

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin V Sportmedizin
(Schwerpunkte: Leistungsmedizin, spezielle Prävention, spezielle
Rehabilitation)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Nieß

**Die differentielle Expression verschiedener mRNA-
Varianten von Hif1 α unter Ausdauerbelastung und
normobarer Hypoxie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tuebingen

vorgelegt von
Alexander Böhringer
aus
Ulm
2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nieß

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Weigert

1. EINFÜHRUNG.....	6
1.1. Körperliche Reaktionen auf Belastung	6
1.1.1. Die Auswirkungen körperlicher Belastung und Hypoxie auf Blut und Immunsystem.....	8
1.1.2. Zelluläre Reaktionen auf Hypoxie.....	10
1.2. Der durch Hypoxie induzierbare Transkriptionsfaktor „HIF“	14
1.2.1. Der Hif1 Proteinkomplex	14
1.2.2. Steuerung von Hif1 α auf Transkriptionsebene.....	16
1.2.3. Bekannte Polymorphismen des HIF-1 α Gens und ihre Auswirkungen auf die Ausdauerleistungsfähigkeit	19
1.2.4. Posttranskriptionale Prozessierung der HIF1 α mRNA	20
1.3. Bekannte Hif1 α mRNA-Varianten.....	21
1.4. Beeinflussung der HIF1 α Transkription durch körperliche Belastung.....	27
1.5. Arbeitshypothesen.....	29
2. MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1. Bioinformatische Methoden	30
2.1.1. <i>GeneOntology</i> (GO-Analyse)	30
2.1.2. <i>Genome Browser</i> : Multiple Sequenzabgleiche und Expressionsanalysen.....	32
2.2. <i>in vitro</i> Versuche	33
2.2.1. Myotubenzellkultur	34
2.2.2. THP1-Zellkulturversuche.....	35
2.3. <i>in vivo</i> Versuche	36
2.3.1. Mittellangfristige, normobare Hypoxieexposition (23h Hypoxie).....	36
2.3.2. Erschöpfende Ausdauerbelastung (Nikolauslauf)	36
2.4. RNA-Proben Gewinnung	37
2.4.1. Gewinnung der PBMC-Fraktion (Lymphozyten und Monozyten) aus den entnommenen Blutproben	37
2.4.2. RNA-Extraktion	38
2.4.3. Isolierung der Gesamt-RNA und DNase Verdau	39
2.4.4. RNA-Aufreinigung.....	39
2.4.5. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA.....	40
2.4.6. cDNA-Gewinnung durch Reverse Transkription und 3'RACE.....	40
2.5. PCR Verfahren.....	41
2.5.1. PCR	41
2.5.2. Quantitative-Real-Time-PCR	42
2.5.3. Verwendete Primer	43
2.5.4. Housekeeping Gen	44
2.5.5. Primereffizienz	44
2.5.6. PCR-Setup.....	45
2.5.7. Schmelzkurven	46
2.5.8. Auswertung der PCR-Ergebnisdaten.....	47
2.5.9. Berechnungen.....	47
2.6. Gelelektrophorese.....	49

3. ERGEBNISSE	50
3.1. <i>in silico</i> Ergebnisse	50
3.1.1. Ergebnisse der GO-Analysen	50
3.1.2. Phylogenetischer mRNA Referenzsequenz-Abgleich	54
3.1.3. EST-Analyse und Phylogenetische Konservierung der EST-Bereiche	55
3.1.4. Wahl der Primerlokalisationen für die Expressionsanalyse der Hif1 α -Varianten	56
3.2. <i>in vitro</i> Ergebnisse	59
3.2.1. Expression von Hif1 α -lv in verschiedenen humanen Zelllinien	59
3.2.2. Untersuchungen der Expression von Hif1 α mRNA und Hif1 α -lv in Myotuben unter Kobaltchlorid (CoCl ₂) und während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben <i>in vitro</i>	62
3.3. <i>in vivo</i> Ergebnisse	66
3.3.1. Expressionsveränderungen von Hif1 α -lv und Hif1 α unter mittelfristiger, normobarer Hypoxieexposition (23h Hypoxie)	66
3.3.2. Expression von Hif1 α -lv und Hif1 α vor und nach Halbmarathon (Nikolauslauf).. ..	68
3.4. Hif1 α -lv Bestimmung, Sequenzanalyse und Strukturberechnung	71
3.5. Zelluläre Lokalisation von HIF1 α mRNA und HIF1 α -lv	75
4. DISKUSSION	78
4.1. Die wichtigsten Ergebnisse bezogen auf die Arbeitshypothese.....	78
4.2. Verschiedene Hif1 α mRNA-Varianten, ihr Expressionsverhalten und ihre Funktion..	79
4.3. Hif1 α -lv eine exprimierte <i>intergenic region</i> oder eine mRNA?	84
4.4. Hif1 α -lv: Lokalisation und Funktion.....	86
4.5. Ausblicke.....	91
5. ZUSAMMENFASSUNG	92
6. SCHLUSSBEMERKUNG	95
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	96
8. LITERATURVERZEICHNIS	100
9. DANKSAGUNGEN.....	106
10. LEBENS LAUF	107

1. Einführung

1.1. Körperliche Reaktionen auf Belastung

Der menschliche Körper ist in Extremsituationen, aber auch im Alltag und im Sport verschiedensten endogenen und exogenen Belastungen ausgesetzt. Je nach Intensität und Dauer der Belastung, genetischer Ausstattung, Allgemeinzustand und Trainingszustand des Individuums, reagiert das sensible System Körper unterschiedlich.

Körperliche Anpassungsmechanismen auf unterschiedliche Formen der Hypoxie sind für die Sportmedizin von hoher praktischer Relevanz.

Unter normalen Umgebungsbedingungen kann eine endogene Hypoxie durch verschiedene Belastungsformen in unterschiedlichen Körperkompartimenten physiologisch hervorgerufen werden oder auch Folge eines pathologischen Zustandes - beispielsweise im Rahmen eines Gefäßverschlusses - sein. In höheren atmosphärischen Lagen, oder generell bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck, treten auch unter Ruhebedingungen Anpassungsmechanismen als Reaktion auf eine in diesen Fällen exogene Hypoxie in Kraft.

Dass der Körper im Allgemeinen auf körperliche Belastung mit Anpassungsmechanismen reagiert, läßt sich am einfachsten und unmittelbar anhand von metabolischen, respiratorischen und kardialen Parametern zeigen. Diese spielen auch für die Anpassung des Organismus auf Hypoxie eine entscheidende Rolle, da sie maßgeblich Sauerstoffaufnahme, Sauerstofftransport und Sauerstoffausschöpfung im peripheren Gewebe beeinflussen.

Hypoxie, Radikale und Antioxidantien sind Bedingungen bei denen das Gen „HIF“ (*hypoxia inducible factor*) wichtige zelluläre Anpassungsvorgänge vermittelt (Morwenna and Ratcliffe, 1997), (Semenza, 1999), (Jiang et al., 1996a), (Wenger, 2000), (Ratcliffe et al., 1998), (Bertges et al., 2000), (Huang et al., 1996).

So können sich Zellen zum Beispiel unter den Bedingungen eines niedrigeren pO₂ Drucks adaptieren (Leach and Treacher, 1998). Dies geschieht durch

Umstellung bestimmter Stoffwechselwege wie zum Beispiel in der Skelettmuskulatur von der aeroben Energiegewinnung mit Sauerstoff zur anaeroben Energiegewinnung mit Anhäufung von Lactat.

Durch unvollständige Reduktion von Sauerstoff entstehen in der Atmungskette der Mitochondrien in Zellen und auch auf andere Art und Weise in verschiedenen Zellen freie Sauerstoff- und Stickstoffradikale (ROS/RNS). Freie Radikale sind auf Grund ihres freien Elektrons sehr reaktionsfreudig und können somit zelluläre DNA, Proteine oder Lipide schädigen. Dieser Vorgang ist in geringem Umfang normal und alltäglich, jedoch in größerem Umfang zum Beispiel auf hypoxische Belastung zurückzuführen. Dabei ist bekannt, dass dieser Effekt nicht ausschließlich auf veränderter Sauerstoffaufnahme beruht (Alessio et al., 2000a; Alessio et al., 2000b), sondern auch Effekt zellregulatorischer Prozesse ist. Bei ausdauertrainierten Sportlern wurden in geringerem Maße freie ROS und RNS aus Leukozyten im Blut nach Belastung im Vergleich mit untrainierten Kontrollen gemessen (Niess et al., 1999). Man kann also sagen, dass das Ausmaß oxidativen Stresses nicht nur von Dauer und Intensität der Belastung, sondern auch vom jeweiligen Trainingszustand und von der individuellen genetischen Ausstattung eines Individuums (somit der antioxidativen Kapazität) des belasteten Organismus abhängt. Insbesondere wurden solche Adaptationsprozesse nach intensivem Ausdauertraining, weniger nach Krafttraining, mittels Malondialdehydkonzentration als Marker für oxidativen Stress gemessen, beobachtet (Viitala et al., 2004). In diesem Zusammenhang wurden bisher erst wenige Untersuchungen in Bezug auf zelluläre Regulationsprozesse bei Hypoxie und körperlicher Belastung mit HIF durchgeführt.

Bei Sportlern wurde gezeigt, dass leukozytäre DNA in Folge von erschöpfender Ausdauerbelastung durch ROS geschädigt wurde (Niess et al., 1998). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass Ros nicht nur schädigend wirken und dadurch eine Entzündungsreaktion hervorrufen, sondern dass diese freien Radikale eine Art Signalfunktion übernehmen, mit der sie an der Regulation der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation beteiligt sind (Sauer et al., 2001).

Der Gedanke dem oxidativen Stress mittels Antioxidantiengabe zu begegnen führte schon zu vielen Studien, die aber auf Grund nicht standardisierter Durchführung schwer zu vergleichen sind, und deren Ergebnisse auch teilweise sehr widersprüchlich sind. Gegenwärtig geht der Trend aber mehr in Richtung der Aussage, dass die Gabe von Antioxidantien vor allem bei gut trainierten Sportlern einen eher geringeren Effekt auf die Bildung freier Radikale bei erschöpfender Ausdauerbelastung hat. Eine Studie von Niess und Mitarbeitern im Jahre 2000 hat gezeigt, dass die Gabe von RRR-alpha-Tocopherol (fettlösliches Vitamin E) bei Läufern unter erschöpfender Ausdauerbelastung die Bildung von Hämoxigenase 1 und „*inducible nitric oxide synthase*“ nicht beeinflusst. In einer Studie von Petersen und Mitarbeitern wurde mit der Gabe von Vitamin C ebenfalls kein Effekt auf den Inflammatorischen Prozess nach Ausdauerbelastung beobachtet (Petersen et al., 2001). Man hat unter der Gabe von Vitamin C zwar eine dosisabhängige Abschwächung der Proteinoxidation gezeigt, jedoch ohne Effekt auf Lipidoxidation oder Einfluss auf das Glutathionsystem, das dem Körper als Schutz gegen Oxidation durch freie Radikale dient (Goldfarb et al., 2005).

Jedoch gibt es Studien, in denen für nur mäßig trainierte Erwachsene mit einem Mangel an Vitamin C ein negativer Effekt auf die Ausdauerleistung nachgewiesen wurde. Doch konnte man auch in diesen Studien einen positiven Effekt auf Ausdauerfähigkeit mittels Gabe von Vitamin C nicht nachweisen (Witt et al., 1992).

Untersuchungen der Genexpression vor allem von Hif1 α stellen hier neue Möglichkeiten zur Erforschung grundlegender Fragestellungen zellulärer Regulationsmechanismen dar. Mit dieser Arbeit versuchen wir ein wenig Licht in die Blackbox zwischen Reiz und Reizantwort zu bringen.

1.1.1. Die Auswirkungen körperlicher Belastung und Hypoxie auf Blut und Immunsystem

Neben körperlichen Anpassungen auf Belastungen im Allgemeinen finden sich auch Anpassungen auf das Blut und Immunsystem welche im Rahmen der *in vivo* Fragestellungen dieser Arbeit untersucht wurden. Fragestellungen bezüglich der Untersuchung von Anpassungsmechanismen auf das Blut und

Immunsystem besitzen den Vorteil, dass sie mittels Blutabnahmen und somit mit vertretbarer Invasivität für die Probanden untersucht werden können. Dementsprechend gut sind bereits einige physiologische Anpassungsmechanismen charakterisiert.

Erhöhte Hämoglobinkonzentrationen und gesteigerte Pufferkapazität des Blutes wurde von (Bailey and Davies, 1997) beschrieben. Ebenfalls im Blut konnte man einen Anstieg von Katecholaminen nach Hypoxiebelastung (Ausdauerbelastung und Aufenthalt in Höhenlage) feststellen (Greiwe et al., 1999), (Calbet, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass in den Regulationsweg von HIF eingebundene Zytokine, vor allem IL-6, aber auch andere Interleukine und Tumornekrosefaktor alpha, nach Belastung im Blut ansteigen (Suzuki et al., 2002). Jedoch findet trotz Ansteigen einiger proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, im Blut keine umfassende systemische Immunabwehrreaktion im Sinne einer exzessiven Leukozytose, Vasodilatation oder irgendwelcher Beeinträchtigung von Organfunktionen statt, da der Körper in solch einer Situation gleichzeitig antiinflammatorische Zytokine sezerniert. So werden zum Beispiel auch Zytokine wie IL-1 Rezeptorantagonist, löslicher TNF-Rezeptor und das Interleukin IL-10 freigesetzt (Ostrowski et al., 1999). Im peripheren Blut konnte außerdem ein Anstieg mononukleärer Zellen, auch PBMC genannt, unter starker erschöpfender Belastung gezeigt werden (Connolly et al., 2004), wobei jedoch allein bei Lymphozyten mit dem Ende der Belastung ein Rückgang derer Zellzahl auf unter das Ausgangsniveau zu beobachten ist (McCarthy and Dale, 1988). Dies ist wahrscheinlich mit der Migration von Lymphozyten aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe, induziert zum Teil durch oben genannte Mediatoren, der Erschöpfung verfügbarer Zellpools in den lymphatischen Organen und einer erhöhten Apoptoserate, zu erklären (Wang and Huang, 2005). In jedem Fall führt körperliche Belastung, vor allem durch Gewebshypoxie mit HIF als entscheidendem Regulatormolekül zu einer peripheren Neutrophilie. Wobei sich mäßige Belastung positiv (Peake, 2002) und sehr starke Belastung negativ (Chinda et al., 2003) auf das Immunsystem auszuwirken scheint. Inwieweit das Immunsystem durch körperliche Belastung

spezifisch reguliert, stimuliert oder unterdrückt wird, ist noch nicht ganz geklärt (Cuzzocrea et al., 2001). Außerdem deuten einige Arbeiten daraufhin, dass Höhengaufenthalte (Meehan, 1987) und Belastungen dazu additiv (Shephard, 1998), einen gewissen immunsupprimierenden Effekt aufweisen.

1.1.2. Zelluläre Reaktionen auf Hypoxie

Es ist bekannt, dass sich die Zellen des menschlichen Organismus auf veränderte Sauerstoffpartialdrücke in Höhenlagen anpassen können, ohne dabei Nachteile in ihrer Lebenserwartung oder ihrer normalen Funktion in Kauf nehmen zu müssen. Doch sind nicht alle Zellen, ihrer Lokalisation und Funktion wegen, immer eines gleichen Sauerstoffpartialdruckes ausgesetzt, was deshalb bedeutet, dass für verschiedene Zellen verschiedene Toleranzbereiche gelten, innerhalb derer sich die Zelle wohl fühlen und adaptieren kann. Zum Beispiel werden Zellen, die in unmittelbarer Nähe zu einem arteriellen Blutgefäß angesiedelt sind, besser mit Sauerstoff versorgt, als Zellen, deren Diffusionsstrecke länger ist (Leach and Treacher, 1998).

Als eine der ersten Reaktionen mancher Zellen auf Hypoxie ist die Freisetzung bestimmter Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren zu nennen. Hält die Hypoxie dann länger an, müssen Gene mittels gesteigerter Transkription vermehrt exprimiert werden, um für einen Nachschub an Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren zu sorgen (Michiels et al., 2000). Zum Beispiel wird das proinflammatorische Zytokin IL-6, welches am akuten Entzündungsgeschehen, durch Sauerstoffmangel induziert, beteiligt ist, vermehrt freigesetzt (Yan et al., 1997). Durch proinflammatorische Zytokine wird ebenfalls der schon weiter oben diskutierte hypoxiebedingte Anstieg der ROS vermittelt (Floyd, 1999). Als transkriptionell im Sinne eines *Immediate Early Gens* induzierter Transkriptionsfaktor ist in erster Linie EGR1 zu nennen, der vor allem während der frühen hypoxischen Phase für ein Ansteigen von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), ICAM1 (*intracellular adhesion molecule*), PAI1 (*plasminogen activator inhibitor*), IL-1 β und dem prokoagulatorischen *tissue factor* verantwortlich ist (Yan et al., 2000), (Yan et al., 1998).

Bei der Anpassung der Zelle ihres Energie Metabolismus an hypoxische Bedingungen, geht die Zelle in den so genannten „*Hibernation state*“ über, in welchem sie ihren Energiekonsum deutlich einschränkt. Energie wird für überlebenswichtige Funktionen eingespart. Dies erreicht die Zelle durch allgemeine Reduktion ihres Stoffwechsels, erhöhte Sauerstoffausschöpfung, Anpassung metabolischer Enzymaktivität, Hemmung der Glukoneogenese, Hemmung der allgemeinen Proteinsynthese und des allgemeinen Proteinabbaus. Außerdem reduziert die Zelle dadurch ihre Anhäufung von Stoffwechsellüll, der in großen Mengen zelltoxisch wirken kann, sie spart verwertbares Substrat ein und sie nützt ATP für überlebenswichtige Funktionen wie Zellmembranintegrität und Stabilität und Aufrechterhaltung der zellulären Kompartimentgliederung, optimal aus. Diese ersten Maßnahmen der Zelle auf Hypoxie entwickeln sich in den ersten ein bis drei Stunden (Leach and Treacher, 1998), (Boutillier and St Pierre, 2000), (Bertges et al., 2000).

Unter Hypoxie werden in Zellen Gene durch Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Zufuhr von Sauerstoff ins Gewebe verbessern. Erythropoietin (allgemein auch unter dem Namen EPO als illegales Dopingmittel bekannt), wird vermehrt exprimiert und regt die Bildung von Erythrozyten an, was zur Steigerung des Hämatokrit führt; Transferrin wird vermehrt gebildet und macht somit die Bildung der Erythrozyten durch die genügende Zufuhr von Eisen möglich; Endothelin1, Adrenomedullin und Hämoxigenase1 werden transaktiviert und führen somit zur Gefäßerweiterung um den Blutfluss zu verbessern; Ebenfalls um die Durchblutung zu verbessern wird VEGF (*vascular endothelial growth factor*) verstärkt exprimiert, was die Angiogenese stimuliert (Boutillier and St Pierre, 2000), (Semenza, 1999), (Ratcliffe et al., 1998), (Morwenna and Ratcliffe, 1997), (Bertges et al., 2000), (Bunn and Poyton, 1996).

Unter Hypoxie werden in Zellen Gene durch Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Anpassung der Zelle an die geänderte Situation bewerkstelligen. Laktatdehydrogenase A wird vermehrt gebildet, was die Induktion verschiedener Enzyme der anaeroben Glykolyse zur Folge hat. Die Konzentrationen der Glukosetransporter 1 und 3 steigen an, die des Glukosetransporters 2 sinkt, um der Zelle genügend Substrat für die Glykolyse

bereit zu stellen (es sind dadurch Steigerungen in der Glukoseaufnahme in die Zelle von bis zu 600% möglich). Die Bildung von Phosphoenolpyruvat-carboxykinase wird gehemmt, so dass bestimmte Enzyme der Glukoneogenese nicht induziert werden, um ATP zu sparen. Die Tyrosinhydroxylase steigt in ihrer Konzentration an, was zur Katecholaminsynthese führt; Adenosinkinase 3 wird vermehrt aktiviert und garantiert dadurch einen hohen Energiephosphat-Metabolismus. Auch p53src wird induziert und regelt damit über ein negatives Feedback die Aktivität von Hif1. p21 wird transaktiviert, was Zellzyklus-Arrest bewirkt. (Semenza, 1999), (Morwenna and Ratcliffe, 1997), (Bunn and Poyton, 1996), (Wenger, 2000).

Der bedeutendste Transkriptionsfaktor hierbei ist wie oben schon mehrfach erwähnt Hif1 α .

Dieser ist mitverantwortlich für das Zustandekommen des so genannten „*pasteur effect*“. Ähnlich der Hefe beim Gärungsprozess zur Herstellung des allgemein beliebten Gerstensaftes, wird unter anaeroben Bedingungen in der eukaryonten Zelle durch Enzyme der Glykolyse Glukose verstoffwechselt, ohne aber Ethanol, sondern Laktat als Stoffwechselendprodukt zu erhalten. Durch diese Umstellung von der aeroben Energiegewinnung weg zur anaeroben Energiegewinnung hin, sichert sich die Zelle wenigstens über kürzere Zeit hinweg einen gewissen ATP-Spiegel, bevor sie der Milchsäure halber auch diesen Weg bald nicht mehr gehen kann.

Ist es einer Zelle nicht möglich sich an Hypoxie anzupassen, steht ihr der Zelltod bevor. Es gibt zwei Arten von Zelltod: Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, und der nekrotische Zelltod.

Wenn eine Zelle ihre ATP Versorgung nicht aufrechterhalten kann, wird sie letzten Endes an Nekrose zu Grunde gehen. Die Gründe dafür sind die durch das Fehlen von ATP verursachte Membrandurchlässigkeit (es können zum Beispiel Natriumionen einströmen und somit das Anschwellen der Zelle bedingen) und schließlich die Membranruptur mit der Aufhebung sämtlicher Kompartimente der Zelle. Die Zelle platzt und schüttet dabei sämtlichen Zellinhalt aus, der für andere Zellen in unmittelbarer Umgebung toxisch und letal sein kann.

Im Gegensatz zum nekrotischen Ableben von Zellen, gibt es Hypothesen, wonach Hypoxie Zelltod durch Apoptose induzieren könnte. Dies könnte ein Hif1 gesteuerter Mechanismus sein, indem Hif1 α p53 stabilisiert, welches Apoptose induzierende Gene wie BAX oder p21 aktiviert (Semenza, 1999). Der Hauptunterschied hiervon zur Nekrose besteht im Untergang der einzelnen Zelle ohne Beschädigung oder ein eventuelles Mitreißen in den Tod von Nachbarzellen beispielsweise durch die unkontrollierte Freisetzung von Kalium, Proteasen und DNAsen.

Für das durchschnittliche Überleben von verschiedenen Geweben in Hypoxie gilt, dass Zellen im Gehirn bis zu drei Minuten, in Niere und Leber bis zu zwanzig Minuten, im Skelettmuskel bis zu 90 Minuten, glatte Muskelzellen der Gefäße bis zu 72 Stunden und Zellen in Haaren und Nägel bis zu mehreren Tagen ohne Sauerstoff leben können (Leach and Treacher, 1998).

