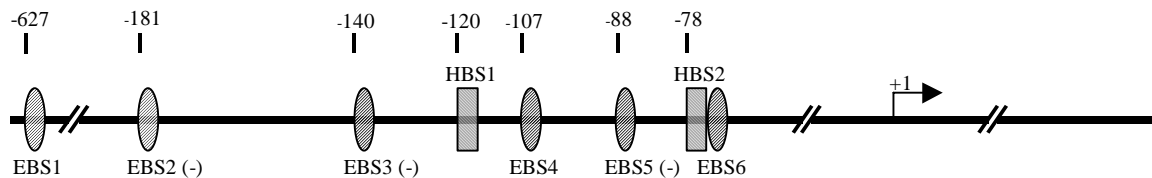


Abbildung 3-16: Lokalisation der Ets-1- und HIF-2 α -Bindestellen im Flk-1-Promotor. Die für die Flk-1-Aktivierung wichtigen Bindestellen EBS3 und EBS6 liegen direkt neben den potentiellen HIF-2 α -Bindestellen HBS1 bzw. HBS2.

Um herauszufinden, ob die beiden potentiellen HIF-Bindestellen den HIF-Komplex binden können, wurden Gelretardierungsexperimente (*elektrophoretic mobility shift assay*, EMSA) durchgeführt. Hierzu wurde aus bovinen Aortenendothelzellen (BAE) ein Kernproteinextrakt hergestellt. Die als Sonde eingesetzten doppelsträngigen, radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotide enthielten neben den Bindestequeuzen auch deren flankierende Bereiche. Als Kontrollen wurden neben dem Wildtyp modifizierte Oligonukleotide eingesetzt, bei denen die potentielle HIF-2 α -Bindestelle durch ein klassisches HRE bzw. durch eine willkürlich veränderte Sequenz ersetzt wurde. Um eine eventuell zu beobachtende Retardierung des Oligonukleotids, den sogenannten *Shift* zu verifizieren, wurde eine Kompetition mit spezifischen und unspezifischen, nicht radioaktiven Oligonukleotiden durchgeführt. Bei einem spezifischen Komplex sollte die entsprechende Bande auf dem Röntgenfilm bei zunehmender Konzentration des spezifischen Kompetitors schwächer werden. Dagegen sollte die spezifische Bande durch die Zugabe eines unspezifischen Kompetitors nicht beeinflusst

werden. Durch Gelelektrophorese wurden die DNA-Proteinkomplexe aufgetrennt und nach Autoradiographie analysiert (Abb. 3-17).

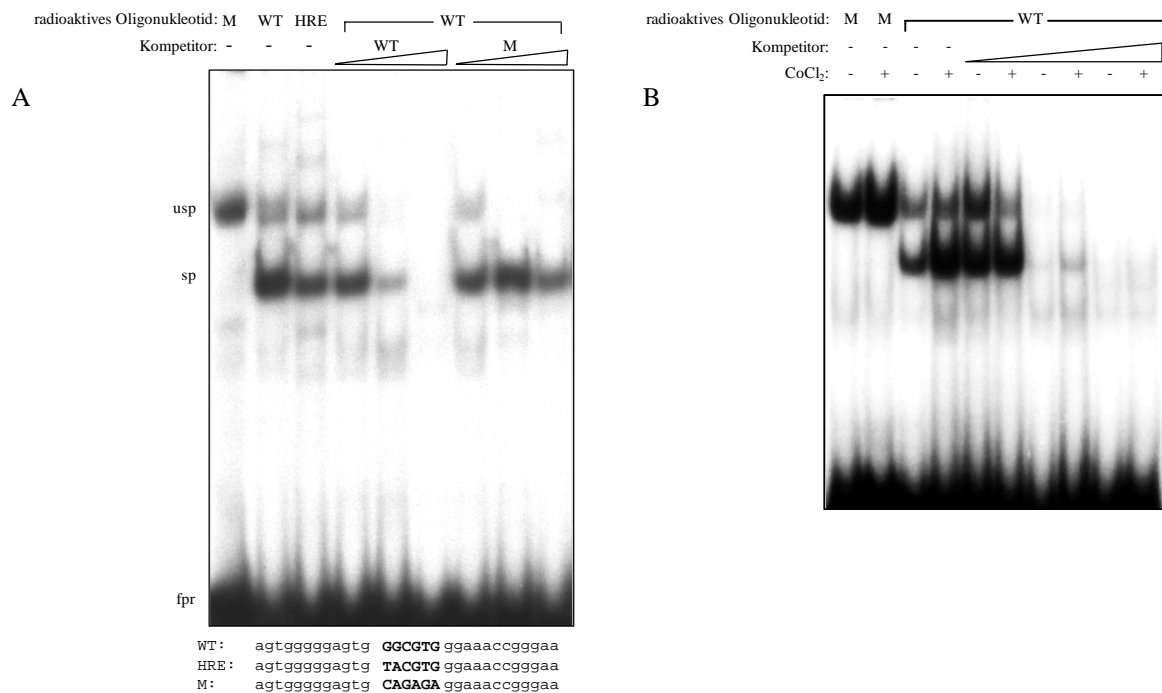


Abbildung 3-17: A: Gelretardierungsanalyse der potentiellen HIF-2 α -Bindestelle HBS1 im Flk-1-Promotor. Proteine aus dem Zellkernextrakt aus BAE-Zellen binden das radioaktiv markierte Oligonukleotid. B: Vergleich der DNA-Bindung mit und ohne Stimulierung durch CoCl₂. Aufgelistet sind die Sequenzen der kodierenden Stränge der entsprechenden Doppelstrang-Oligonukleotide (WT: Wildtyp HBS; HRE: HBS wurde durch eine klassische HRE-Sequenz ersetzt; M: mutierte HBS-Sequenz). Der nicht radioaktive Kompetitor wurde im Verhältnis 1:1, 1:100 und 1:500 zum markierten, spezifischen Oligonukleotid zur Bindereaktion hinzugegeben. (usp: unspezifischer Komplex; sp: spezifischer Komplex; fpr: freie Probe, ungebundenes Oligonukleotid)

Sämtliche eingesetzten, radioaktiv markierten Oligonukleotide bildeten mit dem Zellkernextrakt einen unspezifischen Komplex (usp), der bei Zugabe von spezifischen wie auch unspezifischen, nicht radioaktiven Kompetitoren mit steigender Kompetitor-konzentration verdrängt wurde. Bei Wildtyp HBS und dem Oligonukleotid mit dem klassischen HRE zeigte sich ein zusätzlicher Komplex, der etwas kleiner war. Die Bildung dieses Komplexes ließ sich nur mit dem spezifischen Kompetitor bei einem 500fachen Überschuß vollständig inhibieren (Abb. 3-17A).

Wurde in diesem Experiment ein Kernextrakt von BAE-Zellen verwendet, die zuvor für 16 h mit CoCl₂-haltigem Zellkulturmedium inkubiert wurden, so wurde diese spezifische Bande noch einmal um etwa den Faktor 2 verstärkt (Abb. 3-17B).

Dieser Befund deutet darauf hin, daß es sich bei dem DNA-bindenden Protein um einen hypoxieinduzierbaren Transkriptionsfaktor handelt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem an die Sonde bindenden Protein um HIF-2 α handelt, wurde dem Reaktionsgemisch bei der Bindereaktion anti-HIF-2 α -Antiserum zugesetzt (Abb. 3-18). Der Antikörper sollte den HIF-2 α /DNA-Komplex binden und die resultierende Bande aufgrund des größeren Molekulargewichtes des neuen Komplexes nach oben verschieben (*Supershift*).

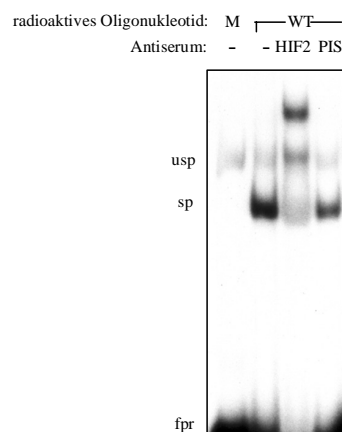


Abbildung 3-18: *Supershift*-Analyse der komplexbildenden Proteine des Retardierungsexperimentes. Gezeigt ist die Retardierung mit dem mutierten Kontrolloligonukleotid (M -) und dem Wildtyp (WT -). In den Bahnen daneben ist das Ergebnis der Inkubation mit anti-HIF2 α -Antiserum (WT HIF2) und Präimmunserum (WT PIS) zu sehen. (usp: unspezifischer Komplex; sp: spezifischer Komplex; fpr: freie Probe, ungebundenes Oligonukleotid)

Nach Zugabe des anti-HIF-2 α -Antikörpers wurde eine neue Bande oberhalb der unspezifischen Bande sichtbar, während die spezifische Bande unterhalb schwächer wurde. Da dieses Phänomen bei der Inkubation mit Präimmunserum nicht auftrat und der Antikörper nicht mit HIF-1 α kreuzreagiert, was in Western-Blot-Analysen überprüft wurde (s. Abbildung 3-1), ist eindeutig, daß HIF-2 α aus dem Proteinextrakt der Endothelzellen an das HBS1-Motiv des Flk-1-Promotors bindet. Bei Einsatz des entsprechenden Oligonukleotids mit der HIF-2 α -Bindestelle HBS2 wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (Daten nicht aufgeführt).

Um zu überprüfen, ob an beide HBS-Motive auch dann Proteine aus dem Kernextrakt binden, wenn nicht nur kurze Oligonukleotide in der Bindereaktion zur Verfügung stehen, sondern ein längeres Promotorfragment, wurde eine sogenannte DNaseI *footprint*-Analyse durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde ein 226 bp langes Fragment aus dem Flk-1-Promotor (-194 bis +32, bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt) durch PCR hergestellt, das die HBS1- und HBS2-Motive beinhaltet. Dieses Fragment wurde radioaktiv markiert und nach Inkubation mit Kernextrakt von BAE-Zellen einer DNaseI-Inkubation unterzogen (Abb. 3-19). DNaseI baut DNA-Stränge ab, wobei es zwar hypersensitive Bereiche gibt, die Restriktion ansonsten aber statistisch verläuft. Dort, wo Transkriptionsfaktoren gebunden haben, ist die DNA vor der Spaltung durch die DNaseI geschützt. An den Rändern dieser protegierten Bereiche findet ein bevorzugter Abbau statt, es treten neue DNaseI-hypersensitive Stellen auf.

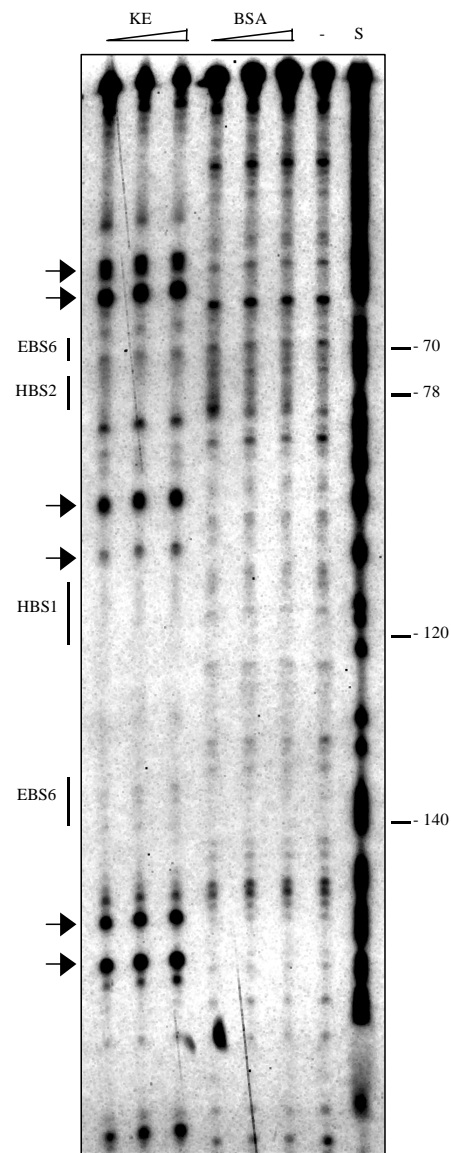


Abbildung 3-19: DNaseI *footprint* Analyse eines Fragmentes aus dem Flk-1-Promotor. Aufgetragen sind die Reaktionsergebnisse mit 2, 10 und 20 μ g Kernextrakt (KE), den gleichen Mengen an BSA und ohne Proteinzugabe. Rechts ist die GA-Leiter einer Maxam-Gilbert-Sequenzierungsreaktion zu sehen (S). Die Pfeile markieren DNaseI-hypersensitive Bereiche.

Beide HIF-2 α -Bindestellen waren in der DNaseI *footprint*-Analyse vor der Spaltung durch das Enzym geschützt. Im Vergleich zu den Kontrollen ist deutlich zu sehen, daß in den entsprechenden Bereichen die Banden bei Zugabe von Kernextrakt fehlten und dafür in den flankierenden Regionen neue Banden zu finden waren, die DNaseI-hypersensitive Bereiche anzeigen. Auffällig ist, daß neben den beiden HIF-2 α -Bindetellen HBS1 und 2 auch die jeweils benachbarten Bindestellen für Ets-1, EBS3 und EBS6, besetzt waren.

3.5 HIF-2 α und Ets-1 kooperieren bei der Aktivierung des Flk-1-Promotors

Wie oben gezeigt, liegen im Flk-1-Promotor HIF-2 α -Bindestellen direkt neben funktionellen Ets-Konsensus-Sequenzen. Von den Mitgliedern der Ets-Familie ist bekannt, daß sie bei der Aktivierung ihrer Zielgene mit anderen Transkriptionsfaktoren zusammenwirken. (Dittmer und Nordheim, 1998). Das Mitglied der Ets-Familie Ets-1 ist während der Angiogenese im Endothel stark exprimiert (Wernert *et al.*, 1992; Calmels *et al.*, 1995). Die Untersuchungen wurden daher auf Ets-1 beschränkt.

Von Ets-1 ist bekannt, daß es Promotoren endothelial exprimierter Gene aktiviert (Iwasaka *et al.*, 1996; Wakiya *et al.*, 1996; Schlaeger *et al.*, 1997; Watabe *et al.*, 1998; Dube *et al.*, 1999; Iljin *et al.*, 1999) und dabei auch synergistisch mit anderen Faktoren wirkt (Thomas *et al.*, 1997; Blumenthal *et al.*, 1999). Um der Frage nachzugehen, ob HIF-2 α und Ets-1 auf dem Flk-1-Promotor eine kooperative Interaktion eingehen können, wurden die entsprechenden Expressionsplasmide in Kotransfektionen für Reportergen-Analysen eingesetzt (Abb. 3-20).

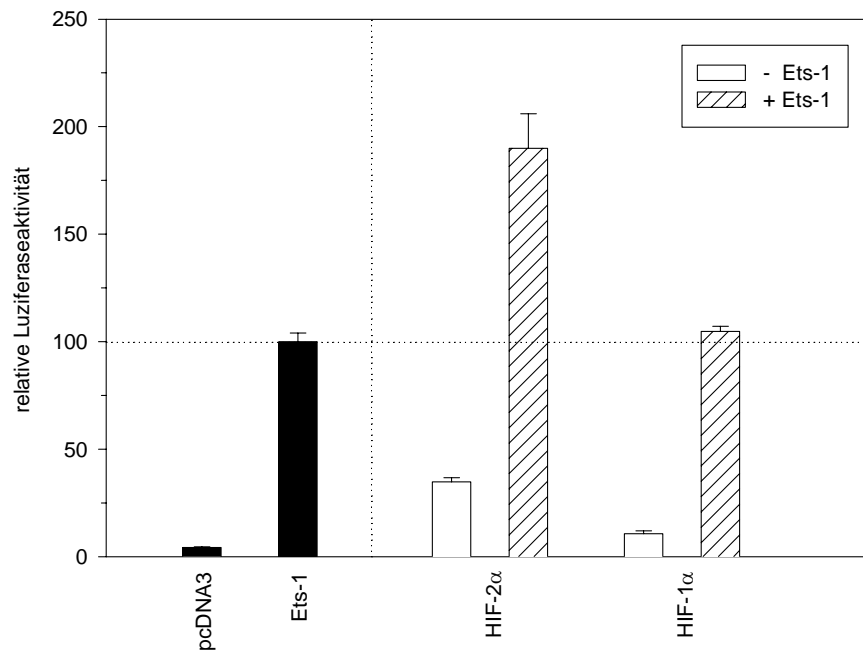


Abbildung 3-20: Kooperation von HIF-2 α und Ets-1 bei der Aktivierung von Flk-1. Die schwarzen Balken zeigen die Aktivierung des Reportergenkonstrukts durch pcDNA3 und Ets-1, die weißen Balken durch HIF-2 α bzw. HIF-1 α , die schraffierten Balken zeigen die Aktivierung bei Kotransfektion von Ets-1 und HIF-2 α bzw. HIF-1 α . Die Werte wurden relativ zu der auf 100 rLE (relative Luziferaseeinheiten) gesetzten Aktivierung durch Ets-1 dargestellt.

Bei der Kotransfektion von Ets-1 und HIF-2 α war ein deutlich überadditiver Effekt zu sehen. Während die Aktivierung des Reportergenkonstrukts bei der einfachen Transfektion der Transkriptionsfaktoren bei 100 rLE (Ets-1) bzw. bei etwa 35 rLE (HIF-2 α) lag, ergab die Kotransfektion beider Faktoren eine Aktivierung von etwa 190 rLE. Die Einzelwerte addierten sich also nicht nur, es zeigte sich ein Synergismus zwischen HIF-2 α und Ets-1. Dagegen war bei der Kotransfektion von Ets-1 und HIF-1 α dieser Effekt nicht zu finden. Innerhalb der Fehlerabweichung war nur eine Addition der Einzelwerte zu beobachten.

Um den Bereich innerhalb von HIF-2 α einzugrenzen, der an der Kooperation mit Ets-1 beteiligt ist, wurden die Mutationskonstrukte von HIF-2 α mit Ets-1 kotransfiziert und in Reporter-gen-Analysen des Flk-1-Promotorkonstrukts untersucht (Abb. 3-21).

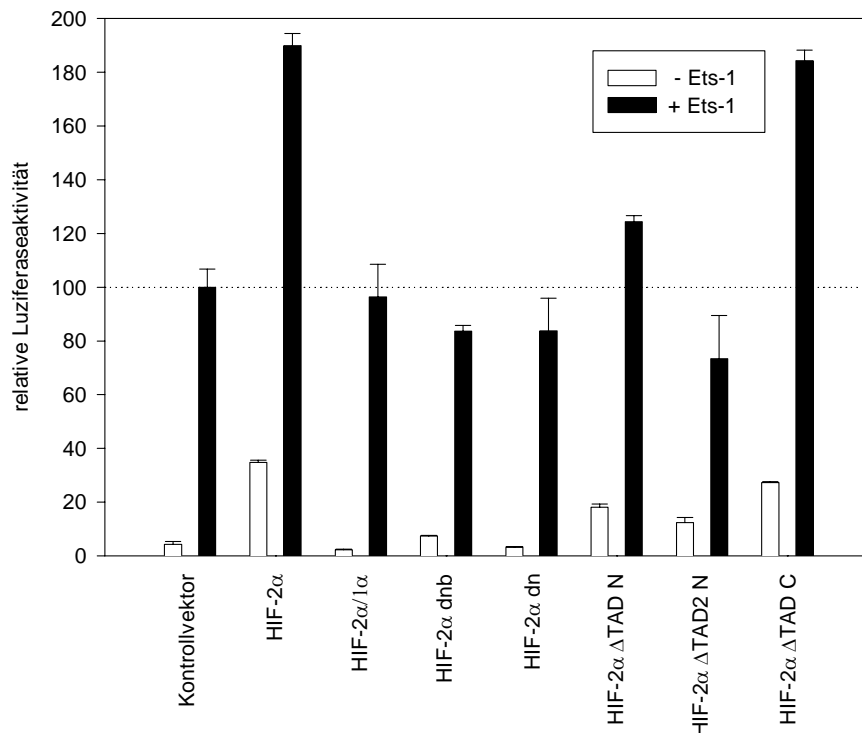


Abbildung 3-21: Kotransfektion von Ets-1 und den verschiedenen HIF-2 α -Mutanten. Die relative Aktivierung des Flk-1-Reportergenkonstrukts bei Transfektion der einzelnen Konstrukte ist durch weiße, die bei Kotransfektion durch schwarze Balken dargestellt. Als Kontrollvektor wurde pcDNA3 eingesetzt und die Aktivierung durch den Kontrollvektor + Ets-1 auf 100 rLE gesetzt.

Die Chimäre HIF-2 α /1 α zeigte bei der Kotransfektion mit Ets-1 eine vergleichbare Wirkung auf den Flk-1-Promotor wie HIF-1 α (Abb. 3-20). Die hier ebenfalls fehlende synergistische Wirkung ist darauf zurückzuführen, daß der C-Terminus von HIF-2 α in dieser Mutante fehlte. Keine der Mutationen inhibierte die Aktivierung des Reportergenkonstrukts durch Ets-1 deutlich. HIF-2 α Δ TAD C verhielt sich ähnlich wie der Wildtyp und kooperierte bei der Stimulierung des Flk-1-Promotors. Dagegen koaktivierten die Mutanten der weiter N-terminal gelegenen Transaktivierungsdomänen und der DNA-Bindedomäne nicht mehr. DNA-Bindung und intakte interne Transaktivierungsdomänen sind also für die Interaktion mit Ets-1 bei der Aktivierung des Flk-1-Promotors nötig.

Mit Hilfe von Ets-1-Deletionsmutanten (Abb. 3-22) sollten die Bereiche von Ets-1 identifiziert werden, die bei der Kooperation mit HIF-2 α eine Rolle spielen. Diese Mutanten wurden von Dr. M. Sieweke (Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Kim *et al.*, 1999).



Abbildung 3-22: Schemazeichnung der Ets-1-Mutanten. Im Wildtyp-Ets-1 (p54ets) sind Exon VII-Domäne und die DNA-Bindedomäne (Exon VIII und IX) sowie die Transaktivierungsdomäne (TAD) eingezeichnet.

Durch den Einsatz der Deletionsmutanten Ets333-441 und Ets238-441 in Reporteranalysen wurde die Kooperation von Ets-1 und HIF-2 α weiter untersucht (Abb. 3-23).