Der oben beschriebene Anstieg der ROS bei Hypoxie durch proinflammatorische Zytokine, ist laut einigen stimmigen Studien mit der Gabe von Antioxidantien der Art Vitamin C, α -Tocopherol oder α -Liponsäure im Gegensatz zur weiter oben beschriebenen belastungsabhängigen Erhöhung freier Radikale, modulierbar. Dies wurde in einer placebokontrollierten Studie zur Höhenkrankheit, mit dem Ergebnis eines mildereren Verlaufes der Höhenkrankheit bei Antioxidantiengabe gezeigt (Bailey and Davies, 2001). Jedoch scheint die Antioxidantiengabe beim kombinierten Versuch der körperlichen Belastung in Höhenlage wiederum vergebens (Subudhi et al., 2004).

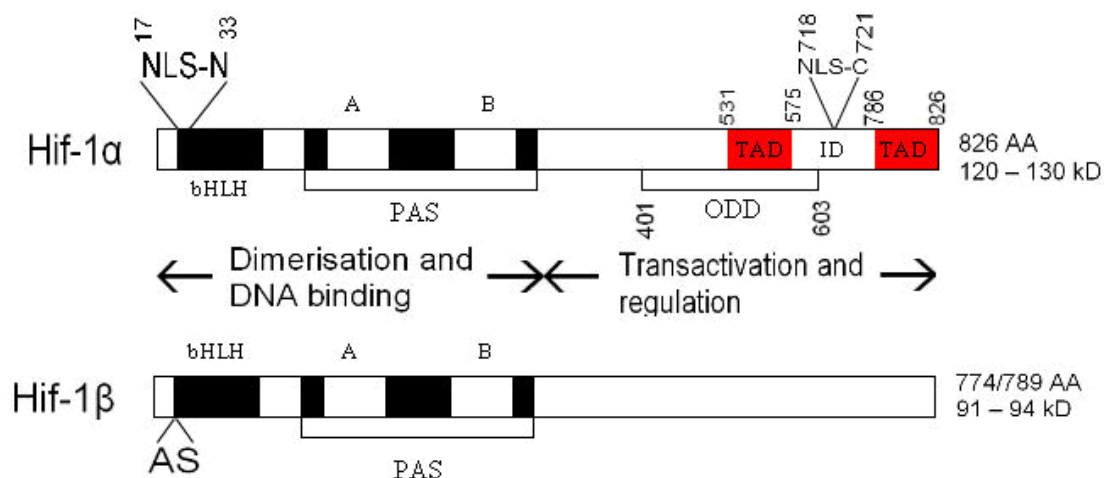
Nachdem bisher auf allgemeine und spezielle Reaktionen des Körpers auf hypoxische Belastungen eingegangen worden ist und dabei HIF1 als entscheidendes Regulatorgen vorgestellt worden ist, wird HIF1 im Folgenden nun näher betrachtet. Dabei wird zwischen HIF-Protein und HIF-mRNA unterschieden.

1.2. Der durch Hypoxie induzierbare Transkriptionsfaktor „HIF“

1.2.1. Der Hif1 Proteinkomplex

Hif1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktorenkomplex, bestehend aus einer Hif1 α (120-130 kD und 826 AS) und einer Hif1 β (91-94 kD und 774-789 AS)=ARNT (*aryl receptor nuclear translocator*) Proteinuntereinheit (Wang and Semenza, 1995). Wobei die Hif1 α Untereinheit den durch Sauerstoff regulierten Teil des Komplexes darstellt, der unter Normoxie dem schnellen Proteinabbau unterworfen ist (Huang et al., 1998). Das Protein Hif1 besitzt einige Domänen mit jeweils unterschiedlichen Funktionen: Die bHLH (*basis helix-loop-helix*) Domäne mit der Funktion an DNA binden zu können und mit der jeweils anderen Untereinheit zu dimerisieren; Die ebenfalls zur Dimerisation erforderliche PAS Domäne ; Die TAD (Amino(N)/Carbonyl(C)) Domäne in der alpha Untereinheit zur Transaktivierung; Die ODD (*oxygen dependent degradation sequence*) Domäne in der alpha Untereinheit zur Proteinstabilisation; Die NLS (Amino(N)/Carbonyl(C) *nuclear localisation signal*) Domäne um bei Hypoxie in den Nukleus zu gelangen; Und die AS (*alternative splicing sequence*, bestehend aus 45bp) Domäne für zwei unterschiedliche Varianten der beta Untereinheit; (Semenza, 1999), (Bertges et al., 2000), (Morwenna and Ratcliffe, 1997), (Semenza, 2000).

Schaubild 1: Modell von Hif1-Protein α und β



Dieses Schaubild (modifiziert nach (Semenza, 1999)) zeigt exemplarisch den Vergleich der beiden Hif1 Proteinuntereinheiten α und β in zwei Aminosäureketten („aa“ = *amino acid*) auf. Benannt sind die verschiedenen Funktionsbereiche (Domänen = „Dimerisation und DNA-Bindung, Transaktivierung und Regulation“), die Länge und das Gewicht eines jeden Proteins.

Bei der Anlagerung von Hif1 an jene hypoxie gesteuerten Gene wie zum Beispiel EPO, bindet Hif1 mit seiner bHLH Domäne an die HBS-Sequenz (*Hif binding site* A/(G)CGTG), die in der HRE-Region (*hypoxia response element*) des zu aktivierenden Gens lokalisiert ist. Die erste beschriebene HRE-Region befindet sich auf dem EPO-Gen, ist 50bp lang, enthält die Sequenz 5`-TACGTCGT-3` und enthält außer der Hif1 Bindungsstelle noch mindestens vier weitere (Wenger, 2000).

Während Normoxie ist das Protein Hif1 α so gut wie nicht zu detektieren, die β -Untereinheit ist auf einem Basisniveau konstant exprimiert. Das liegt daran, dass nur Hif1 α während Normoxie einem ständigen Abbau unterworfen ist, bei dem zuerst eine Prolin Hydroxilation stattfindet, dann ein VHL (von Hippel Lindau Protein) die Ubiquitinierung an der ODD-Domäne vornimmt, welche darauf hin einem Proteasom anzeigt, dass dieses Hif1 α -Protein abgebaut werden kann. Somit beträgt die Halbwertszeit eines Hif1 α -Proteins während Normoxie weniger als 5 Minuten.

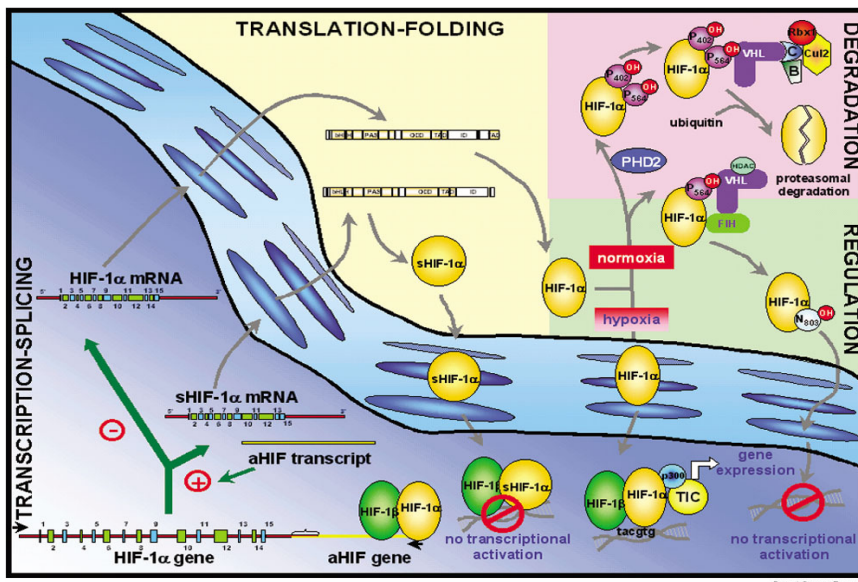
Im Gegensatz zur Normoxie wird bei Hypoxie der Proteinabbau des Hif1 α unterdrückt (eine Rolle im Signalweg könnten hierbei die von Mitochondrien gebildeten ROS während Hypoxie spielen (Agani et al., 2000), (Schroedl et al., 2002)), so dass das Protein akkumulieren und vom Zytosol in den Zellkern wandern kann (Jiang et al., 1996a), (Jiang et al., 1996b), (Jewell et al., 2001). Dies geschieht einerseits durch eine Stabilisierung der ODD-Domäne des Hif1 α -Proteins (ob dies durch Phosphorylierung, oder auf eine andere Art und Weise stattfindet, ist noch unklar) (Wenger, 2000), andererseits sind sinkende VHL-Proteinspiegel beobachtet worden (Ameln et al., 2005).

Die Aktivität von Hif1 α , und die mit Hypoxie einhergehende Transkription verschiedener Gene, steigt in einem gewissen Rahmen exponentiell mit der Intensität der Hypoxie an (Morwenna and Ratcliffe, 1997). Im Speziellen steigen

Hif1 DNA-Bindungsaktivität und Hif1 α und Hif1 β Proteinkonzentrationen (Jiang et al., 1996a).

Folgende Schritte gibt es auf dem Weg zur Aktivierung von verschiedenen Hif1 regulierten Genen: Zuerst wird Hif1 durch Hypoxie aktiviert (bzw. es akkumuliert durch Abbauhemmung), dann wandert es in den Zellkern, dort heterodimerisieren die beiden Untereinheiten miteinander, darauf hin findet die Bindung des Proteins an spezifische DNA-Abschnitte des Genoms statt (dieser Schritt benötigt verschiedene transkriptionelle Cofaktoren wie zum Beispiel *Histone acetyltransferase* CBP/p300 und HSP90 (*heat shock protein*)), nun folgt die Transkription dieser Gene mit darauffolgender Translation.

Schaubild 2: Regulation des „Hypoxia Inducible Factors“ (Cayre et al., 2003)



Gezeigt ist in diesem Schaubild von Cayre et al., 2003 der Weg des Hif1 α von der Transkription (links unten: Geninformation wird in einer mRNA verpackt) im Kern über die Translation in ein Protein im Zytosol (in der Mitte oben) und als aktiver Transkriptionsfaktor wieder im Kern (in der Mitte unten). Ebenfalls dargestellt ist die Degradation von Hif1 α Protein unter Normoxie (rechts oben) und die Inaktivierung von Hif1 α Protein durch einen falschen Partner (in der Mitte: sHif1 α translatiert aus aHif).

1.2.2. Steuerung von Hif1 α auf Transkriptionsebene

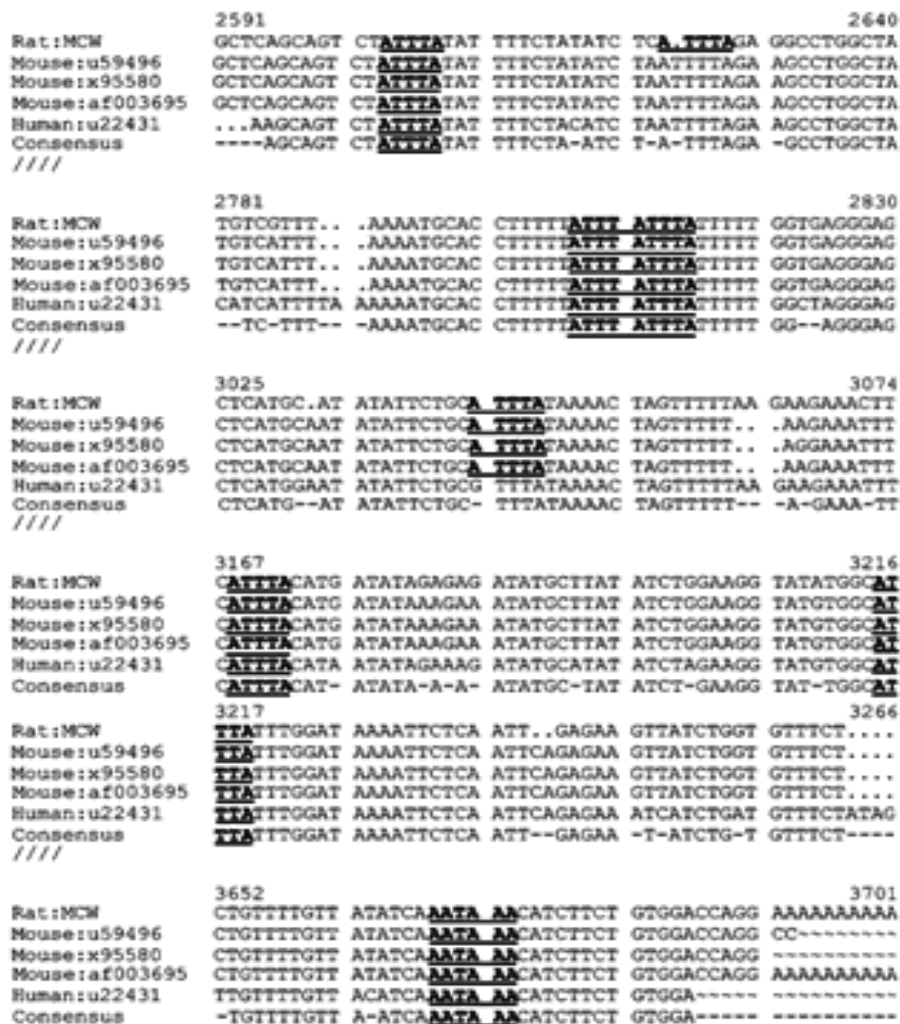
Das Hif1 α Gen liegt auf 14q20-24 und enthält bisher publiziert 15 Exons. Bisher gibt es viele Arbeiten, die zeigen, dass Hif1 α Protein nach Belastung auf

posttranslationalen Ebene durch Hemmung seines Abbaus vermehrt anfällt (Vogt et al., 2001), (Gustafsson et al., 2002), (Gustafsson et al., 1999). Wobei Ausdauerbelastung unter Normoxie zu einem stärkeren Anstieg von Hif1 α Protein führen soll, als Ausdauerbelastung unter hypoxischen Bedingungen (Wagner, 2001). Uchida et al. haben 2004 in einer Arbeit mit Lungenepithelzellen unter längerer Hypoxie interessante Entdeckungen gemacht. Hif1 α Protein stieg vier Stunden nach Hypoxiebeginn am stärksten an, war sechs Stunden nach Hypoxiebeginn schon wieder vermindert und zwölf Stunden nach Hypoxiebeginn gar wieder auf seinem *base-level* angekommen. Die Hif1 α mRNA Konzentration hingegen veränderte sich bis sechs Stunden nach Hypoxiebeginn überhaupt nicht. Von sechs zu zwölf Stunden nach Hypoxiebeginn jedoch, zeigte sich ein dramatischer Abfall der Hif1 α mRNA-Konzentration (Uchida et al., 2004). Uchida et al. schlussfolgerten daraus, dass Hif1 α Protein, mit seinem Anstieg im Sinne einer negativen Rückkopplung, aHif mRNA induzieren könnte, welche wiederum für den Abfall der Hif1 α mRNA-Konzentration verantwortlich sein könnte.

aHif (AntiHif) wurde erstmals im klarzelligen Nierenkarzinom gefunden und ist in 1027bp komplementär zum 3'UTR (*untranslated region*) von Hif1 α mRNA (Thrash-Bingham and Tartof, 1999). Doch aHif ist mittlerweile auch in vielen anderen foetalen, wie adulten Geweben benignen, wie auch malignen Art nachgewiesen worden. Das 3'UTR-Ende von Hif1 α mRNA enthält eine AU-reiche Basenregion, welche normalerweise in der Sekundärstruktur gesehen innerhalb einer Haarnadelkurve lokalisiert ist. Diese Lokalisation soll eine Bindung von Proteinen erschweren. Das aHif sei nun in der Lage im Zellkern an Hif1 α mRNA komplementär zu binden und jene genannten Haarnadelstrukturen zu glätten, was ein Freilegen der AU-reichen Basenregion zur Folge hätte. Dies wiederum könnte im Falle einer Translokation dieses Hif mRNA-Komplexes ins Zytosol zu einer Bindung von Proteinen, mit der Folge eines Abbaus der Hif1 α mRNA, führen. Außerdem sind in aHif verschiedene HRE-Regionen gefunden worden, mit welchen die Überexpression der RNA unter hypoxischen Bedingungen zu erklären wäre (Rossignol et al., 2002).

Für das bisher angenommene 3'UTR-Ende von Hif1 α wurde im Genom eine hohe Sequenzgleichheit (=lässt eine hohe Konservierung über lange Zeit hinweg vermuten) zwischen verschiedenen Säugetierarten gezeigt, was auf eine wichtige physiologische Bedeutung dieser Region hindeutet (Zou et al., 2001). Ebenfalls wurde für aHif eine hohe Sequenzgleichheit für die zu Hif1 α mRNA komplementäre Region zwischen Mensch und Nager gefunden (Rossignol et al., 2004).

Schaubild 3: Phylogenetische Konservierung von Hif1 α im Bereich seines bisher publizierten 3'UTR-Endes



ZOU, A.-P. et al. *Physiol. Genomics* 6: 159-168 2001

Das Schaubild zeigt die phylogenetische Konservierung eines Bereiches des bisher publizierten 3'UTR-Endes von Hif1 α im Genom. Dargestellt ist hierbei der Abgleich zwischen Mensch, Maus

und Ratte von der genomischen Position 2591 aus bis 3701. Bei den im Schaubild fett gezeichneten und unterlegten Sequenzabschnitten handelt es sich zum einen um „AT“-Reiche Basensequenzen (die mehrfach vorkommende fünf Basen umfassende Sequenz „ATTTA“). Diese sogenannten *AU-rich Elements* sind dafür bekannt, dass sie der posttranskriptionellen Stabilisierung der mRNA dienen können. Zum anderen ist die sechs Basen umfassende Sequenz Hex („AATAAA“) hervorgehoben, welche das stärkste, Polyadenylierungssignal für eine mRNA darstellt.

Im menschlichen Hoden und nur dort gibt es eine Hif1 α mRNA Variante genannt hHif1 α -te mRNA. Diese kodiert für ein Protein (hHif1 α -te Protein), welches mit Hif1 β zwar einen Komplex bilden kann, jedoch nicht fähig ist an DNA zu binden und als Transkriptionsfaktor zu wirken. Diese Eigenschaft von hHif1 α -te mRNA könnte man auch als dominant negative Regulatorisform der Hif1 α Aktivität bezeichnen (Depping et al., 2004).

1.2.3. Bekannte Polymorphismen des HIF-1 α Gens und ihre Auswirkungen auf die Ausdauerleistungsfähigkeit

Von Hif1 α mRNA sind verschiedene genetische Polymorphismen beschrieben worden. Prior et al. haben sechs seltene und drei häufigere genetische Polymorphismen (A-2500T, P582S (C/T), T+140C) von Hif1 α mRNA gefunden. Des Weiteren waren nicht alle Polymorphismen bei allen menschlichen Rassen in gleicher Kombination und Zahl zu finden. Bei dem A-2500T Polymorphismus zeigte sich für die seltene (AT/TT) Variante bei Amerikanern afrikanischer Abstammung gegenüber den homozygoten A-Allelträgern eine niedrigere Maximale Sauerstoff Aufnahme VO_{2max} auf. Diese Beobachtung galt jedoch nicht für Kaukasier. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass jene Individuen, die beim P582S (C/T) Polymorphismus ein CT- oder ein TT-Allel tragen, nach dem 60. Lebensjahr, nur mehr einen geringeren Anstieg ihrer Maximalen Sauerstoff Aufnahme (VO_{2max}) durch Ausdauertraining erreichen können, als Träger des CC-Allels. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung sei ein Tausch der 582. Aminosäure (Prolin statt Serin) des Hif1 α Proteins (Prior et al., 2003).

1.2.4. Posttranskriptionale Prozessierung der HIF1 α mRNA

Das primäre Transkriptionsprodukt ist eine hnRNA (heteronukleäre RNA). Damit sie schließlich mRNA genannt werden kann, muss sie mindestens drei Modifikationen über sich ergehen lassen. Das Anhängen eines GTP an das 5'-Ende (immer ein Purinderivat) der hnRNA über eine 5'-5'-Bindung mit anschließender Methylierung des Guanosins, ist die erste Modifikation und wird auch Kappe genannt. Die zweite Modifikation ist das Anhängen eines Poly-A-Schwanzes durch eine Poly-A-Polymerase (meist um die 250 Adenosinmonophosphate in einer Kette) an das 3'-Ende der hnRNA nach dem Transkriptionsstoppsignal 5'-AATAAA-3'. Die dritte Modifikation betrifft das Spleißen (Zusammenfügen der Exons) der hnRNA. Dabei werden die nicht kodierenden Genabschnitte (Introns) entfernt und die kodierenden Genabschnitte (Exons) miteinander verbunden. Introns sind in ihrer Anzahl und Länge in verschiedenen Genen sehr unterschiedlich. Im Grenzbereich zwischen Intron und Exon befinden sich dazu so genannte Spleißsignale, die von Spleißosomen (bestehend aus snRNA Molekülen und Proteinen) erkannt werden. Beim alternativen Splicing werden nicht nur Introns (vollständig oder auch unvollständig) entfernt, sondern fakultativ auch bestimmte Exons. In der Literatur sind für HIF zwei Varianten beschrieben, die sich lediglich im Vorhandensein des Exon 14 unterscheiden. Die Variante ohne Exon 14 (Kimura et al., 2006) ist die alternativ gesplice Form der Variante mit Exon 14 (Hogenesch et al., 1997). All diese Modifikationen finden im Zellkern statt und dienen der Reifung der mRNA, der Regulation des Abbaus der mRNA und der Koordination des Transports aus dem Zellkern heraus ins Zytoplasma der Zelle, sowie Aufgaben zur Translation der mRNA in Proteine durch Ribosome im Zytosol. Durch das oben angesprochene alternative Splicing, sowie durch die mRNA-Editierung (das Vertauschen von einzelnen Basen) und die im Folgenden erläuterte differentielle Polyadenylierung, wird eine immense Proteinvielfalt erreicht.

Differentielle Polyadenylierung:

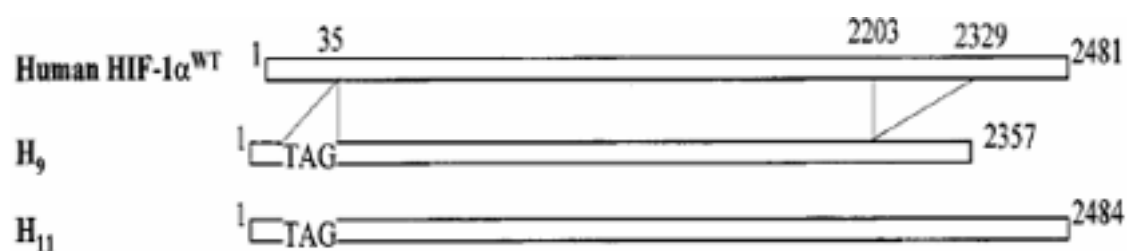
Termination bedeutet Beendigung der Transkription. Das Ende der Transkription bestimmt den Punkt ab dem die RNA-Polymerase keine weitere

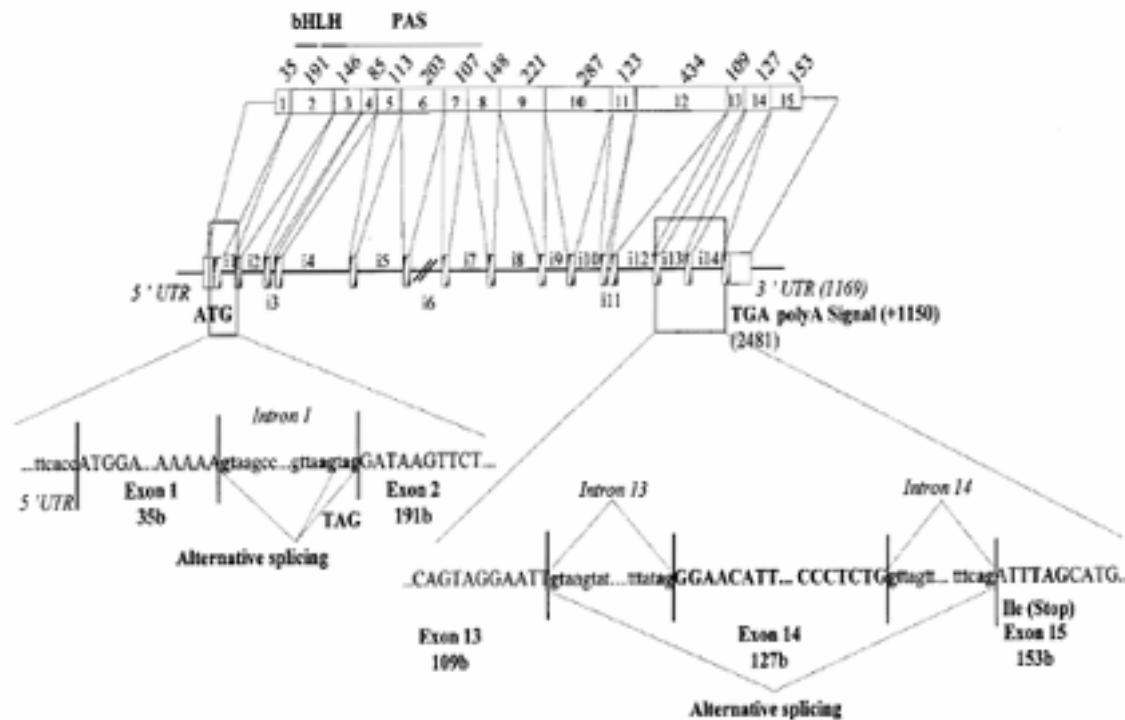
Synthese mehr betreibt. Dieser wird eingeleitet durch ein 5`-AATAAA-3` Signal oder sehr ähnliche Sequenzen, unter denen AUUAAA die zweithäufigste Variante ist. In der Nähe dieses Signals (im Schnitt etwa 5-10nt weiter *downstream*) wird ein Polyadeninschwanz (*PolyA tail*) an die mRNA synthetisiert, weshalb man diese Sequenzen auch Poly-A-Signale nennt (Tian et al., 2005). Von diesem Signal muss das Stoppkodonsignal unterschieden werden, welches bei der Translation der mRNA durch Ribosome im Zytosol dem Abbruch der Aminosäure-Kette dient, also das Ende eines Proteins signalisiert. Die differentielle Polyadenylierung von Hif1 α zum Beispiel wird durch verschiedene Poly-A-Signale, die unterschiedlich stark sind reguliert. In Abhängigkeit von zu unterschiedlichen Zeiten in der Zelle gebildeten Faktoren wird das vorangehende (schwächere) Poly-A-Signal entweder berücksichtigt oder nicht. Man nimmt an, daß auf diese Art und Weise viele Varianten, vor allem jene mit unterschiedlich langem 3`Ende, entstehen.

1.3. Bekannte Hif1 α mRNA-Varianten

Wie weiter oben mehrfach angedeutet, sind von Hif1 α mRNA ebenfalls schon einige Varianten bekannt. Von der konventionellen Hif1 α mRNA sind in einer Arbeit zwei weitere unterschiedliche Varianten, durch alternatives Splicen entstehend, beschrieben worden. Diese enthalten fakultativ das Exon 14 und fakultativ ein TAG-Basentriplet an der Übergangsstelle von Exon eins zu Exon zwei. Hif1 α mRNA mit Exon 14 ist die häufigst exprimierte, also die eigentliche konventionelle (von uns als Hif1 α -sv gemessene) Hif1 α mRNA (Gothie et al., 2000).

Schaubild 4: mRNA Splice-Varianten des konventionellen Hif1 α nach Gothie





Oben sieht man drei Hif1 α mRNA Varianten nach Gothie et al., 2000. Zuerst sieht man Hif1 α ohne das zusätzliche Trinukleotid TAG aber mit Exon 14 (2481bp Länge), dann die Variante „H₉“ mit dem Trinukleotid TAG aber ohne das Exon 14 (2357bp Länge), und zuletzt die Variante „H₁₁“ mit dem Trinukleotid TAG und dem Exon 14 (2484bp Länge).

Auf dem unteren Schaubild sieht man das alternative Splicing des Exon 14 rechts unten (die Ränder der Exons 13, 14 und 15 sind in Großbuchstaben dargestellt, die der Introns 13 und 14 in Kleinbuchstaben. Die Länge des alternativ gespliced Bereichs ist mit 127 Basenpaaren angegeben) und das alternative Splicing des Intron 1 (das Intron 1 wird fakultativ komplett, oder nur teilweise mit dem Verbleiben der Übergangs-Trinukleotidsequenz TAG, entfernt) links unten. In der Mitte schematisch dargestellt ist die Hif1 α mRNA (5'UTR links bis 3'UTR rechts) mit ihren bekannten 15 Exons (die jeweilige Exonlänge ist darüber angegeben) und der Lokalisation der beiden alternativen Splicestellen.

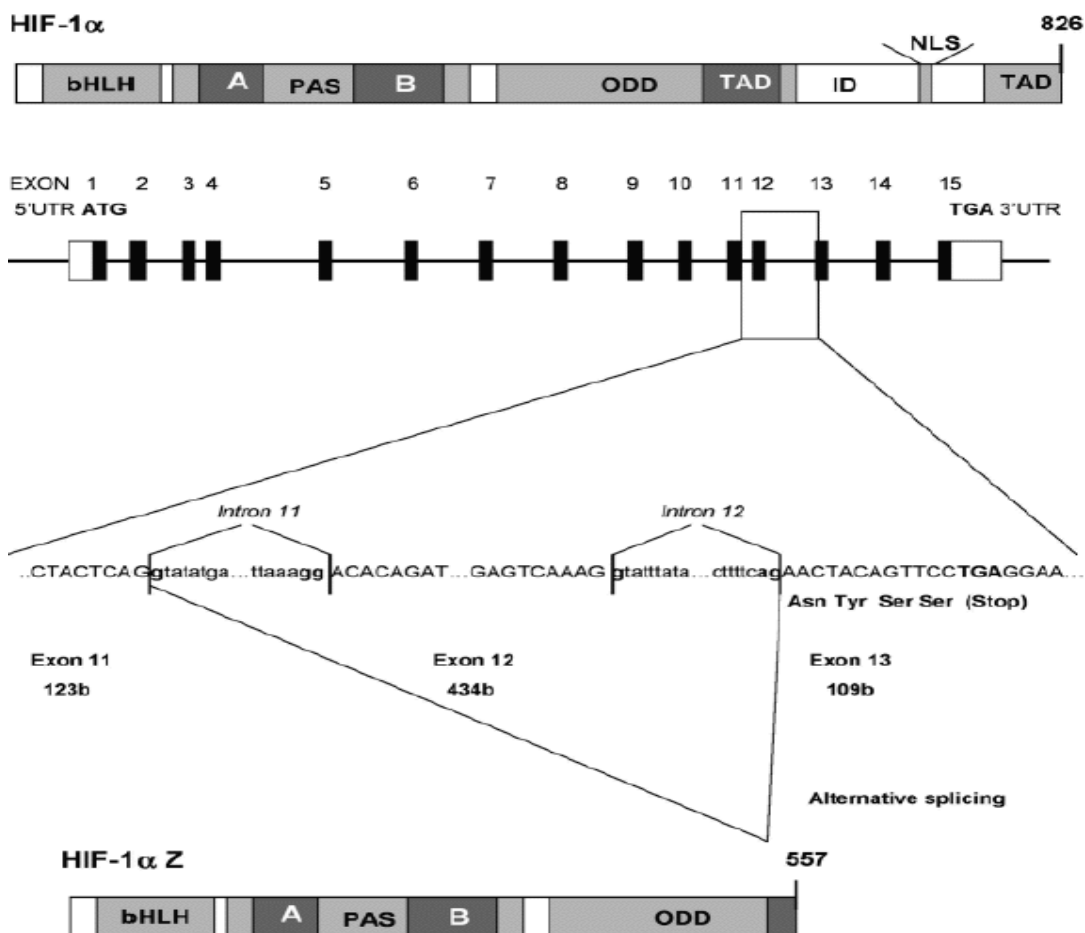
Des Weiteren wurden in aktivierten T-Zellen zwei Hif1 α -mRNA Varianten (I.1 Hif1 α mRNA und I.2 Hif1 α mRNA unterscheiden sich am 5'Ende ihres Exon1 (alternativ gespliced)) gezeigt, die nicht sauerstoffabhängig reguliert werden. I.2 Hif1 α mRNA kodiert für ein N-terminal 12 Aminosäuren längeres Protein als I.1 Hif1 α mRNA und ist eher konstitutiv exprimiert, während I.1 Hif1 α mRNA situationsspezifisch reguliert wird (*immediate early response gene*). Beide

Isoformen wirken jedoch an den gleichen Ziel-Genen als Transkriptionsfaktoren (Lukashev et al., 2001).

Eine andere Variante, der Hif1 α mRNA, der das Exon 10 fehlt, kodiert für ein Protein mit 417 Aminosäuren. Obwohl diesem Protein ein Teil der TAD-Domäne fehlt, kann es im Zellkern an ARNT-gebunden als Transkriptionsfaktor für das EPO-Gen wirken. Deshalb geht man in diesem Falle davon aus, daß die Bindung als Transkriptionsfaktor an DNA über die TAD-Domäne der ARNT Untereinheit geschieht (Lee et al., 2004).

Durch die Anwesenheit von Zink-Ionen wird eine Hif1 α mRNA Variante durch alternatives Splicen induziert, welcher das Exon 12 fehlt. Diese Variante wird Hif1 α Z genannt.

Schaubild 5: Modell des alternativen Splicens von Hif1 α Z mRNA

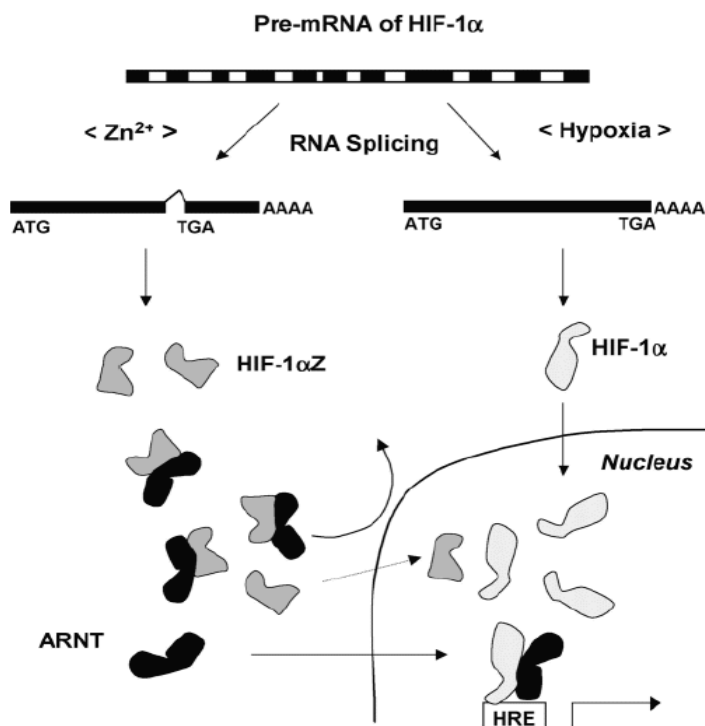


In diesem Modell nach Chun et al., 2001 ist Hif1 α Z dargestellt, welchem durch alternatives Splicen Exon 12 fehlt. Am oberen Schaubildrand ist das konventionelle Hif1 α als Aminosäurenkette dargestellt. Darin eingezeichnet sind die verschiedenen funktionellen

Domänen. In der Mitte der Abbildung ist gezeigt, wie der Bereich vom Anfang des Intron 11 bis zum Ende des Intron 12 herausgespliced wird und Hif1 α Z entsteht. Am unteren Schaubild wird dann verdeutlicht, welche funktionellen Domänen bei diesem Vorgang entfallen.

Das dazugehörige Protein mit der Anzahl von 557 Aminosäuren zu dieser durch Zink induzierten Variante bildet mit ARNT einen zum normalen Hif1 α alternativen Proteinkomplex, der dadurch an einem Übertritt in den Zellkern gehindert wird. Somit steht ARNT nicht mehr für die Dimerisation mit normalem Hif1 α im Zellkern zur Verfügung, was sich dadurch äußert, dass Hif1 α gesteuerte Gene wie zum Beispiel EPO vermindert exprimiert werden. Während Hypoxie ist die Anwesenheit von Zink-Ionen vermindert, was zu einem Abfall von Hif1 α Z führt, wodurch ARNT in den Nucleus übertreten und mit normalem Hif einen funktionsfähigen Transkriptionskomplex bilden kann. Hif1 α Z (Zink induziert) hat also die Funktion einer dominant negativen Isoform von Hif1 α (Chun et al., 2001).

Schaubild 6: Modell der Regulation durch Hif1 α Z



Dieses Modell nach Chun et al., 2001 veranschaulicht, wie während der Anwesenheit von Zink-Ionen (linke Schaubildhälfte) die Hif1 α mRNA Variante (Hif1 α Z) gespliced wird, und dass diese

ARNT im Zytoplasma durch Bindung zurückhält. Unter hypoxischen Bedingungen (rechte Schaubildhälfte, also der Abwesenheit von Zink-Ionen und somit auch Hif1 α Z) führt das mRNA-Splicing zu einer normalen Hif1 α mRNA, welche daraufhin im Zellkern mit ARNT einen funktionsfähigen Transkriptionskomplex bilden kann.

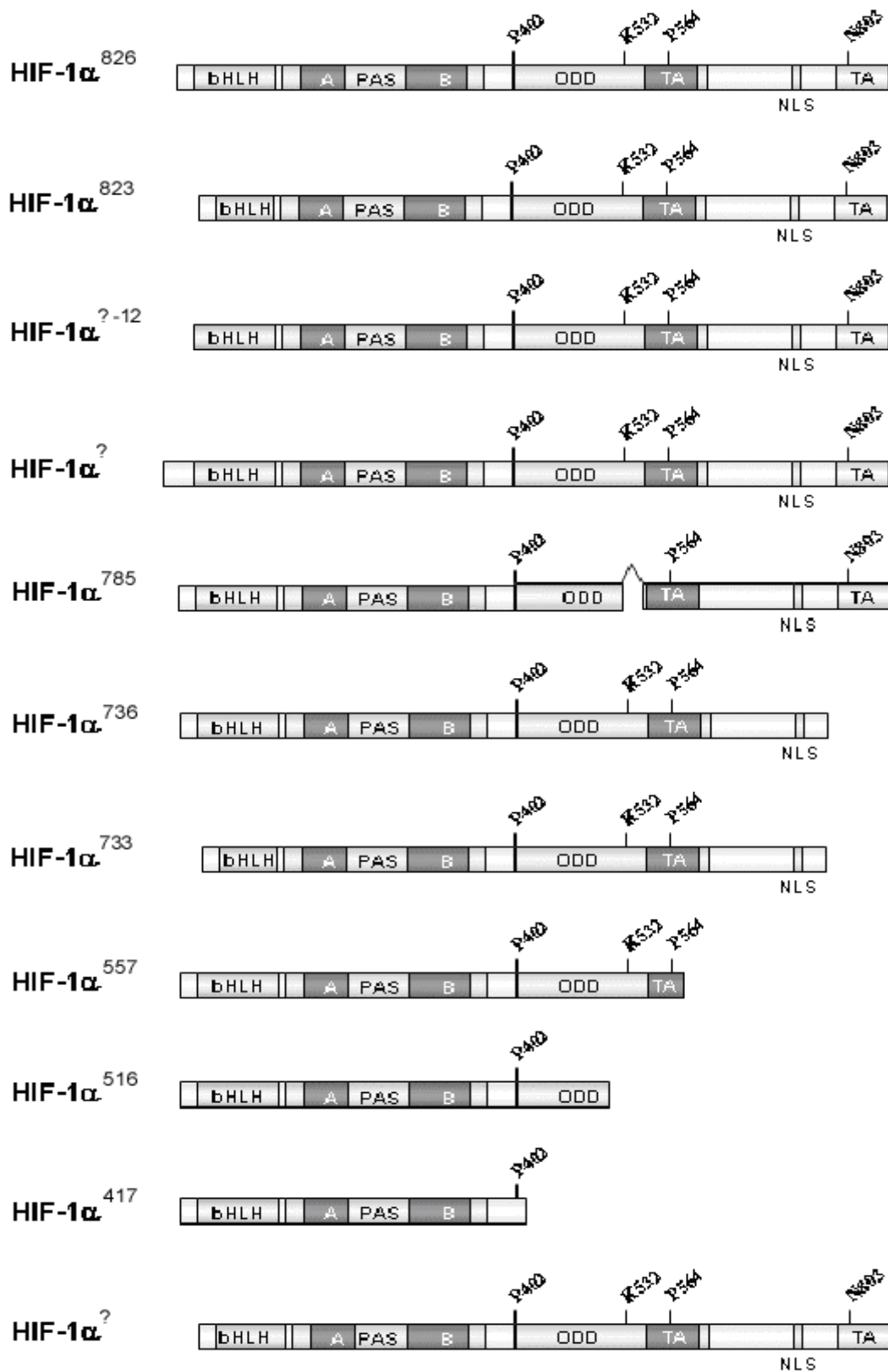
Ebenfalls eine durch alternatives Splicen entstehende Variante von Hif1 α mRNA wurden 2002 in einer Arbeit von Chun et al. gezeigt. Dabei handelt es sich um eine Hif1 α mRNA, welcher die beiden Exons 11 und 12 entfernt werden und die als dominant negative Isoform der konventionellen Hif1 α mRNA beschrieben worden ist. Sie soll die Aktivierung und die Aktivität von Hif1 inhibieren und somit auch die mRNA-Expression von Hif1-regulierten Genen reduzieren (Chun et al., 2002).

Außerdem wurde wie schon weiter oben beschrieben eine ebenfalls dominant negative Isoform von Hif1 α mRNA beschrieben, die jedoch nur gewebespezifisch (zum Beispiel im menschlichen Hoden) vorkommt. Diese Variante wird hHif1 α -te genannt und soll die Dimerisation des konventionellen Hif1 α mit ARNT unterbinden (Depping et al., 2004).

Im Folgenden zeigen wir die bisher beschriebenen ubiquitär exprimierten Hif1 α mRNA Varianten in einem Schaubild auf.

In den Experimentellen Teil dieser Doktorarbeit wurden nur die Hif1 α mRNA Varianten mit und ohne Exon 14 aufgenommen, da diese als unstrittig gelten. Die anderen Varianten sind noch nicht von mehr als einer Arbeitsgruppe beschrieben worden und deshalb nicht Teil des Gegenstands dieser Forschungsarbeit.

Schaubild 7: Bisher bekannte Hif1 α mRNA Varianten entstehend durch alternatives Splicing (Schaubild modifiziert nach (Lee et al., 2004))



Von oben nach unten bezeichnet:

1. Hif1 α (826 Aminosäuren-Protein) mit Exon 14 und der TAG Sequenz
2. Hif1 α (823 Aminosäuren-Protein) mit Exon 14 ohne die TAG Sequenz
3. Hif1 α I.1 (12 Aminosäuren kürzer als Hif1 α I.2)
4. Hif1 α I.2
5. Hif1 α (785 Aminosäuren-Protein) ohne Exon 11 (exprimiert in Tumorzellen)
6. Hif1 α (736 Aminosäuren-Protein) ohne Exon 14 aber mit der TAG Sequenz
7. Hif1 α (733 Aminosäuren-Protein) ohne Exon 14 und ohne die TAG Sequenz
8. Hif1 α (557 Aminosäuren-Protein) ohne Exon 12, Hif1 α Z, dominant negativ
9. Hif1 α (516 Aminosäuren-Protein) ohne Exon 11/12, aHif, dominant negativ
10. Hif1 α (417 Aminosäuren-Protein) ohne Exon 10
11. hHif1 α -te, dominant negativ

Nachdem weiter oben angedeutet worden ist, daß Hypoxie, Radikale und Antioxidantien Bedingungen sind, bei denen HIF1 α wichtige Anpassungsvorgänge vermitteln könnte, drängen sich nun spätestens Fragen nach der Vielfalt, der Aktivität, der Spezifität, der individuellen Regulation, und der gegenseitigen Beeinflussung der einzelnen Varianten auf.

1.4. Beeinflussung der HIF1 α Transkription durch körperliche Belastung

Die Expression von Hif1 α mRNA wurde schon in vielen Studien mit verschiedenen Studienprotokollen untersucht und führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. In einer Arbeit über Ausdauertraining konnten für Hif1 α mRNA in schon bereits trainierten und untrainierten Oberschenkel-Streckmuskeln unterschiedliche Expressionen nachgewiesen werden. Im trainierten Muskel veränderte sich die Expression von Hif1 α mRNA zu keiner Zeit. Im untrainierten Muskel hingegen konnte sechs Stunden nach einmaliger, akuter, dreistündiger Ausdauerbelastung (Beinextension) ein flüchtiges, jedoch signifikantes Ansteigen von Hif1 α mRNA gezeigt werden, welches 24 Stunden nach Belastung nicht mehr nachzuweisen war. Dieser transiente Effekt wird also durch Training eliminiert (Lundby et al., 2006). In einer vorausgegangenen Studie konnte nach ähnlicher Belastung kein Ansteigen von Hif1 α -mRNA gezeigt werden (Gustafsson et al., 1999), was sich jedoch durch die

Probenentnahme (ebenfalls Muskelbiopsie) nur 30 Minuten nach Belastung, verglichen mit der oben genannten Arbeit, stimmig erklären lässt.

In einer 2001 veröffentlichten Studie wurden Sportler einem Ausdauertraining unter Hypoxie und Normoxie unterzogen. Dabei konnte man in durch Muskelbiopsie entnommenen Proben, 24 Stunden nach der letzten Belastung, nur in den Hypoxie-Ausdauerbelastungsproben, nicht aber in den Normoxie-Ausdauerbelastungsproben ein Ansteigen von Hif1 α mRNA zeigen (Vogt et al., 2001). Ebenfalls konnte in einer Studie von 2002 kein Ansteigen von Hif1 α mRNA 48 Stunden nach der letzten Belastung eines dreimonatigen intensiven Ausdauertrainings gezeigt werden (Ookawara et al., 2002). Diese Ergebnisse der beiden zuletzt genannten Studien stehen jedoch wegen dem zuvor betriebenen Ausdauertraining und der späten Probenentnahme im Einklang mit den Ergebnissen von Lundby et al. 2006.

Mit einer als erstes von Eiken und Bjurstedt beschriebenen experimentellen Übung, in der Probanden unter normaler und reduzierter O₂-Zufuhr der Beine einer Knieextensionsbelastung, angefangen bei fünf Watt bis zur Ermüdung, unterzogen wurden, wurde in einer 2005 von Ameln et al. durchgeführten Studie, trotz Probenentnahme zu den Zeitpunkten 0, 30, 120 und 360 Minuten, zu keiner Zeit und unter keinen Umständen ein Ansteigen von Hif1 α mRNA beobachtet (Ameln et al., 2005).