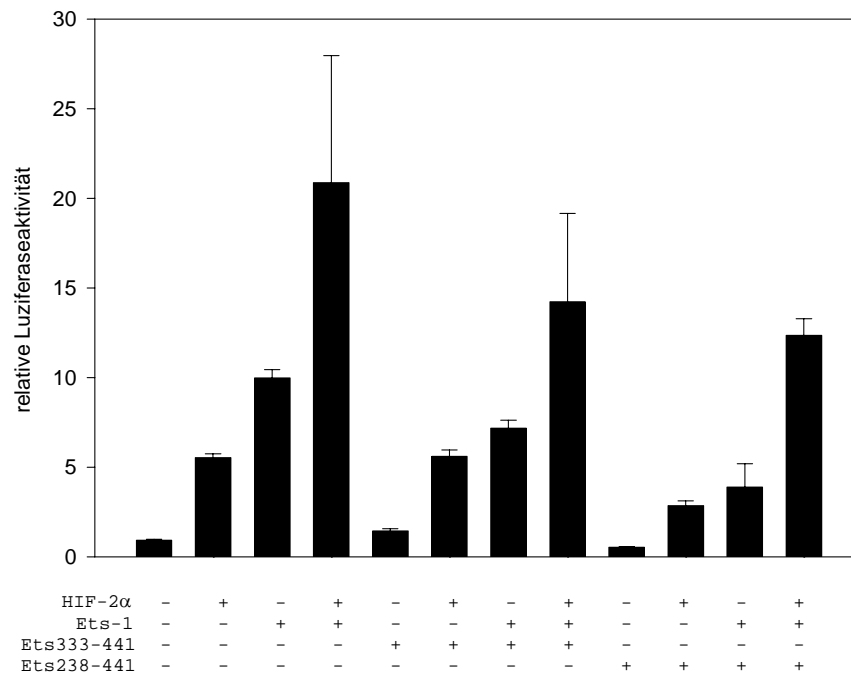


Abbildung 3-23: Kotransfektion von HIF-2 α , Ets-1, Ets333-441 und Ets 238-441 mit dem Flk-1-Reportergenkonstrukt. Die Tabelle darunter gibt an, welche Komponenten zusammen transfiziert wurden.

Die Kotransfektion der Mutante Ets333-441, die nur die DNA-Bindedomäne von Ets-1 enthält, zeigt keinen Effekt auf die Aktivierung von Flk-1 durch HIF-2 α . Zusammen mit Wildtyp-Ets-1 hingegen ergibt sich eine leichte Abschwächung der Ets-1-Aktivität und der synergistische Effekt des Wildtyps mit HIF-2 α wird etwas reduziert. Die Mutante Ets238-441, die zusätzlich die Exon VII-Domäne enthält, reduziert dagegen auch die Aktivierung durch HIF-2 α und folglich die synergistische Wirkung von HIF-2 α und Ets-1 noch stärker.

3.6 HIF-2 α und Ets-1 interagieren *in vitro* physikalisch miteinander

Die synergistische Aktivierung von Flk-1 und die räumliche Nähe der Bindesequenzen im Flk-1-Promotor weisen auf eine physikalische Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren hin.

Um die Interaktion *in vitro* zu untersuchen, wurden im Labor von Dr. M. Sieweke HIF-2 α , HIF-1 α , das chimäre HIF-2 α /1 α und HIF-2 α dn *in vitro* translatiert und zusammen mit verschiedenen aufgereinigten Glutathion-S-Transferase(GST)-Ets-1-Fusionsproteinen in

sogenannten *pull-down* Analysen analysiert (Abb. 3-24). Dabei wurde das entsprechende Ets-1-Fragment, das mit GST fusioniert wurde, mit den *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten HIF-Proteinen inkubiert und auf einer Glutathion-Sepharose immobilisiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Inkubationspuffer wurde das Eluat auf einem Polyacrylamidgel analysiert.

In der Comassie-Färbung sind vor allem die Ets-Komponenten des Ansatzes zu sehen, während die nur in geringen Konzentrationen im Eluat vorhandenen ³⁵S-markierten HIF-2 α -Proteine durch Autoradiographie detektiert wurden.

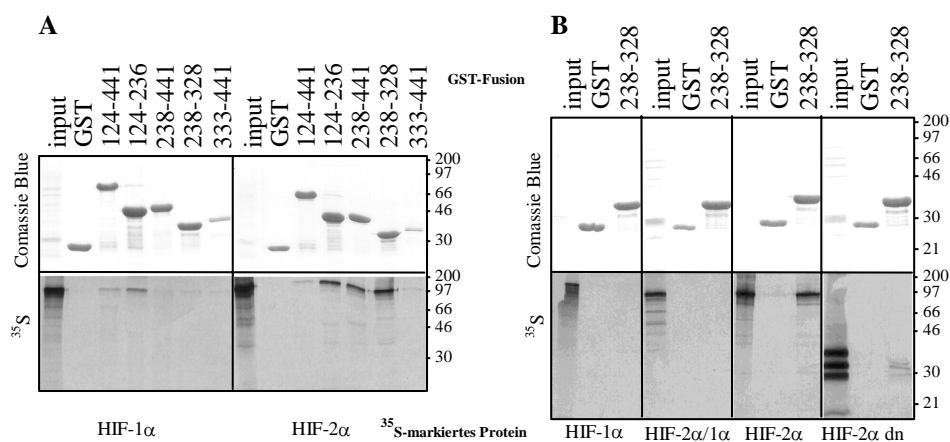


Abbildung 3-24: GST-*pull-down*-Analysen. A: Interaktion von HIF-1 α und HIF-2 α mit den verschiedenen Ets-1-Fragmenten, B: Interaktion des Ets-1-Exon VII-GST-Fusionsproteins mit den HIF-Proteinen und den Mutanten. In der oberen Hälfte ist jeweils eine Proteinfärbung zu sehen, darunter ist das Ergebnis der Autoradiographie gezeigt. input: *in vitro* Translation ohne Inkubation mit einem Ets-1-GST Fusionsprotein, GST: Inkubation der *in vitro* Translation mit GST ohne Ets-1. Jeweils rechts daneben: Inkubation mit den verschiedenen Ets-1-GST-Fusionsproteinen

HIF-2 α zeigte deutliche Wechselwirkungen mit Ets-1. Diese war am stärksten, wenn das Ets-1-GST-Fusionsprotein die Exon VII-Domäne (Aminosäuren 238-328) oder ein weiter N-terminal gelegenes Fragment (Aminosäuren 124-236) enthielt. Die DNA-Bindedomäne allein (Aminosäuren 333-441) zeigte dagegen keine physikalische Wechselwirkung mit HIF-2 α oder HIF-1 α (s. Abb. 3-24A). HIF-1 α interagiert nur sehr schwach mit dem N-terminalen Bereich von Ets-1 (Aminosäuren 124-236).

Die Exon VII-Domäne (Aminosäuren 238-328), die eine starke spezifische Wechselwirkung mit HIF-2 α zeigte, wurde eingesetzt, um die Bereiche innerhalb von HIF-2 α zu identifizieren, die für diese Wechselwirkungen verantwortlich sind (Abb. 3-24B). Von besonderer

Bedeutung scheint ein Bereich zu sein, der dicht C-terminal benachbart zu den PAS-Domänen von HIF-2 α liegt. War der komplette C-Terminus ab Aminosäure 318 durch den C-Terminus von HIF-1 α ersetzt (HIF-2 α /1 α), so zeigte sich keine Interaktion. Die Deletionsmutante, bei der der C-Terminus ab Aminosäure 325 fehlte (HIF-2 α dn), konnte dagegen noch schwach interagieren.

Die Ergebnisse des GST-*pull-down*-Experiments sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

		HIF-Proteine			
		HIF-2 α	HIF-1 α	HIF-2 α /1 α	HIF-2 α dn
Ets-1-GST Fusionsproteine	Ets238-441	++	-		
	Ets333-441	-	-		
	Ets238-328	++	-	-	+/-
	Ets124-236	++	+		
	Ets124-441	+/-	+/-		
	GST	-	-	-	-

Tabelle 1: Ergebnisse der GST-*pull-down*-Analysen. Abstufungen der Wechselwirkungen: ++ sehr stark, + deutlich, +/- schwach, - nicht detektierbar.

Dieser Befund unterstützt das Ergebnis der Reporteranalysen, daß HIF-2 α , jedoch nicht HIF-1 α mit Ets-1 bei der Aktivierung des Flk-1-Promotors kooperiert und daß die Transaktivierungsdomäne TAD N im C-Terminus von HIF-2 α dabei von entscheidender Bedeutung sind.

3.7 Das Element EBS3/HBS1 aus dem Flk-1-Promotor überträgt die starke Induzierbarkeit durch HIF-2 α und Ets-1 auf heterologe Promotoren

Die starke physikalische Interaktion und synergistische Wirkungsweise von HIF-2 α und Ets-1 bei der Aktivierung von Flk-1, sowie die räumliche Nähe funktionell aktiver Bindestellen innerhalb des Flk-1-Promotors deuten auf die Bedeutung des Elements aus beiden Bindestellen hin. Es scheint sich um ein stark *cis*-aktives Element zu handeln, welches auch wichtig für die Endothelspezifität der Flk-1-Regulation sein könnte.

Um die Rolle der beiden Elemente EBS3/HBS1 und HBS2/EBS6 näher zu untersuchen, wurden Oligonukleotide (MWG/Ebersberg) synthetisiert, die jeweils eines dieser Elemente mit den flankierenden Bereichen beinhalteten. Alternativ wurden DNA-Fragmente hergestellt, die Mutationen in einer der beiden Bindestellen aufwiesen. Diese Oligonukleotide wurden in einen Luziferasevektor vor den TK-Promotor kloniert.

Es ergaben sich Konstrukte, in denen die Bindeelemente ein- oder zweimal in verschiedenen Richtungen vor dem Promotor plaziert waren. In ersten Tests zeigte sich, daß Tandems aus jeweils zwei Elementen deutliche Effekte aufwiesen. Diese Konstrukte ([EBS3/HBS1]₂ TK-Luc und [HBS2/EBS6]₂ TK-Luc), bzw. die entsprechenden Mutationen wurden in Reporteragen-Analysen eingesetzt (Abb. 3-25).

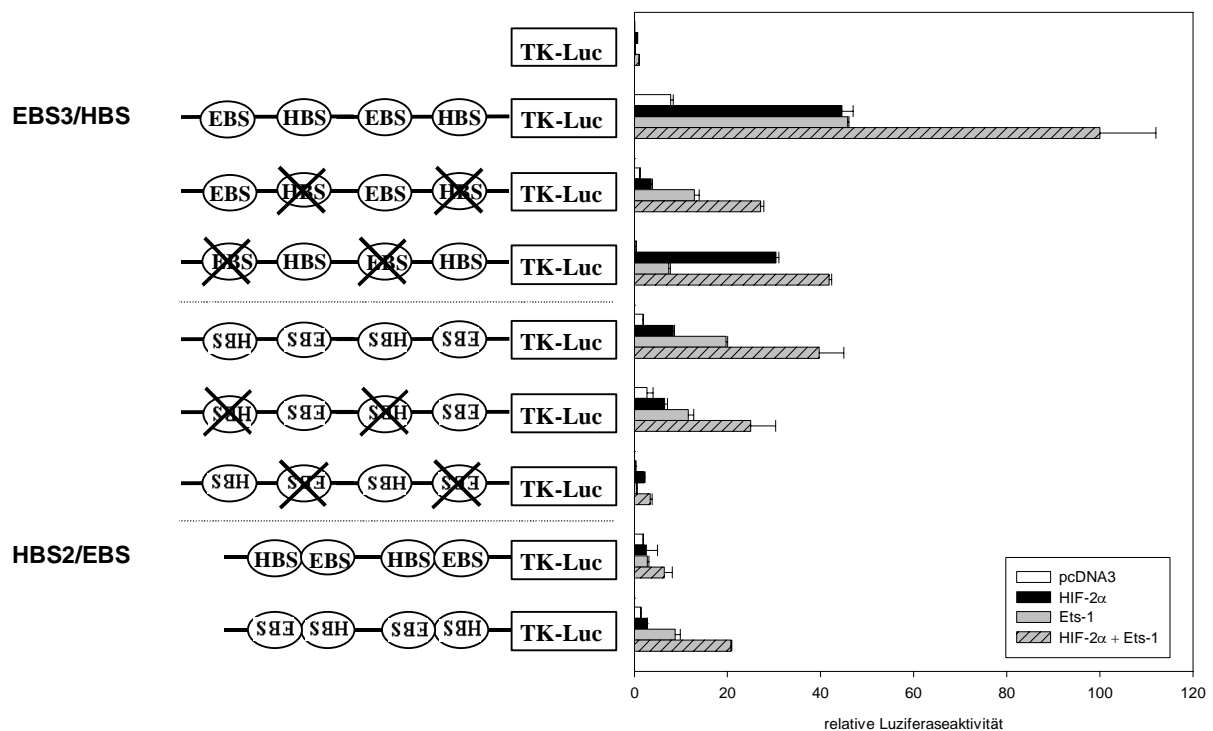


Abbildung 3-25: Aktivierung der EBS/HBS-TK-Luc-Reportergenkonstrukte durch HIF-2 α und Ets-1. Tandems aus EBS3/HBS1- bzw. HBS2/EBS6-Elementen aus dem Flk-1-Promotor wurden in einen Reporteragenvektor kloniert, in dem das Luziferasegen unter Kontrolle eines *Herpes simplex* Tyminidinkinase-Promotors stand. Links sind die getesteten Konstrukte schematisch dargestellt. Die Orientierung der einklonierten DNA-Fragmente ist durch die Richtung der Beschriftung symbolisiert. Rechts ist die Aktivierung der Konstrukte durch den Kontrollvektor, HIF-2 α , Ets-1 und HIF-2 α +Ets-1 zu sehen. Die maximale Aktivierung wurde auf 100, die anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

Die basale Aktivität der verschiedenen Konstrukte war sehr unterschiedlich. Während der Wildtyp-TK-Promotor nur geringe basale Aktivität aufwies, war sie bei dem Konstrukt [EBS3/HBS1]₂-TK-Luc etwa um den Faktor 100 stärker. Die Mutation der einzelnen Bindestellen führte zu einer Reduktion der basalen Aktivität um 70% (Mutation der HBS) bzw um 95% (Mutation der EBS). Die Konstrukte, in denen die Bindestellen im Vergleich zum Flk-1-Promotor in umgekehrter Orientierung kloniert waren, zeigten eine geringe basale Aktivität, die bei etwa 25% von [EBS3/HBS1]₂-TK-Luc lag.

Während das Wildtyp-TK-Luc-Konstrukt nicht durch HIF-2 α oder Ets-1 induzierbar war, zeigten die anderen Reporterengenkonstrukte eine deutliche Aktivierbarkeit. Die größten Messwerte ergaben sich für das Konstrukt [EBS3/HBS1]₂-TK-Luc. Der überadditive Effekt der ohnehin starken Aktivierung durch die einzelnen Transkriptionsfaktoren war hier allerdings nicht erkennbar, vermutlich lagen die sehr hohen Meßwerte nicht mehr im linearen Bereich der Messung. Die Mutation der HIF-2 α -Bindestelle HBS1 führte zu einer deutlichen Reduktion der Aktivierung durch HIF-2 α . Interessanterweise war die Aktivierung des Reporterengenkonstrukts durch Ets-1 ebenfalls reduziert und die synergistische Wirkung von HIF-2 α und Ets-1 blieb, wenn auch auf niedrigerem Niveau, erhalten. Bei Mutation der Ets-1-Bindestellen dagegen wurde diese Kooperation unterbunden und das generelle Aktivierungsniveau lag ebenfalls deutlich unter dem des Wildtyp-Konstrukts [EBS3/HBS1]₂-TK-Luc.

Die Untersuchung des Konstrukts [HBS2/EBS6]₂-TK-Luc ergab grundsätzlich die gleichen Ergebnisse. Die Aktivierung lag jedoch deutlich niedriger (6 bis 20fach).

Bei entgegengesetzter Orientierung der klonierten Tandems ergab sich dasselbe Bild. Allerdings reduzierte sich die Aktivierbarkeit bei allen Konstrukten um mindestens 50%.

Diese Ergebnisse wurden bei Verwendung eines Reportervektors bestätigt, in dem das Luziferasegen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors stand. Auch hier wurde die synergistische Aktivierbarkeit auf den heterologen Promotor übertragen. Allerdings erwies sich der Promotor als nicht gut geeignet, da schon der Wildtyp-SV40-Promotor durch Ets-1 aktiviert wurde (Daten nicht aufgeführt).

Nachdem gezeigt werden konnte, daß vor allem das [EBS3/HBS1]₂-Element die Eigenschaften des Flk-1-Promotors bezüglich der Induktion durch HIF-2 α und Ets-1 auf heterologe Promotoren übertragen konnte, stellte sich die Frage, ob dies auch für die Endothelspezifität gilt. Um dies zu untersuchen, wurde das Konstrukt [EBS3/HBS1]₂-TK-Luc in Reporteragen-Analysen in verschiedenen Zelllinien getestet (Abb. 3-26).

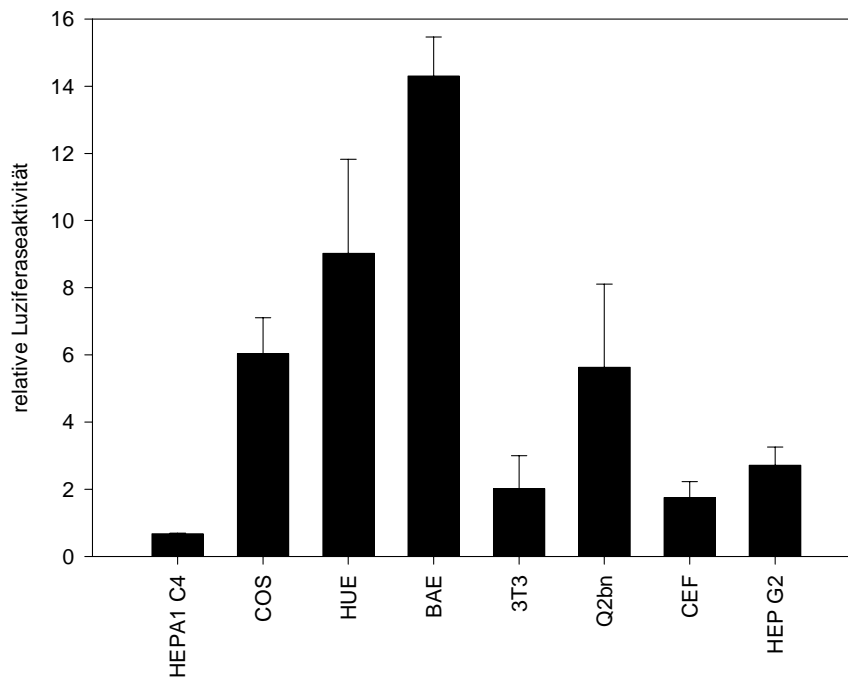


Abbildung 3-26: Aktivierung von [EBS3/HBS1]₂-TK-Luc in verschiedenen Zelllinien. Die Meßwerte wurden relativ zur Transfektion mit dem Wildtyp-TK-Luc-Konstrukt dargestellt.

In den Endothelzelllinien BAE und HUE war das Reporteragenkonstrukt am aktivsten. Auch in COS- und Q2bn-Zellen war eine deutliche Aktivität feststellbar, während nur eine schwache Induktion in CEF-, 3T3- und HEP G2-Zellen detektierbar war. In HEP A1 C4-Zellen war das Konstrukt wie erwartet inaktiv. Diese Zelllinie exprimiert kein HIF-1 β /ARNT (Gradin *et al.*, 1996; Gassmann *et al.*, 1997). Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Aktivierung über HIF-2 α erfolgt, da für die DNA-Bindung die Heterodimerisierung mit ARNT nötig ist.

Die Aktivität des [EBS3/HBS1]₂-TK-Luc-Konstrukts weist auf die Spezifität des Motivs für Endothelzellen hin. Um zu testen, ob diese Beobachtung durch die Expression von Flk-1/KDR *in vivo* bestätigt wird, wurde aus verschiedenen Zelllinien die Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe einer radioaktiv markierten KDR-Sonde in Northern-Blot-Analysen untersucht (Abb. 3-27).

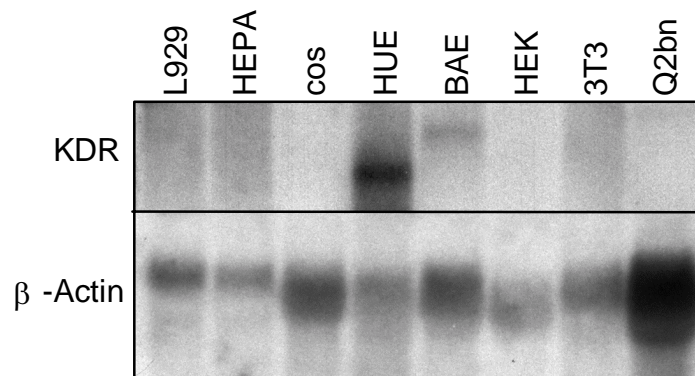


Abbildung 3-27: Northern-Blot-Analyse. Aufgetragen wurde Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien. In der oberen Hybridisierung wurde eine radioaktiv markierte KDR-Sonde, in der unteren als Referenz eine β-Aktin-Sonde eingesetzt.

Die KDR-Sonde hybridisierte nur mit RNA aus HUE- und BAE-Zellen. Die unterschiedlichen Intensitäten könnten durch die Wahl der Sonde begründet sein, die wie die HUE-Zellen humanen Ursprungs war, während es sich bei den BAE-Zellen um Rinderendothelzellen handelte. Dadurch wird auch die unterschiedliche Größe der hybridisierenden RNA erklärt, da humane KDR-mRNA etwa 6 kb (Itakura *et al.*, 2000) und bovine Flk-1-mRNA etwa 8 kb groß ist (Takagi *et al.*, 1996).