Im Gegensatz dazu haben Connolly und Mitarbeiter in einer Studie, in der sie Probanden 30 Minuten lang über ihrer aeroben Schwelle belasteten, erhöhte Hif1 α mRNA Expressionswerte in aus venösem Blut extrahierten PBMC-Zellen, 60 Minuten nach Belastung gemessen. Nicht jedoch unmittelbar vor Beginn oder unmittelbar nach Ende der Belastung (Connolly et al., 2004).

Es bleibt zu erwähnen, dass in keiner der oben genannten Arbeiten eine Untersuchung der Ergebnisse in Hinblick auf verschiedene Varianten von Hif1 α mRNA gemacht worden ist.

1.5. Arbeitshypothesen

Wie beschrieben liegen insbesondere bezüglich der Regulation von Hif1 α auf Proteinebene umfangreiche wissenschaftliche Arbeiten vor. Dabei kamen vor allem *in vitro* Experimente zum Einsatz, bei denen mit sehr niedrigen Sauerstoffpartialdrücken stimuliert wurde. Zum Teil besteht Unklarheit inwiefern derartige Sauerstoffpartialdrücke *in vivo* unter Belastung inklusive Hypoxie in den unterschiedlichen Geweben erreicht werden. Es gibt derzeit erst eine einzige Arbeit, welche nahe legt, dass der Regulationsmechanismus über die Stabilisierung des Proteins *in vivo* tatsächlich von Bedeutung ist (Ameln et al., 2005). Diese Arbeit steht allerdings im Widerspruch zu anderen Arbeiten, welche weniger eine posttranskriptionelle als vielmehr auch eine transkriptionelle Regulation von Hif1 α nahe legen (Lundby et al., 2006), (Connolly et al., 2004). Dabei wurden in den jeweiligen Arbeiten unterschiedliche Bereiche der Hif1 α mRNA untersucht. Keine der Arbeiten äußert sich dazu welche der bekannten HIF-mRNA Varianten untersucht wurde. In dieser Arbeit untersuchen wir erstmalig Unter Berücksichtigung von Datenbankanalysen der *Expressed Sequence Tags* (ESTs) im Bereich des Hif1 α Gens, der phylogenetischen Konservierung der jeweiligen ESTs sowie des phylogenetischen Abgleichs der Referenz mRNA Sequenzen die Existenz möglicher neuer, noch nicht charakterisierter mRNA Varianten. Die *in silico* ermittelten unterschiedlichen mRNA Varianten von Hif1 α werden nachfolgend auf Ihre Expression und insbesondere auf ihre Induzierbarkeit *in vivo* und *in vitro* überprüft.

Hierdurch erhoffen wir uns einen Beitrag zur Aufklärung der bislang bestehenden Widersprüchlichkeiten bezüglich der transkriptionellen Regulation von Hif1 α zu leisten. Dies erscheint umso wichtiger zumal für die bislang bekannten Hif1 α mRNA Varianten Hif1 α V1 und V2 zumindest eine zelltyp spezifische Expression gezeigt werden konnte.

2. Material und Methoden

2.1. Bioinformatische Methoden

2.1.1. GeneOntology (GO-Analyse)

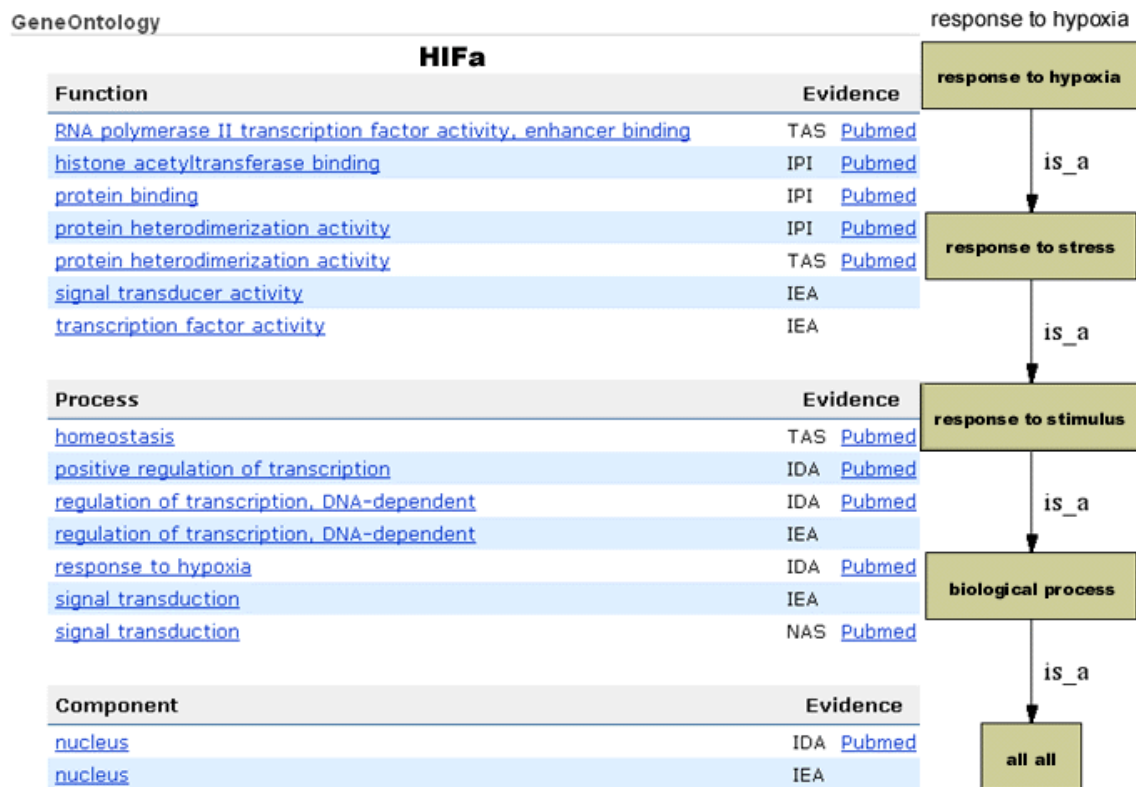
Bei dieser bioinformatischen Methode handelt es sich um ein im Internet frei zugängliches Programm, welchem wir in dieser Arbeit *in silico* Suchanfragen über Gene gestellt haben. Gen-Ontologie ist sinngemäß übersetzt „die philosophische Wissenschaft über das Dasein von Genen“. Das beinhaltet zum Beispiel die Beschreibung von Genprodukten (RNA und Proteine), die zelluläre Lokalisation und molekulare Funktion dieser Genprodukte und ganz allgemein Prozesse bei denen diese Genprodukte als involviert gelten. Das messbare und somit vergleichbare Dasein vom einzelnen Genprodukt stellt somit den Indikator für sein Gen dar.

Die web-basierte Datenbank GenOntology ist hierzu ein kontrolliertes und hierarchisch gegliedertes, formal definiertes System von Begriffen und oder Konzepten und derer Relationen. Über ein standardisiertes, biologisches Vokabular ist es GenOntology möglich dem Anwender Informationen unterschiedlichster Datenbanken über ein Gen oder einen Fachterminus darzubieten.

Die erhaltene Information einer Suchanfrage wird in GO über DAGs (*=directed acyclic graphs*) visualisiert, wobei Zusammenhänge zwischen einzelnen Graphikboxen entweder mit „*is_a*“, oder mit „*part_of*“ verknüpft werden.

In einem ersten Arbeitsschritt haben wir mit GO-Analysen überprüft, in wie fern bestimmte Genexpressionen von miteinander assoziierten Prozessen, in Einklang mit den Erwartungen der oben formulierten Arbeitshypothesen dieser Arbeit zu bringen sind.

Schaubild 8: Exemplarisches Ergebnis der GO-Analyse auf Hif1α



Auf dem Schaubild sieht man links das Ergebnis der GO-Analyse auf Hif1α in den Kategorien Funktion (*Function*), Prozessbeteiligung (*Process*) und zelluläre Lokalisation (*Component*). Die Links in diesen drei Kategorien führen jeweils zu den entsprechenden DAGs (*directed acyclic graphs*). Exemplarisch ist rechts daneben der DAG des aufgeführten Prozesses links „response to hypoxia“ aufgeführt.

Die Links in der Spalte „Evidence“ (in der Mitte des Schaubilds), führen jeweils zu den „Summary“, oder „AbstractPlus“ der aufgeführten Arbeiten. Dabei stehen die mit schwarzer Farbe gedruckten Kürzel für die Art und Reliabilität und damit indirekt auch für die Qualität des Beweises:

- TAS: Zurückverfolgbare Erklärung eines Autors (*Traceable Author Statement*)
- IDA: Folgerung über wissenschaftlichen Bericht (*Inferred from Direct Assay*)
- IEA: Folgerung über elektronische Benotung (*Inferred from Electronic Annotation*)
- NAS: Nicht zurückverfolgbare Erklärung eines Autors (*Non-Traceable Author Statement*)
- IPI: Folgerung über physikalische Interaktionen (*Inferred from Physical Interaction*)
- IEP: Folgerung über Expressionsmuster (*Inferred from Expression Pattern*)
- NR: Nicht schriftlich belegt (*Not Recorded*)

ISS: Folgerung über Basensequenz oder strukturelle Gleichartigkeit (*Inferred from Sequence or structural Similarity*)

Die im Schaubild 8 verwendeten Kürzel (*evidence codes*) sind in Pubmed hierarchisch nach ihrer Reliabilität aufgeführt:

TAS/IDA

IPI

ISS/IEP

NAS

IEA

2.1.2. Genome Browser: Multiple Sequenzabgleiche und Expressionsanalysen

Mit dieser bioinformatischen Methode werden *in silico* multiple Sequenzabgleiche (komparative Genomik) angestrengt, um dadurch zwischen den Spezies (phylogenetisch) hoch konservierte Sequenzabschnitte im Genom zu finden und diese zu charakterisieren. Häufig weisen diese phylogenetisch hoch konservierten Sequenzabschnitte, da sie eben über die Evolution hinweg erhalten blieben, auf wichtige funktionelle Aspekte hin.

Wir führten in dieser Arbeit zwei Arten multipler Sequenzabgleichen durch.

Zuerst genannt seien die klassischen *Alignments* kürzerer Sequenzabschnitte von wenigen hundert Basenpaaren. Diese führten wir durch um phylogenetische Konservierung auf Einzelbasenniveau zu bestimmen und um einzelne konservierte Funktionselemente wie zum Beispiel das Polyadenylierungssignal „HEX“ auf Konservierung und somit indirekt auf mögliche funktionelle Bedeutsamkeit zu untersuchen. Wir führten diese Abgleiche mit dem Programm GeneDoc durch (Nicholas et al., 1997).

Zum Zweiten genannt sei das orientierende Screening auf alle mRNA-Varianten und ESTs (*Expressed Sequence Tag*) innerhalb eines ausgewählten Genlokus durch gegeneinander Vergleichen. Die manchmal nur geringen Unterschiede der verschiedenen möglichen mRNAs in deren Basensequenzen vermutet man durch alternatives Splicing entstehend. Darüber hinaus sind weitere mRNA-

Varianten durch fakultative Nutzung verschiedener Promotoren in Betracht zu ziehen.

Der im www frei zugängliche *UCSC Genomebrowser* (<http://genome.ucsc.edu>) ermöglicht Sequenzanalysen ausgehend von einem eingegebenen Zielbereich innerhalb des Genoms oder einer eingegebenen Zielsequenz (Kent et al., 2002). Dabei liegt dem *UCSC Genomebrowser* eine umfangreiche Datenbank mit Genomdaten und Gensequenzen von zwanzig verschiedenen Spezies zu Grunde (Karolchik et al., 2003). Innerhalb dieses Browsers haben wir mittels BLAT gezielte Sequenzabgleiche vorgenommen (Kent, 2002), um die ermittelten mRNA-Sequenzen und ESTs einer Spezies auf andere Spezies zu vergleichen. Hierdurch erhält man Hinweise darauf, welche Sequenzbereiche des Genoms mit höchster Wahrscheinlichkeit exprimiert sind. Zudem verfügt der *UCSC Genomebrowser* über Möglichkeiten (Verfahren) zur verfeinerten Sequenzanalytik. In dieser Arbeit haben wir Verfahren zur Detektion von bei Vertebraten promotortypischen CpG-Inseln (Gardiner-Garden and Frommer, 1987), Verfahren zur Detektion von micro-RNA-Bindungsstellen (Lewis et al., 2005), Verfahren zur Untersuchung von *repeating elements* (Jurka, 2000), und Verfahren zur Detektion von Eigenkomplementaritäten von Sequenzen innerhalb eines Genlokus oder auch des Gesamtgenoms genutzt (Karolchik et al., 2003).

Bei der Fragestellung, ob bestimmte Bereiche außerhalb der Referenz-RNA-Sequenz eines Gens exprimiert sein könnten, wurden in dieser Arbeit Daten des *Affymetrix Transcriptome Project Phase II* berücksichtigt, welche eine Expressionsanalyse mit 5-Nukleotidauflösung für zehn humane Chromosomen zulassen (Cheng et al., 2005).

2.2. *in vitro* Versuche

Folgende Proben haben wir zur Untersuchung aus externen Labors erhalten. Hierbei handelte es sich stets um aufgereinigte RNA-Proben, welche von uns direkt durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurden.

Tabelle 1: Probenart und Herkunft extern erhaltener Proben

In der linken Spalte dieser Tabelle sind jeweils die Gewebe angegeben aus welchen die Proben isoliert wurden. In der rechten Spalte sind die Namen der Personen aufgelistet, die uns diese Proben zur Verfügung gestellt haben.

Probenart	Herkunft
T-Zellen	PD Dr. Cora Weigert
THP1	PD Dr. Cora Weigert
CD34+ Stammzellen	Dr. Karin Schilbach-Stückle
Burkitt Lymphom	Dr. Karin Schilbach-Stückle
Erythroleukämie	Dr. Karin Schilbach-Stückle
Gehirn	Dr. Michel Guy Andre Mittelbronn
Ependymom II°	Dr. Michel Guy Andre Mittelbronn
Pinealis Tumor	Dr. Michel Guy Andre Mittelbronn
primitiv neuroektodermaler Tumor	Dr. Michel Guy Andre Mittelbronn
Medulloblastom	Dr. Michel Guy Andre Mittelbronn
Glioblastom	Dr. Michel Guy Andre Mittelbronn
Neuroblastom	Dr. Karin Schilbach-Stückle
Herz	Dr. Hans-Peter Wendel
Muskel	Prof. Dr. Andreas Nieß
Niere	Dr. Axel Merseburger
Nierenzell-Ca	Dr. Axel Merseburger
Nephroblastom	Dr. Karin Schilbach-Stückle
Ovarial-Ca	Dr. Michel Guy Andre Mittelbronn

2.2.1. Myotubenzellkultur

Isolierte RNA aus den Myotubenzellkulturen haben wir aus dem Labor von Frau Doktor Cora Weigert erhalten.

Für den Versuch der Differenzierung von Skelettmuskelmyoblasten zu Skelettmuskelmyotuben und für den Versuch der Stimulation von Skelettmuskelmyotuben mit Kobaltchlorid (CoCl₂), verwendeten wir menschliche Satellitenzellen aus dem lateralen Anteil des „musculus quadrizeps femoris“. Der Versuch war durch die Ethikkommission genehmigt

worden, die Probanden sind aufgeklärt worden und haben dem Versuch freiwillig zugestimmt. Das Muskelgewebe wurde durch perkutane Feinnadelbiopsie entnommen. Die Spender waren über die Risiken der Biopsie aufgeklärt worden, körperlich gesund, europäischer Abstammung und von normalem Gewicht. Die benutzten Zellkulturmedien und Ergänzungslösungen stammten von der Firma Invitrogen. Die Satellitenzellen wurden zum Wachstum in der Konzentration 5×10^4 Zellen pro 60 cm^2 in Gefäßen mit einer 1:1 Lösung bestehend aus *α -minimum Eagles medium* und *Ham's F-12* angeregt (ergänzt mit 20% fetalem Rinderserum, 1% Haushuhn-Embryoextract und 0,2% Antibiotika/Antimykotika). Danach wurden die Zellen für vier Tage in ein *α -minimum Eagles medium* mit 5,5mM Glucose, 2% fetalem Rinderserum und 0,2% Antibiotika/Antimykotika gegeben. Am fünften Tag wurden die Zellen zusätzlich mit 30mM Glucose für 48h stimuliert.

2.2.2. THP1-Zellkulturversuche

Isolierte RNA aus den THP1-Zellkulturversuchen haben wir aus dem Labor von Frau Doktor Cora Weigert erhalten.

Präparation cytosolischer und nukleärer RNA aus THP1 Zellen:

Bei dem Versuch zur zellulären mRNA-Lokalisation von Hif1 α -lv, Hif1 α ohne und mit Exon 14, GAPDH und 7sk wurden THP-1 Zellen verwendet (frühes Entwicklungsstadium myelomonozytärer Differenzierung).

Für die Extraktion der gesamt RNA wurden 1×10^7 Zellen angezchtet und weiter mit 1ml TriFast™ nach Protokoll des Herstellers „peqGOLD“ bearbeitet.

Für die Extraktion der cytosolischen und nukleären RNA wurden 2×10^7 Zellen angesetzt, abtrypsinisiert, abzentrifugiert und in 0,2ml RLN Puffer (bestehend aus 50mM Trispuffer pH8.0, 140mM NaCl, 1.5mM MgCl², 0,5% (v/v) Triton x-100, und frisch dazu gegebenem 200U/ml RNAse Inhibitor) resuspendiert.

Danach wurde diese Suspension für 3 Minuten bei 5500 rpm (1000g) und 4° C zentrifugiert. → Der Überstand entsprach nun der zytoplasmatischen RNA 1.

Das Pellet wurde weiter in 0,1ml RLN Puffer + 20 μ l RLN-Detergent (bestehend aus 3,3% (wt/v) NA-Deoxycholát und 6,6% (v/v) Tween 40) gelöst und 5 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wurde diese Suspension wiederum

für 3 Minuten bei 5500 rpm und 4° C zentrifugiert. → Der Überstand entsprach nun der zytoplasmatischen RNA 2. Das verbleibende Pellet wurde daraufhin einmal mit RLN Puffer gewaschen und entsprach danach der → nukleären RNA. Die Extraktionen zytoplasmatische RNA 1, zytoplasmatische RNA 2 und nukleäre RNA wurden nun jeweils mit 1ml TriFast™ versetzt und weiter nach Protokoll des Herstellers „peqGOLD“ bearbeitet.

2.3. *in vivo* Versuche

2.3.1. Mittellangfristige, normobare Hypoxieexposition (23h Hypoxie)

Probandenauswahl: In dieser Studie verbrachten sieben nicht höhenangepasste männliche Probanden mit einem Durchschnittsalter von 22,6 Jahren (zwischen 21,4 und 23,8 Jahren) 23 Stunden in einer Hypoxiekammer (der Sauerstoffgehalt in der Kammerluft betrug 13,8%, was einem Höhengedächtnis von etwa 3300m über Meeresspiegel entspricht) unter Normaldruckbedingungen. Die Sauerstoffsättigung des Blutes der Probanden wurde die ganzen 23 Stunden über kontinuierlich mit Hilfe von Pulsoxymetern gemessen. Den Probanden wurde nach Aufklärung über die Risiken der Blutentnahme jeweils fünfmal (0h, 7h, 23h, 26h und 31h nach Versuchsbeginn) je 10ml venöses Blut abgenommen.

2.3.2. Erschöpfende Ausdauerbelastung (Nikolauslauf)

Probandenauswahl: In dieser Studie wurden zehn Minuten vor Start und direkt nach Zielankunft eines Halbmarathons, sieben trainierten Ausdauerathleten je 10ml venöses Blut entnommen. Die Sportler waren über die Risiken der Blutentnahme vorher aufgeklärt worden.

2.4. RNA-Proben Gewinnung

2.4.1. Gewinnung der PBMC-Fraktion (Lymphozyten und Monozyten) aus den entnommenen Blutproben

Für die umgehende Isolation der Lymphozyten und Monozyten (PBMC) aus dem entnommenen Blut wurde Lymphoflot (Biotest AG, Dreieich) benutzt. Zuerst wurden je 20ml Blut mit 20ml PBS-Puffer verdünnt. In doppelt so viele andere Cups wurden je 20ml Lymphoflot gegeben, wovon je zwei der Cups mit 20ml der gleichen verdünnten Blutprobe aufgefüllt wurden. Da das Lymphoflotgemisch eine höhere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten besitzt, jedoch eine niedrigere als Erythrozyten und auch Granulozyten, wurden jene Fraktionen durch eine 20minütige Zentrifugation bei 2100rpm ihrer Dichte nach aufgetrennt. In den Cups waren nach Zentrifugation nun also die Erythrozyten und Granulozyten unterhalb der Lymphoflotschicht und die Lymphozyten, Monozyten als auch die Thrombozyten oberhalb der Lymphoflotschicht lokalisiert. Die obere Schicht wurde abpipettiert und mit PBS-Puffer auf je 50ml in neuen Cups aufgefüllt. Die Entfernung der Thrombozyten erfolgte durch eine erneute Prozedur folgenden Zentrifugierens: Aus den jeweiligen 50ml wurden je 300 μ l entwendet, um mit Hilfe des Zellzählers Cell-Dyn (Abbott, Ludwigshafen) deren Zellgehalt bestimmen zu können. Daraufhin wurden die jeweiligen verbliebenen 49,7ml bei 1200rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Es entstand ein Zellpellet am Boden der zentrifugierten Cups, welches durch geschicktes Dekantieren vom jeweiligen Überstand befreit wurde. Die getrockneten Pellets wurden nun je nach vorherig gemessenem Zellgehalt in so viel PBS-Puffer gelöst, dass eine Lösung mit der Konzentration von 10⁷ Zellen pro ml Lösung entstand. Aus dieser Lösung wurde wiederum 1ml entnommen und mit 9ml PBS-Puffer aufgefüllt und für 10min bei 1200rpm zentrifugiert. Diesmal jedoch wurde der Überstand abpipettiert und in 600 μ l RLT-Puffer gelöst.

2.4.2. RNA-Extraktion

Um die zelluläre RNA aus den PBMC-Zellen herauslösen zu können, verwendeten wir den PAXgene™ Blood RNA Kit (PreAnalytix, Quiagen GmbH, Hilden) und gingen nach den Empfehlungen des Herstellers folgendermaßen vor: Die Proben wurden zuerst zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie dann 10 Minuten lang zentrifugiert wurden. Der dadurch entstandene Überstand wurde nun durch Dekantieren abgetragen, so daß nur noch das Pellet am Boden übrig blieb, welches darauf hin mit 5ml RNase freiem Wasser versetzt und mittels Vortexer (REAXtop, Heidolph) gut gemischt wurde. Nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation bei 4000facher Erdanziehung, wurde der Überstand erneut verworfen, wobei das entstandene Pellet diesmal 360µl der Pufferlösung BR1 gelöst wurde. Wir gaben dann zu diesem Probengemisch 300µl Puffer BR2 und 40µl Proteinase K dazu und inkubierten das Ganze dann 10 Minuten lang bei 55° C. Nachdem die Probe nun für weitere drei Minuten zentrifugiert wurde bildeten sich zwei Phasen heraus, von welchen wir die Untere durch Abpipettieren verwarfen. Der ehemals oberen Phase gaben wir nun 350µl Ethanol zu. Nun trugen wir 700µl (die Füllmenge der Säulen und der darunter steckenden Cups war begrenzt) dieses Probengemisches auf die so genannte PAXgene-Säule, die wir in ein leeres Cup setzten, auf, und zentrifugierten diese darauf hin bei 8000facher Erdanziehungskraft für eine Minute. Diesen Vorgang wiederholten wir mit dem Rest des Probengemisches, mit weiteren 700µl Pufferlösung Br3 und 500µl Pufferlösung BR4. Ein weiteres Mal folgte eine Zentrifugation bei 8000facher Erdanziehung für drei Minuten nach nochmaliger Zugabe von 500µl BR4 Pufferlösung. Um die Probe nun aus der Säule lösen zu können pipettierten wir 40µl BR5 Pufferlösung direkt auf die Säule und zentrifugierten diese dann wiederum eine Minute lang bei 8000facher Erdanziehung. Diesen Herauslösungsvorgang wiederholten wir ein zweites Mal, bis wir darauf hin die Probe fünf Minuten lang bei 65° C inkubieren und danach sofort auf Eis lagern konnten.