3.8 Die Deletion der Bindestellen für HIF-2α und Ets-1 im Flk-1-Promotor führt zum Verlust der gewebespezifischen Expression des Proteins

Um zu überprüfen, ob die Motivelemente des Wildtyp-Flk-1-Promotors aus HBS und EBS für die transkriptionelle Aktivierung wichtig sind, wurden entsprechende Mutationen generiert und in einen Reportergenvektor kloniert. Diese Konstrukte wurden in Hinblick auf ihre Induzierbarkeit durch HIF-2α und Ets-1 in Reportergenanalysen ausgetestet (Abb. 3-28).

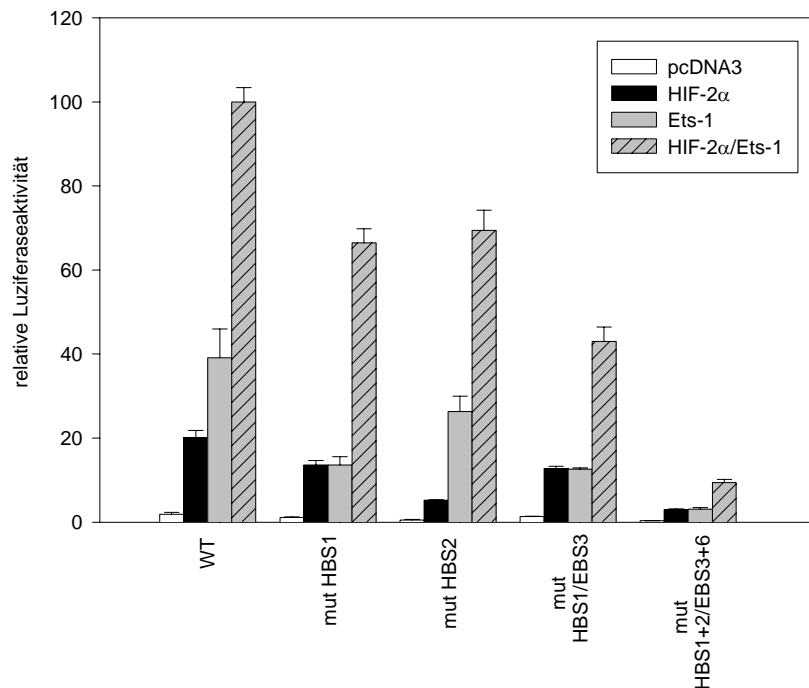


Abbildung 3-28: Aktivierung des Reportergenkonstrukts mit Wildtyp-Flk-1-Promotor und den Mutanten durch HIF-2 α und Ets-1. Die maximale Induktion (Wildtyp (WT) mit HIF-2 α und Ets-1) wurde auf 100, die anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

Die Mutation von HBS1 oder HBS2 führte zu einer eindeutigen, aber nicht sehr starken Reduktion der Induktion sowohl durch HIF-2 α , als auch durch die Kombination aus HIF-2 α und Ets-1. Interessanterweise führte die Mutation der HIF-2 α -Bindestellen auch zu einer abgeschwächten Aktivierung durch Ets-1. Dabei zeigten die Mutationen beider Bindestellen innerhalb der Fehlertoleranzen vergleichbare Effekte.

Eine komplette Mutation des HBS1/EBS3-Elements, das sich in vorangegangenen Experimenten als starkes *cis*-aktives Element gezeigt hatte, führte zu einer stärkeren Abschwächung des kooperativen Effektes bei der Induktion durch HIF-2 α und Ets-1, die allerdings auch nur 60% ausmachte. Erst die Mutation beider HBS/EBS-Elemente führte zum weitgehenden Verlust der Induzierbarkeit des Promotors durch HIF-2 α , Ets-1 und der Kombination aus beiden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine vergleichbare Bedeutung beider Elemente bei der Regulation von *Flk-1* hin.

Um diese Vermutung *in vivo* zu überprüfen, wurden die in Reporteranalysen verwendeten Promotorvarianten mit HBS1/EBS3, mit HBS1+2/EBS3+6, sowie der Wildtyp in einen Reportervektor kloniert, der das Gen der β -Galaktosidase und eine invers orientierte Sequenz aus dem ersten Intron des *Flk-1*-Gens enthielt (Kappel, 1999) (Abb. 3-29).

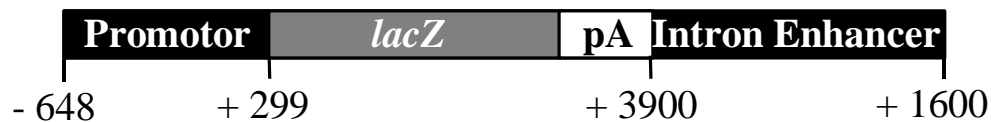


Abbildung 3-29: Struktur der eingesetzten *lacZ*-Reporterkonstrukte. Das *lacZ*-Gen (grau) mit anschließender Poly-Adenylsequenz (pA, weiß) steht unter der Kontrolle des *Flk-1*-Promotors bzw. der entsprechenden Mutationen (Positionen -648 bis -299 im *flk-1*-Gen, schwarz) und einem Enhancer-Element aus dem ersten Intron von *flk-1* (Positionen 1600 bis 3900, schwarz).

Diese *lacZ*-Reporterkonstrukte wurden in Zusammenarbeit mit Regina Heidenreich (Bad Nauheim) in transgenen Mausembryonen (Tag 10,5 der Embryonalentwicklung) auf ihre Expression hin untersucht.

Es wurde die Technik der DNA-Injektion in Pronuklei von Mausoozyten verwendet. Die DNA integriert bei dieser Methode an zufälligen Stellen in das Genom. Nach dem Transfer in den Eileiter einer pseudoträchtigen Maus und anschließender Rückkreuzung ergaben sich Nachkommen, von denen einige transgen für das gewünschte Konstrukt waren. Durch Genotypisierung wurden Embryonen ausgewählt, die das Reporterkonstrukt im Genom integriert hatten (Abb. 3-30).

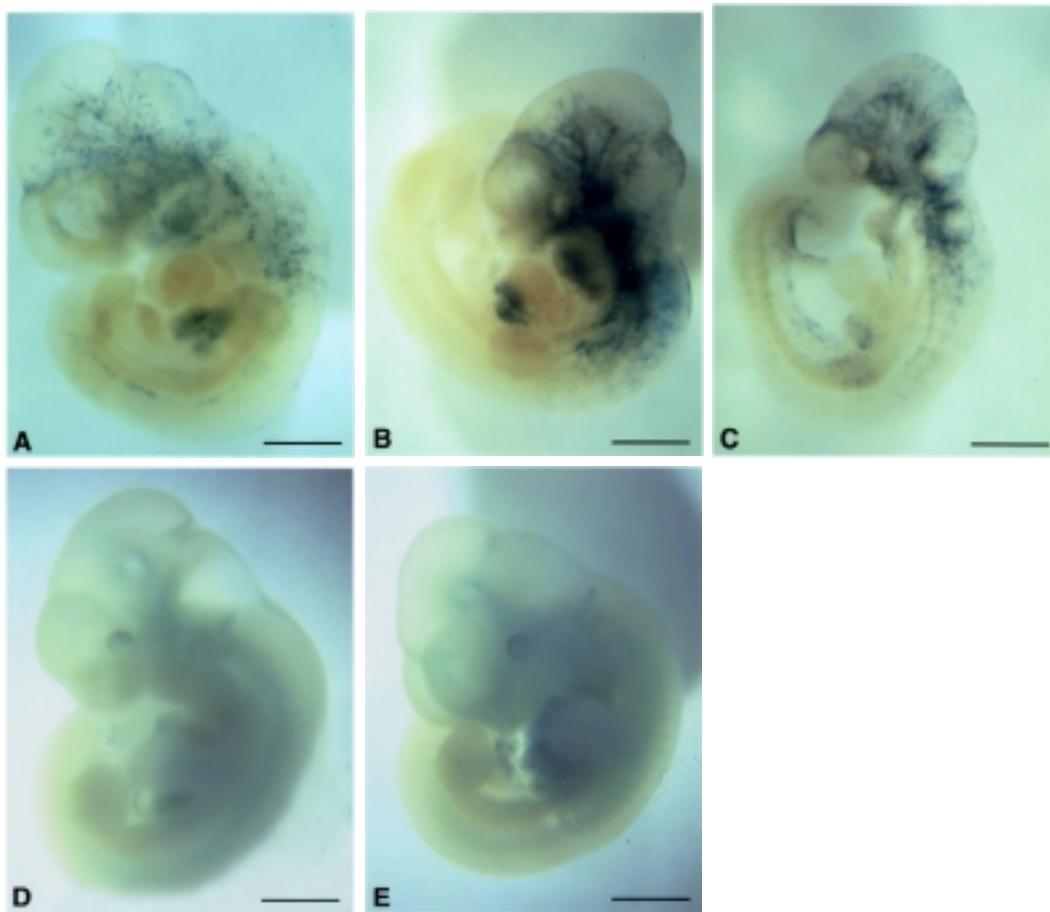


Abbildung 3-30: *lacZ*-Färbung von Mausembryonen (Tag 10,5 der Embryonalentwicklung). Die Reporterexpression wird vom 947 bp großen *Flk-1*-Promotor und dem 430 bp großen Enhancerelement aus dem ersten Intron von *flk-1* gesteuert. A: Wildtyp, B und C: Mutation von HBS1 und EBS3, D und E: Mutation von HBS1+2 und EBS3+6.

Das Wildtyp-Promotorkonstrukt (A) wurde endothelspezifisch exprimiert. Deutlich sind im Bereich des Kopfes und des Rückens positive Zellen erkennbar, die mit den Gefäßen assoziiert sind. Erstaunlicherweise führte die Mutation des EBS3/HBS1-Elements (B und C) nicht zu einer Abschwächung oder Lokalisationsänderung der Expression. Wurde jedoch zusätzlich das HBS2/EBS6-Element mutiert (D und E), so fand sich nur bei einem transgenen Embryo neben einer ektopischen Expression eine leichte Expression des Reportergenkonstrukts im Endothel.

Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse der Transgenanalyse zusammen:

Konstrukt	transgene Embryonen	spezifische Expression in Endothelzellen	ektopische Expression	keine Expression
Wildtyp	13	6	1	6
mut HBS1/EBS3	16	10	1	5
mut HB S1+2/EBS3+6	11	(1)	(1)	10

Tabelle 2: Ergebnisse der Analyse der transgenen Mausembryonen. Angegeben ist die Anzahl der Embryonen, die in der Genotypisierung positiv waren, die Anzahl der Embryonen, die eine spezifische Färbung aufwiesen und unspezifisch bzw. nicht gefärbte Embryonen.

Diese Befunde weisen darauf hin, daß beide HIF-2 α /Ets-1-Bindemotive stark positiv auf den Flk-1-Promotor wirken und *in vivo* für die Endothelspezifität der Expression nötig sind.

Diese Promotorspezifität zusammen mit der endothelspezifischen Expression von HIF-2 α , die mit der von Flk-1 korreliert, deuten auf ein neues Regulationssystem in der Angiogenese hin.

3.9 Der Aktivierungsmechanismus von HIF-2 α und Ets-1 stimuliert auch Promotoren anderer endothelial exprimierter Gene

In weiteren Luziferase-Reportergentests wurde untersucht, ob dieses Regulationssystem auf Promotoren anderer Angiogenese-relevanter Gene wirkt. So wurden zum Vergleich der Tie-1- und der VEGF-Promotor sowie TK-Minimalpromotor-Fusionskonstrukte aus den 5'-genregulatorischen Sequenzen des humanen *Ets-1*, des *VEGFR-2 (KDR)* und des *VEGFR-1 (Flt-1)* auf ihre Induzierbarkeit durch HIF-2 α und Ets-1 hin untersucht. Die entsprechenden Promotorabschnitte wurden mittels PCR aus humaner, genomischer DNA amplifiziert und in den TL-Luc-Vektor inseriert.

Der Abschnitt des KDR-Promotors ist der orthologe Abschnitt zu dem Bereich des murinen Flk-1-Promotors, der die HBS/EBS-Motive enthält. Eine Sequenzanalyse dieses Abschnittes zeigte, daß im KDR-Promotor diese Elemente nicht konserviert sind. Aus dem humanen Ets-1-Promotor wurde ein Abschnitt gewählt, in dem durch Sequenzanalyse ein HBS/EBS-Motiv nachgewiesen werden konnte. In früheren Arbeiten war gezeigt worden, daß dieser Abschnitt eine funktionelle Ets-1-Bindestelle enthält und damit eine wichtige autoregulatorische Rolle bei der Expression des Ets-1-Gens spielen könnte (Jorcyk *et al.*, 1991). Aus dem humanen

Flt-1-Promotor wurde ein Bereich gewählt, der eine funktionelle Ets-1-Bindestelle enthielt (Morishita *et al.*, 1995, Wakiya *et al.*, 1996).

Folgende Reportergenkonstrukte wurden eingesetzt (Abb. 3-31):

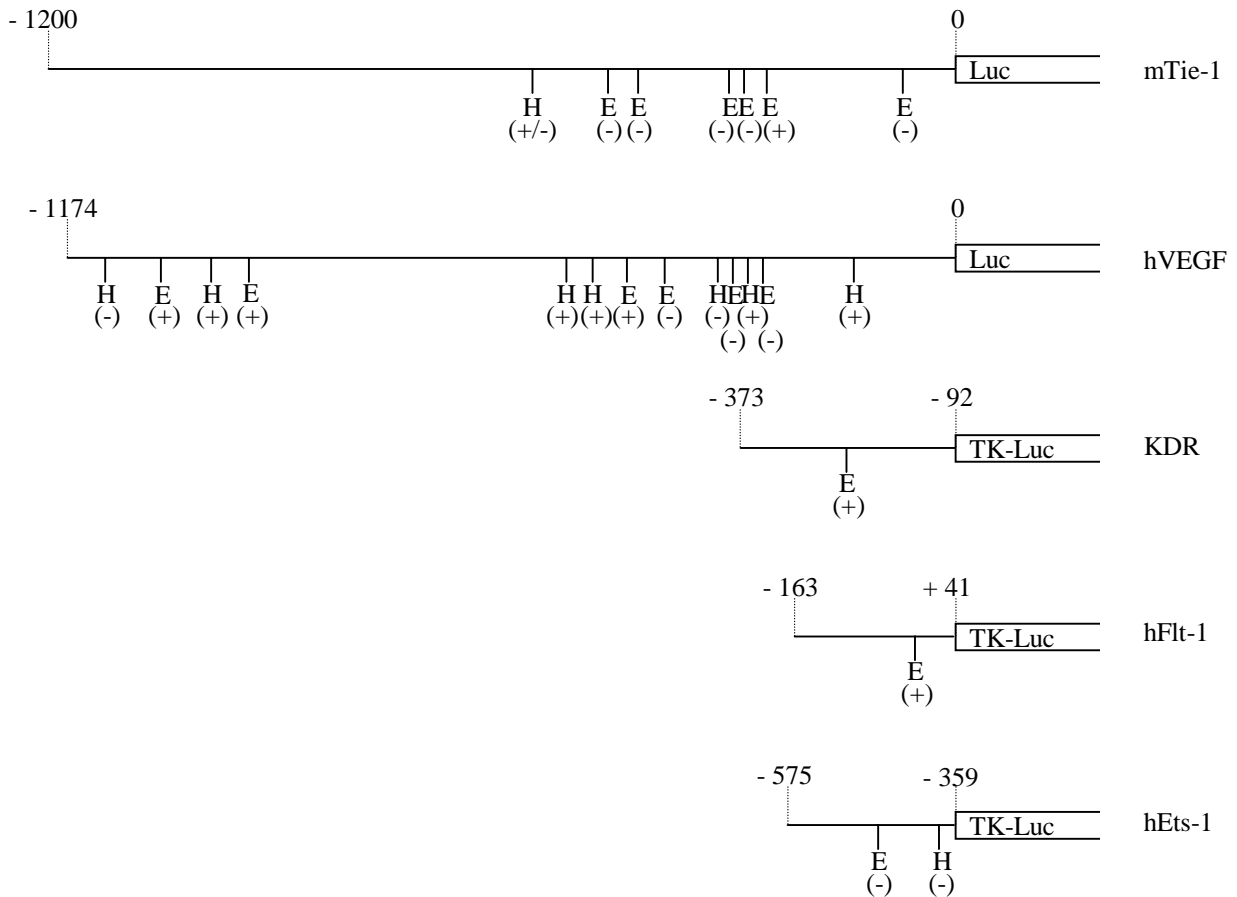


Abbildung 3-31: Eingesetzte Reportergenkonstrukte für die Untersuchung der Aktivierbarkeit durch HIF-2 α und Ets-1. Die Positionen der Promotorfragmente relativ zum Transkriptionsstart sowie potentielle Bindestellen für Ets-1 (E) bzw. HIF-2 α (H) sind angegeben. Die in Klammern gesetzten Vorzeichen symbolisieren die Anordnung auf dem kodierenden (+) bzw. auf dem nichtkodierenden DNA-Strang (-).

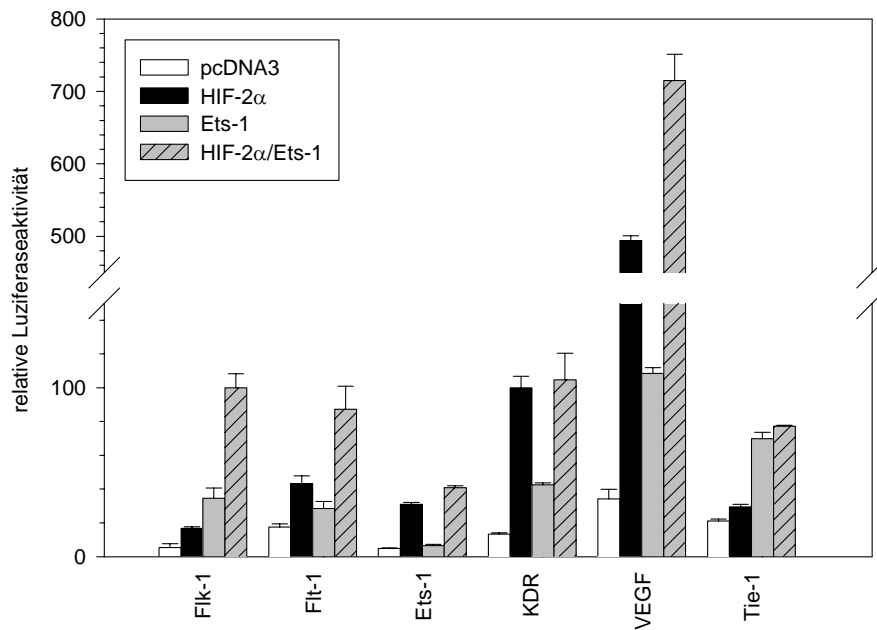


Abbildung 3-32: Kotretransfektion von HIF-2 α und Ets-1 mit verschiedenen Reporter-genkonstrukten. Als Kontrolle wurde jeweils pcDNA3 (weiße Balken) verwendet. Die in den Luziferasevektor inklonierten Promotorfragmente sind angegeben. Zum Vergleich wurde der Flk-1-Promotor kotretransfiziert und dessen Aktivierung durch HIF-2 α +Ets-1 auf 100 gesetzt. Die anderen Ergebnisse wurden dazu im Verhältnis dargestellt.

Die verschiedenen Promotorkonstrukte waren unterschiedlich stark durch HIF-2 α und Ets-1 aktivierbar. Der überadditive Effekt der Kotretransfektion war nicht nur im Flk-1-Konstrukt, sondern auch bei VEGF und Flt-1 zu beobachten. Während die Sequenzanalyse des VEGF-Promotors mit dem MatInspector™ Programm mehrere mögliche HBS/EBS-Elemente ergab, wurde interessanterweise innerhalb des klonierten Flt-1-Promotorabschnitts keine potentielle Bindestelle für HIF-2 α angezeigt. Trotzdem war die Aktivierung durch die alleinige Transfektion von HIF-2 α bei beiden Reporter-genkonstrukten im Gegensatz zum Flk-1-Promotor stärker als durch Ets-1.

Beim Ets-1-Promotorkonstrukt lag die Überadditivität nur knapp über der Fehlertoleranz und die Aktivierung durch Ets-1 war nicht signifikant. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu früheren Untersuchungen (Jorcyk *et al.*, 1991).

Wie in der Literatur beschrieben, wird der Tie-Promotor durch Ets-1 aktiviert (Iljin *et al.*, 1999). Neben einer nur schwachen Aktivierung durch HIF-2 α findet sich keine synergistische Interaktion des Transkriptionsfaktors mit Ets-1.

Interessanterweise wirkten HIF-2 α und Ets-1 auch bei der Aktivierung des KDR-Promotors nicht kooperativ. In den regulatorischen Bereichen dieses Promotors wurden bei der Sequenzanalyse eine potentielle Bindestelle für Ets-1 und keine für HIF-2 α gefunden. Trotzdem wurde das Reportergenkonstrukt durch HIF-2 α stark aktiviert, während die Ets-1-Aktivierung nur schwach war. Da KDR das humane Homologe zu Flk-1 ist, das sich in dieser Arbeit als Ziel der synergistischen Kooperation von HIF-2 α und Ets-1 gezeigt hatte ist dieser Befund unerwartet.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die synergistische Aktivierung gemeinsamer Zielgene von HIF-2 α und Ets-1 eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation der Promotoren von Flk-1, Flt-1 und VEGF spielt. Dieser Mechanismus scheint nicht auf das Sequenzmotiv aus HIF-2 α - und Ets-1-Bindestelle beschränkt zu sein.

3.10 Die Aktivierung von KDR durch VEGF führt über das HBS/EBS-Element zur transkriptionellen Autoaktivierung des Rezeptors

Die mögliche Bedeutung der gemeinsamen Aktivierung ihrer Zielgene durch HIF-2 α und Ets-1 zeigt sich bei der Betrachtung der regulatorischen Zusammenhänge von VEGF-Signalübertragung und transkriptioneller Aktivierung des VEGF-Rezeptors 2.

Im Verlauf der Signaltransduktionskaskade von Flk-1 wird über den MAP-Kinase-Signalpfad auch das *Ets-1*-Gen transkriptionell aktiviert und die Aktivität des Ets-1-Proteins erhöht (zur Übersicht s. Sharrocks *et al.*, 1997; Dittmer und Nordheim, 1997; Wasylyk *et al.*, 1998; Zachary, 1998). Es kann spekuliert werden, ob Ets-1 dadurch seinerseits die Expression von Flk-1 stimuliert.

Um zu untersuchen, ob die HBS/EBS-Motive aus dem Flk-1-Promotor in diesem Regulationsmechanismus eine Rolle spielen, wurde das [EBS3/HBS1]₂-TK-Luc-Konstrukt mit einem KDR (hVEGFR-2) Expressionsvektor kotransfiziert. Nach der Transfektion in HEK/293-Zellen wurden diese zunächst in VEGF-freiem Medium gehalten und nach 24 Stunden mit VEGF stimuliert. Zur Kontrolle wurde dabei der Flk-1/KDR-spezifische Inhibitor SU5416 (Firma Sugen/San Francisco; USA) zugegeben, durch den die Phosphorylierung von Flk-1/KDR nach Bindung von VEGF verhindert wird (Fong *et al.*, 1999).

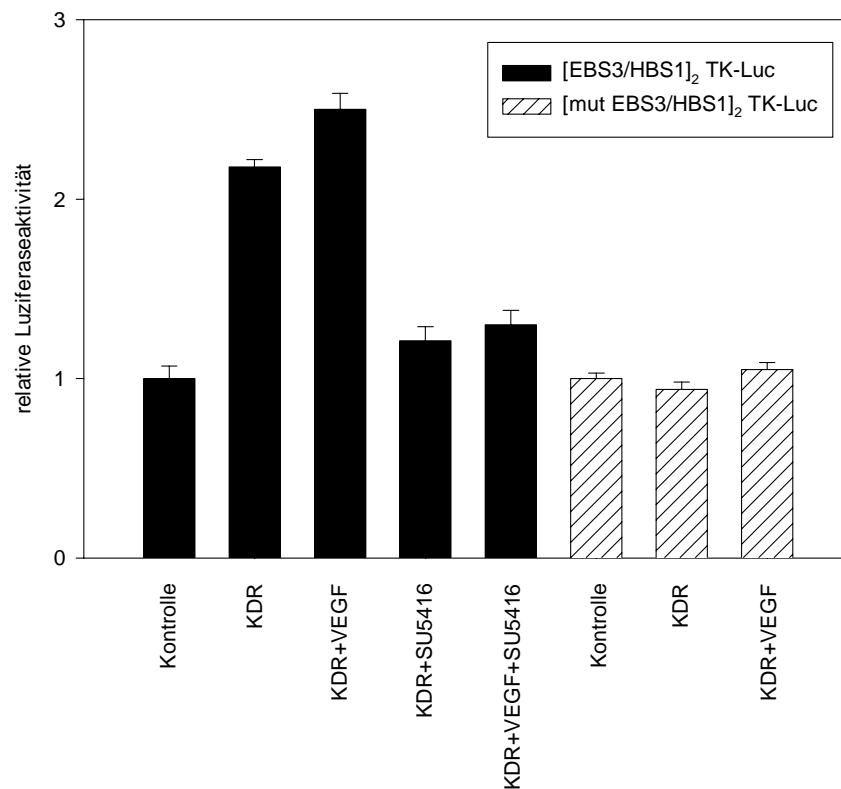


Abbildung 3-33: Indirekte Aktivierung des [EBS3/HBS1]₂-TK-Luc-Konstrukts durch die Signaltransduktion von KDR (schwarze Balken). Als Kontrolle wurde pcDNA3 kotransfiziert. Zum Vergleich wurde die Aktivierung des [mutEBS3/HBS1]₂-TK-Luc-Konstrukts aufgetragen (schraffierte Balken), in dem die HBS- und EBS-Sequenz mutiert war. Die Kontroll-Transfektionen wurden jeweils auf 1 und die dazugehörigen Meßwerte ins Verhältnis dazu gesetzt.

Die Kotransfektion von KDR ergab eine Stimulierung des Reporter-genkonstrukts, die sich durch Zugabe von VEGF in geringem Umfang noch erhöhen ließ, während die mutierten Konstrukte im Bereich der Kontrolle lagen. Die Zugabe von Inhibitor verhinderte eine Stimulierung durch KDR und VEGF, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Aktivierung des Reporter-genkonstrukts von der Aktivität der Kinasedomäne von KDR abhing. Die Zugabe von VEGF zeigte keine starke Steigerung der Reporter-genaktivität. Dies lag vermutlich daran, daß KDR nach Überexpression in nicht-endothelialen Zelllinien konstitutiv aktiv ist und VEGF daher keinen starken Effekt mehr ausübt (persönliche Mitteilung Dr. H. Weich, Braunschweig).

Die Daten dieses Experimentes deuten darauf hin, daß die Kooperation von HIF-2 α und Ets-1 für die verstärkte transkriptionelle Aktivierung von *Flk-1* nach Bindung des Liganden VEGF durch den Rezeptor wichtig ist.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Genexpression des VEGF-Rezeptors 2 (Flk-1) untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die endothelial exprimierten Transkriptionsfaktoren HIF-2 α und Ets-1 bei der Aktivierung des Flk-1-Promotors kooperieren. In GST-pulldown-Experimenten wurde eine physikalische Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren nachgewiesen. Der Synergismus bei der transkriptionellen Aktivierung von Flk-1 wird über Aktivatorelemente im Promotor vermittelt. Diese Elemente bestehen aus jeweils einer HIF-2 α - und Ets-1-Bindestelle, die unmittelbar benachbart angeordnet sind. Durch die Übertragung der Elemente auf heterologe Promotoren mit anschließenden Reporter-Experimenten und Transgen-Analysen von Mutationen des Flk-1-Promotors konnte ihre entscheidende Bedeutung *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Die Auswertung der Transgen-Experimente zeigte, daß die Mutation der Aktivatorelemente zum Verlust der endothelspezifischen Expression des Reporter-Genkonstrukts führte. Die regulatorische Rolle von HIF-2 α bei der Flk-1-Aktivierung wird durch die Beobachtung bestätigt, HIF-2 α -Protein nicht mehr in den Zellkernen von Hirnkapillarendothelzellen nachweisbar ist, wenn die Flk-1 mRNA-Expression herunterreguliert wird. Dies geschieht zeitgleich mit dem Stillstand der Endothelzellproliferation nach Abschluß des Hirnwachstums. Durch den Vergleich mit dem homologen qHIF-2 α aus der Wachtel und dem nahe verwandten HIF-1 α , das in Bezug auf Flk-1-Aktivierung und Synergismus mit Ets-1 völlig andere Eigenschaften aufweist, wurden funktionelle Bereiche von HIF-2 α identifiziert, die an der Kooperation mit Ets-1 beteiligt sind.

4.1 Der Flk-1-Promotor wird durch einen Synergismus von HIF-2 α und Ets-1 aktiviert

Die Proliferation von Endothelzellen hängt entscheidend vom VEGF/VEGFR-2-Signaltransduktionssystem ab. Die Signalübertragung über den VEGF-Rezeptor 2 (Flk-1) ist unentbehrlich für den Start der Entwicklung des Gefäßsystems (Shalaby *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1997). Da die Expression von Flk-1 stark auf Endothelzellen beschränkt ist und präzise während der Entwicklung reguliert wird, ist die Charakterisierung der Gen-regulatorischen Elemente von Flk-1 wichtig, um den Mechanismus der Endothel-Spezifität und der zeitlich begrenzten Regulation der Genexpression zu verstehen.

Wie viele andere Endothelzell-spezifische Promotoren (z.B. die Promotoren von Ets-1, Tie-1, PECAM-1 und eNOS) enthält der Flk-1-Promotor keine TATA-Consensus-Sequenz. Seine Gewebespezifität konnte bisher nicht auf bestimmte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zurückgeführt werden. In Reporterexperimenten konnte gezeigt werden, daß der Flk-1-Promotor die endothelspezifische Expression von Reportergen steuert. Die hierfür notwendigen Elemente wurden in einem Bereich von -225 bis -60 bp vom Transkriptionsstartpunktes lokalisiert (Patterson *et al.*, 1995; Rönicke *et al.*, 1996). In Transgenexperimenten gelang die endothelspezifische Expression von Reportergen durch den Flk-1-Promotor erst, nachdem regulatorische Elemente aus dem ersten Intron in das Transgenkonstrukt mit einbezogen wurden. So wurde ein 430 bp langer Minimal-Enhancer aus dem ersten Intron des Flk-1-Gens identifiziert, der in Verbindung mit dem Flk-1-Promotor ausreichend und nötig ist, um in transgenen Mäusen eine Endothelzell-spezifische Genexpression anzutreiben (Kappel *et al.*, 1999). Obwohl der Minimal-Enhancer die Endothelzell-spezifische Expression des *lacZ*-Reportergens zum Teil auf den heterologen *Herpes simplex*-TK-Promotor übertragen kann, wurde die volle endotheliale Flk-1-Expression nur in Verbindung mit dem Flk-1-Promotor beobachtet (Kappel *et al.*, 1999). Diese Daten weisen zusammen mit der Endothelzell-Spezifität des Flk-1-Promotors (Patterson *et al.*, 1995; Rönicke *et al.*, 1996) darauf hin, daß endothelzellspezifische Transkriptionsfaktoren für die Expression von Flk-1 nötig sind, die an korrespondierende Zielsequenzen im Promotor binden.

In dieser Arbeit wurden zwei funktionelle Bindungsstellen von HIF-2 α innerhalb des Flk-1-Promotors identifiziert, in deren unmittelbarer Nähe funktionelle Ets-Konsensus-Sequenzen liegen. Diese Elemente, die aus einer HIF-2 α -Bindungsstelle (HBS) und einer Ets-Bindungsstelle (EBS) bestehen, übertragen die Induzierbarkeit durch die beiden Transkriptionsfaktoren auf heterologe Promotoren. Werden diese Elemente dagegen im Flk-1-Promotor mutiert und die Mutanten in Luziferase-Reporter-Gen-Analysen untersucht, so reduziert sich diese Induzierbarkeit erheblich. Dabei scheinen die beiden HIF-2 α -Bindungsstellen HBS1 und HBS2 eine vergleichbare Bedeutung zu haben. Bei einer Mutation einer der beiden Zielsequenzen reduziert sich die synergistische Wirkung von HIF-2 α und Ets-1 auf etwa 70%. Die Mutation des Elementes aus HBS1 und EBS3, das bei der Untersuchung der Wechselwirkung mit heterologen Promotoren einen deutlich stärkeren Effekt zeigte als das Element aus EBS6 und HBS2, führt zu einer stärkeren Reduktion der Promotoraktivierung. Die Mutation beider HBS/EBS-Elemente führt zu einem fast völligen

Verlust der Induzierbarkeit. So konnte davon ausgegangen werden, daß es sich bei diesen Elementen um die gesuchten positiv aktivierenden Elemente handelt, die zusammen mit dem Flk-1-Intron-Enhancer für die komplette endothelzellspezifische Expression verantwortlich sind.

Um diese Hypothese *in vivo* zu überprüfen, wurden die Mutationen der HIF-2 α - und Ets-Bindungsstellen in transgenen Mausembryonen getestet. Es zeigte sich, daß diese Elemente für die endothelzellspezifische Reporter-gen-Expression unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente von Flk-1 unentbehrlich sind.

Ein vollständiger Verlust der Endothelzell-spezifischen Transgen-Expression konnte interessanterweise erst nach Mutation beider Elemente aus HBS2/EBS6 und EBS3/HBS1 beobachtet werden. Diese Daten weisen darauf hin, daß die Elemente bei der Flk-1-Transaktivierung *in vivo* alternativ genutzt werden. Der Befund, daß beide HBS/EBS-Elemente in Gel-Retardierungsversuchen HIF-2 α binden und in DNaseI-*Footprint*-Analysen vergleichbar stark besetzt sind, unterstützt diese These.

Allerdings lassen sich die sehr stark unterschiedlichen Induktionen von HBS2/EBS6 und EBS3/HBS1 nach Fusion vor einen heterologen Promotor durch die *in vivo*-Befunde nicht erklären. In diesem Fall kann nur spekuliert werden, daß der unterschiedliche Abstand zwischen benachbarter HIF-2 α - und Ets-Bindungsstelle bzw. der Abstand zum Transkriptionsstartpunkt des Minimalpromotors zu den kritischen Parametern gehören, die den Grad der Induzierbarkeit bestimmen.

4.2 HIF-2 α und Ets-1 interagieren *in vitro* physikalisch miteinander

Entsprechend der synergistischen Aktivierung des Flk-1-Promotors konnte eine physikalische Interaktion zwischen Ets-1 und HIF-2 α nachgewiesen werden.

Die physikalische Interaktion von Ets-1 und anderen Mitgliedern der Ets-Familie mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren wurde vor allem in Differenzierungsprozessen der Hematopoese gezeigt (Janknecht und Nordheim, 1993; Wasyluk *et al.*, 1993; Crepieux *et al.*, 1994; Sieweke und Graf, 1998). Während für die Interaktion von Ets-1 mit dem bHLH-Protein USF-1 als bindungsrelevante Bereiche die DNA-Bindedomänen identifiziert wurden, zeigen die Ergebnisse aus den GST-*pull down*-Analysen in dieser Arbeit, daß die C-terminale Domäne von HIF-2 α stark mit der Exon VII-Domäne von Ets-1 interagiert.

Neben dem zentralen Bindemotiv (GGA) auf der DNA bestimmen benachbarte Basen, welcher Bereich der DNA-Bindedomäne in Kontakt mit der DNA tritt (Sharrocks *et al.*, 1997). Wie bei anderen Ets-Transkriptionsfaktoren unterliegt die DNA-Bindung von Ets-1 einem autoregulatorischen Mechanismus (zur Übersicht s. Janknecht und Nordheim, 1993; Wasyluk *et al.*, 1993; Crepieux *et al.*, 1994). Eine inhibitorische Domäne, die N-terminal zur DNA-Bindedomäne liegt, schwächt die DNA-Bindefähigkeit von Ets-1. Diese Exon VII-Domäne ist als negativ regulierende Domäne bekannt, die erst nach Konformationsänderung eine Bindung von Ets-1 an DNA erlaubt (Petersen *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus dieser Konformationsänderung ist noch nicht geklärt.

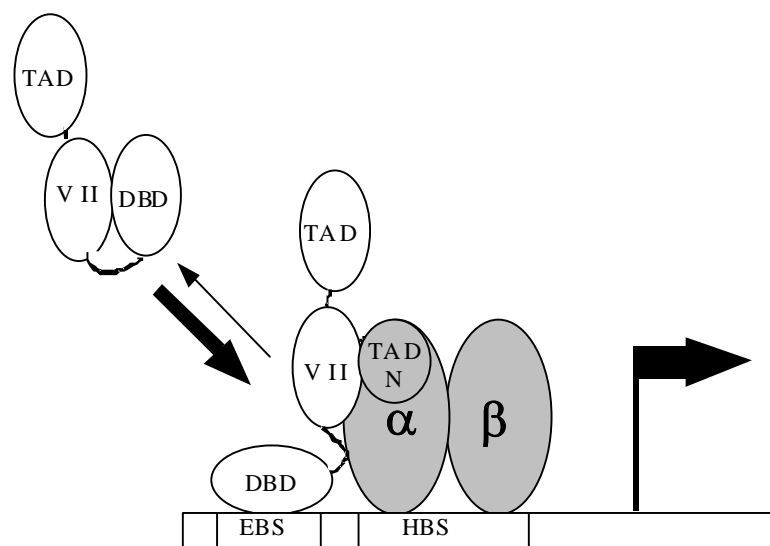


Abbildung 4-1: Interaktion von Ets-1 und HIF-2 α und Bindung an DNA. Die starke Rekrutierung von Ets-1 an DNA führt zu einer hohen Aktivierung des Promotors. Weiß: Schematische Darstellung von Ets-1, grau: schematische Darstellung von HIF-2 α (α) und HIF-1 β (β). TAD = Transaktivierungsdomäne, DBD = DNA-Bindedomäne, VII = Exon VII-Domäne.

Die Interaktion der Exon VII-Domäne mit der Transaktivierungsdomäne von HIF-2 α führt vermutlich zu einer Konformationsänderung von Ets-1 und ermöglicht so die verstärkte DNA-Bindung (Abb. 4-1). Daraus könnte die überadditive Transaktivierung des Zielgens durch die beiden Transkriptionsfaktoren resultieren.

Ein ähnlicher Mechanismus ist bei dem RUNT-Domänen-Faktor AML-1 bekannt, der in ähnlicher Weise mit Ets-1 interagiert (Kim *et al.*, 1999). In diesem Fall wird die Fähigkeit, an DNA zu binden, durch die wechselseitige Konformationsänderung der autoinhibitorischen Domänen verstärkt.

4.3 Die Transaktivierungsdomäne TAD N im C-Terminus von HIF-2 α ist an der Kooperation mit Ets-1 bei der Aktivierung des Flk-1-Promotors beteiligt

Die Daten der Reporteragen-Analysen zeigen, daß der C-Terminus von HIF-2 α nicht nur für die Transaktivierung und Hypoxie-Induzierbarkeit wichtig ist, sondern auch für die Interaktion mit Ets-1. Dabei ist der entscheidende Bereich für die Interaktion identisch mit der TAD N genannten Transaktivierungsdomäne oder in unmittelbarer Nähe davon.

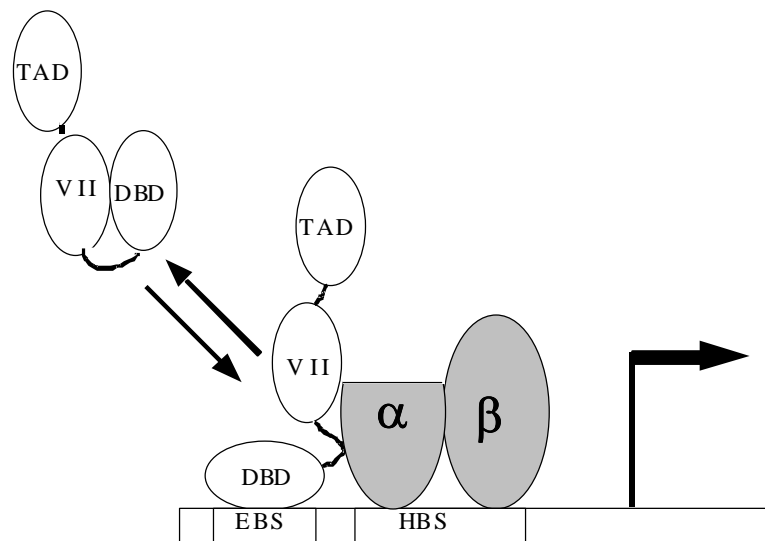


Abbildung 4-2: Interaktion von Ets-1 und HIF-2 α Δ TAD N. Die schwächere Rekrutierung von Ets-1 an DNA führt gegenüber der Kooperation mit dem Wildtyp HIF-2 α zu einer schwächeren Aktivierung des Promotors. Weiß: Schematische Darstellung von Ets-1, grau: schematische Darstellung von HIF-2 α Δ TAD N (α) und HIF-1 β (β). TAD = Transaktivierungsdomäne, DBD = DNA-Bindedomäne, VII = Exon VII-Domäne.

Die Deletion dieser TAD N-Domäne führt zum weitgehenden Verlust der synergistischen Aktivierung von Flk-1 (Abb. 4-2). Wird die weiter C-terminal gelegene Domäne TAD2 N deletiert, so ist der Effekt noch stärker. Die Aktivierung wird auf ein Niveau herabgesetzt, das auch bei Transfektion von Ets-1 ohne HIF-2 α beobachtet wurde. So kann davon ausgegangen werden, daß die TAD N-Domäne, bzw. ein Bereich, der noch etwas darüber hinaus geht, über die Bindung an die Exon VII-Domäne von Ets-1 förderlich für die Rekrutierung von Ets-1 an die DNA ist. Dagegen scheint die am C-terminalen Ende von HIF-2 α gelegene, in der Literatur beschriebene Transaktivierungsdomäne TAD C nicht für die Interaktion mit Ets-1 benötigt zu werden, da ihre Deletion keinen Einfluß auf die Interaktion hat.

Die Mutation der DNA-Bindedomänen von HIF-2 α (bei den Mutanten HIF-2 α dn und HIF-2 α dnb) führt zu einem vergleichbaren Effekt wie die Mutation der Transaktivierungsdomäne TAD2 N: das Aktivierungsniveau entspricht der Aktivität der Ets-1-Transfektion ohne Kooperationspartner.

Untersuchungen in entsprechenden Kotransfektionen zeigen, daß die Mutanten, die mit Ets-1 nicht mehr synergistisch kooperieren (HIF-2 α dn, HIF-2 α dnb, HIF-2 α Δ TAD N und HIF-2 α Δ TAD2 N) gegenüber dem Wildtyp von HIF-2 α dominant negativ wirken. Jedoch reduzieren sie die basale Stimulation durch Ets-1 auch unter forcierter Expression nicht signifikant.

Daraus kann geschlossen werden, daß endogenes HIF-2 α nicht für die basale Aktivierung des Flk-1-Promotors durch Ets-1 benötigt wird. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, daß auch in HEK/293-Zellen eine hohe Aktivität des Promotors bei Transfektion von Ets-1 feststellbar ist, obwohl diese Zellen keine detektierbare Menge an HIF-2 α -Protein aufweisen (Wiesener *et al.*, 1998).

4.4 Die Exon VII-Domäne von Ets-1 vermittelt die Interaktion mit HIF-2 α

Durch die Ko-Transfektion einer Ets-1-Mutante, der die N-terminale Transaktivierungsdomäne fehlt, sollte die Aktivierung des Flk-1-Promotors gegenüber der Aktivierung durch den Ets-1-Wildtyp stark herabgesetzt sein. Diese Mutante sollte jedoch über die Exon VII-Domäne immer noch mit der TAD N-Domäne von HIF-2 α interagieren können, was die Autoinhibition schwächen und damit die DNA-Bindung von Ets-1 ermöglichen würde. Da gleichzeitig die Transaktivierungsdomäne von HIF-2 α blockiert ist, sollte auch keine intrinsische Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren mehr feststellbar sein (Abb. 4-3a).

Fehlt zusätzlich auch die Exon VII-Domäne, kann zwar noch Bindung an die DNA stattfinden, es sollte jedoch kein Einfluß auf die basale Aktivierung durch HIF-2 α feststellbar sein (Abb. 4-3b).