2.4.3. Isolierung der Gesamt-RNA und DNase Verdau

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den PBMC-Proben, erfolgte bei uns unter Verwendung des RNeasy-Midi-Kits (Quiagen GmbH, Hilden) mit dessen Standardprotokollempfehlungen des Herstellers. Die Proben wurden anschließend in je 88µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Darauf hin gaben wir in jedes dieser Cups 2µl DNase (RNase-free DNase-set, Quiagen GmbH, Hilden) und 10µl zehnfach DNase Puffer (1M Natriumacetat und 50mM Magnesiumsulfat mit Salzsäure auf pH5 titriert). Der enzymatische Verdau der in der Probe enthaltenen DNA, fand nun bei Raumtemperatur innerhalb einer Stunde statt. Nach dieser Stunde inaktivierten wir das DNase-Enzym in den Cups in einem Hitzeblock (Digital Dry Block Heater, PMC) durch Erwärmung der Proben auf 65° C für 10 Minuten.

2.4.4. RNA-Aufreinigung

In diesen Schritten wurde die RNA nun best möglich von Unreinheiten in den Proben befreit. Als erstes wurden die Proben mit 400µl Phenol/Chloroform (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) versetzt und bei 4° C für fünf Minuten zentrifugiert (EBA 12R, Hettich). Nach diesem Arbeitsschritt waren jeweils zwei Phasen in den Cups sichtbar geworden, wovon die Untere durch abpipettieren verworfen wurde. Die ehemals obere Phase wurde anschließend mit je 400µl Chloroform/Isoamylalkohol (Sigma-Aldrich GmbH, München) versetzt und wiederum bei 4° C für fünf Minuten zentrifugiert. Es entstanden erneut je zwei Phasen, wovon wiederum die Untere durch abpipettieren verworfen wurde. Die Proben wurden nun mit je 10µl Natriumacetat (Merck, Darmstadt) zur Ausfällung der Gesamt-RNA und 250µl 100% EtOH (Merck, Darmstadt) versetzt und für 30 Minuten bei -70° C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Proben für 15 Minuten bei 4° C und 14000rpm zentrifugiert. Die Gesamt-RNA setzte sich am Boden der Cups in einem Pellet enthalten ab. Nun wurde der Überstand dekantiert und die Probe erneut, aber diesmal zweimal mit 70% EtOH versetzt, inkubiert und zentrifugiert. Es entstand zum Schluss ein RNA-haltiges Pellet, das nach Trocknung in Raumluft in je 20µl 10mM Tris-Puffer bei pH8 gelöst wurde.

2.4.5. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Um die Konzentration und die Reinheit der einzelnen RNA-Proben zu messen, verwendeten wir ein Photometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Wir stellten nun mit Hilfe dieses Photometers jede Probe durch Zugabe von Reinstwasser (Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg) auf eine RNA-Konzentration von 50ng/µl ein, um vor der folgenden reversen Transkription eventuelle RNA-Konzentrationsunterscheide in den einzelnen Proben auszugleichen.

2.4.6. cDNA-Gewinnung durch Reverse Transkription und 3'RACE

Mittels nun folgender Beschreibung wurden je 250ng Gesamt-RNA enzymatisch in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Dazu wurde ein RT-Reagenz, bestehend aus 50U MuLV Reverse-Transkriptase-Enzym (M-MLV RT, Promega, Mannheim), 50U RNase Inhibitor, je 1mM dNTP, 5mM MgCl² und 10mM Tris-Puffer pH 8,3 verwendet. So haben wir also je 5µl aufgereinigter RNA-Probe mit 1µl Random Hexameren (ein Gemisch aus gleichen Anteilen von dATP, dGTP, dCTP und dTTP) der Konzentration 100mM versetzt, zehn Minuten lang bei 70° C inkubiert und anschließend bei 4° C gekühlt. Danach kamen in dieser kurzen 4° C-Pause zu jedem Ansatz 14µl jenes oben beschriebenen RT-Reagenzes, bevor fünf weitere PCR-Schritte getätigt wurden. Zusätzlich in jedem Umschrieb pipettierten wir eine no-RT-control, bestehend zwar aus RNA-Probe, jedoch mit dem Zusatz von Reinstwasser anstatt RT-Reagenz, als Negativkontrolle dazu, um eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA ausschließen zu können. Die fünf weiteren PCR-Schritte lauteten: 50 Minuten bei 37° C, fünf Minuten bei 90° C, 30 Sekunden bei 4° C, wieder fünf Minuten bei 90° C und zuletzt endlos 4° C.

Bei der Durchführung der 3'RACE-Umschriebe (*3'rapid amplification of cDNA-ends*), wurden anstatt den Random Hexamer Primern oder OligoT's wie oben beschrieben, Ankerprimer (siehe unten) verwendet. Der Umschrieb als Solcher blieb aber der Gleiche. Ankerprimer binden unspezifisch an den durch posttranskriptionelle Prozession erzeugten Poly-A-Schwanz einer jeden RNA, stehen jedoch mit einer spezifischen Sequenz an ihrem 5'Ende etwas über das

äußerste 3'Ende der umzuschreibenden RNA. Durch Verwendung von Ankerprimern definierten wir also für alle mit dem gleichen Ankerprimer umgeschriebenen cDNA-Stränge die gleichen 3'Enden. In den später durchgeführten PCR-Amplifikationen konnten wir nun durch Verwendung Gen-spezifischer Senseprimer und den Ankerprimern als Antisenseprimer die zugrunde liegenden mRNAs bis an ihr 3'Ende hin vervielfachen. So war es uns möglich verschieden langen Varianten einer mRNA nachzuweisen.

Nach dem Umschreiben wurden die gewonnenen cDNA-Proben bei -20 ° C gelagert.

2.5. PCR Verfahren

2.5.1. PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist ein Verfahren zur annähernd exponentiellen Amplifikation von DNA-Abschnitten. Sie wurde erstmals 1986 von K.Mullis beschrieben. Voraussetzung für eine erfolgreiche PCR ist die Kenntnis der Nukleotidsequenz an Anfang und Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, für den meist eine Länge von ungefähr 60-140 Basenpaaren angestrebt wird), um ein geeignetes Primerpaar als Startpunkte für die DNA-Polymerase bestimmen zu können.

Die Zutaten für einen Reaktionsansatz sind: Ein spezifisches Primerpaar im Überschuss (kurze DNA-Einzelstrangstücke = Oligonukleotide von ca. 24 Nukleotiden Länge) als forward (sense) und reward (antisense) Startpunkte, die wir jeweils durch Angabe ihrer Nukleotidsequenz bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bestellt haben. Desoxynukleotide für die Polymerisation in Form eines gleichen Mischungsverhältnisses von dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Eine hitzestabile DNA-Polymerase mit einem Puffer, der ihren optimalen pH-Bereich zu halten vermag. Und zu vervielfältigende DNA in Form von nativer DNA oder cDNA. Optional und vor allem zur Verbesserung der Primereffizienz haben wir mit verschiedenen Mastermixvarianten (PCR-Ansatz ohne DNA und Primer) experimentiert, in denen wir zum Beispiel zu verschiedenen Anteilen

DMSO, Glycerol, Betain, MgCl² oder Reinstwasser zum Mastermix zugegeben haben.

Der Reaktionsansatz durchläuft im PCR-Gerät meist ca. 30-40 Zyklen. Ein Zyklus besteht aus Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei ca. 94° C zu zwei Einzelsträngen mit nachfolgendem Annealing der Primer genspezifisch zwischen ca. 55- und 65° C und anschließender Extension durch die DNA-Polymerase bei ca. 72 ° C. Bei jedem Zyklus wird optimal eine Verdopplung des erwünschten DNA-Materials erreicht (=2, also bestmögliche Primereffizienz). Wir haben in unseren Versuchen mit verschiedenen PCR-Protokollen, was die Zeitdauer und die Temperatur der einzelnen Zyklen betrifft, gearbeitet und somit nichts unversucht gelassen, bestmögliche Primereffizienzen zu erlangen.

2.5.2. Quantitative-Real-Time-PCR

Durch die Methode der Echtzeit-PCR ist eine Amplifikation mit gleichzeitiger quantitativer Bestimmung der aktuellen Produktmenge möglich. Durch Beigabe von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden oder einem für DNA-Nachweis geeigneten Fluoreszenzfarbstoff in den PCR-Ansatz, kann das Quantitative-Real-Time-PCR-Gerät mittels optischer Meßmethode den relativen Anstieg der Produktmenge durch steigende Fluoreszenzwerte detektieren. Wir haben in unseren Versuchen zur Eichung des Fluoreszenzdetektors durch Ermittlung einer einheitlichen Basisfluoreszenz den Fluoreszenzfarbstoff FITC in 10nM Konzentration verwendet. Um den Zuwachs der Produktmengen zu detektieren, haben wir den DNA-Fluoreszenzmarker Sybr-Green (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet, welcher sich jeweils in die Doppelstrangformen der Produkte interkaliert.

In dieser Arbeit wurde sowohl das Verfahren der Quantitativen-Real-Time-PCR, als auch das konventionelle PCR Verfahren angewandt. „RT-PCR“ bedeutet nicht „Real Time“ PCR, sondern „Reverse Transcriptase“ PCR (da wir in dieser Arbeit zum größten Teil mRNA untersucht haben, mussten wir für die PCR RNA in cDNA *reverse* umschreiben).

2.5.3. Verwendete Primer

Die Auswahl der geeigneten Primer für unsere Versuche tätigten wir mit Hilfe der beiden Primerdesignprogramme Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) und Primer 5 (Premier, Biosoft International). Außerdem überprüften wir die Spezifität der ausgesuchten Primer mittels der Datenbank GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi) im zu untersuchenden Genom. Für unsere Versuche verwendeten wir sechs verschiedene Primerpaarkonstellationen für die unterschiedlichen Fragestellungen bezogen auf HIF1 α ; ein Primerpaar für GAPDH als Housekeeping Gen; ein Primerpaar für 7sk (ebenfalls als Housekeeping Gen), und ein Primerpaar für HSP27, welches in der Literatur als Reaktionsfreudiges Gen in Bezug auf Expressionsänderung bei körperlicher Belastung beschrieben ist („quasi Positivkontrolle“). In der folgenden Tabelle sind lediglich die Primer GAPDH, 7sk, HSP27, IL6, IL1 β und TNF α aufgelistet, da die Primer für HIF1 α bereits Ergebnisse unserer Arbeit darstellen und somit erst weiter unten in Tabelle 3 erscheinen.

Tabelle 2: Nukleinsäuresequenzen verwendeter Primer und Produktlängen
geprimter Genabschnitte

Alle Primer wurden von uns bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bestellt. In der Spalte *Forward* sind die genauen „sense“ Primerbasensequenzen der Gene GAPDH, 7sk, HSP27, IL6, IL1 β und TNF α aufgelistet. In der Spalte *Reverse* sind die genauen „antisense“ Primerbasensequenzen dieser Gene dargestellt.

Gen	Forward	Reverse
GAPDH	5'-GCC TGG AGA AAC CTG CCA AG-3'	5'-TGG TCC TCA GTG TAG CCC AAG-3'
7sk	5'-TCC CCT GCT AGA ACC TCC AA-3'	5'-CAT GCA GCG CCT CAT TTG-3'
HSP27	5'-GCA GTC CAA CGA GAT CAC CA-3'	5'-GCT TTA CTT GGC GGC AGT CT-3'
IL6	5'-CAC ACA GAC AGC CAC TCA CCT C-3'	5'-CTG CCA GTG CCT CTT TGC TG-3'

IL1 β	5'-CCC ACA GAC CTT CCA GGA GA-3'	5'-CGG AGC GTG CAG TTC AGT G-3'
TNF α	5'-CCG TCT CCT ACC AGA CCA AGG-3'	5'-CTG GAA GAC CCC TCC CAG ATA G-3'

2.5.4. Housekeeping Gen

Mit dem Primerpaar GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) amplifizierten wir einen Abschnitt eines Gens, welches sich schon in Vorversuchen, in denen es unter verschiedenen Untersuchungsbedingungen mit einem Teil der ribosomalen Untereinheit 18s und mit β -aktin verglichen wurde, als sehr konstant exprimiert erwiesen hatte und deshalb für uns in dieser Arbeit als Housekeeping Gen dient (Simon et al., 2004). Ebenfalls als Housekeeping Gen verwendet haben wir das Gen 7sk. Die 7sk-mRNA verweilt im Zellkern und wird nicht im Zytoplasma in Protein umgeschrieben, weshalb wir dieses Gen als Housekeeping Gen für unsere Kern-Zytoplasma-Versuche verwendet haben. Ein Housekeeping Gen wird deshalb benötigt, um relative Aussagen über Amplikons anderer Gene und unterschiedliche PCR-Läufe durch Expressionsvergleich im gleichen Versuch machen zu können, da sich die Expression dieses Housekeeping Gens eben im Optimalfall zu keinem Zeitpunkt, unter welchen Belastungen der Organismus sich auch befinden mag, ändert (Simon et al., 2004).

In unseren Versuchen setzten wir die Expression von GAPDH in Relation zu den Expressionen der verschiedenen mRNA-Varianten von Hif1 α .

Unter keiner Behandlung und zu keinem Einzelzeitpunkt ergab sich eine signifikante Änderung der GAPDH Expression innerhalb des jeweiligen Experiments.

2.5.5. Primereffizienz

Wie oben schon einmal erwähnt, ist 2.0 (Verdopplung) die theoretisch bestmögliche Primereffizienz, die es anzustreben gilt, die aber selten erreicht wird. In der Praxis können auch Primereffizienzen > 2,0 auftreten. Dies ist bei Messungenauigkeiten und z.B. dann der Fall, wenn bei der PCR zusätzlich zum

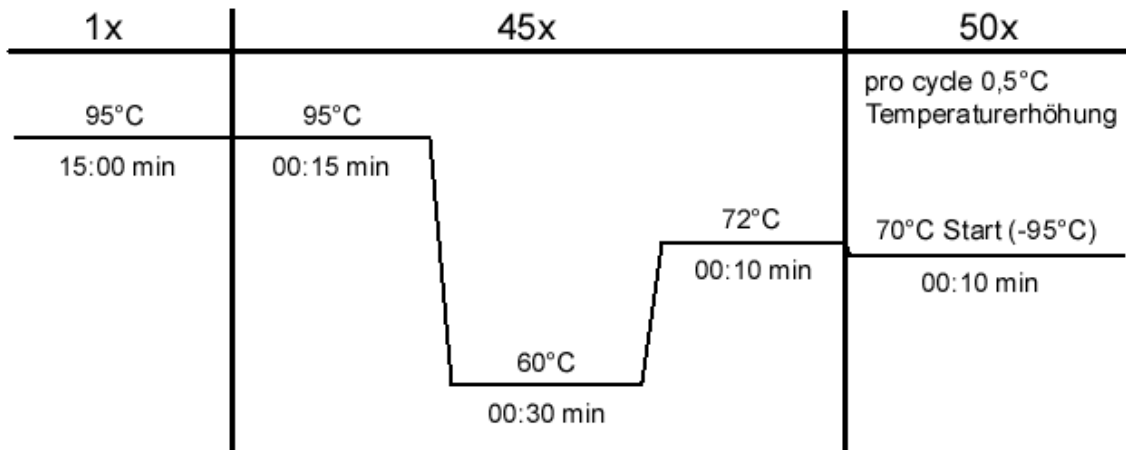
spezifischen Amplikon auch noch Nebenprodukte wie Primerdimere entstehen. Bevor wir mit der Untersuchung der eigentlichen Proben unserer Versuche angefangen haben, ermittelten wir in jeweils sechs Verdünnungsstufen die Effizienzen unserer Primer. Dabei veränderten wir Primerdesign, Mastermixzusammensetzung und PCR-Protokolle um letzten Endes durch Vergleichen dieser unterschiedlichen PCR-Läufe die Kombination mit der bestmöglichen Primereffizienz heraus zu finden. Danach errechneten wir die Effizienz (E) aus den *CT-values* der jeweiligen Verdünnungsstufen mit dem Softwareprogramm REST (R.Rasmussen 2001, M. W. Pfaffl et al. 2002). Diese Werte fanden später bei der Berechnung der PCR-Resultate mit der weiter unten gezeigten Formel 1. Berücksichtigung. In Tabelle 4 (weiter unten im Ergebnisteil) sind die Effizienzen aller in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgelistet.

2.5.6. PCR-Setup

Wir führten die quantitative real time PCR mit einem Endvolumen von 15µl (für eine Probe) pro Well in einem PCR-Gerät Namens iCycler (von Biorad, Hercules, CA, USA) durch. Pro PCR-Lauf hatten wir eine Platte mit 96 Wells (Thermo-Fast® 96, Semi-Skirted, natural, Cat# AB-0900, ABgene, Epsom, U.K.) zur Verfügung, die wir in 32 Triplets aufteilten um zum Einen die Qualität der Versuchsdurchführung kontrollieren, und zum Anderen das Mittel aus drei Ansätzen für eine Probe berechnen zu können. Die 15µl Ansatz pro Well pipettierten wir im Verhältnis DNA:Submix wie 1:2 (also 5µl:10µl) und den jeweiligen Submix im Verhältnis Primer:Mastermix wie 1:3 (also 2,5µl:7,5µl). Die Primer waren in den 2,5µl pro Well zu 50% (1,25µl) Sense- und zu 50% Antisense-Primer in der jeweiligen Endkonzentration von je 0,3µM enthalten. Die 7,5µl QuantiTect™ SYBR®-Green PCR-Mastermix-Kit (Qiagen, Hilden, Germany) pro Well, enthielten 0,015µl (10nM) FITC inclusive. Nach dem Pipettieren der Platte, wurde diese mit Folie (*Clear Seal Strong*, Cat# AB-0685 ABgene, Epsom, U.K.) mit dem Combi-Thermo-Sealer (Model-No. 0384/240, ABgene, Epsom, U.K.) luftdicht verschweißt. Die nun pipettierte und luftdicht

verschlossene Platte stellten wir in den schon vor geheizten Cyclor unter Verwendung folgenden Protokolls für alle Läufe und Primerpaare.

Schaubild 9: Verwendetes Protokoll bei der Real-Time-PCR



In der linken Spalte des Schaubilds sieht man die Aktivierungsphase des Polymeraseenzym im PCR-Ansatz bei 95°C einmal 15 Minuten lang.

In der mittleren Spalte des Schaubilds sieht man die 45 Quantifizierungszyklen einer jeden PCR jeweils bestehend aus dem Trennen der einzelnen DNA-Doppelstränge für 15 Sekunden bei 95°C, dem Binden der Primer an die DNA-Einzelstränge für 30 Sekunden bei 60°C, und dem Synthetisieren neuer DNA-Doppelstränge an den Einzelsträngen durch die Polymeraseenzyme für 10 Sekunden bei 72°C.

In der rechten Spalte des Schaubilds sieht man die Erstellung einer Schmelzkurve am Ende einer jeden PCR zur Kontrolle der quantifizierten Produkte auf Art, Negativkontrollen und Primerdimere. Die Schmelzpunkte sind abhängig von der unterschiedlichen Basenzusammensetzung der einzelnen DNA-Doppelstränge und somit annähernd genspezifisch. Die Schmelzkurve hat ihren Anfang bei 70°C und erfährt pro 10 Sekunden andauerndem Zyklus eine Temperaturerhöhung von 0,5°C. Nach 50 Zyklen ist die Schmelzkurve dann bei 95°C angelangt.

2.5.7. Schmelzkurven

Jeder DNA-Doppelstrang lässt sich auf Grund seines charakteristischen GC-Gehaltes bei einer bestimmten Temperatur trennen. Definitionsgemäß sind bei diesem spezifischen Schmelzpunkt 50% der DNA-Stränge aufgetrennt. Wir haben jeweils zum Ende jedes PCR-Laufes hin (siehe oben) eine Schmelzkurvenanalyse programmiert, um das Produkt jener vorausgegangenen Amplifikation identifizieren und eventuelle Verunreinigungen durch unspezifisch

amplifizierte Produkte ausschließen zu können. Die Bestimmung der Schmelzkurve erreichten wir durch schrittweise Temperaturerhöhung um 0,5°C alle 10 Sekunden von 70-95°C.

2.5.8. Auswertung der PCR-Ergebnisdaten

Zuerst verglichen wir die einzelnen Ergebnisdaten eines jeden Triplets, um einzelne stark abweichende Well-Daten innerhalb eines Triplets identifizieren und von der Statistik ausschließen zu können. Wir beurteilten sowohl die Daten der Amplifikation als auch diejenigen der Schmelzkurvenbestimmung. Danach bestimmten wir den Mittelwert eines jeden einzelnen Triplets (wieder unter der Kontrolle einer maximal tolerierten Abweichung). Zuletzt trugen wir die Datenmenge in das Softwareprogramm JMP IN 5.1 (SAS Institute Inc., NC, USA) ein.

2.5.9. Berechnungen

Bei ungefähr 10% der im Durchschnitt maximal erreichten Fluoreszenzintensität eines PCR-Laufes, definierten wir einen Fluoreszenzschwellenwert (*Threshold*), der meistens so um die 25 lag. Betrachtet man den Verlauf der Fluoreszenzintensität pro PCR-Zyklus eines einzelnen Wells, so wird der Zykluswert an dem die Fluoreszenzintensität jenen Fluoreszenzschwellenwert übersteigt, als „*Cycle Threshold Value*“ (CT-Wert) bezeichnet. Wir haben nun aus diesen CT-Werten den „*Mean Normalized Expression*“-Wert (MNE) berechnet, der die Expression des zu untersuchenden PCR-Produktes im Verhältnis zu der Expression des verwendeten Housekeeping-Genes angibt (Simon, 2003). Dazu haben wir folgende Formel benützt.

Formel 1:

$$\text{MNE} = \frac{(E_{\text{reference}})^{\text{CT reference mean}}}{(E_{\text{target}})^{\text{CT target mean}}}$$

Die Abkürzungen der oben gezeigten Formel 1 erklären sich wie folgt: „E_{reference}“ gibt die Effizienz des Primers des Housekeeping Gens an. Durch „E_{target}“ stellen wir die Effizienz des Primers des jeweiligen Zielamplikons dar. „CT reference mean“ und „CT target mean“ geben die CT-Werte des Zielgens und des Housekeeping Gens an.