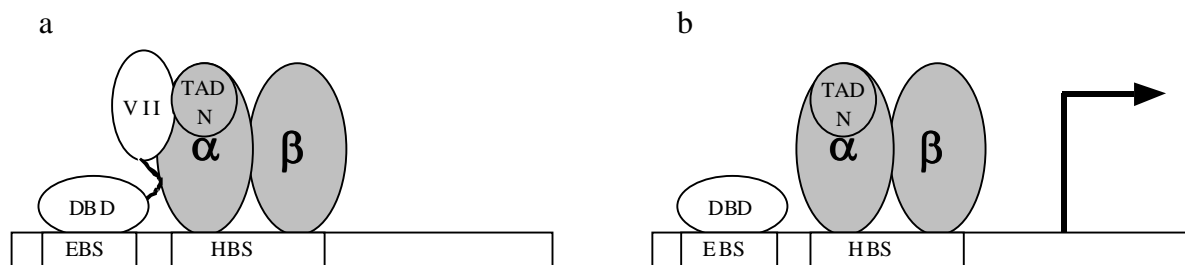


Abbildung 4-3: a: Interaktion von Ets238-441 und HIF-2 α . b: Interaktion von Ets333-441 und HIF-2 α . Durch die TAD N-Domäne von HIF-2 α wird die Bindung von Ets-1 an die DNA ermöglicht. Aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne von Ets-1 erfolgt keine signifikante Aktivierung des Promotors. Fehlt auch die Exon VII-Domäne von Ets-1, verursacht die nun nicht besetzte Transaktivierungsdomäne TAD N die basale Transaktivierung durch HIF-2 α . Weiß: Schematische Darstellung der Ets-1-Mutanten, grau: schematische Darstellung von HIF-2 α (α) und HIF-1 β (β). TAD = Transaktivierungsdomäne, DBD = DNA-Bindedomäne, VII = Exon VII-Domäne.

Die Ergebnisse der Reporteragen-Analysen der Ets-1 Mutante 238-441 bestätigen diese Hypothese. Vor diesem Hintergrund kann postuliert werden, daß der Synergismus von HIF-2 α und Ets-1 wahrscheinlich auf einer gesteigerten Ets-1-Aktivität beruht, die durch die verstärkte Rekrutierung des Transkriptionsfaktors an seine Zielsequenz hervorgerufen wird, HIF-2 α jedoch nicht mehr direkt zur Transaktivierung beiträgt, da seine entscheidende Transaktivierungsdomäne maskiert ist.

Die Untersuchung der Promotoren verschiedener anderer endothelial exprimierter Gene zeigt, daß HIF-2 α und Ets-1 nicht nur bei der Aktivierung von Flk-1 kooperieren. Der Synergismus zeigt sich auch bei Flt-1 und VEGF, jedoch nicht bei Ets-1, KDR und Tie-1. Dabei sind alle untersuchten Promotoren stark durch HIF-2 α und, bis auf den Ets-1-Promotor, auch durch Ets-1 induzierbar. Das in dieser Arbeit identifizierte Element aus HBS und EBS findet sich allerdings in den regulatorischen Bereichen nicht.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch eine Koaktivierung von Ets-1 durch HIF-2 α stattfinden kann, ohne daß eine spezifische Bindung von HIF-2 α an die DNA vorliegt. Die Analysen der Fusionskonstrukte aus dem heterologen TK-Promotor und den Bindungselementen HBS und EBS ergaben bei Mutation der HBS1-Sequenz zwar einen Verlust der Induktion durch HIF-2 α , es zeigte sich jedoch immer noch der Synergismus der beiden Transkriptionsfaktoren. Dagegen wird die intakte Bindestelle EBS3 für die Induktion durch Ets-1 und die Kooperation mit HIF-2 α benötigt.

Diese Daten weisen darauf hin, daß HIF-2 α zu den DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren gehört, die auch über ihre Interaktion mit Kofaktoren transaktivieren können, ohne dafür eine spezifische DNA-Bindung einzugehen, wie es z.B. für den bHLH-Faktor SCL/Tal-1 gezeigt wurde (Porcher *et al.*, 1999). Andererseits zeigen die Analysen der HIF-2 α -Mutanten mit deletierter DNA-Bindedomäne (HIF-2 α dn und HIF-2 α dnb), daß diese Domäne unerlässlich für den Synergismus mit Ets-1 ist.

Eine mögliche Erklärung dafür, daß die DNA-Bindedomäne, aber nicht die spezifische Erkennungssequenz für die volle Aktivität benötigt wird, ist die Hypothese, daß HIF-2 α die DNA-Bindung für eine synergistische Aktivierung braucht, jedoch nicht notwendigerweise an seine spezifische Erkennungssequenz binden muß, wenn es mit Ets-1 interagiert.

4.5 Im Gegensatz zu HIF-2 α kann HIF-1 α bei der Aktivierung von Flk-1 nicht mit Ets-1 interagieren

Der Transkriptionsfaktor mit der höchsten Homologie zu HIF-2 α , der Namensgeber der HIF-Familie HIF-1 α , kann nicht mit der Exon VII-Domäne von Ets-1 interagieren und zeigt dementsprechend keine Kooperation mit Ets-1. Durch Übertragung des C-terminalen Bereiches des HIF-1 α -Moleküles auf HIF-2 α verliert HIF-2 α seine Fähigkeit, mit Ets-1 zu kooperieren und physikalisch zu interagieren. Die strukturellen Unterschiede im C-Terminus sind also wahrscheinlich für diese Eigenschaften verantwortlich.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die größere Instabilität des HIF-1 α -Proteins unter normoxischen Bedingungen für die geringere Flk-1-Aktivierung und die fehlende physikalische Interaktion verantwortlich ist, wurde eine Titration der transfizierten DNA-Menge durchgeführt. Außerdem wurden durch Zugabe von Kobaltchlorid hypoxische Bedingungen simuliert. Es zeigte sich, daß sich die Aktivierung des Reporter-gen-Konstrukts bei beiden Transkriptionsfaktoren bereits in einem Sättigungsbereich befand, während die Expression des Proteins noch steigerbar war. Die Experimente unter simulierter Hypoxie zeigten, daß beide HIF-Proteine um etwa denselben Faktor stabilisiert wurden.

Das Verhältnis der Aktivierung durch HIF-2 α zur Aktivierung durch HIF-1 α wurde auch in Reporter-gen-Analysen mit dem VEGF-Promotor beobachtet. Die Regulierung des VEGF-Gens durch die Mitglieder der HIF-Familie wurde in früheren Arbeiten bereits beschrieben (Forsythe *et al.*, 1996; Ema *et al.*, 1997; Flamme *et al.*, 1998).

Auch unter Stimulierung mit Kobaltchlorid aktivierten die beiden Transkriptionsfaktoren die beiden Promotoren im gleichen Verhältnis. Frühere Untersuchungen zeigten, daß die Aktivierung des Promotors durch HIF-2 α unter Normoxie und Hypoxie etwa 1,7 mal stärker ist, als durch HIF-1 α (Wiesner *et al.*, 1998). Dieses Verhältnis wurde auch bei Experimenten in verschiedenen Zelllinien beobachtet.

Damit ist deutlich, daß die unterschiedlichen Aktivitäten der beiden Transkriptionsfaktoren durch die strukturellen Differenzen im C-Terminus bedingt sind.

Die widersprüchlichen Beobachtungen in HIF-2 α *knock out*-Mäusen, daß entweder kein signifikanter vaskulärer Phänotyp oder ernste Störungen der Angiogenese auftraten (Tian *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2000), könnten darauf hindeuten, daß HIF-1 α oder ein anderer Transkriptionsfaktor in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund die Aufgaben von HIF-2 α übernehmen und den Ausfall dadurch zum Teil kompensieren kann. Ob die schwache Interaktion von HIF-1 α mit dem N-Terminus von Ets-1, die in den GST-pulldown-Experimenten beobachtet wurde, dabei von funktioneller Relevanz ist, muß noch näher untersucht werden.

Die *Supershift*-Experimente zeigen, daß nach Bindung von HIF-2 α durch den spezifischen Antikörper noch immer eine geringe Restaktivität in Höhe der HIF-DNA-Bande detektierbar ist. Das könnte darauf hinweisen, daß HIF-2 α bei der Komplexbildung zwar der vorherrschende, aber nicht der einzige Vertreter der HIF-Familie ist. Dieser Befund müßte in HIF-2 α - und HIF-1 α -defizienten Zellen überprüft werden, da HIF-2 α und HIF-1 α gegenseitig ihre Transkription beeinflussen (Ryan *et al.*, 1998; Krieg *et al.*, 1999).

4.6 Über die Signaltransduktionskaskade übt Flk-1 einen autoregulatorischen Effekt aus

Die mögliche Bedeutung der synergistischen Interaktion von HIF-2 α und Ets-1 bei der Aktivierung von Flk-1 wird deutlich, wenn man die Signaltransduktionskaskade von Flk-1 betrachtet.

Die Rezeptor-Tyrosinkinase Flk-1 vermittelt nach Bindung des Liganden, Dimerisierung und Autophosphorylierung über das sogenannte MAP-Kinase (MAPK)-Netzwerk das Signal für die Proliferation im Zellkern (zur Übersicht s. Zachary, 1998). Im Verlauf dieser Phosphorylierungskaskade kommt es schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, speziell auch von Mitgliedern der Ets-Familie (Sharrocks *et al.*, 1997; Wasylyk *et al.*, 1998).

Das Ets-1-Protein besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen. Ein in der Nähe der DNA-Bindedomäne gelegener Bereich, der vier Serinreste enthält und Ziel der Kalzium-Signalkaskade ist, induziert nach Phosphorylierung über eine Konformationsänderung die Autoinhibition von Ets-1. Die Folge davon ist eine Abschwächung der DNA-Bindefähigkeit um den Faktor 50 (Cowley und Graves, 2000). Dagegen führt die Phosphorylierung der im N-terminalen Bereich gelegenen MAPK-Phosphorylierungsstelle (Threonin 38) zur Steigerung der DNA-Bindefähigkeit von Ets-1 (Rabault *et al.*, 1996; Wasylyk *et al.*, 1998; Jayaraman *et al.*, 1999).

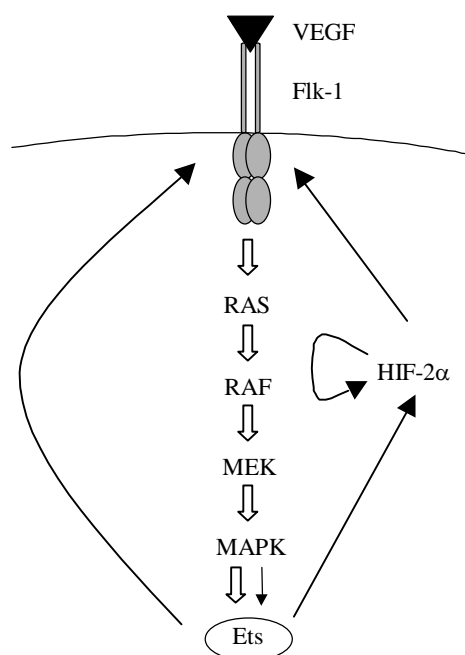


Abbildung 4-4: Schematische Darstellung der Ets-Aktivierung durch die MAP-Kinase nach Bindung von VEGF durch Flk-1. Schwarz: Der Ligand VEGF bindet an seinen Rezeptor. Grau: der VEGF-Rezeptor 2 (Flk-1) vermittelt das Signal nach Homodimerisierung über seine intrazellulären Tyrosinkinasedomänen. Das aktivierte Ets-Protein stimuliert wiederum die Expression von HIF-2 α und Flk-1. Einfache Pfeile: transkriptionelle Aktivierung; Blockpfeile: Phosphorylierung.

Wie auch Ets-1 wird HIF-2 α durch die Signaltransduktion über die MAP-Kinase aktiviert, wobei der Mechanismus noch ungeklärt ist (Conrad *et al.*, 1999). Da in den regulatorischen Sequenzen von HIF-2 α auch Ets-Bindestellen gefunden wurden und HIF-2 α ebenfalls einer starken synergistischen Aktivierung durch Ets-1 und HIF-2 α unterliegt (persönliche Mitteilung von Stephan Lanz, Köln), kann postuliert werden, daß über die gesteigerte HIF-2 α -Menge und die höhere Ets-1-Aktivität eine forcierte Flk-1-Aktivierung resultiert. Dies würde in einem autoregulatorischen Effekt das Signal des Liganden VEGF verstärken.

Das Reportergenkonstrukt, das unter der Kontrolle des mit dem HBS1/EBS3-Element fusionierten TK-Promotors stand, wird nach Kotransfektion von KDR und Zugabe von VEGF aktiviert. Dagegen wird diese Aktivierung bei Zugabe des spezifischen Inhibitors SU5416 verhindert. Der Inhibitor blockiert selektiv die Autophosphorylierung der Tyrosinkinasedomäne von KDR/Flk-1 nach der Bindung von VEGF und der anschließenden Homodimerisierung. Dieser Befund belegt die Hypothese, daß das HBS/EBS-Element im Flk-1-Promotor in der Folge der Signalübertragung von VEGF über die Rezeptor-Tyrosinkinase an einer verstärkten Expression des Rezeptors beteiligt ist.

Verstärkt wird dieser autoregulatorische Effekt durch den Befund, daß Ets-1 im Verlauf der Signaltransduktion von Flk-1 auch transkriptionell aktiviert wird (Iwasaka *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1999).

Autoregulatorische Regulationsmechanismen wurden in verschiedenen Systemen beschrieben: in der Tumervaskularisierung führt die Signaltransduktion nach VEGF-Überexpression zur Stabilisierung der VEGF-mRNA, damit zu einer gesteigerten Expression des Proteins und erhöhter Gefäßbildung im Tumor (White *et al.*, 1995) und die Expression des Tumornekrosefaktors TNF- α steht unter der Kontrolle der Signaltransduktion über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) und die MAP-Kinasekaskade (Brinkman *et al.*, 1999). Ein weiterer autoregulatorischer Mechanismus wurde für den *transforming growth factor* TGF- α beschrieben (Jiang *et al.*, 1998).

4.7 Hypoxie reguliert über die Stabilisierung des HIF-2 α -Proteins die Transkription von Flk-1

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß das HIF-2 α -Protein während der Angiogenese in den Zellkernen von Kapillarendothelzellen lokalisiert ist. Dies wurde am Beispiel von Hirnkapillaren während der postnatalen Entwicklung gezeigt. Das Gehirn juveniler Mäuse wurde für diese Untersuchungen ausgewählt, da dieses Organ in Hinblick auf seine

Gefäßentwicklung gut untersucht ist und gezeigt wurde, daß Endothelzellproliferation und Flk-1-Expression korrelieren (Robertson *et al.*, 1985; Kremer *et al.*, 1997). Sowohl die Endothelzellproliferation als auch die Flk-1-Expression nehmen ab, wenn das Gehirn ausgereift ist. Parallel zu dieser transkriptionalen Herunterregulierung von Flk-1 ist auch die Expression von HIF-2 α stark vermindert. Das HIF-2 α -Protein ist nicht mehr in den Zellkernen detektierbar, obwohl noch immer eine starke Expression der mRNA im Kapillarendothel zu finden ist. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß HIF-2 α in Endothelzellen posttranslational reguliert wird. Über den zugrundeliegenden Mechanismus kann bislang nur spekuliert werden. Die Induktion von HIF-2 α durch Hypoxie scheint ähnlich wie bei HIF-1 α von der Stabilisierung des Proteins abzuhängen. Sie wird durch eine "Sauerstoff-abhängige Degradierungsdomäne" im C-Terminus des Moleküls vermittelt, die unter Normoxie dem VHL-Protein (dem Produkt des von Hippel-Lindau-Tumor-Suppressorgens) als Ansatzpunkt für die Degradierung über das Ubiquitin-Proteosomensystem dient (Huang *et al.*, 1998; O'Rourke *et al.*, 1999, Krieg *et al.*, 2000; Tanimoto *et al.*, 2000). Der O₂-Partialdruck im Gewebe hängt von der Sauerstoffzufuhr und vom Sauerstoffverbrauch ab. Da der Verbrauch in wachsendem, metabolisch hoch aktivem Gewebe hoch ist, kann es zu relativer Hypoxie kommen. Angesichts der Beobachtung, daß das HIF-2 α -Protein in wachsenden Kapillaren während der Adoleszenz, jedoch nicht in ruhenden Kapillaren des ausgewachsenen Organismus vorhanden ist, könnte eine relative Hypoxie im wachsenden Gehirn ein wichtiger Faktor sein, der über die Stabilisierung des endothelialen HIF-2 α -Proteins die Transkription von Flk-1 und damit das Gefäßwachstum reguliert. Die Daten über die transkriptionelle Regulierung von Flk-1 durch Hypoxie sind widersprüchlich (Tuder *et al.*, 1995; Detmar *et al.*, 1997; Gerber *et al.*, 1997; Marti und Riesau, 1998). In Kulturen von Gehirnschnitten konnte gezeigt werden, daß die Expression von Flk-1 durch Hypoxie induziert wird (Kremer *et al.*, 1997), aber es ist unklar, ob diese Induktion auf direktem Weg stattfindet oder indirekt über die Hochregulierung des Liganden VEGF, der dann seinerseits die Flk-1-Expression stimuliert (Shen *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu Flk-1 wird die Transkription des VEGF-Rezeptors 1 (Flt-1) direkt durch Hypoxie stimuliert, was über ein Hypoxie-induzierbares Element innerhalb des Promotors geschieht (Gerber *et al.*, 1997). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß der orthologe Bereich zu dem Abschnitt des Flk-1-Promotors, der die entscheidenden HBS/EBS-Elemente beinhaltet, für die Aktivierbarkeit des Fusionskonstruktes mit dem TK-Promotor durch HIF-2 α und Ets-1 verantwortlich ist. Interessanterweise konnten innerhalb dieses Fragmentes in der Sequenzanalyse keine HIF-2 α -Bindestelle gefunden werden. Daß das Konstrukt trotzdem

durch die beiden Transkriptionsfaktoren in synergistischer Weise aktiviert wird, deutet auf eine kryptische Bindungsstelle hin, die den Einfluß des Transkriptionsfaktors auf den Promotor vermitteln. Der Synergismus von HIF-2 α und Ets-1 ist auch bei der Aktivierung des VEGF-Promotors zu finden. Hier zeigt die Sequenzanalyse eine Vielzahl von potentiellen HIF-2 α - und Ets-Bindestellen, deren Bedeutung für die Promotorregulation im Einzelnen noch untersucht werden muß. Es ist zu erwarten, daß mehrere HBS/EBS-Elemente für die sehr starke Aktivierung dieses Promotors durch die beiden Transkriptionsfaktoren sorgen. Die Expression von HIF-2 α in VEGF-produzierenden Geweben weist auf die regulatorische Rolle von HIF-2 α bei der VEGF-Expression hin. Der ebenfalls untersuchte Promotor von Tie-1 und die Konstrukte mit den Promotorfragmenten von Ets-1 und KDR unterliegen nicht einer synergistischen Aktivierung durch HIF-2 α und Ets-1. Dies ist im Fall des humanen KDR von besonderem Interesse, da der orthologe Bereich im Promotor des homologen murinen Flk-1 für diese Aktivatoren hochsensitiv ist. Es kann spekuliert werden, ob die im Vergleich zum murinen Homologen geringere Aktivierbarkeit der Expression des humanen VEGF-Rezeptors 2 durch HIF-2 α und Ets-1 mit der wesentlich langsameren Adoleszenz des Menschen und der damit langsameren Bildung des Gefäßsystems zu erklären ist. Die Untersuchung der genauen Lokalisation der Proteine könnte weitere Hinweise auf die Rolle von HIF-2 α bei der Regulation des VEGF-Rezeptors 2 im Menschen ergeben.

Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, daß der Synergismus von HIF-2 α und Ets-1 bei der Aktivierung verschiedener endothelial exprimierter Gene eine Rolle spielt. Vor dem Hintergrund, daß *Tie-2* und *Flt-1* in den regulatorischen Sequenzen funktionelle Ets-Bindestellen besitzen und wie viele andere endotheliale Gene transkriptionell durch Ets-1 aktiviert werden (Wakiya *et al.*, 1996; Schlaeger *et al.*, 1997; Dube *et al.*, 1999), kann spekuliert werden, ob hier auch andere Transkriptionsfaktoren die Rolle von HIF-2 α übernehmen. Es ist bisher auch nicht bekannt, welche Vertreter der Ets-Familie die Expression dieser Gene *in vivo* regulieren. Die funktionelle Redundanz der Ets-Transkriptionsfaktoren, die im Endothel exprimiert werden, könnte erklären, warum sich in Ets-1-defizienten Mäusen kein vaskulärer Phänotyp findet (Barton *et al.*, 1998). Ob HIF-2 α auch mit anderen Mitgliedern der Ets-Familie interagieren kann und ob der Synergismus zwischen HIF-2 α und Ets-Faktoren in der Regulation anderer endothelialer Gene eine Rolle spielt, muß noch genauer untersucht werden. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, könnte HIF-2 α an einem generellen Mechanismus zur Bestimmung der Endothel-Spezifität beteiligt sein.

Außerdem zeigen die Daten dieser Arbeit und anderer Untersuchungen, daß HIF-2 α ein wichtiger Regulator der VEGF-Expression in gesunden und krankhaften Prozessen sein kann (Ema *et al.*, 1997; Flamme *et al.*, 1998). Damit wäre HIF-2 α ein wichtiger Regulator in der durch metabolische Prozesse ausgelösten Endothelzell-Proliferation und ein interessantes Ziel weiterer Untersuchungen im Zusammenhang mit experimentellen und therapeutischen Manipulationen der Angiogenese.

4.8 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß der Synergismus zwischen den Transkriptionsfaktoren HIF-2 α und Ets-1 bei der transkriptionellen Aktivierung von Flk-1, einem Schlüssel-molekül der Angiogenese eine essentielle Rolle spielt. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, genauere Daten bezüglich der Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren, zum Beispiel aus der Ets-Familie, zu erhalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transgenanalysen müßten durch andere Experimente *in vivo* überprüft werden, da die Aktivität der verwendeten Reportergenkonstrukte vom Ort der Insertion ins Genom abhängen kann. Eine hierdurch nicht beeinflusste *in vivo*-Analyse der HBS/EBS-Elemente im Flk-1-Promotor würde der sogenannte *knock-in* von Promotorkonstrukten mit mutierten Bindestellen darstellen. Hierbei wird durch homologe Rekombination ein Abschnitt des Zielgens gegen einen mutierten Abschnitt ausgetauscht.