Nachdem die errechneten MNE-Werte durch die Überprüfung mittels eines Shapiro-Wilk-W-Tests Zeichen einer nicht Normalverteilung aufwiesen, wurden die Daten vor der Auswertung logarithmiert, da die Box-Cox-Transformation die Logarithmierung als das am besten geeignete Verfahren zur Normalisierung der Daten in den Gruppen identifizierte. Darauf hin untersuchten wir die Ergebnisse der verschiedenen Gruppen auf signifikante Einflüsse mittels einer Varianzanalyse bezüglich eines Merkmals. Dazu haben wir die Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle wegen der besseren graphischen Darstellbarkeit in die nicht logarithmierte Form zurück transformiert.

Mit den im Rahmen der in vivo Studien erhobenen Laborparametern wurden entsprechend analog verfahren. Bei Mehrfachvergleichen zwischen Gruppen wurde der errechnete p-Wert nach Bonferroni entsprechend der Anzahl der Gruppenvergleiche bereinigt.

Die Daten aller Zeitpunkte der mittellangfristigen Hypoxieaufenthaltsstudie wurden mit den Werten vor Beginn dieser sowie jeweils mit den direkt benachbarten Werten verglichen. Mit den Daten der kurzfristigen Hypoxie wurde analog verfahren. Bei der Halbmarathon-Ausdauerbelastung wurden die Daten vorher mit nachher verglichen. Bei der kurzfristigen Hypoxie wurde der Einfluss mehrerer Variablen, wie Antioxidantiengabe und Placebogabe oder Hypoxie und Normoxie auf die jeweilige Zielvariable einer Genexpression untersucht. In solchen Fällen wurde mittels logistischer Regression in einer multivariaten Analyse ein *Standard Least Squares Fitting* durchgeführt. Das verwendete Statistikprogramm Jump 5.1 (SAS-Institut) berechnet in diesen Fällen die entsprechend adjustierten Varianzen und Signifikanzen. Gepaarte Vergleiche bei Verlaufsanalysen zu denselben Probanden wurden dadurch ermöglicht, dass jeweils der Faktor „Proband“ als Einflussvariable in das Modell mit einbezogen wurde.

Bei allen Zellkulturversuchen und gewebsspezifischen Expressionswerten beziehen sich die Mittelwerte und Konfidenzintervalle auf drei durchgeführte Messwiederholungen und nicht auf komplett unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

2.6. Gelelektrophorese

Wir haben um die Identität eines amplifizierten Produktes nachzuweisen dessen DNA-Fragmentlänge in einer Gelelektrophorese bestimmt. Dazu benutzten wir je nach zu erwartender Größe des Produktes oder der Produkte 1,5- bis 2%iges Agarose-Gel als Laufmatrize und Ethidiumbromid als DNA-Marker.

Für einen Lauf wurden 1,5-2g Agarose gelöst in 100ml 1xTAE-Puffer in einer Mikrowelle bis zur vollständigen Homogenisierung aufgeköcht, danach mit 5µl Ethidiumbromid versetzt und nach kurzer Abkühlung auf Handwärme, in einem immer noch homogen-flüssigen Zustand, in eine Laufform gegossen. Sofort nach Befüllung der Kammer mit dem flüssigen Gel wurden zwei Kammpfalter für je zwanzig Taschen in die Laufform eingeführt. Nachdem das Gel nun mindestens 45min lang auspolymerisiert hatte, betteten wir es mit der Laufform in eine Laufkammer ein und bedeckten es flächig mit 1xTAE-Puffer. Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 15µl DNA zu 3µl 6x-Loading-Buffer gemischt und dann in der Menge von je 15µl in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Längenbestimmung der DNA-Fragmente, ließen wir jeweils eine oder mehrere DNA-Leitern (123bp-, 250bp-, 1kbp-Ladder) bei 89mV ca. 1-1,5 Stunden mitlaufen. Wir detektierten die DNA-Banden mit einem UV-Gerät und einem PC mit der Software *Quantity-one*. Wichtige Banden wurden unter einer UV-Lampe manuell mittels eines Skalpellts ausgeschnitten und zur Sequenzierung versandt.

3. Ergebnisse

3.1. *in silico* Ergebnisse

3.1.1. Ergebnisse der GO-Analysen

Auf Grund der weiter oben in dieser Arbeit genannten Informationen bezüglich des Kapitels „Die Auswirkungen körperlicher Belastung und Hypoxie auf Blut und Immunsystem“ und den Arbeitshypothesen, untersuchten wir mittels der GO-Analyse die Gene: EGR1 *early growth response 1*, HSPB1 *heat shock 27kDa Protein 1*, IL7R *interleucin 7 receptor*, IL1B *interleucin 1 beta*, TNF *tumor necrosis factor*, HIF1A *hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit*, IL6 *interleucin 6*. Das Ergebnis war, daß wir Zusammenhänge zwischen den einzelnen Genen im Sinne gegenseitiger Beeinflussung von Funktionen, gemeinsamer Beteiligung an den Selben Prozessen und zellulärer Lokalisation, bestätigen konnten. Im Einzelnen direkt unter den Schaubildern erklärt.

Schaubilder 10: Ergebnisse der GO-Analysen oben genannter Gene (folgend von oben nach unten: HIF1 α , EGR1, HSPB1, TNF α , IL6, IL1 β , IL7R)

GeneOntology

HIFa	
Function	Evidence
RNA polymerase II transcription factor activity, enhancer binding	TAS Pubmed
histone acetyltransferase binding	IPI Pubmed
protein binding	IPI Pubmed
protein heterodimerization activity	IPI Pubmed
protein heterodimerization activity	TAS Pubmed
signal transducer activity	IEA
transcription factor activity	IEA

Process	Evidence
homeostasis	TAS Pubmed
positive regulation of transcription	IDA Pubmed
regulation of transcription, DNA-dependent	IDA Pubmed
regulation of transcription, DNA-dependent	IEA
response to hypoxia	IDA Pubmed
signal transduction	IEA
signal transduction	NAS Pubmed

Component	Evidence
nucleus	IDA Pubmed
nucleus	IEA

HIF1 α : Mit der GO-Analyse dieses Gens haben wir die folgenden Kandidaten auf Gemeinsamkeiten in den drei Kategorien Funktion (*Function*), Prozess (*Process*) und Lokalisation (*Component*) verglichen.

GeneOntology

EGR1

Function	Evidence
metal ion binding	IEA
transcription factor activity	TAS Pubmed
zinc ion binding	IEA
Process	Evidence
regulation of transcription, DNA-dependent	IEA
transcription	IEA
Component	Evidence
intracellular	IEA
nucleus	IEA

EGR1: Immediate Early Gen (EGR = *early growth response*). Zentraler Transkriptionsfaktor für die Steuerung der Zytokinexpression. EGR1 ist wie Hif1 α an der DNA-abhängigen Regulation der Transkription im Zellkern als Transkriptionsfaktor beteiligt.

GeneOntology

HSPB1

Function	Evidence
protein binding	IPI Pubmed
Process	Evidence
anti-apoptosis	TAS Pubmed
cell motility	TAS Pubmed
protein folding	IEA
regulation of translational initiation	TAS Pubmed
response to unfolded protein	TAS Pubmed
Component	Evidence
cell surface	IEP Pubmed
cytoplasm	TAS Pubmed
cytoskeleton	TAS Pubmed

HSPB1: Wichtiges, in der Literatur schon gut beschriebenes und zuverlässiges Referenzgen in Bezug auf Reaktion des Organismus auf körperliche Belastung.

GeneOntology

TNF

Function	Evidence
protein binding	IPI Pubmed
tumor necrosis factor receptor binding	TAS Pubmed
Process	Evidence
activation of NF-kappaB transcription factor	IDA Pubmed
anti-apoptosis	TAS Pubmed
apoptosis	TAS Pubmed
cell-cell signaling	NR
immune response	IEA
leukocyte adhesion	TAS Pubmed
regulation of transcription, DNA-dependent	TAS Pubmed
response to virus	TAS Pubmed
response to wounding	NR
signal transduction	TAS Pubmed
Component	Evidence
extracellular space	IEA
integral to membrane	IEA
membrane	IEA
soluble fraction	TAS Pubmed

TNF: Immunregulation. Von PBMCs bei Belastung (Inflammationsreiz) sezerniert, wirkt es auf die Gene IL1 und IL6 regulierend. Setzt in Leber CRP frei. TNF α ist wie Hif1 α vor allem an Entzündungsprozessen (Hypoxie geht mit Entzündungsreaktionen einher), aber auch an DNA abhängiger Regulation der Transkription (jedoch nicht innerhalb des Zellkerns lokalisiert), an Zellzyklus Steuerung (Hif1 α bei Zellhomeostase, TNF α bei Zellapoptose) und Signalübertragungsprozessen beteiligt.

GeneOntology

IL6

Function	Evidence
cytokine activity	IEA
interleukin-6 receptor binding	NAS Pubmed
Process	Evidence
acute-phase response	IEA
cell surface receptor linked signal transduction	TAS Pubmed
cell-cell signaling	NAS Pubmed
humoral immune response	TAS Pubmed
negative regulation of cell proliferation	TAS Pubmed
negative regulation of chemokine biosynthesis	ISS
neutrophil apoptosis	ISS
positive regulation of cell proliferation	TAS Pubmed
Component	Evidence
extracellular region	NAS Pubmed
extracellular space	TAS Pubmed

IL6: Immunregulation. Pro- und Antiinflammatorisch vor allem von PBMCs sezerniert. Bewirkt in der Leber Synthese von Akute-Phase-Proteinen. Wichtiges Zytokin bei B-Zell-Proliferation. IL6 ist wie Hif1 α vor allem an Entzündungsprozessen beteiligt, aber auch an der Steuerung des Zellzyklus (Hif1 α ist bei der Zellhomeostase beteiligt, IL6 an positiver wie negativer Zellproliferation).

GeneOntology

IL1B

Function	Evidence
interleukin-1 receptor binding	NAS Pubmed
signal transducer activity	TAS Pubmed
Process	Evidence
antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata)	NR
apoptosis	TAS Pubmed
cell proliferation	IEA
cell-cell signaling	TAS Pubmed
fever	IEA
negative regulation of cell proliferation	TAS Pubmed
regulation of progression through cell cycle	IEA
signal transduction	TAS Pubmed
Component	Evidence
extracellular region	NAS Pubmed
extracellular space	TAS Pubmed

IL1 β : Immunregulation. Proinflammatorisch in PBMCs gebildet. In seiner Wirkungsweise ähnlich dem TNF. Daher wie Hif1 α ebenfalls beteiligt an Entzündungsprozessen, Zellregulation und Signalübertragungsprozessen.

GeneOntology

IL7R

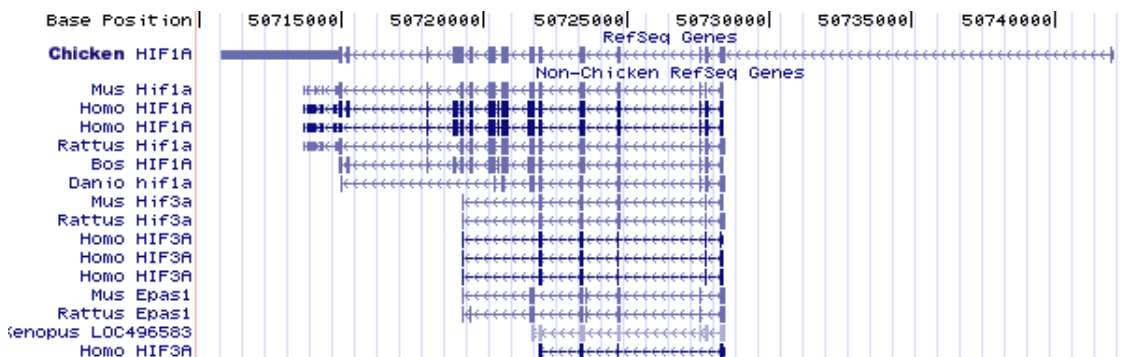
Function	Evidence
antigen binding	TAS Pubmed
hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor activity	IEA
interleukin-7 receptor activity	TAS Pubmed
protein binding	IPI Pubmed
receptor activity	IEA
Process	Evidence
antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata)	TAS Pubmed
cell surface receptor linked signal transduction	TAS Pubmed
immune response	TAS Pubmed
regulation of DNA recombination	TAS Pubmed
Component	Evidence
integral to membrane	IEA
membrane	IEA

IL7R: Immunregulation. Antikörperbindung in B-Zellen. ILR7 ist ebenfalls wie Hif1 α an Entzündungsprozessen beteiligt.

3.1.2. Phylogenetischer mRNA Referenzsequenz-Abgleich

Beim genaueren Betrachten der Länge des Hif1 α -Gens durch einen phylogenetischen mRNA Referenzsequenz-Abgleich *in silico*, wurden wir auf einen Bereich weiter *downstream* des bisher beim Menschen publizierten 3'Endes der Hif1 α mRNA Sequenz aufmerksam (das bisher angenommene 3'UTR-Ende von Hif1 α (auszugsweise dargestellt in Schaubild 3) ist im Genom auf Chromosom 14q20-24 mit der Position 3934 bezogen auf die Hif1 α Referenz mRNA Sequenz AH006957 angegeben). Wie in Schaubild 11 ersichtlich zeigt sich beim Hähnchen im Vergleich zu den anderen Spezies neben einer hohen phylogenetischen Konservierung der translatierten Exons auch ein alternatives Exon 1 sowie eine längere 3'UTR.

Schaubild 11: Das Hif1 α -Gen erstellt mit: UCSC Genome Browser on *Human* May 2004 Assembly



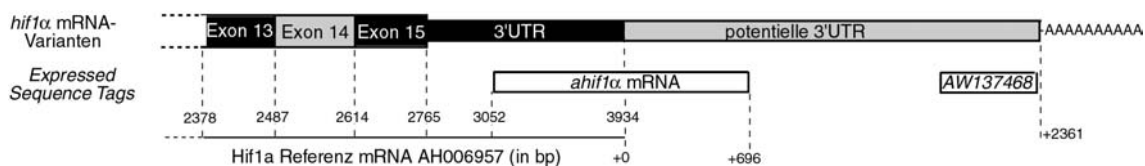
Alignment der Referenzgensequenzen sieben unterschiedlicher Spezies für den HIF1 α -Lokus. Die translatierten Exons (*coding sequence*) sind dabei jeweils fett dargestellt, die Introns, beziehungsweise die UTRs jeweils dünn. Das Schaubild muss von rechts (5') in Richtung links (3') gelesen werden, was man an den Pfeilen zwischen den Exon-Banden sieht. Das Haushuhn („*Chicken*“) besitzt neben einem längeren 3'UTR auch ein alternatives Exon 1.

Auf Grund der längeren 3'UTR von Hif1 α *Chicken*-mRNA und der sonstigen Sequenzähnlichkeit dieser mRNA zur menschlichen Hif1 α mRNA, waren für uns nähere Untersuchungen des 3'UTR-Endes von Hif1 α *human* von Interesse.

3.1.3. EST-Analyse und Phylogenetische Konservierung der EST-Bereiche

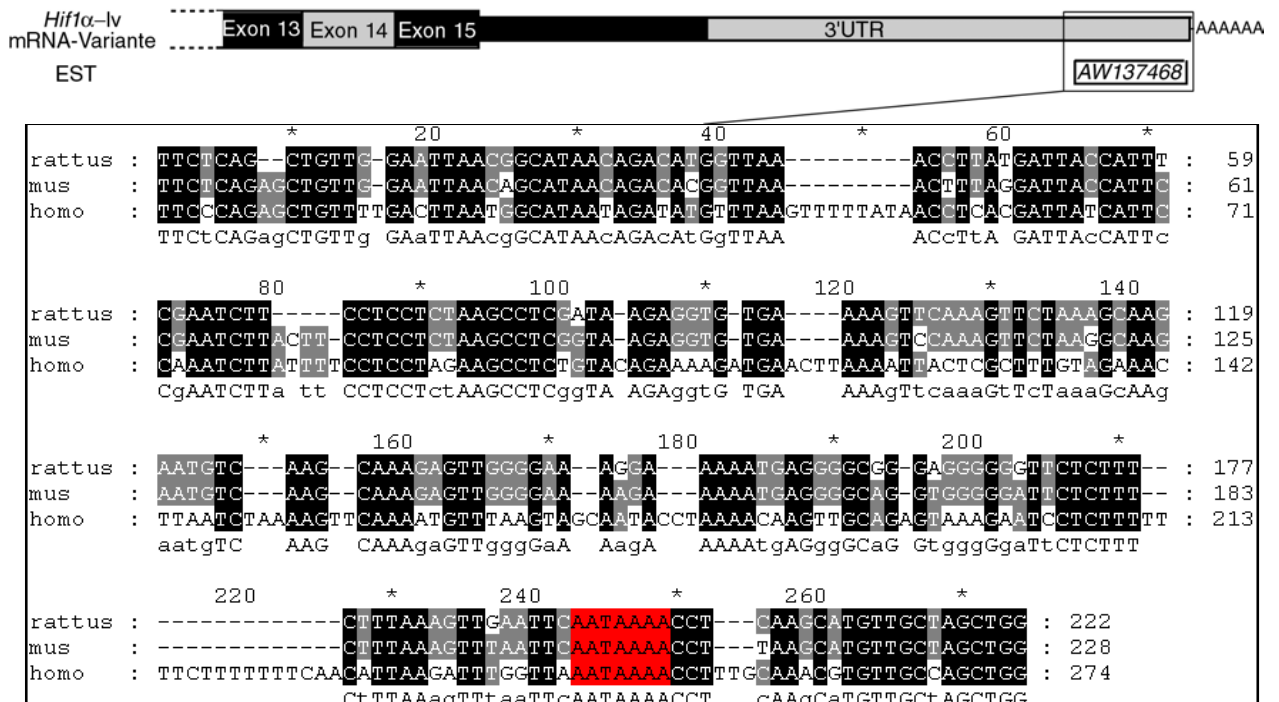
Mit Hilfe des *UCSC Genome Browser on Human May 2004 Assembly* haben wir eine „EST-Analyse“ (Analyse von humanen „expressed sequence tags“) in den genomischen Abschnitten, die das 5'- und das 3'UTR von Hif1 α mRNA flankieren, durchgeführt. Es fand sich analog zur Hif1 α mRNA vom Haushuhn mit längerem 3'UTR (s.o.) auch beim Menschen in dem entsprechenden Genlocus ein EST (Genbank *AW137468*, siehe Schaubild 13). In einer darauf folgenden Untersuchung dieses genomischen Bereichs auf phylogenetische Konservierung, zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den Basensträngen von Ratte und Maus (90 %) und von Ratte und Mensch (55 %). Zudem fanden wir in diesem EST-Bereich ein hoch konserviertes Polyadenylierungssignal (Stoppsignal).

Schaubild 12: Expressed Sequence tag



Exemplarisch zu sehen sind hier verschiedene Hif1 α mRNA-Varianten und jene sie flankierenden Primer (in Basenpaarziffern bezogen auf die Hif1 α Referenz mRNA Sequenz AH006957 angegeben) aufgezeigt. In schwarz dargestellt sind die obligaten Anteile der Hif1 α mRNA mit Exon 13, 15 und dem bisher angenommenen 3'UTR-Ende (bei Position 3934 bzw. +0). In grau dargestellt ist das fakultative Exon 14 und weiter hinten das von uns propagierte, fakultative 3'UTR-Ende mit einem Poly-A-Schwanz (Hif1 α -lv). Weiter aufgezeigt ist die in der Literatur beschriebene ahif1 α mRNA, die sich über die halbe Länge des bisher angenommenen 3'UTR und über ein Drittel der Länge des potentiellen 3'UTR von Hif1 α mRNA erstreckt. Am Ende der potentiellen 3'UTR ist ein „*expressed sequence tag*“ (AW137468) eingezeichnet, welcher einen in der Literatur bereits beschriebenen Bereich innerhalb des Genoms darstellt, den man als exprimiert gefunden und sequenziert hat.

Schaubild 13: Phylogenetische Konservierung des EST Bereichs AW137468

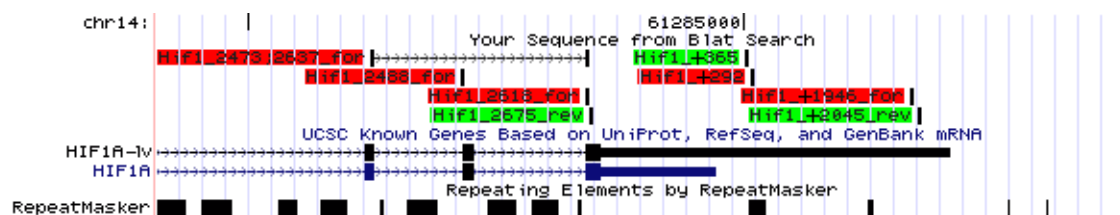


Man sieht hier den vergrößerten Ausschnitt eines Teils des Endes der potentiellen 3'UTR von Hif1α mRNA (Hif1α-lv). Gezeigt ist die hohe genetische Konservierung dieses Bereichs zwischen Mensch, Maus und Ratte in drei Basensträngen, welche sich im EST AW137468 befinden. Mit schwarzer Farbe markiert sind Übereinstimmungen auf allen drei Basensträngen, mit grauer Farbe markiert sind Übereinstimmungen auf nur zwei. Mit roter Farbe markiert ist ein konserviertes Polyadenylierungssignal mit der Referenznukleinsäuresequenz 5'-AATAAAA-3'.

Um die bisherigen Ergebnisse weiter molekulargenetisch in vitro und in vivo zu untersuchen, war es nun möglich und von Nöten geeignete Primer für unser Vorhaben auszusuchen.

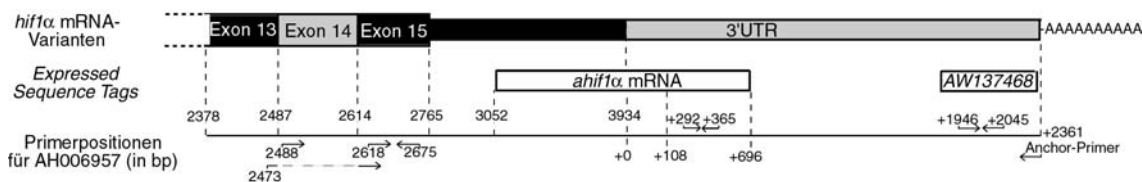
3.1.4. Wahl der Primerlokalisierungen für die Expressionsanalyse der Hif1α-Varianten

Schaubild 14 a): Primerlokalisierungen



Das Schaubild zeigt die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hif1 α mRNA Varianten Hif1 α -lv (der schwarz markierte Strang in der Mitte des Schaubilds wird in Richtung der Pfeile (5' \rightarrow 3') von links nach rechts gelesen) und Hif1 α (der blau markierte Strang darunter mit der Pfeilrichtung ebenfalls von links nach rechts). Eingezeichnet sind auf diesen beiden Strängen je drei fett dargestellte Kästchen (von links nach rechts handelt es sich hierbei um Exon 13, 14 und 15) und im direkten Anschluss daran jeweils ein schmaleres längliches Kästchen (hierbei handelt es sich um die beiden 3'UTR Enden der mRNAs, wovon das Hif1 α -lv 3'UTR Ende mehr als doppelt so lang dargestellt ist, wie jenes von Hif1 α). Links oben im Schaubild steht das Kürzel „chr14“, welches für die Lokalisation des Gens Hif1 α auf Chromosom 14 steht. Ganz oben in der Mitte des Schaubilds ist mit 61285000 das Ende von Hif1 α auf Chromosom 14 in Basenpaaren beziffert. Rot unterlegt sind alle *forward* („_for“ (*sense*)) Primer mit denen wir in dieser Arbeit Hif1 α und Hif1 α -lv untersucht haben. Grün unterlegt sind alle *reverse* („_rev“ (*antisense*)) Primer mit denen wir in dieser Arbeit Hif1 α und Hif1 α -lv untersucht haben. Die Lokalisation dieser Primer ist jeweils mit einem senkrechten schwarzen Strich direkt hinter ihrer Bezeichnung angegeben. Ganz unten im Schaubild sind in der Zeile „RepeatMasker“ schwarze Kästchen aufgezeigt. Diese bezeichnen redundante Sequenzabschnitte wie zum Beispiel die weiter unten im Ergebnisteil erläuterten, im 3'UTR vorkommenden „*inverted SINE repeats*“.

Schaubild 14 b): Primerlokalisationen



Zu sehen sind in diesem Schaubild: Die verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hif1 α -mRNA-Varianten (jeweils untersucht durch die weiter unten genannten Primerpaare, benannt in Bezug auf AH006957 (in Basenpaaren)). Schwarz gezeichnet sind die kanonischen RNA-Sequenzen, die in allen bislang bekannten sense-Varianten von HIF1 α exprimiert sind. Die grauen Sequenzbereiche sind fakultativ exprimiert, wie Exon 14 und der längere 3'UTR Bereich, der in dieser Arbeit untersucht wird.

- Mit dem Primerpaar 2618 \rightarrow 2675 haben wir alle bekannten sense mRNA-Varianten von Hif1 α geprimt.
- Mit dem Primerpaar 2488 \rightarrow 2675 haben wir alle bekannten sense mRNA-Varianten von Hif1 α geprimt, die das Exon 14 enthalten.
- Mit dem Primerpaar 2473; 2637 \rightarrow 2675 haben wir alle bekannten sense mRNA-Varianten von Hif1 α geprimt, denen das Exon 14 fehlt.
- Mit dem Primerpaar +292 \rightarrow +365 haben wir sowohl Anti-Hif1 α , als auch

Hif1 α -lv geprimt.

- Mit den Primerpaaren +1946 \rightarrow +2045 und +1946 \rightarrow Ende (Ankerprimer) haben wir Hif1 α -lv geprimt.

Tabelle 3: Nukleinsäuresequenzen verwendeter HIF1 α -Primer

Alle Primer wurden von uns bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bestellt. In dieser Tabelle sind die untersuchten Hif1 α mRNA-Varianten und die dazugehörigen Primerpaare mit Sequenzangabe dargestellt. Die Spalte Position bezieht sich jeweils auf die Position innerhalb der HIF1 α mRNA-Referenzsequenz Genbank *Accession Number* AH006957. Die mit + versehenen Zahlen kennzeichnen den *downstream* gelegenen genomischen Abstand der jeweils gekennzeichneten Primer zum 3'Ende der Referenz-mRNA. In der Spalte „Forward“ steht jeweils die genaue Basensequenz der sense Primer. In der Spalte „Reverse“ steht jeweils die genaue Basensequenz der antisense Primer.

Gen	Position	Forward	Reverse
Hif1 α	2473; 2637 \rightarrow 2675	5'-AGC AGT AGG AAT TAT TTA GCA TGT AGA C-3'	5'-ACT GGT CAG CTG TGG TAA TCC A-3'
Hif1 α	2488 \rightarrow 2675	5'-AAC ATT ATT ACA GCA GCC AGA CG-3'	5'-ACT GGT CAG CTG TGG TAA TCC A-3'
Hif1 α	2618 \rightarrow 2675	5'-GCA TGT AGA CTG CTG GGG C-3'	5'-ACT GGT CAG CTG TGG TAA TCC A-3'
Hif1 α -lv	+1946 \rightarrow +2045	5'-CAA GTG CCA TTT AGT GGG TTC TG-3'	5'-GTG CTT TCC CAT TCA CTA CCT TG-3'
Anti-Hif1 α und Hif1 α -lv	+292 \rightarrow +365	5'-TAT GAA TGG GAT GAG TGA AGC AG-3'	5'-TCT TCA GAG AAG CTC TAG CCT TTG-3'
Ankerprimer	+1946 \rightarrow Ende	5'-CAA GTG CCA TTT AGT GGG TTC TG-3'	5'-GCG AGC TCC GCG GCC GCG T(12)

Im Folgenden sind die durch Verdünnungsstufenversuche errechneten Effizienzen der verschiedenen Hif1 α Primerpaare und übriger verwendeter Primer in einer Tabelle dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht über die mit der Formel 1 errechneten Primereffizienzen

Primerpaar	Hif1 α 2473; 2637→ 2675	Hif1 α -lv +1946→ +2045	Hif1 α 2618→ 2675	EGR1-sv	EGR1-lv
Effizienz	1,84	1,9	2,07	1,98	1,97

Primerpaar	HSP27 (HSPB1)	GAPDH	7sk	TNF α
Effizienz	1,84	1,98	1,93	2,0

Primerpaar	IL1B	IL7R	IL6
Effizienz	1,87	2,0	2,02

Mit den ausgesuchten Primern, welche Ergebnis der *in silico* Analysen waren und welche jetzt durch Effizienzbestimmung bestätigt wurden, versuchten wir im Folgenden die verschiedene mRNA-Varianten von Hif1 α (vor allem Hif1 α -lv) in verschiedenen Zelllinien nachzuweisen.

3.2. *in vitro* Ergebnisse

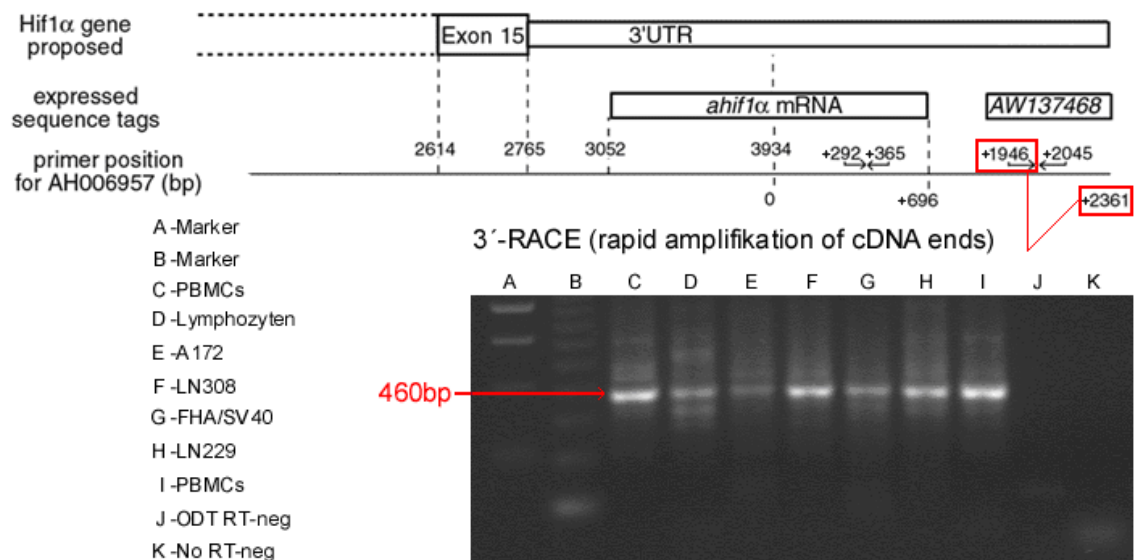
3.2.1. Expression von Hif1 α -lv in verschiedenen humanen Zelllinien

Die bei diesem Versuch verwendeten mRNA-Proben wurden mit Ankerprimer in DNA-Proben umgeschrieben, womit das durch die multiplen Polyadenylierungssignale (Stoppsignale) polymorphe 3`Ende von Hif1 α in all seinen verschiedenen Längen theoretisch erhalten blieb. Mit Hilfe des oben genannten Ankerprimers als anti-sense Primer und einem sense Primer innerhalb der AW137468 *expressed sequence tag*, konnten wir dann in einer

3'RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) polyadenyliertes Hif1 α -lv in verschiedenen humanen Zelllinien und Zellarten nachweisen.

Durch eine Sequenzanalyse jener Hif1 α -lv Produkte konnten wir dieses Ergebnis spezifisch verifizieren. Es bleibt jedoch anzumerken, daß die Analyse von Primer +1946 aus in Richtung +2361 (Ankerprimer) nicht vollständig zu bewerkstelligen war, sondern kurz vor Erreichen des Ankerprimerbereichs abbrach. Es wurden deshalb nur etwa 400 Basenpaare bestimmt. Die theoretische Polyadenylierungsstelle liegt bei ca. 450bp (siehe Länge der gezeigten Hif1 α -lv-Banden im folgenden Schaubild).

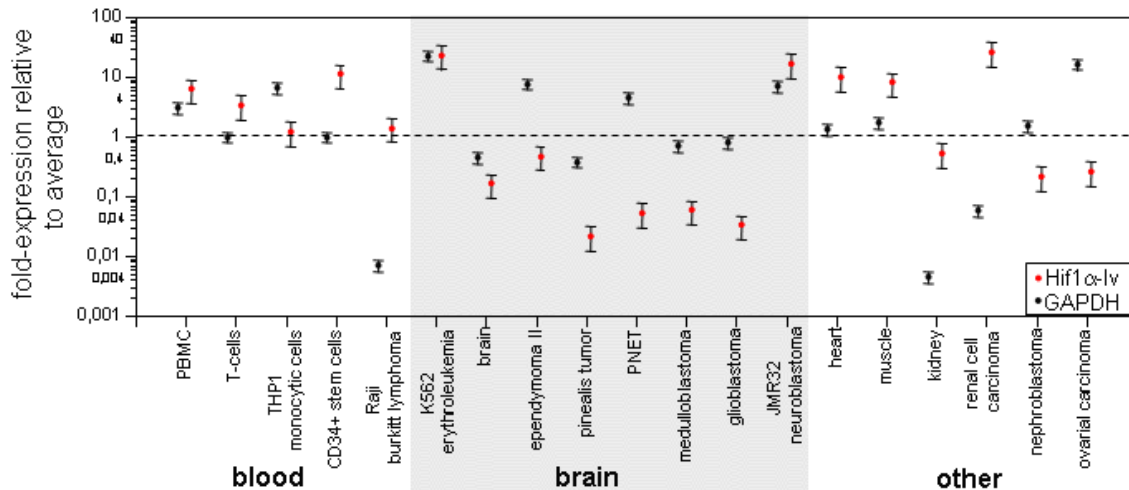
Schaubild 15: 3'RACE (*rapid amplification of cDNA ends*). Hif1 α -lv ist in PBMCs, Lymphozyten und humanen Zelllinien exprimiert



In diesem Schaubild sieht man eine Gel-Elektrophorese der 3'RACE mit zwei DNA-Leitern (Marker A = 250bp (erste Bande enthält 250 Basenpaare, zweite Bande 500, dritte 750 usw.) und Marker B = 123bp) am linken Bildrand, den PCR-Produkten aus den Proben von C bis I der Länge von ca. 460bp in der Mitte, und zwei negativ Kontrollen (J und K) am rechten Bildrand. Die 3'RACE wurde mit den Primern +1946 (5'CAA GTG CCA TTT AGT GGG TTC TG-3') \rightarrow +2361 *Anchor Primer* (5'TTG AGG ACA GAG ACA GCA GCG T₁₅-3' (=Ankerprimer)) gefertigt. Die Produkte bei E,F und H sind aus Glioblastomzelllinien. Das Produkt bei G stammt aus fetalen, humanen, immortalisierten Astrozytomzellen (FHA/SV40). Die Negativkontrolle J war ohne Primer angesetzt, die Negativkontrolle K war ohne Enzym (keine Reverse Transkriptase) im Ansatz. Oben sieht man ein Schaubild zur Lokalisation der ausgewählten Primer und des EST in Bezug zu Hif1 α -lv.

Des Weiteren haben wir Hif1 α -lv in weiteren Untersuchungen als nahezu ubiquitär exprimiert nachgewiesen. Die dabei verwendeten Proben verschiedenen menschlichen Gewebes erhielten wie aus externen Labors.

Schaubild 16: „Hif1 α exprssion tissue“



In dieser Graphik sind Expressionswerte von Hif1 α -lv (rot markiert) und GAPDH (blau markiert) relativ bezogen auf ihren errechneten Konzentrations-Durchschnittswert (gestrichelte Linie beim Expressionswert 1) eingezeichnet. Auf der y-Achse sind die Expressionswerte dargestellt. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Gewebe oder Zelllinien aus denen die Proben stammten dargestellt. Hif1 α -lv zeigt sich auf den ersten Blick in den Zellen des Blutes, der Muskeln und im Nierenzellkarzinom verstärkt exprimiert (relativ oberhalb der gestrichelten Linie), wohingegen es in den Zellen des Gehirns (außer den beiden äußeren Zelllinien), im Ovarialkarzinom und im Nephroblastom vermindert exprimiert zu sein scheint (relativ unterhalb der gestrichelten Linie).

Da wir Hif1 α -lv in verschiedenen Zelllinien exprimiert gefunden und durch Sequenzanalyse verifiziert hatten, stellte sich uns die Frage: Ist Hif1 α -lv konstant exprimiert, oder reagiert es in seiner Expression auf spezifische Reize wie zum Beispiel Zellwachstum, Differenzierung und Hypoxie überhaupt, oder gar differentiell?

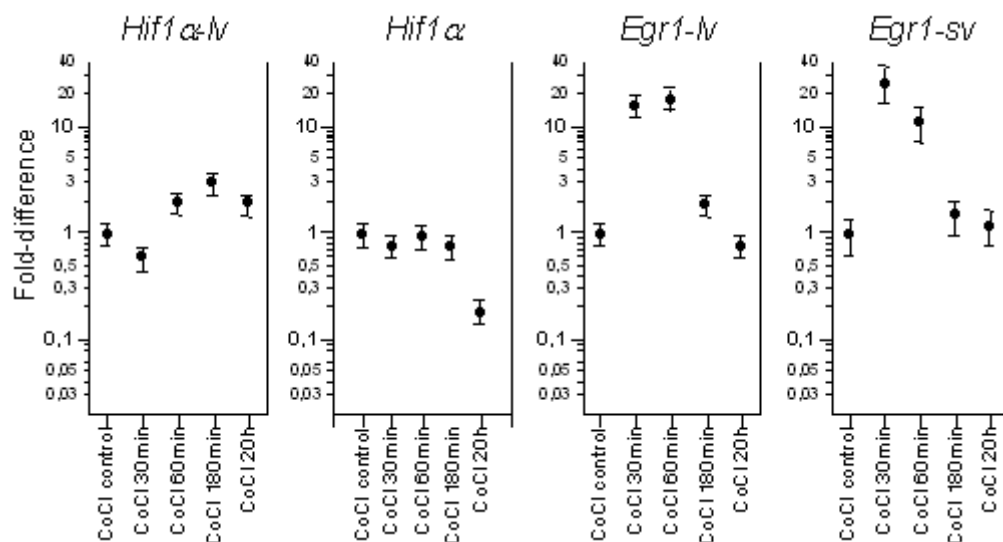
3.2.2. Untersuchungen der Expression von Hif1 α mRNA und Hif1 α -lv in Myotuben unter Kobaltchlorid (CoCl₂) und während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben *in vitro*

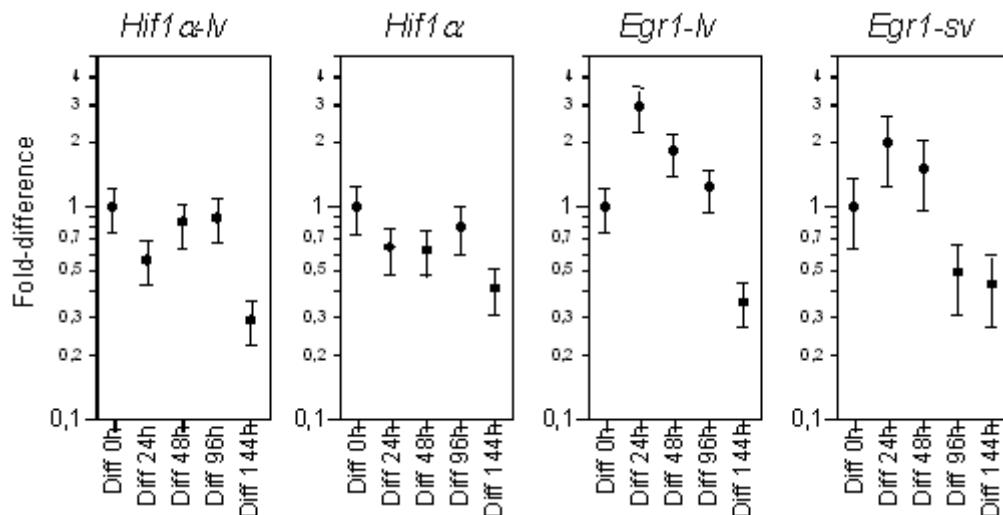
Bei den Versuchen der Behandlung von Myotuben mit Kobaltchlorid und der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben über die Zeit hinweg haben wir für Hif1 α mRNA das alle sense Varianten von Hif1 α umfassende Primerpaar 2618 → 2675 verwendet und für Hif1 α -lv das Primerpaar +1946 → +2045. Außerdem haben wir als Positivkontrolle das bekannte Immediate Early Gen Egr1 mit seinen beiden mRNA-Varianten Egr1-lv und Egr1-sv verwendet.

Bei der Untersuchung der Myotuben auf Stimulation mit Kobaltchlorid ergab die Messung der Expression für Hif1 α mRNA lediglich einen starken Abfall der Expression nach 20h auf das 0,18-fache des Ausgangswertes, wohingegen wir für Hif1 α -lv nach 180 min einen Anstieg von 3,0-fach gegenüber dem Ausgangswert gemessen haben.

Bei der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben konnten wir kaum signifikante Änderungen nachweisen, lediglich einen Expressionsabfall beider gegen Ende des Versuchs hin (nach 144h) und bei Hif1 α -lv auch beim 24h-Wert. Im Gegensatz zum Verhalten unter Hypoxie (der Kobaltchloridbehandlung), verlaufen die Kurven in der Entwicklung ähnlich.

Schaubild 17: Hif1 α und Hif1 α -lv RNA-Expressionen unter Kobaltchlorid (obere Reihe) und über die Zeit der Myotubendifferenzierung hinweg (untere Reihe)





Aufgetragen sind auf den y-Achsen die mit GAPDH als Housekeepinggen normalisierten Expressionswerte als *fold-difference* bezogen auf den jeweiligen 0h Kontrollwert. Auf den x-Achsen sind in der oberen Reihe der Kobaltchloridbehandlung fünf Zeitmesspunkte (0min, 30min, 60min, 180min und 20h nach CoCl₂ Stimulation) eingetragen. Auf den x-Achsen der unteren Schaubildreihe (Myotubendifferenzierung) sind ebenfalls fünf Zeitmesspunkte (0h, 24h, 48h, 96h und 144h) eingetragen. Die Mittelwerte und die gegen Mehrfachvergleiche adjustierten 95%-Konfidenzintervalle sind jeweils eingezeichnet. Als Primerpaare für die beiden Hif1α mRNA Referenzvarianten wurden 2618 → 2675 für Hif1α, und +1946 → +2045 für Hif1α-lv verwendet.

Kobaltchloridversuch (obere Reihe des Schaubilds 17): Wie zu erwarten war, reagieren die beiden mRNA-Varianten von EGR1 als „*immediate early gen*“ unmittelbar auf Hypoxie. Sie steigen in ihrer Expression simultan bei 30- und 60min nach Kobaltchloridbehandlung signifikant (die 95%igen Konfidenzintervalle dieser beiden Werte überlappen sich nicht mit dem 0min Kontrollwert) an, um danach wieder auf ihr Ausgangsniveau zu sinken. Die Expressionskurven der beiden Hif1α mRNA-Varianten verlaufen unterschiedlich. Während Hif1α-lv bei 60min nach Kobaltchloridbehandlung deutlich signifikant ansteigt, um bei 180min (3,0-fach gegenüber dem Ausgangswert (CI: 2,3 – 3,7; $p < 0.001$)) seinen Höhepunkt zu erreichen und bei 20h immer noch signifikant gegenüber dem 0min Kontrollwert ist, reagieren die konventionellen Hif1α mRNA-Varianten zuerst nicht signifikant. Sie fallen jedoch bei 20h nach Kobaltchloridbehandlung signifikant in ihrer Expression

gegenüber dem 0min Kontrollwert ab, entsprechend einem Abfall auf das 0,18-fache ihres Ausgangswertes (CI: 0,14 – 0,23; $p < 0,0001$).

Tabelle 5: Signifikante Konfidenzintervalle (CI) und „*Fold Differences*“ (Fold Diff) von EGR1-sv, EGR1-lv, Hif1 α und Hif1 α -lv bezogen auf ihren jeweiligen 0h Kontrollwert beim Kobaltchloridversuch

Bei dieser Tabelle sind die 0h Kontrollwerte der einzelnen Gene jeweils orange markiert. Für Hif1 α sieht man einen signifikanten Wert (bei 20h 0,18-fach erniedrigt, Konfidenzintervalle überschneiden sich mit dem Kontrollwert nicht), für Hif1 α -lv sieht man drei signifikante Werte, für EGR1-sv zwei und für EGR1-lv drei.

Gen	Zeitpunkt	Fold Diff	Oberes CI	Unteres CI
Hif1 α	0	1	1,24	0,75
Hif1 α	20h	0,18	0,23	0,14
Hif1 α -lv	0	1	1,23	0,76
Hif1 α -lv	60min	1,94	2,39	1,49
Hif1 α -lv	180min	2,96	3,65	2,27
Hif1 α -lv	20h	1,91	2,36	1,47
EGR1-sv	0	1	1,36	0,63
EGR1-sv	30min	25,9	35,3	16,5
EGR1-sv	60min	11,1	15,2	7,12
EGR1-lv	0	1	1,23	0,76
EGR1-lv	30min	16,0	19,8	12,3
EGR1-lv	60min	18,4	22,7	14,1
EGR1-lv	180min	1,89	2,33	1,45

Myotubendifferenzierung (untere Reihe des Schaubilds 17): Ähnlich wie beim Kobaltchloridversuch verlaufen die Expressionskurven beider EGR1 mRNA-Varianten über die Zeit der Myotubendifferenzierung hinweg fast gleich. Beide mRNAs sind 24h nach Start der Differenzierung maximal exprimiert und fallen daraufhin in ihrer Expression kontinuierlich bis unterhalb ihres Ausgangswertes ab. Jedoch ist bei EGR1-sv nur der 144h Wert signifikant (erniedrigt), während bei EGR1-lv die Werte 24h, 48h (beide erhöht) und 144h (erniedrigt) nach Start der Differenzierung signifikant sind. Im Gegensatz zum Kobaltchloridversuch

verhalten sich die beiden mRNAs Hif1 α und Hif1 α -lv in ihrer Expression über die Zeit der Myotubendifferenzierung hinweg nun nicht unterschiedlich sondern ähnlich. Dennoch ist ein signifikanter Expressionsanstieg wie bei EGR nicht zu sehen. Lediglich beim 144h Wert zeigen beide mRNAs (und Hif1 α -lv auch beim 24h Wert) ein signifikantes Abfallen ihrer Expression.

Tabelle 6: Signifikante Konfidenzintervalle (CI) und „*Fold Differences*“ (Fold Diff) von EGR1-sv, EGR1-lv, Hif1 α und Hif1 α -lv bezogen auf ihren jeweiligen 0h Kontrollwert bei der Myotubendifferenzierung

Analog zur Tabelle 5 findet sich hier ein signifikanter Wert für Hif1 α , zwei für Hif1 α -lv, einer für EGR1-sv und drei für EGR1-lv.