Ein weiteres interessantes Forschungsprojekt ist die Suche nach weiteren Zielgenen von HIF-2 α . Diese könnten durch Überexpression von HIF-2 α in nicht-endothelialen Zellen, anschließender Hybridisierung von cDNA-Chips und Klonieren differentiell exprimierter Gene identifiziert werden.

In dieser Arbeit zeigten einige Mutanten von HIF-2 α einen dominant negativen Effekt gegenüber dem Wildtyp. Durch Überexpression dieser Mutanten könnten Therapiemodelle der Antiangiogenese entwickelt werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, Faktoren zu identifizieren, die die Transkription des VEGF-Rezeptors 2/Flk-1 in der Maus aktivieren. Als Kandidaten dafür kamen Transkriptionsfaktoren in Frage, deren Expression mit der des VEGF-Rezeptors korreliert. Eine derartige Korrelation wurde für den bHLH PAS-Domänen-Transkriptionsfaktor HIF-2 α , einen nahen Verwandten des Hypoxie-induzierbaren-Faktors HIF-1 α gefunden. Das HIF-2 α -Protein ist während der Angiogenese in den Zellkernen von Kapillarendothelzellen nachweisbar; nach Abschluß der Angiogenese, wenn VEGF herunterreguliert wird, jedoch nicht mehr. In Reporter-gen-Assays konnte gezeigt werden, daß HIF-2 α ein aus dem Promotor von Flk-1 und dem Luziferasegen bestehendes Reporter-genkonstrukt aktiviert. Im Gegensatz hierzu aktiviert der nahe Verwandte des HIF-2 α , HIF-1 α , den Flk-1 Promotor kaum.

Durch Austauschmutagenese zwischen HIF-1 α und HIF-2 α konnte gezeigt werden, daß die C-terminale Hälfte des HIF-2 α die Elemente enthält, die für die Transaktivierung des Flk-1 Promotors notwendig sind. Eine 62 Aminosäuren lange Domäne wurde als Transaktivierungsdomäne identifiziert. Ihre Deletion erzeugte eine HIF-2 α -Mutante, die gegenüber dem Wildtyp nicht nur eine stark verringerte Flk-1-Aktivierung zeigte, sondern auch bei Ko-Transfektion zusammen mit dem Wildtyp die Aktivierung des Reporter-genkonstruktes herabsetzte und somit dominant negativ wirkte. Bei der Untersuchung der Deletionsmutanten wurde außerdem festgestellt, daß eine DNA-Bindung von HIF-2 α für die Transaktivierung von Flk-1 nötig ist, da eine Deletion in der DNA-Bindedomäne die Aktivierung des Reporter-gen-Konstruktes ebenfalls herabsetzt.

Bei der Suche nach potentiellen Bindestellen für HIF-2 α auf dem Flk-1 Promotor fanden sich zwei Bereiche, die eine 6 bp lange Konsensussequenz (HRE, *hypoxia responsive element*) beinhalteten. Durch Gelretardierungsexperimente konnte gezeigt werden, daß es sich hier um HIF-2 α -Bindestellen (HBS) handelt. Auffallend war, daß unmittelbar benachbart dazu jeweils eine Konsensus-Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie (EBS, Ets-Bindungsstelle) liegt. Es ist bekannt, daß Ets-Faktoren bei der Aktivierung ihrer Zielgene mit Transkriptionsfaktoren anderer Familien kooperativ interagieren. In der DNase I-*footprint*-Analyse des Flk-1-Promotors mit Endothelzellkernextrakten fanden sich die benachbarten HIF-2 α - und Ets-Bindestellen besetzt. Reporter-genexperimente ergaben, daß HIF-2 α und Ets-1 den Flk-1 Promotor kooperativ aktivieren. Durch *GST-pull down*-Experimente wurde gezeigt, daß HIF-2 α und Ets-1, nicht jedoch HIF-1 α und Ets-1 physikalisch interagieren.

Durch Kombination verschiedener Ets-1 und HIF-2 α -Mutanten konnten die Interaktionsdomänen lokalisiert werden, so daß ein Modell der Interaktion von HIF-2 α und Ets-1 entwickelt werden konnte.

Durch Übertragung der HBS/EBS-Elemente aus dem Flk-1-Promotor auf heterologe Promotoren gelang der Nachweis, daß es sich bei diesen Elementen um ein stark positiv wirkendes Element handelt, mit dem die synergistische Induzierbarkeit durch HIF-2 α und Ets-1 auf heterologe Promotoren übertragen werden konnte. Dieses Konstrukt besaß in Endothelzellen die stärkste basale Aktivität. Somit könnte es sich bei dem HBS/EBS-Element um das entscheidende Sequenzmotiv handeln, das sowohl zur Expressionskontrolle, als auch zur endothelzellspezifischen Expression des Flk-1-Gens beiträgt. Durch Mutation der verschiedenen Bindestellen im nativen Flk-1-Promotor und Austestung in transgenen Mausembryonen konnte diese Hypothese belegt werden, eine Mutation beider HBS/EBS-Elemente führte zum Verlust der Flk-1-Expression.

Für den Regulationsmechanismus von Flk-1 ist die Kooperation von HIF-2 α und Ets-1 offenbar von großer Bedeutung. Die Daten dieser Arbeit weisen auf einen autoregulatorischen Effekt hin, da das HBS/EBS-Element aus dem Flk-1-Promotor durch die Signaltransduktionskaskade des VEGF/Flk-1-Systems aktiviert wird. Dies beruht möglicherweise auf der Aktivierung von HIF-2 α und der in der Literatur schon beschriebenen Ets-1-Aktivierung. So wird das VEGF-vermittelte Signal durch die zusätzliche transkriptionelle Stimulierung von Flk-1 verstärkt.

6 Literaturverzeichnis

- Agani, F. und Semenza, G. (1998): Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 12, 149-62.
- Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F. und Livingston, D.M. (1996): An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12969-12973.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1994): *Current protocols in molecular biology*, Wiley.
- Baird, A. und Walicke, P.A. (1989): Fibroblast growth factors. *British Medical Bulletin* 45, 438-452.
- Bankston, P. und Pino, R. (1980): The development of the sinusoids of fetal rat liver: morphology of endothelial cells, Kupffer cells, and the transmural migration of blood cells into the sinusoids. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 1061-70.
- Bär, T. (1980): The vascular system of the cerebral cortex. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 59, 1-62.
- Barton, K., Muthusamy, N., Fischer, C., Ting, C., Walunas, T., Lanier, L. und Leiden, J. (1998): The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* 9, 555-63.
- Bicknell, R. und Harris, A. (1992): Anticancer strategies involving the vasculature: vascular targeting and the inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 3, 399-407.
- Birnboim, H. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-23.
- Blumenthal, S., Aichele, G., Wirth, T., Czernilofsky, A., Nordheim, A. und Dittmer, J. (1999): Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1, cooperate with GATA3 and HTLV-I Tax1. *J Biol Chem.* 274, 12910-6.
- Brinkman, B.M., Telliez, J.B., Schievella, A.R., Lin, L.L., und Goldfeld, A.E. (1999): Engagement of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 leads to ATF-2- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF- α gene expression. *J Biol Chem.* 274, 30882-6.
- Borck, K., Beggs, J., Brammar, W., Hopkins, A. und Murray, N. (1976): The construction in vitro of transducing derivatives of phage lambda. *Mol Gen Genet.* 146, 199-207.
- Breier, G. und Risau, W. (1996): The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol* 6, 454-456.
- Brogi, E., Wu, T., Namiki, A. und Isner, J.M. (1994): Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 90, 649-52.
- Burgess, W.H. und Maciag, T. (1989): The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58, 575-606.
- Calmels, T., Mattot, V., Wernert, N., Vandenbunder, B. und Stehelin, D. (1995): Invasive tumors induce c-Ets1 transcription factor expression in adjacent stroma. *Biol Cell.* 84, 53-61.

Chandel, N.S., McClintock, D.S. und Feliciano, C.E. (2000): Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize HIF-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *JBC* 275, 25130-8.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenshtein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. und Nagy, A. (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.

Connolly, D.T., Heuvelman, D.M., Nelson, R., Olander, J.V., Eppley, B.L., Delfino, J.J., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M. und Feder, J. (1989): Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84, 1470-8.

Conrad, P., Freeman, T., Beitner-Johnson, D. und Millhorn, D.E. (1999): EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem.* 274, 33709-13.

Coumailleau, P., Poellinger, L., Gustafsson, J. und Whitelaw, M. (1995): Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. *J Biol Chem.* 270, 25291-300.

Crepieux, P., Coll, J. und Stehelin, D. (1994): The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit Rev Oncog.* 5, 615-38.

Cowley, D.O. und Graves, B.J. (2000): Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev* 14, 366-76.

Damert, A., Machein, M., Breier, G., Fujita, M.Q., Hanahan, D., Risau, W. und Plate, K.H. (1997): Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in a rat glioma is conferred by two distinct hypoxia-driven mechanisms. *Cancer Res.* 57, 3860-4.

Davis, S., Aldrich, T., Jones, P., Acheson, A., Compton, D., Jain, V., Ryan, T., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P. und Yancopoulos, G. (1996): Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87, 1161-1169.

De Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. und Williams, L.T. (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991.

Detmar, M., Brown, L.F., Berse, B., Jackman, R.W., Elicker, B.M., Dvorak, H.F. und Claffey, K.P. (1997): Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol* 108, 263-8.

Dittmer, J. und Nordheim, A. (1998): Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1377, F1-11.

Dolwick, K., Schmidt, J., Carver, L., Swanson, H. und Bradfield, C. (1993): Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol.* 44, 911-7.

Dube, A., Akbarali, Y., Sato, T.N., Libermann, T.A. und Oettgen, P. (1999): Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ. Res.* 84, 1177-85.

Dumont, D., Gradwohl, G., Fong, G., Puri, M., Gertsenshtein, M., Auerbach, A. und Breitman, M. (1994): Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 8, 1897-1909.

- Dumont, D.J., Yamaguchi, T.P., Conlon, R.A., Rossant, J. und Breitman, M.L. (1992): tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 7, 1471-80.
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L. und Fujii-Kuriyama, Y. (1999): Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J* 18, 1905-14.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. und Fujii-Kuriyama, Y. (1997): A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 94, 4273-4278.
- Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T. und Risau, W. (1998): Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 140, 947-959.
- Farnebo, F., Piehl, F. und Lagercrantz, J. (1999): Restricted expression pattern of VEGF-D in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 891-4.
- Ferrara, N., Carvermoore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O' Shea, K.S., Powellbraxton, L., Hillan, K.J. und Moore, M.W. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Ferrara, N. und Henzel, W.J. (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 851-8.
- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. und Leung, D.W. (1992): Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13, 18-32.
- Flamme, I., Breier, G. und Risau, W. (1995): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Developmental Biology* 169, 699-712.
- Flamme, I., Fröhlich, T. und Risau, W. (1997a): Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 173, 206-210.
- Flamme, I., Fröhlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A. und Risau, W. (1997b): HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to Hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mech. Dev.* 63, 51-60.
- Flamme, I., Krieg, M. und Plate, K.H. (1998): Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF-2 α . *Am. J. Pathol.* 153, 25-9.
- Folkman, J. (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285, 1182.
- Folkman, J. (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.
- Folkman, J. (1996): Spektrum der Wissenschaft, Spezial 5: Krebsmedizin; Spektrum der Wissenschaft Verlags GmbH/Heidelberg, 91-96.
- Folkman, J. und Klagsbrun, M. (1987): Vascular physiology. A family of angiogenic peptides [news]. *Nature* 329, 671-2.

- Folkman, J. und Shing, Y. (1992): Angiogenesis. *J Bio Chem* 267, 10931-34.
- Fong, G., Zhang, L., Bryce, D. und Peng, J. (1999): Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in Flt-1 knock-out mice. *Development* 126, 3015-25.
- Fong, G.H., Klingensmith, J., Wood, C.R., Rossant, J. und Breitman, M.L. (1996): Regulation of Flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium. *Developmental Dynamics* 207, 1-10.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. und Breitman, M.L. (1995): Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Fong, T.A., Shawver, L.K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T.J., Kim, Y.H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., Ullrich, A., Hirth, K.P., McMahon, G. (1999): SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59, 99-106.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D. und Semenza, G.L. (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by Hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-13
- Frelin, C., Ladoux, A. und D'angelo, G. (2000): Vascular endothelial growth factors and angiogenesis. *Ann Endocrinol (Paris)* 61, 70-4.
- Gassmann, M., Kvietikova, I., Rolfs, A. und Wenger, R. (1997): Oxygen- and dioxin-regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int.* 51, 567-74.
- Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J. und Ferrara, N. (1997): Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272, 23659-67.
- Gering, M., Rodaway, A.R., Gottgens, B., Patient, R.K. und Green, A.R. (1998): The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J* 17, 4029-45.
- Gimbrone, M.J. (1976): Culture of vascular endothelium. *Prog Hemost Thromb.* 3, 1-28.
- Gluzman, Y., (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-82.
- Gospodarowicz, D. und Bialecki, H. (1979): Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine, and human origin. *Endocrinology* 104, 757-64.
- Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R., Kvietikova, I., Whitelaw, M., Toftgard, R., Tora, L., Gassmann, M. und Poellinger, L. (1996): Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 16, 5521-31.
- Graves, B., Cowley, D., Goetz, T., Petersen, J., Jonsen, M. und Gillespie, M. (1998): Autoinhibition as a transcriptional regulatory mechanism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 63, 621-9.
- Guillemin, K. und Krasnow, M. (1997): The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 89, 9-12.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166, 557-80.

Hanneken, A., Luty, G.A., McLeod, D.S., Robey, F., Harvey, A.K. und Hjelmeland, L.M. (1989): Localization of basic fibroblast growth factor to the developing capillaries of the bovine retina. *J Cell Physiol* 138, 115-20.

Hatva, E., Kaipainen, A., Mentula, P., Jaaskelainen, J., Paetau, A., Haltia, M. und Alitalo, K. (1995): Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *Am J Pathol.* 146, 368-78.

Hertig, A.T. (1935): Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib Embryol Carnegie Inst Washington* 25, 37-81.

Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. und Shibuya, M. (1998): Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9349-9354.

His, W. (1900): Lecithoblast und Angioblast der Wirbeltiere. *Abhandl. K. S. Ges. Wiss. Math.-Phys.* 22, 171-328.

Hobson, B. und Denekamp, J. (1984): Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 49, 405-13.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. und Lacy, E. (1994): *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual.*, sec. ed., Cold Spring Harbor Lab Press NY.

Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H. und Bradfield, C.A. (1997): Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272, 8581-93.

Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B. und Leung, D.W. (1991): The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5, 1806-14.

Huang, J.P., Tang, C.J., Kou, G.H., Marchesi, V.T., Benz, E.J. und Tang, T.K. (1993): Genomic structure of the locus encoding protein 4.1. Structural basis for complex combinational patterns of tissue-specific alternative RNA splicing. *J Biol Chem* 268, 3758-66.

Huang, L., Gu, J., Schau, M. und Bunn, H. (1998a): Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 7987-7992.

Ikeda, T., Wakiya, K. und Shibuya, M. (1996): Characterization of the promoter region for flt-1 tyrosine kinase gene, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 13, 151-62.

Iljin, K., Dube, A., Kontusaari, S., Korhonen, J., Lahtinen, I., Oettgen, P. und Alitalo, K. (1999): Role of Ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *Faseb J* 13, 377-86.

Itakura, J., Ishiwata, T., Shen, B., Kornmann, M. und Korc, M. (2000): Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 85, 27-34.

Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M. und Sato, Y. (1996): Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell. Physiol.* 169, 522-531.

Janknecht, R. und Nordheim, A. (1993): Gene regulation by Ets proteins. *Biochim Biophys Acta* 1155, 346-56.

Jayaraman, G., Srinivas, R., Duggan, C., Ferreira, E., Swaminathan, S., Somasundaram, K., Williams, J., Hauser, C., Kurkinen, M., Dhar, R., Weitzman, S., Buttice, G. und Thimmapaya, B. (1999): p300/cAMP-responsive element-binding protein interactions with Ets-1 and Ets-2 in the transcriptional activation of the human stromelysin promoter. *J Biol Chem* 274, 17342-52.

Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R. und Alitalo, K. (1997): Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276, 1423-1425.

Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R. und Semenza, G.L. (1996a): Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 17771-8.

Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. und Semenza, G.L. (1996b): Novel mechanism of transcriptional activation by hypoxia-inducible factor 1: derepression in response to hypoxia signal transduction. *Blood* 88, 191a.

Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. und Semenza, G.L. (1997): Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 272, 19253-60.

Jiang, D., Liang, J., Humphrey, L.E., Yang, H. und Brattain, G. (1998): Expression of TGF α autocrine activity in human colon carcinoma CBS cells is autoregulated and independent of exogenous epidermal growth factor. *J Cell Phys* 175, 174-183.

Jorcyk, C., Watson, D.K., Mavrothalassitis, G. J. und Papas, T.S. (1991): The human Ets-1 gene: genomic structure, promoter characterisation and alternative splicing. *Oncogene* 6, 523-532.

Jorcyk, C., Garrett, L., Maroulakou, I., Watson, D. und Green, J. (1997): Multiple regulatory regions control the expression of Ets-1 in the developing mouse: vascular expression conferred by intron I. *Cell Mol Biol* 43, 211-25.

Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. und Alitalo, K. (1996): A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases [published erratum appears in *EMBO J* 1996 Apr 1;15(7):1751]. *EMBO Journal* 15, 290-98.

Kabrun, N., Buhring, H., Choi, K., Ullrich, A., Risau, W. und Keller, G. (1997): Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 124, 2039-2048.

Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V., Fang, G., Dumont, D., Breitman, M. und Alitalo, K. (1995): Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3566-3570.

Kallianpur, A., Jordan, J. und Brandt, S. (1994): The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 1200-1208.

Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y. und Poellinger, L. (1999): Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274, 6519-25.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S., Heyman, R., Rose, D., Glass, C. und Rosenfeld, M. (1996): A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-14.

- Kappel, A. (1999): Analyse der regulatorischen Elemente des *Flk-1* Gens. Dissertationsarbeit am Fachbereich Humanbiologie der Philipps-Universität Marburg, Deutschland.
- Kappel, A., Flamme, I., Risau, W. und Breier, G. (2000): Role of SCL/Tal-1, GATA, and Ets transcription factor binding sites for the regulation of Flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* 96, in press.
- Kappel, A., Ronicke, V., Damert, A., Flamme, I., Risau, W. und Breier, G. (1999): Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood* 93, 4284-92.
- Kim, W.Y., Sieweke, M., Ogawa, E., Wee, H.J., Englmeier, U., Graf, T. und Ito, Y. (1999): Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *Embo J* 18, 1609-20.
- Korhonen, J., Lahtinen, I., Halmekyto, M., Alhonen, L., Janne, J., Dumont, D. und Alitalo, K. (1995): Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. *Blood* 86, 1828-1835.
- Koriyama, Y., Yamada, E. und Watanabe, I. (1992): Pored-domes of the fenestrated endotheliocyte of the glomerular and peritubular capillaries in the rodent kidney. *J Electron Micr* 41, 30-36.
- Kremer, C., Breier, G., Risau, W. und Plate, K.H. (1997): Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res* 57, 3852-9.
- Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I. und Plate, K.H. (2000): Stabilization of hypoxia-inducible factors HIF1a and HIF2a under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. Submitted.
- Kvietikova, I., Wenger, R.H., Marti, H.H. und Gassmann, M. (1995): The transcription factors ATF 1 and CREB 1 bind constitutively to the hypoxia inducible factor 1 (HIF 1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Research* 23, 4542-4550.
- Ladoux, A. und Frelin, C. (1993): Expression of vascular endothelial growth factor by cultured endothelial cells from brain microvessels. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 799-803.
- Ladoux, A. und Frelin, C. (1997): Cardiac expressions of HIF-1 alpha and HLF/EPAS, two basic loop helix/PAS domain transcription factors involved in adaptative responses to hypoxic stresses. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 552-6.
- Lando, D., Pongratz, I., Poellinger, L. und Whitelaw, M.L. (2000): A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α and the HIF-like factor. *J Biol Chem* 275, 4618-4627.
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V. und Ferrara, N. (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-9.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S. und Goldberg, M.A. (1995): Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 270, 13333-13340.
- Li, H., Ko, H.P. und Whitlock, J.P. (1996): Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia - roles of ARNT and HIF-1 α . *Journal of Biological Chemistry* 271, 21262-21267.

Liao, E., Paw, B., Oates, A., Pratt, S., Postlethwait, J. und Zon, L. (1998): SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev* 12, 621-626.

Lin, P., Polverini, P., Dewhirst, M., Shan, S., Rao, P.S. und Peters, K. (1997): Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie2 in pathologic vascular growth. *J Clin Invest* 100, 2072-8.

Lindahl, P., Johansson, B., Leveen, P. und Betsholtz, C. (1997): Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277, 242-245.

Liu, Y.X., Cox, S.R., Morita, T. und Kourembanas, S. (1995): Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells identification of a 5' enhancer. *Circulation Research* 77, 638-643.

Maemura, K., Hsieh, C.M., Jain, M.K., Fukumoto, S., Layne, M.D., Liu, Y., Kourembanas, S., Yet, S.F., Perrella, M.A. und Lee, M.E. (1999): Generation of a dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain. *J Biol Chem* 274, 31565-31570.

Marti, H.H. und Risau, W. (1998): Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15809-14.

Maxam, A. und Gilbert, W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 560-4.

Millauer, B., Wizigmann Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N.P., Risau, W. und Ullrich, A. (1993): High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72, 835-46.

Morishita, K., Johnson, D. und Williams, L. (1995): A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem* 270, 27948-53.

Moscattelli, D., Presta, M., Joseph Silverstein, J. und Rifkin, D.B. (1986): Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 129, 273-6.

Murray, P.D.F. (1932): The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *R. Soc. London Ser. B III*,

Mustonen, T. und Alitalo, K. (1995): Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 129, 895-8.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. und Poltorak, Z. (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9-22.

O'Rourke, J.F., Tian, Y.M., Ratcliffe, P.J. und Pugh, C.W. (1999): Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 274, 2060-71.

- Olofsson, B., Pajusola, K., Voneuler, G., Chilov, D., Alitalo, K. und Eriksson, U. (1996): Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *Journal of Biological Chemistry* 271, 19310-19317.
- Orkin, S.H., Saga, Y., Hata, N., Kobayashi, S., Magnuson, T., Seldin, M.F. und Taketo, M.M. (1995): Hematopoiesis: how does it happen? *Current Opinion in Cell Biology* 7, 870-7.
- Palmiter, R., Chen, H. und Brinster, R. (1982): Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* 29, 701-10.
- Pardanaud, L. und Dieterlen-Lievre, F. (1993): Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhesion & Communication* 1, 151-60.
- Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A. und Ferrara, N. (1994): Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 269, 25646-54.
- Patterson, C., Perrella, M.A., Hsieh, C.M., Yoshizumi, M., Lee, M.E. und Haber, E. (1995): Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 270, 23111-8.
- Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L. und Fong, G. (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, 8386-91.
- Petersen, J.M., Skalicky, J.J., Donaldson, L.W., McIntosh, L.P., Alber, T. und Graves, B.J. (1995): Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix. *Science* 269, 1866-9.
- Plate, K., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A. und Risau, W. (1993): Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Research* 53, 5822-5827.
- Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A., Mennel, H.D. und Risau, W. (1994): Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis - coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int. J. Cancer* 59, 520-529.
- Porcher, C., Liao, E.C., Fujiwara, Y., Zon, L.I. und Orkin, S.H. (1999): Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* 126, 4603-4615.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M. und Ratcliffe, P.J. (1997): Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272, 11205-14.
- Rabault, B., Roussel, M., Quang, C. und Ghysdael, J. (1996): Phosphorylation of Ets1 regulates the complementation of a CSF-1 receptor impaired in mitogenesis. *Oncogene* 13, 877-81.
- Rak, J., St Croix, B. und Kerbel, R. (1995): Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anticancer Drugs* 6, 3-18.
- Ratajskaja, A., Torry, R.J., Kitten, G.T., Kolker, S.J. und Tomanek, R.J. (1995). Modulation of cell-migration and vessel formation by vascular endothelial growth-factor and basic fibroblast growth-factor in cultured embryonic heart. *Dev Dyn* 203, 399-407.
- Risau, W. (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.

- Risau, W. und Flamme, I. (1995): Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11, 73-91.
- Risau, W., Gautschi, S.P. und Bohlen, P. (1988): Endothelial cell growth factors in embryonic and adult chick brain are related to human acidic fibroblast growth factor. *Embo J* 7, 959-62.
- Risau, W. und Lemmon, V. (1988): Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol* 125, 441-50.
- Robertson, P.L., Du Bois, M., Bowman, P.D. und Goldstein, G.W. (1985): Angiogenesis in developing rat brain: an in vivo and in vitro study. *Brain Res* 355, 219-23.
- Ronicke, V., Risau, W. und Breier, G. (1996): Characterization of the endothelium-specific murine vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter. *Circ Res* 79, 277-85.
- Ruggeri, Z. und Ware, J. (1993): von Willebrand factor. *FASEB J* 7, 308-16.
- Ryan, H.E., Lo, J. und Johnson, R.S. (1998): HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17, 3005-15.
- Sabin, F.R. (1920): Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood plasma and red blood-cells as seen in the living chick. *Anat Rec* 13, 199-204.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Salceda, S. und Caro, J. (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, 22642-7.
- Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendronmaguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W. und Qin, Y. (1995): Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376, 70-74.
- Schlaeger, T., Bartunkova, S., Lawitts, J., Teichmann, G., Risau, W., Deutsch, U. und Sato, T. (1997): Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3058-3063.
- Schlaeger, T., Qin, Y., Fujiwara, Y., Magram, J. und Sato, T. (1995): Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice. *Development* 121, 1089-98.
- Schnürch, H. und Risau, W. (1993): Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 119, 957-968.
- Schulze Osthoff, K., Risau, W., Vollmer, E. und Sorg, C. (1990): In situ detection of basic fibroblast growth factor by highly specific antibodies. *Am J Pathol* 137, 85-92.
- Schwartz, S. (1978): Selection and characterization of bovine aortic endothelial cells. *In Vitro* 14, 966-80.
- Seed, J., Olwin, B.B. und Hauschka, S.D. (1988): Fibroblast growth factor levels in the whole embryo and limb bud during chick development. *Dev Biol* 128, 50-7.

- Semenza, G.L. (1998): Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 588-94.
- Semenza, G.L. und Wang, G.L. (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular & Cellular Biology* 12, 5447-54.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S. und Dvorak, H.F. (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-5.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W., Fischer, K., Schuh, A., Schwartz, L., Bernstein, A. und Rossant, J. (1997): A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89, 981-90.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L. und Schuh, A.C. (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Sharrocks, A., Brown, A., Ling, Y. und Yates, P. (1997): The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1371-87.
- Shen, B., Lee, D., Gerber, H., Keyt, B., Ferrara, N. und Zioncheck, T. (1998): Homologous Up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J. Biol. Chem* 273, 29979-29985.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. und Keshet, E. (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-5.
- Sieweke, M.H. und Graf, T. (1998): A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 8, 545-51.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G. und Klagsbrun, M. (1998): Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-45.
- Steward, P.A. und Hayakawa, E.M. (1987): Interendothelial junctional changes underlie the developmental tightening of the blood-brain barrier. *Dev Brain Res* 32, 271-81.
- Steward, P.A. und Wiley, M.J. (1981): Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: A study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev Biol* 84, 183-192.
- Stocker, A.W. und Bissel, M.J. (1988): Development of avian sarcoma and leukosis virus-based vector-packaging cell lines. *J Virol* 62, 1008-15.
- Suda, T., Takakura, N. und Oike, Y. (1999): Hematopoiesis and angiogenesis. *Int J Hematol* 71, 99-107
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N. und Yancopoulos, G.D. (1996): Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during early embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171-1180.
- Takagi, H., King, G.L. und Aiello, L.P. (1996): Identification and characterization of vascular endothelial growth factor receptor (Flt) in bovine retinal pericytes. *Diabetes* 45, 1016-1023.

Talks, K., Turley, H., Gatter, K., Maxwell, P., Pugh, C., Ratcliffe, P. und Harris, A. (2000): The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157, 411-21.

Tanaka, M. (1996): Modulation of promoter occupancy by cooperative DNA binding and activation domain function is a major determinant of transcriptional regulation by activators in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4311-15.

Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. und Poellinger, L. (2000): Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 19, 4298-309.

Terman, B.I., Dougher Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D. und Bohlen, P. (1992): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 1579-86.

Thomas C. (1998): Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie; 12. Auflage; Schattauer/Stuttgart, 57

Thompson, J.A., Haudenschild, C.C., Anderson, K.D., DiPietro, J.M., Anderson, W.F. und Maciag, T. (1989): Heparin-binding growth factor 1 induces the formation of organoid neovascular structures in vivo [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Feb;87(4):1625] [retracted by Thompson JA, Haudenschild CC, Anderson KD, DiPietro JM, Anderson WF, Maciag T. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Aug 15;89(16):7849]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7928-32.

Tian, H., Hammer, R.E., Matsumoto, A.M., Russell, D.W. und McKnight, S.L. (1998): The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 12, 3320-4.

Tian, H., McKnight, S.L. und Russell, D.W. (1997): Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11, 72-82.

Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. und Abraham, J. (1991): The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266, 11947-54.

Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W. und Orkin, S.H. (1994): An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA2. *Nature* 371, 221-226.

Tuder, R.M., Flook, B.E. und Voelkel, N.F. (1995): Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 95, 1798-1807.

Veikkola, T. und Alitalo, K. (1999): VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9, 211-20.

Visvader, J., Fujiwara, Y. und Orkin, S. (1998): Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* 12, 473-479.

von Schulte, W. (1914): Early stages of vasculogenesis in the cat (*felis domestica*) with special reference to the mesenchymal origin of endothelium. *Anat Rec* 8, 78-80

Wagner, R.C. (1980): Endothelial cell embryology and growth. *Adv Microcirc* 9, 45-75.

- Wakiya, K., Begue, A., Stehelin, D. und Shibuya, M. (1996): A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem* 271, 30823-30828.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. und Heldin, C.H. (1994): Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269, 26988-95.
- Wang, G. und Semenza, G. (1993a): Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *Blood* 82, 3610-5.
- Wang, G. und Semenza, G. (1993b): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4304-8.
- Wang, G.L., Jiang, B.H. und Semenza, G.L. (1995): Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia inducible factor 1. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 216, 669-675.
- Wang, G.L. und Semenza, G.L. (1995): Purification and characterization of hypoxia inducible factor 1. *J Biol. Chem.* 270, 1230-1237.
- Wasylyk, B., Hagman, J. und Gutierrez-Hartmann, A. (1998): Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 23, 213-6.
- Wasylyk, B., Hahn, S. und Giovane, A. (1993): The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211, 7-18.
- Watabe, T., Yoshida, K., Shindoh, M., Kaya, M., Fujikawa, K., Sato, H., Seiki, M., Ishii, S. und Fujinaga, K. (1998): The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int. J. Cancer* 77, 128-137.
- Wenger, R.H. und Gassmann, M. (1997): Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Chem.* 378, 609-616.
- Wenger, R.H., Rolfs, A., Marti, H.H., Guenet, J.L. und Gassmann, M. (1996): Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia inducible factor 1 α . *Biochem Biophys Res Commun* 223, 54-59.
- Wernert, N., Raes, M.B., Lassalle, P., Dehouck, M.P., Gosselin, B., Vandebunder, B. und Stehelin, D. (1992): c-Ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathol* 140, 119-27.
- White, F.C, Carroll, S.M. und Kamps, M.P. (1995): VEGF mRNA is reversibly stabilized by hypoxia and persistently stabilized in VEGF-overexpressing human tumor cell lines. *Growth Factors* 12, 289-301.
- White, R.J. und Phillips, D.R. (1989): Bidirectional transcription footprinting of DNA binding ligands. *Biochemistry* 28, 6259-69.
- Wiener, C.M., Booth, G. und Semenza, G.L. (1996): In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 225, 485-488.
- Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. und Maxwell, P.H. (1998): Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 92, 2260-8.

Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E.M., Ocalan, M., Farrell, C. und Risau, W. (1994): Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107, 1347-57.

Wong, A.L., Haroon, Z.A., Werner, S., Dewhirst, M.W., Greenberg, C.S. und Peters, K.G. (1997): Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res*, 81, 567-74

Yamaguchi, T.P., Dumont, D.J., Conlon, R.A., Breitman, M.L. und Rossant, J. (1993): Flk-1, an Flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118, 489-98.

Zachary, I. (1998): Vascular endothelial growth factor: how it transmits its signal. *Exp Nephrol* 6, 480-7.

Zelzer, E., Wappner, P. und Shilo, B.Z. (1997): The PAS domain confers target gene specificity of *Drosophila* bHLH/PAS proteins. *Genes Dev* 11, 2079-89.

7 Anhang

7.1 Basenpaarsequenz der Wachtel-HIF-2 α -cDNA

```

                                CCCGCCGCCGAGCCGCTGCCGTGCCGTGCCGCCGCCGCTGCCCTCCCCGGGCG 55
GGCCGTACAATCCTCGGCAGTGTCTGAGACTGTAGCCCGCCCTCGGGGGCGACCCGGCACAGCCGGCCACGCCGACCCAGCCGACCC 145
GACCCGCCGCCCGCGGAGTCTCGCGTCCCAGTGTGAGCCCGCCCGCCGAGAGGCGCGCAGGAGCCGACGCCGACCCGCG 235
1  M T A D K E K K R S S E R R K E K S R D A A R C R R S K E
   A T G A C A G T G A C A A G G A G A A G A G G A G C A G T T C T G A G C G G A G A A G A A T C A A G A G A T G C A C A A G A T G C A G G A G A A G C A A A G A G 325
31 T E V F Y E L A H E L P H N V S S H L D K A S I M R L G A
   A C G G A A G T A T T C A C G A A C T G G C T C A T G A A C T G C C C C T G C C C C A C A A T G T C A G T T C C C A C C T G G A C A A G G C A T C T A T A A T G C G C T G G C A 415
61 I S F L R T H K L L S S V C A D N E N E L E A D Q Q M D N L
   A T C A G T T C T T A C G C A C T C A A G C T T C T G T C T T C A G T A T G T G C C G A C A A C G A G A A T G A A C T A G A A G C A G A T C A G C A G A T G G A C A A C T T G 505
91 Y L K A L E G F I A V V T Q D G D M I F L S E N V N K Y M G
   T A C C T G A A A G C T T T G G A G G A T T A T T G C C G T G G T G A C A C A G G A T G G A G A C A T G A T C T T T T T G T C A G A G A A T G T C A A C A A T A C A T G G G T 595
121 L T Q V E L T G H S I F D F T H P C D H E E I R E N L S L K
   C T C A C C C A G G T G G A A T T A A C T G G A C A C A G C A T T T T T G A C T T C A C T C A T C C A T G T G A T C A T G A G G A A A T T A G A G A A T T C T G A G T C T G A A A 685
151 N G P G F G K K N K E M S T E R D F F M R M K C T V T N R G
   A A T G G T C C A G G C T T T G G A A G A A A A C A A G G A G A T G T C A A C T G A C T G A C T T C T C T C A T G A G G A T G A A A T G C A C C G T T A C T A A C A G A G G C 775
181 R T V N L K S A T W K V L H C T G Q V K V Y N T C P P H T L
   A G A A C T G T T A A C C T A A A T T G C C A C A T G C C A A G G T T T G C A C T G G A C A A G T T A A A G T G T A C A A C A C T T G C C T C C T C A C A G T T T G 865
211 C G Y K E P L L T C L I I M C E P I Q H P S N I D I P L D S
   T G T G G T A T A A A G A A C C T C T T C A C C T G C C T T A T A A T A T G T G T G A G C C T A T T C A A C A T C C T T C A A A C A T T G A T A T C C C T C T G G A C A G C 955
241 K T F M S R H S M D M K F T Y C D D R I T E L I G Y H P E E
   A A G A C C T T C A T G A G T C C C A T A G C A T G G A C A T G A A A T T C A C C T A C T G T G A T G A C A G A A T A A C A G A A T T G A T T G G A T A T C A C C C A G A G G A G 1045
271 L L G R S V Y E F Y H A L D S E N M T K S H Q N L C T K G Q
   T T G C T G G G C C G T T C A G T A T A T G A G T T C A C C A T G C C T T G G A C T C G G A C A T G A C C A A A A G T C A T C A G A A C T T G T G T A C A A A A G G T C A A 1135
301 V V T G Q Y R M L A K H G G Y V W L E T Q G T V I Y N T R N
   G T A G T G A C T G C C A G T A C C G T A T G C T T G C C A A G C A T G G T G G A T A C G T G T G G C T G G A A A C T C A A G G G A C C G T C A T T T A C A A C A C G C G C A A C 1225
331 L Q P Q C I I C V N Y V L S E I E K N D V V F S M D Q T E S
   C T A C A C C C T C A G T G T A T C A T C T G T C A A C T A T G T G C T G A G T G A A A T T G A G A A G A A T G A T G T T G T C T T C T A T G G A C C A A C G G A A T C G 1315
361 L F K P H L L T I S T A F E N G I S R R D K S D L L F T K L
   C T C T T C A A G C C T C A C T G T T G A C A A T A A G C A C T G C C T T T G A G A A T G G G A T C T C A C G G A G G A T A A G A G T G A C T T A T T A T T T A C T A A G C T A 1405
391 K E E P E E V A Q L A P T P G D A I I S L D F E L H P G I Q
   A A A G A A G A A C C G G A G A A G T T G C A C A G C T G G C T C C A A C C T G G A G A T G C C A T T A T T C C C T G G A T T T G A A C C C A T C C A G G G A T A C A G 1495
421 K F E E P P D Y T S A V L T P N K P W P V E V K S H A A Q G
   A A G T T T G A G G A A C C C C C T G A C T A T A C C A G T G C T G T T T G A C A C C A A C A A A C C G T G C C A G T A G A A G T G A A A G C C A T G C T G C T C A A G G T 1585
451 E T L T M P S F T M P Q I P P G N S T P S A S S N S S C S T
   G A A A C G C T G A C A A T G C C A T C C T T T A C A A T G C C T C A G A T T C C A C C T G G C A A C A G T A C T C C A A G T G C A A G C A G A C A C A G T A G C T G T T C C A G 1675
481 P N S P E D Y Y T S V D D D L K I E V I E K L F A M D T E S
   C C A A C A G T C C A G A G A T T A C T A C A C T T C T G T G G A T G A C G A T C T T A A G A T T G A G G T G A T G A A A A A C T C T T T G C C A T G G A C A C A G A A T C A 1765
511 K S Q C N S Q T D F N E L D L E T L A P Y I P M D G E D F Q
   A A A A G T C A G T G C A A C T C C C A G A C T G A T T T C A A T G A A C T G G A C C T T G A A A C C T T G G C T C C T T A C A T T C C A T G G A T G G A G A A G A T T T C C A G 1855
541 L S P I C Q E E R P H S E S A Q N T Q Q N L S S M S T I F Q
   C T C A G C C C T A T C T G C C A A G A A G A G C G T C C T C A C T C T G A A A G T G C A C A A A A T A C C C A G C A G A A T C T A A G T A G C A T G A G T A C C A T T T T C C A A 1945
571 P V A S A S Q N Q F L P E K Y C P Q L S N K N I N P G H G S
   C C T G T T G C T T C T G C T T C A C A G A A T C A G T T C C T C C C A G A G A A A T T G C C C A C A G C T A T C A A A T A A A A C A T T A A C C C T G G T C A T G G G T C C 2035
601 L S S V F F N N M S R S S L P P Y H N Q A S T P L S S M G G
   C T A T C A T C T G T G T T T C A A C A A T A T G A G T A G T C A T C G T T G C C A C C A T A C C A C A C C A A G C C A G C A C T C C G T G T C T C G A T G G G G G G T 2125
631 R P N T Q W P P D P P L E Y V P A K W R L M D K Y S G T L S
   A G A C C A A A C C C A G T G G C C A C C T G A T C C A C C G T T A G A A T A T G T T C C T G C T A A A T G G A G A C T C A T G G A T A A A T A C T C A G G A A C C C T A T C A 2215
661 S S P S P P I H S P N M P V Y K K R L L D G L G Q R G I D
   A G T T C C C C T C A G G A C C C C A A T A C A T T C C C A A C A T G C C C G T A T A T A A A A A A A G G C T G C T G G A T G G T T T G G G G C A A C G A G C A T A G A T 2305
691 I N P A R I A L S N S L K L K R Q L D Y E E Q A M Q Q L T G
   A T A A A C C C A G C A A A A T T G C T T T G T C A A T A G T T T G A A G T G A A G C A C A G T T G G A T T A T G A A G A G C A G G C A A T G C A A C A G C T G A C T G G G 2395
721 G D P S A I N P S Q L M W K R M K F L K G E N C S L L T E K
   G G A G C C C A T C T G C C A T T A A C C A T C T C A G T T A A T G T G G A A G A G A A T G A A A T T T C T C A A A G G G G A A A A C T G T T C C T T G C T T A C G G A G A A G 2485
751 K S L S T S V L T D E F V C N S R G L S Q P M N Q L Q L Q Q
   A A G T C T C T C A G C A C A A G T G T T T A C T G A T G A G T T T G T C T G C A A C T C G A G A G G T C T G A G C C A C C A A T G A A T C A A C T G C A G C T G C A G C A G 2575
781 Q Q Q Q P T C G S P G E N L K A G A F S P Q F Y S P H Y Q D
   C A A C A G C A G A C A C C C A C C T G T G G C A G T C C T G G T G A A A A T C T G A A A G C A G G A G C G T T T T C C C C T C A G T T T T A C A G T C C C C A T T A T C A G G A C 2665
811 Y T V Q S A H K V S G V T S R L L G S S Y E P Y L L P E L T
   T A T A C T G T G C A G T C A G C T A T A A A G T G T C A G G T G T G A C A G A G T C G T C T G T G G G G T C T C C T A T G A A C C A T A T T T G C T G C T G A C T G A C A 2755
841 R Y D C E V N V P V L G S S T L L Q G S E L L R A L D Q T T
   A G A T A T G A C T G T G A G G T A A A C G T C C C T G T T T T G G G C A G T T C C A C G T T C T G C A G G G C A G C G A A C T G C T C A G A G C C C T G G A C C A G A C A A C C 2845
   T G A G C A A T C T G C A G T A T T G C C T A T A C T G T T C A A A C A G C T T C A G T T T T A A A T A T A T T T T G C A A G T A G A C A G A T T T C A A T A C C A A T A 2935
   C A C T T T T A C A G G A T T T T A C A T A G A T A T T G A A T C T G T C C A C G T T A C C A A A T A G T G G C C T T T T G A A G T T A C T C A C T T C T A T T A T T C A T A T T A 3025
   A A G A A A T A C A T C T A C T G T A T T T T C T A T T C C A A T T A A A G T G T T G C G G C C G A G 3079

```

Abbildung 7-1: Basenpaarsequenz und voraussichtliche Aminosäuresequenz des im Verlauf dieser Arbeit sequenzierten qHIF-2 α -CDNA Klon aus einer E1 Wachtel λ gt10 cDNA-Bank.

7.2 Basenpaarsequenz der Flk-1- Mutationen

Flk-1 wt	445	TTCCACCAGAAACCGAGCTGCGTCCAGATTGCTCTCAGATGCGACTTGCCGCCCGGCAC
HBS1 mut	441
HBS2 mut	448
HBS1/EBS3 mut	481
HBS1+2/EBS3+6 mut	480
Flk-1 wt	505	AGTTCGGGGTAGTGGGGGAGTGGCGTGGGAAACCGGAAACCCAAACCTGGTATCCAG
HBS1 mut	501"CAGAGA".....
HBS2 mut	508
HBS1/EBS3 mut	541"CAAT"....."CAGAGA".....
HBS1+2/EBS3+6 mut	540"CAAT"....."CAGAGA".....
Flk-1 wt	565	TGGGGGGCGTGGCGCGGACGCAGGGAGTCCCCACCCTCCCGGTAATGACCCCGCCCCAT
HBS1 mut	561
HBS2 mut	568"CAGAGA".....
HBS1/EBS3 mut	601
HBS1+2/EBS3+6 mut	600"CAGAGA"....."ATTG".....
Flk-1 wt	625	TCGCTAGTGTGTAGCCGGCGCTCTCTTTCTGCCCTGAGTCTCAGGACCCCAAGAGAGTA
HBS1 mut	621
HBS2 mut	628
HBS1/EBS3 mut	661
HBS1+2/EBS3+6 mut	660

Abbildung 7-2: Basenpaarsequenz des Flk-1-Promotorbereichs, der die HBS/EBS-Motive enthält. Unter der Sequenz des Wildtyps sind die Sequenzen der Mutationen angegeben. Grau: EBS3 und HBS1, eingerahmt: HBS2 und EBS6. Sequenzunterschiede sind angegeben.

7.3 Basenpaarsequenz der HIF-2 α -Mutationen

HIF-2 α	1	ATGACAGCTGACAAGGAGAAAAAAGGAGCAGCTCAGAGCTGAGGAAGGAGAAATCCCGT
HIF-2 α /1 α	1
HIF-2 α dn	1
HIF-2 α dnb		
HIF-2 α Δ TAD N	1
HIF-2 α Δ TAD2 N	1
HIF-2 α Δ TAD C	1
HIF-2 α	61	GATGCCGCGAGGTGCCGCGCAGCAAGGAGACGGAGGTCTTCTATGAGTTGGCTCATGAG
HIF-2 α /1 α	61
HIF-2 α dn	8
HIF-2 α dnb	1
HIF-2 α Δ TAD N	61
HIF-2 α Δ TAD2 N	61
HIF-2 α Δ TAD C	61
HIF-2 α	121	TTGCCCTGCCTCACAGTGTGAGCTCCACCTGGACAAAGCCTCCATCATGCGCCTGGCC
HIF-2 α /1 α	121
HIF-2 α dn	68
HIF-2 α dnb	40
HIF-2 α Δ TAD N	121
HIF-2 α Δ TAD2 N	121
HIF-2 α Δ TAD C	121

HIF-2 α	181	ATCAGCTTCCTTCGGACACATAAGCTCCTGTCTCCTCAGTCTGCTCTGAAAATGAATCTGAA
HIF-2 α /1 α	181
HIF-2 α dn	128
HIF-2 α dnb	100
HIF-2 α Δ TAD N	181
HIF-2 α Δ TAD2 N	181
HIF-2 α Δ TAD C	181
HIF-2 α	241	GCTGAGGCCGACCAGCAAATGGATAACTTGTACCTGAAAGCCTTGGAGGGTTTCATTGCT
HIF-2 α /1 α	241
HIF-2 α dn	188
HIF-2 α dnb	160
HIF-2 α Δ TAD N	241
HIF-2 α Δ TAD2 N	241
HIF-2 α Δ TAD C	241
HIF-2 α	301	GTGGTGACCCAAGACGGTGACATGATCTTCTGTCTCGGAAAACATCAGCAAGTTCATGGGA
HIF-2 α /1 α	301
HIF-2 α dn	248
HIF-2 α dnb	220
HIF-2 α Δ TAD N	301
HIF-2 α Δ TAD2 N	301
HIF-2 α Δ TAD C	301
HIF-2 α	361	CTTACTCAGGTAGAACTAACAGGACACAGCATCTTTGACTTCACTCATCCTTGGACCAT
HIF-2 α /1 α	361
HIF-2 α dn	308
HIF-2 α dnb	280
HIF-2 α Δ TAD N	361
HIF-2 α Δ TAD2 N	361
HIF-2 α Δ TAD C	361
HIF-2 α	421	GAAGAGATCCGTGAGAACCTGACTCTCAAAAACGGCTCTGGTTTTGGGAAGAAGAGCAAA
HIF-2 α /1 α	421
HIF-2 α dn	368
HIF-2 α dnb	340
HIF-2 α Δ TAD N	421
HIF-2 α Δ TAD2 N	421
HIF-2 α Δ TAD C	421
HIF-2 α	481	GACGTGTCCACCGAGCGTGACTTCTTCATGAGGATGAAGTGCACGGTCACCAACAGAGGC
HIF-2 α /1 α	481
HIF-2 α dn	428
HIF-2 α dnb	400
HIF-2 α Δ TAD N	481
HIF-2 α Δ TAD2 N	481
HIF-2 α Δ TAD C	481
HIF-2 α	541	CGGACTGTCAACCTCAAGTCGGCCACCTGGAAGTCCGTCCTGCACTGCACCGGGCAAGTG
HIF-2 α /1 α	541
HIF-2 α dn	488
HIF-2 α dnb	460
HIF-2 α Δ TAD N	541
HIF-2 α Δ TAD2 N	541
HIF-2 α Δ TAD C	541

HIF-2 α	601	AGAGTCTACAACAACAGCCCCCTCACAGTAGCCTCTGTGGCTCCAAGGAGCCCCTGCTG
HIF-2 α /1 α	598
HIF-2 α dn	545
HIF-2 α dnb	517
HIF-2 α Δ TAD N	598
HIF-2 α Δ TAD2 N	598
HIF-2 α Δ TAD C	598
HIF-2 α	661	TCCTGCCTTATCATCATGTGTGAGCCAATCCAGCACCCATCCCACATGGACATCCCCCTG
HIF-2 α /1 α	658
HIF-2 α dn	605
HIF-2 α dnb	577
HIF-2 α Δ TAD N	658
HIF-2 α Δ TAD2 N	658
HIF-2 α Δ TAD C	658
HIF-2 α	721	GACAGCAAGACTTTCCTGAGCCGCCACAGCATGGACATGAAGTTCACCTACTGTGACGAC
HIF-2 α /1 α	718
HIF-2 α dn	665
HIF-2 α dnb	637
HIF-2 α Δ TAD N	718
HIF-2 α Δ TAD2 N	718
HIF-2 α Δ TAD C	718
HIF-2 α	781	AGAATCTTGAACTGATTGGTTACCACCCCGAGGAGCTACTTGGACGCTCTGCCTATGAG
HIF-2 α /1 α	778
HIF-2 α dn	725
HIF-2 α dnb	697
HIF-2 α Δ TAD N	778
HIF-2 α Δ TAD2 N	778
HIF-2 α Δ TAD C	778
HIF-2 α	841	TTTTACCATGCCCTGGATTTCGGAGAACATGACCAAAAGTCACCAGAACTTGTGCACCAAG
HIF-2 α /1 α	838
HIF-2 α dn	785
HIF-2 α dnb	757
HIF-2 α Δ TAD N	838
HIF-2 α Δ TAD2 N	838
HIF-2 α Δ TAD C	838
HIF-2 α	901	GGGCAGGTGGTATCTGCCAGTACCGGATGCTAGCCAAACACGGAGGATATGTGTGGCTG
HIF-2 α /1 α	898"T"....."AGA"....."C"....."G"....."T"
HIF-2 α dn	845
HIF-2 α dnb	817
HIF-2 α Δ TAD N	898
HIF-2 α Δ TAD2 N	898
HIF-2 α Δ TAD C	898
HIF-2 α	961	GAGACCCAGGGGACGGTCATCTACAACCCCGCAACCTGCAGCCTCAGTGTATCATGTGT
HIF-2 α /1 α	958	"A"....."T"....."A"....."CA"....."T"....."A"....."T"....."TA"....."GAAG"....."TCC"....."A"....."C"....."TG"....."
HIF-2 α dn	905
HIF-2 α dnb	877
HIF-2 α Δ TAD N	958
HIF-2 α Δ TAD2 N	958
HIF-2 α Δ TAD C	958

Anhang

HIF-2 α	1441	ACGCCCAGCAGCCCTGAGGACTACTATTCATCCTTGGAGAATCCCTTGAAGATCGAAGTG
HIF-2 α /1 α	1438	GAAT"A " "TCCAGAGTCACTGGGACT" " "T"TTACCAT"CCC"AGA"TC"AGATC"GCCA
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1357	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD N	1438	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1438	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD C	1438	""""""""""
HIF-2 α	1501	ATTGAGAAGCTTTTCGCCATGGACACGGAGCCGAGGGACCCGGGCAGTACCCAGACGGAC
HIF-2 α /1 α	1498	GCAAGTCCTTC"GAT"GA"GCACT"GAC"AAGTTCACCTGA"CCT"AC"GT"CC"GT" "A
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1417	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD N	1498	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1498	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD C	1498	""""""""""
HIF-2 α	1561	TTCAGTGAACCTGGATTTGGAGACCTTGGCACCCCTACATCCCTATGGACGGCGAGGACTTC
HIF-2 α /1 α	1558	"ATT"CTTTGAT"GGATAGCGATA" " "TCAATGTAT" "AAGT" " "ACTG" T " "AAAA
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1477	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD N	1542	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1558	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD C	1558	""""""""""
HIF-2 α	1621	CAGCTGAGCCCCATCTGCCAGAGGAGCCGCTCATGCCAGAGAGCCCCAGCCCACCCCC
HIF-2 α /1 α	1618	"T" T "TGCTGAAGA"ACAGAG"CAA" "AAT"CAT"TT" "ACTCAGGA"ACTGATTTAGAT
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1537	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD N	1542	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1618	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD C	1618	""""""""""
HIF-2 α	1681	CAGCACTGCTTCAGTACCATGACCAGCATCTTCCAGCCGCTCACCCCGGGGGCCACCCAC
HIF-2 α /1 α	1678	TT"G"GATGC"GGC" C "TAT" T "CCA" "GGATG"TGATT" "CAGTTAC" TT "TTTG" T
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1597	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD N	1542	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1678	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD C	1678	""""""""""
HIF-2 α	1741	GGCCCCTTCTTCCTCGATAAGTACCCGCAGCAGTTGGAAAGCAGGAAGACAGAGTCTGAG
HIF-2 α /1 α	1738	CAGTTG"CACCAT"A" "G"GCA"TT" T "CAAGCCCTCC" " "T" T "GC" " "TTA" "G"
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1657	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD N	1552	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1738	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD C	1738	""""""""""
HIF-2 α	1801	CACTGGCCCATGTCTTCCATCTTCTTTGATGCTGGGAGCAAAGGGTCCCTGTCTCCATGC
HIF-2 α /1 α	1798	TT"CA" "AG"CCCAG"TACAGAAACC"ACCATCACTGC" "CT"CCA" "ACAA" "G"CAC"
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1717	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD N	1612	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1798	""""""""""
HIF-2 α Δ TAD C	1798	""""""""""

HIF-2 α	1861	TGTGGCCAGGCCAGCACCCCTCTCTCTTCTATGGGAGGCAGATCCAACACGCAGTGGCCC
HIF-2 α /1 α	1858	AC "ATG" AT "A" AA "AGAGACGAAGGAC" ATAA "AAGATATT" "A" TA "T" ATTG "A
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1777	""
HIF-2 α Δ TAD N	1672	""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1858	""
HIF-2 α Δ TAD C	1858	""
HIF-2 α	1921	CCGGATCCACCATTACATTTCCGGCCCTACTAAGTGGCCTGTGGGTGATCAGAGTGCTGAA
HIF-2 α /1 α	1918	T "TCCAT" TT "TACC" "AG" ACCT "AAGAA" C "ACCA" " " CTAAG "CATCAGCATACAGT
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1837	""
HIF-2 α Δ TAD N	1732	""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1866	""
HIF-2 α Δ TAD C	1918	""
HIF-2 α	1981	TCCCTGGGAGCCCTGCCGGTGGGGTCATGGCAGTTGGAACCTCCGAGCGCCCGCTTCAT
HIF-2 α /1 α	1978	GG "ACTCACAGT" G "A" A "CCTCAC" "GACAGAGCA" G "AAGAGAGT" ATAGAA "AGACA
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1897	""
HIF-2 α Δ TAD N	1792	""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1909	""
HIF-2 α Δ TAD C	1978	""
HIF-2 α	2041	GTCTCCATGTTCAAGATGAGGTCTGCAAAGGACTTCGGGGCCCGAGGTCCATACATGATG
HIF-2 α /1 α	2038	"A" AAAGCTCATCCA "G" " " CCT "AAGCT" TCTGC "ACTTTGAATCAAAG" A "T" CTG "T
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	1957	""
HIF-2 α Δ TAD N	1852	""
HIF-2 α Δ TAD2 N	1969	""
HIF-2 α Δ TAD C	2038	""
HIF-2 α	2101	AGCCCAGCCATGATCGCCCTGTCCAACAAGCTGAAGCTAAAAGCGGCAGCTGGAGTATGAG
HIF-2 α /1 α	2098	CCTGAG "AAGAAT" AAA " " CAAAG "CA" TAGCTTC "AG" "TGCT" " " AG "A" "CGAA" A
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	2017	""
HIF-2 α Δ TAD N	1912	""
HIF-2 α Δ TAD2 N	2029	""
HIF-2 α Δ TAD C	2098	""
HIF-2 α	2161	GAGCAAGCCTTCCAAGACACAAGCGGGGGGACCCTCCAGGCACCAGCAGTTCACACTTG
HIF-2 α /1 α	2158	AT "G" "CATGATGGCTC" CTTTTTCAA "CA" CAGGAAT "A" "ATTATGCAG" "ACCA
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	2077	""
HIF-2 α Δ TAD N	1972	""
HIF-2 α Δ TAD2 N	2089	""
HIF-2 α Δ TAD C	2158	""
HIF-2 α	2221	ATGTGGAACGTATGAAGAGCCTCATGGGCGGGACCTGTCCTTTGATGCCTGACAAGACC
HIF-2 α /1 α	2218	GGTGACTGTGCACCT "CT" TGTCAC "TTC" T " " AAC "AGTGAAGGATTCATATCT" GT
HIF-2 α dn		
HIF-2 α dnb	2137	""
HIF-2 α Δ TAD N	2032	""
HIF-2 α Δ TAD2 N	2149	""
HIF-2 α Δ TAD C	2218	""

7.4 Abkürzungen

A	Adenosin
A. bid.	bidestilliertes Wasser
Abb.	Abbildung(en)
abs.	absolut(er/es)
Ac	Acetat
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurereste
bHLH-Motiv	<i>basic Helix-Loop-Helix</i> -Motiv
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine (englisch); Rinderserumalbumin
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca	circa
cDNA	copy-DNA
cfu	colony forming units (englisch); Kolonien bildende Phagenklone
CIP	calf intestine phosphatase (englisch); alkalische Phosphatase
cpm	counts per minute (englisch); Impulse pro Minute
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F	Farad, SI-Einheit für die Kapazität
Fa.	Firma
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanosin
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-Piperazinyl(1)]
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertoni

m	Meter
min	Minute
MOPS	M-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NMR	nuclear magnetic resonance (englisch); Kernmagnetische Resonanz
O.D.	optische Dichte
p	Plasmid
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming unit (englisch); Plaque bildender Phagenklon
Pos.	Position
rLE	relative Luziferaseeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SSC	sodium salt citrat (englisch); Natriumchlorid-Natriumcitrat
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
U	units (englisch); Einheit der Enzymaktivität
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5'-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid

Aminosäuren (Drei- und Ein-Buchstaben-Code):

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Aspartat
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutamat
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

7.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Paulsson und Herrn PD Dr. I. Flamme danke ich für die Themenstellung und die Betreuung sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Zentrum für Molekulare Medizin Köln an der Universität zu Köln. Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Flamme für die inspirierenden Diskussionen, die technischen Ratschläge und unzähligen Tipps und Ideen.

Frau PD Dr. S. Waffenschmidt und Herrn Prof. Dr. H. Klein danke ich dafür, daß sie sich als Gutachter zur Verfügung gestellt haben.

Für die gute Kooperation danke ich den Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für physiologische und klinische Forschung in Bad Nauheim, insbesondere Herrn Dr. G. Breier, Frau R. Heidenreich und Herrn Dr. A. Kappel, der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Plate und der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. M. Siewecke.

Mein besonderer Dank gilt Katrin, Stephan, Steffi, Ingo und Herrn Paulsson für die Durchsicht meines Manuskripts.

Unseren technischen Mitarbeitern Manuel Rauter und Anja Bion danke ich für die großartige Unterstützung der praktischen Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Nachwuchsgruppe I des ZMMK ein herzliches Dankeschön für das gute Arbeitsklima.

Für ihr organisatorisches Talent und ihren unermüdlichen Einsatz danke ich dem guten Geist des LFI-Gebäudes, Frau Bendixen.

Ein besonderes Lob haben sich die Mitarbeiter des Servicelabors der ZMMK verdient.

Besonders danke ich meiner Freundin Katrin und meiner Mutter, die mich während meiner Promotion jederzeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums.

7.6 Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen – die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von Herrn PD Dr. Ingo Flamme und Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson betreut.

Gerd Elvert

Teilpublikationen:

Elvert, G., Lanz, S., Kappel, A. und Flamme, I. (1999): mRNA cloning and expression studies of the quail homologue of HIF-2 α . *Mech Dev* 87, 193-197.

I. Flamme, G. Elvert, A. Kappel, S. Lanz, M. Krieg, K. Plate, G. Breier (1999). The role of HIF-2 α during vascular development; *Cardiology* 94, 5

Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G. und Flamme, I. (2000): Synergistic interaction of hypoxia inducible factor HIF-2 α and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). Manuskript eingereicht.

7.7 Kurzzusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Genexpression des VEGF-Rezeptors 2 (Flk-1) untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die endothelial exprimierten Transkriptionsfaktoren HIF-2 α und Ets-1 bei der Aktivierung des Flk-1-Promotors kooperieren. In GST-*pull-down*-Experimenten wurde eine physikalische Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren nachgewiesen. Der Synergismus bei der transkriptionellen Aktivierung von Flk-1 wird über Aktivatorelemente im Promotor vermittelt. Diese Elemente bestehen aus jeweils einer HIF-2 α - und Ets-1-Bindestelle, die unmittelbar benachbart angeordnet sind. Durch die Übertragung der Elemente auf heterologe Promotoren mit anschließenden Reporter-Experimenten und Transgen-Analysen von Mutationen des Flk-1-Promotors konnte ihre entscheidende Bedeutung *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Die Auswertung der Transgen-Experimente zeigte, daß die Mutation der Aktivatorelemente zum Verlust der endothelspezifischen Expression des Reporter-Genkonstrukts führte. Die regulatorische Rolle von HIF-2 α bei der Flk-1-Aktivierung wird durch die Beobachtung bestätigt, daß HIF-2 α -Protein nicht mehr in den Zellkernen von Hirnkapillarendothelzellen nachweisbar ist, wenn die Flk-1 mRNA-Expression herunterreguliert wird. Dies geschieht zeitgleich mit dem Stillstand der Endothelzellproliferation nach Abschluß des Hirnwachstums. Durch den Vergleich mit dem homologen qHIF-2 α aus der Wachtel und dem nahe verwandten HIF-1 α , das in Bezug auf Flk-1-Aktivierung und Synergismus mit Ets-1 völlig andere Eigenschaften aufweist, wurden funktionelle Bereiche von HIF-2 α identifiziert, die an der Kooperation mit Ets-1 beteiligt sind.

7.8 Abstract

Interactions between Ets-family members and a variety of other transcription factors exert important function during development and differentiation processes, e.g. in the hematopoietic system. This thesis shows for the first time that the recently discovered endothelial cell-specific basic helix-loop-helix PAS domain transcription factor HIF-2 α (but not its close relative HIF-1 α) synergistically interacts with the Ets-family founding member Ets-1 in activating transcription of VEGF receptor-2 (Flk-1). Flk-1 is an indispensable signaling receptor tyrosine kinase for angiogenesis and its expression is tightly regulated during development. It is shown that HIF-2 α and Flk-1 are regulated concordantly in mouse brain capillaries, in that both proteins are strongly expressed after birth and largely down-regulated postnatally when endothelial proliferation ceases. This suggests control function of HIF-2 α over Flk-1. A tandem of a HIF-2 α and an Ets binding site located in close proximity was identified as a strong acting enhancer element within the Flk-1 promoter. By analysis in transgenic mouse embryos this element was shown to be indispensable for the Flk-1 gene regulatory sequences to drive endothelial cell specific reporter gene expression. This element confers strong synergistic induction by HIF-2 α and Ets-1 when fused to heterologous promoters and is most active in endothelial cells. Physical interaction of HIF-2 α with Ets-1 was demonstrated and located to the HIF-2 α carboxyterminus and the autoinhibitory exon VII domain of Ets-1, respectively. The deletion of DNA binding and carboxyterminal transactivation domains of HIF-2 α , respectively, created dominant negative mutants which suppressed transactivation by the wild type protein and failed to synergize with Ets-1. These results suggest that the interaction between HIF-2 α and endothelial Ets factors is required for full transcriptional activation of Flk-1 in endothelial cells and therefore may represent a future target for the manipulation of angiogenesis.

7.9 Lebenslauf

Name: Gerd Elvert
Geburtsdatum: 02.01.1971
Geburtsort: Fulda
Eltern: Ludger Elvert und Waltraud Elvert, geb. Czerwinski

Schulbildung:

1977 – 1990 Schulausbildung in 36251 Bad Hersfeld
11.06.1990 Abiturprüfung an der Modellschule Obersberg
Prüfungsfächer:
Chemie, Biologie, Deutsch, Gemeinschaftskunde

Studium:

Oktober 1990 Immatrikulation an der Philipps-Universität Marburg
Studiengang: Chemie (Diplom)
1990 – 1995 Grund- und Hauptstudium
1995 – 1996 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J. Niessing
am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg
Thema der Diplomarbeit: "Expression eines *caudal*-homologen
Homöoboxgens während der Entwicklung von Eizellen im embryonalen und
adulten Huhn"
03.04.1996 Diplomprüfung
Prüfungsfächer: Anorganische Chemie, Organische Chemie,
Physikalische Chemie, Biochemie
15.05.1996 Beginn der Promotion in der Abteilung Immunregulation der Hoechst AG im
Labor von Herrn Dr. Boßlet (Behringwerke Marburg)
Vorläufiger Arbeitstitel der Dissertation: "Arbeiten zur Verwendung von
phage display libraries zur Auffindung von therapeutisch relevanten
Antikörpern gegen proliferierendes Endothel"
30.06.1997 Abbruch der Arbeit wegen firmeninternen Umstrukturierungen
01.08.1997 Beginn der experimentellen Arbeiten zur Promotion an der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln bei Herrn PD. Dr.
Flamme und Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson
Titel der Dissertation: "Untersuchungen zur
transkriptionellen Regulierung des VEGF-Rezeptors 2 (Flk-1)"
09.01.2001 Promotion