Gen	Zeitpunkt	Fold Diff	Oberes CI	Unteres CI
Hif1 α	0	1	1,24	0,75
Hif1 α	144h	0,41	0,52	0,31
Hif1 α -lv	0	1	1,23	0,76
Hif1 α -lv	24h	0,56	0,69	0,43
Hif1 α -lv	144h	0,29	0,36	0,22
EGR1-sv	0	1	1,36	0,63
EGR1-sv	144h	0,43	0,58	0,27
EGR1-lv	0	1	1,23	0,76
EGR1-lv	24h	2,92	3,59	2,24
EGR1-lv	48h	1,81	2,23	1,39
EGR1-lv	144h	0,36	0,44	0,28

Nachdem wir für Hif1 α und Hif1 α -lv differentielle Expression (und damit auch Regulation) unter Hypoxie *in vitro* nachgewiesen hatten, lag nahe dieses Ergebnis *in vivo* zu verifizieren. Wir taten dies anhand von Untersuchungen menschlichen Blutes (genauer gesagt Untersuchungen von PBMCs, da diese unter Hypoxie für allgemeine Entzündungsprozesse verantwortlich gemacht werden) bei Ausdauerbelastung und normobarer Hypoxie.

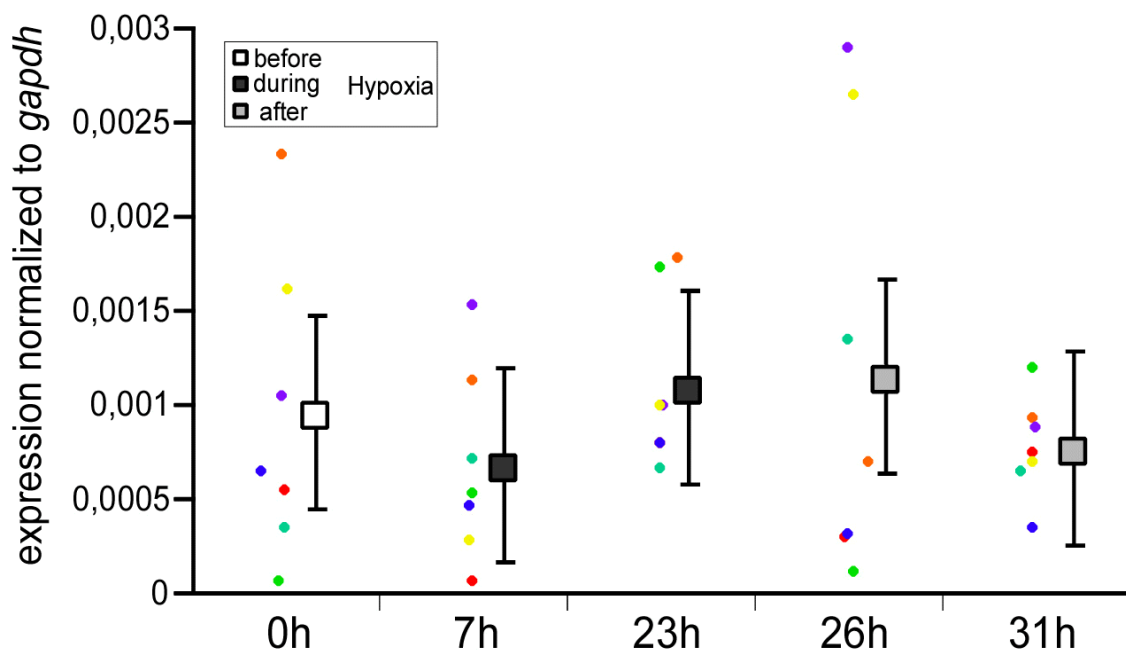
3.3. *in vivo* Ergebnisse

3.3.1. Expressionsveränderungen von Hif1 α -lv und Hif1 α unter mittellangfristiger, normobarer Hypoxieexposition (23h Hypoxie)

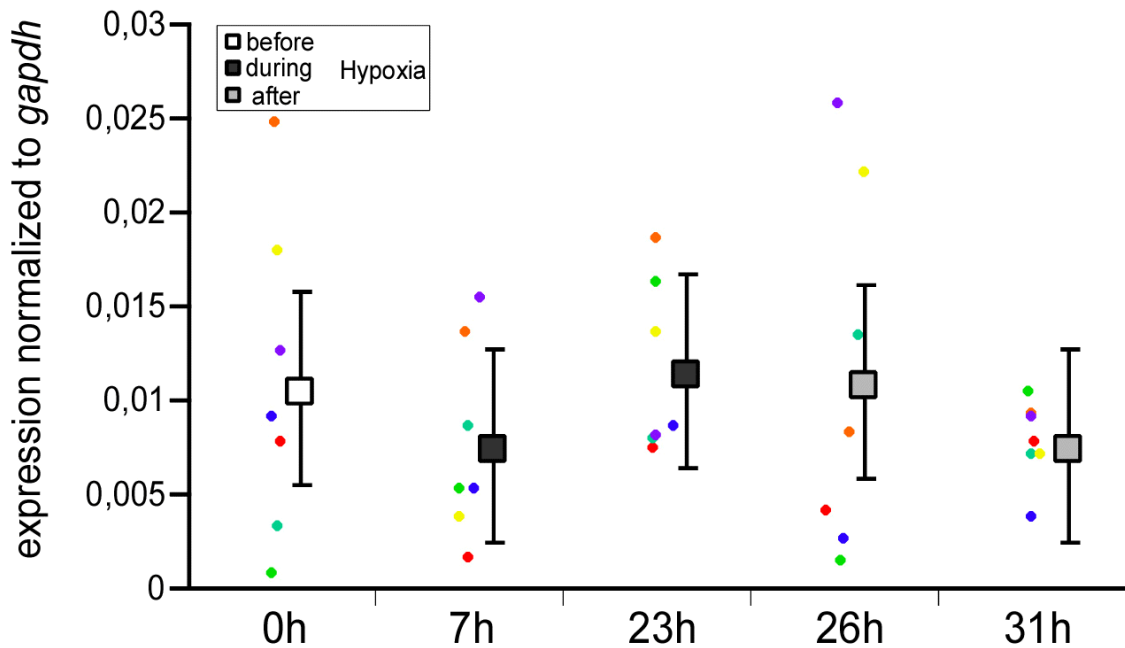
Bei diesem Versuch haben wir mit den Primern 2618 \rightarrow 2675 den Bereich geprimert, der in allen sense mRNA Varianten von Hif1 α enthalten ist. Außerdem haben wir die Proben der 23h Hypoxie auf Hif1 α -lv mit dem Primerpaar +1946 \rightarrow +2045 untersucht. Jedoch ergaben sich weder für Hif1 α -lv, noch für das konventionelle Hif1 α signifikante Veränderungen in deren Expression über die Zeit der normobaren Hypoxieexposition und bis acht Stunden danach hinweg. Korrelationsberechnungen dieser beiden RNAs zueinander zeigen ein hohes Bestimmtheitsmaß sowohl für die Zustände „vor“ als auch „während“ und „nach“ der Hypoxiebelastung.

Schaubilder 18: Expression von Hif1 α -lv und Hif1 α mRNA in den Proben der 23h Hypoxie

a) Expression von Hif1 α -lv über die Zeit der normobaren Hypoxieexposition und bis acht Stunden danach hinweg



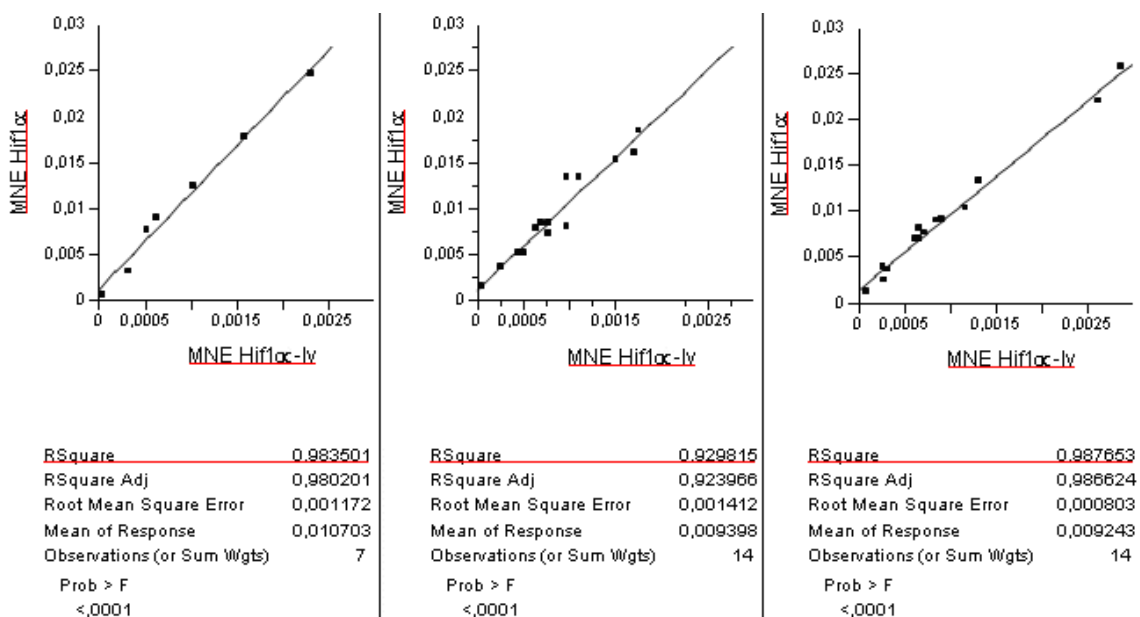
b) Expression der gesamten Hif1 α mRNA über die Zeit der normobaren Hypoxieexposition und bis acht Stunden danach hinweg



Bei beiden Schaubildern repräsentiert ein bunter Punkt einen Probanden (sieben an der Zahl). Dargestellt sind als quadratische Kästchen (weiß vor der Hypoxie, schwarz während der Hypoxie und grau nach der Hypoxie) die Mittelwerte und als Begrenzung nach oben und unten die dazugehörigen, gegen Mehrfachvergleiche adjustierten 95%-Konfidenzintervalle. Auf der y-Achse sind die Expressionswerte relativ zu denen von GAPDH angegeben. Auf der x-Achse sehen wir fünf Zeitpunkte zu denen jeder Proband jeweils eine Probe abgegeben hat. 0h wird als vor, 7h und 23h werden als während und 26h und 31h werden als nach der Hypoxieexposition mit 13,8%FiO₂ angegeben.

Man sieht bei beiden mRNA-Varianten von Hif1 α einen ähnlichen Verlauf im Schaubild. Sowohl das Verhalten der Mittelwerte und Konfidenzintervalle (nicht signifikantes: Abfallen bei 7h, Ansteigen bei 23h, Abfallen bei 26h und 31h) als auch die Verteilung der einzelnen Werte zu den einzelnen Zeitmesspunkten (interindividuelle Streuung der einzelnen Werte bei 0h und 26h, dichtes Zusammenliegen der Werte bei 31h) sind auffallend. Deshalb wurden im Folgenden drei Korrelationen der beiden mRNAs aus den Werten der 23h Hypoxie von „vor“, „während“ und „nach“ Exposition erstellt.

Schaubild 19: Korrelation von Hif1 α mRNA mit Hif1 α -lv vor, während und nach Hypoxiebelastung



Die linke Graphik in diesem Schaubild zeigt die Korrelation von Hif1 α mRNA (rot unterstrichen, y-Achse) mit Hif1 α -lv (rot unterstrichen, x-Achse) von vor der Hypoxiebelastung (0h-Werte). Die sieben Probanden sind als schwarze Kästchen eingezeichnet. Die berechnete Regressionsgerade zeigt ein Bestimmtheitsmaß (rot unterstrichen „*RSquare*“) von 0,98 auf.

Die mittlere Graphik beschreibt analog dazu die Korrelation während der Hypoxie (7h, 23h Werte). Da nun zwei Zeitmesspunkte in die Korrelation mit einfließen, sind in dieser Graphik (und der rechten) 14 schwarze Kästchen eingezeichnet. Das Bestimmtheitsmaß ist hierbei mit 0,93 angegeben.

Die rechte Graphik beschreibt die Korrelation nach der Hypoxie (26h, 31h Werte). Das Bestimmtheitsmaß liegt dort bei 0,99.

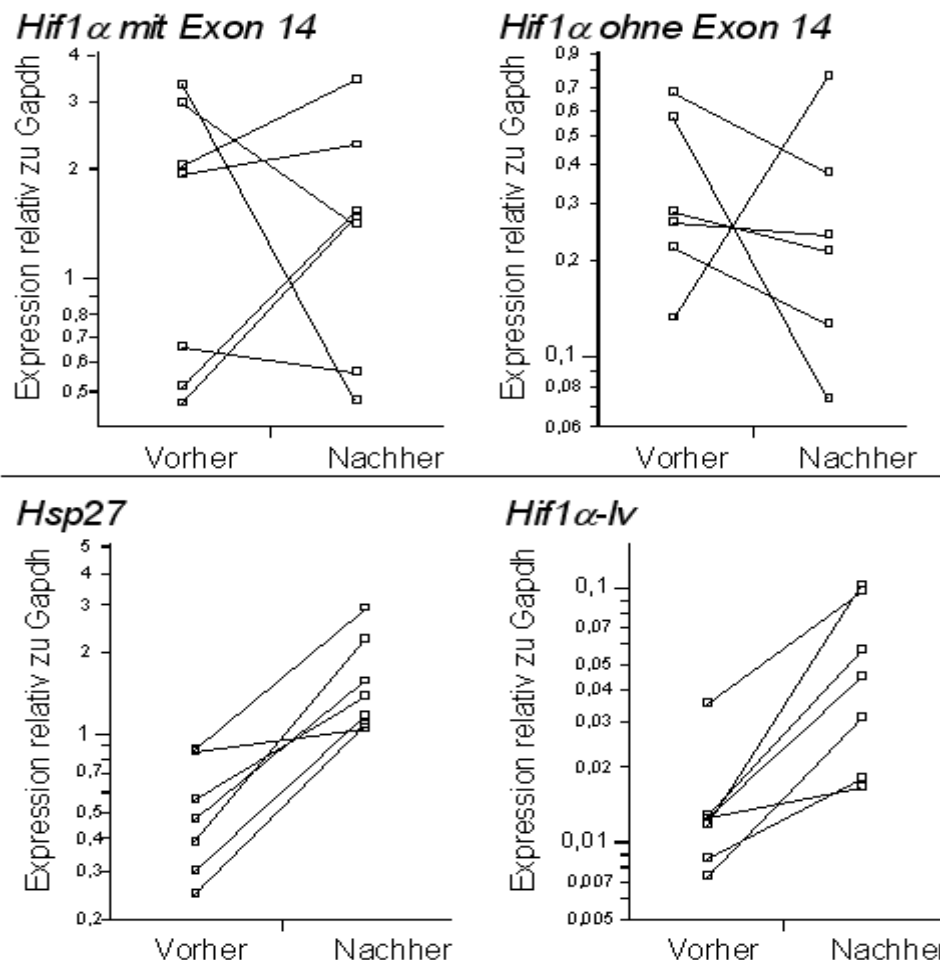
Es bleibt für die 23h Hypoxie insgesamt gesehen zu bemerken, daß hier bei der mittellangfristigen, normobaren Hypoxieexposition (23h Hypoxie) weder für Hif1 α , noch für Hif1 α -lv signifikante Unterschiede in deren Expression über die Zeit hinweg gezeigt werden konnten.

3.3.2. Expression von Hif1 α -lv und Hif1 α vor und nach Halbmarathon (Nikolauslauf)

Die Auswertung der quantitativen real-time-PCR ergab für Hif1 α -lv im Mittel einen signifikanten 3,3-fachen Anstieg nach Halbmarathonwettkampf (CI: 1,90 - 5,85, $p = 0,002$). Ebenfalls ein signifikantes Ansteigen nach dieser

Ausdauerbelastung fanden wir für HSP27 mRNA, welches wir auf Grund seiner sehr gut charakterisierten Induzierbarkeit durch körperliche Belastung untersucht haben (CI: 2,00 - 4,97, $p = 0,001$, Mittelwertsquotient = 3,16), für das konventionelle „*immediate early gen*“ EGR1-sv mRNA (CI: 1,06 – 2,90, $p = 0,022$, Mittelwertsquotient = 1,75) und für IL7R mRNA (CI: 1,14 – 2,67, $p = 0,019$, Mittelwertsquotient = 1,74). Keine signifikante Änderung der Expression von vor Ausdauerbelastung zu nach Ausdauerbelastung war bei den konventionellen mRNA-Varianten Hif1 α mit Exon 14 und ohne Exon 14, bei dem Interleukin IL6 und bei TNF α zu finden. Ebenfalls als nicht signifikant in seinem mRNA Expressionsverlauf bei Halbmarathonbelastung ist das Interleukin IL1B zu nennen, welches jedoch im Folgenden nicht graphisch aufgezeigt ist.

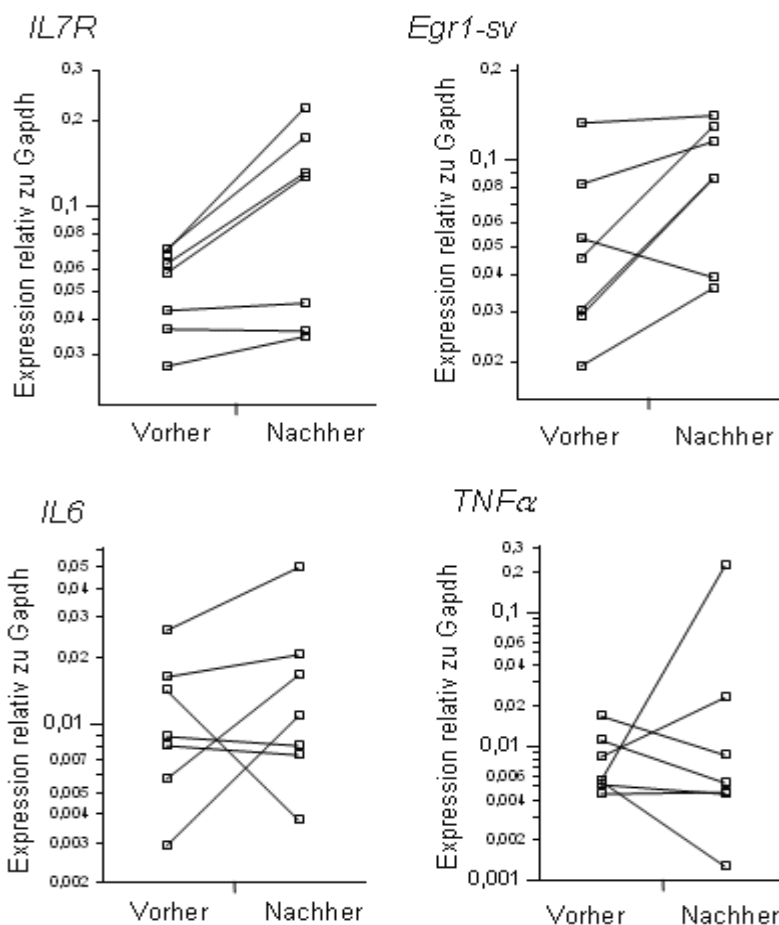
Schaubild 20: Hif1 α und Hif1 α -lv RNA-Expressionsverläufe unter erschöpfender Ausdauerbelastung durch einen Halbmarathon



Auf diesen vier Schaubildern sind Expressionswerte von je sieben Probanden von Vorher zu Nachher aufgezeigt. Ein Proband ist als zwei quadratische Kästchen dargestellt (vorher, nachher), welche durch eine Gerade verbunden sind. Die Steigung einer jeden Geraden zeigt uns ob die Ausdauerbelastung auf den jeweiligen Probanden einen steigernden oder einen vermindernden Effekt auf dessen spezifische Genexpression zur Folge hatte. Wichtig ist aber jeweils die Beurteilung aller sieben Expressionsverläufe zusammen, da nur so eine Aussage über die Signifikanz einer vermuteten Regelmäßigkeit des Expressionsverlaufs eines spezifischen Gens bei dieser Ausdauerbelastung getroffen werden kann. Die Expressionswerte auf der y-Achse ablesbar, sind zum *Housekeepinggen* GAPDH normalisiert. Im Gegensatz zu den Schaubildern der konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten (die oberen Schaubilder mit Exon 14 und ohne Exon 14), sieht man hier bei Hif1 α -lv (rechts unten) ein deutlich signifikantes Ansteigen der mRNA Expression von vorher zu nachher (CI: 1,90-5,85), $p = 0,002$, Mittelwertsquotient = 3,33).

Weiter sind im Schaubild links unten signifikant steigende Expressionswerte des Gens Hsp27 aufgezeigt (CI: 2,00-4,97, $p = 0,001$, Mittelwertsquotient = 3,16).

Schaubild 21: RNA-Expressionsverläufe der Gene IL7R, EGR1-sv, IL6 und TNF α unter erschöpfender Ausdauerbelastung durch einen Halbmarathon



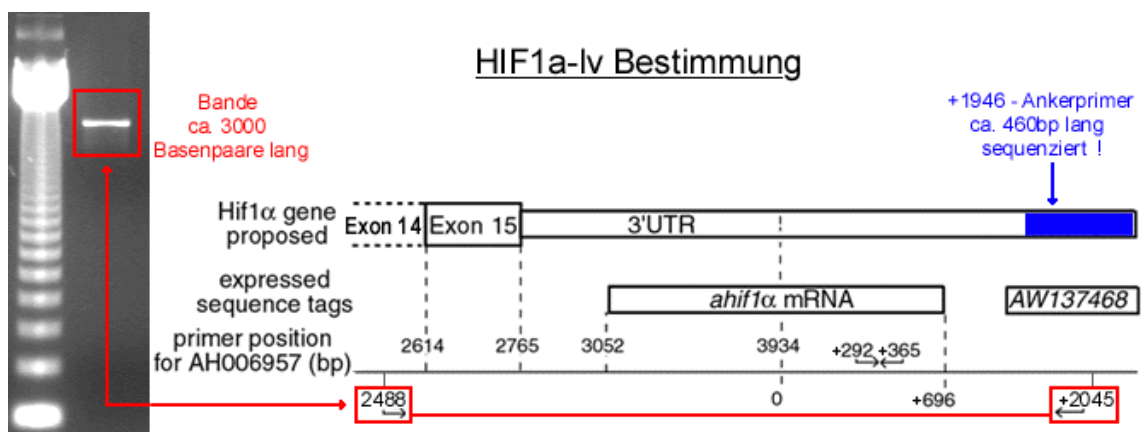
Analog zu Schaubild Nummer 20 sind die beiden Gene der oberen Reihe (IL7R und EGR1-sv) als signifikant zu beschreiben. Die beiden Gene der unteren Reihe (IL6 und TNF α) sind jeweils nicht signifikant in ihrer mRNA Expression gestiegen oder gefallen. Die Signifikanz in diesen (insgesamt acht) Schaubildern lässt sich grob an der synchronen Steigung der Geraden beurteilen. Die definitive Signifikanz jedoch wurde von uns *in silico* berechnet. Für IL7R zeigte sich ein signifikantes Ansteigen seiner mRNA Expression von vor zu nach Halbmarathonbelastung (CI: 1,14 – 2,67, p = 0,019, Mittelwertsquotient = 1,74). Ebenfalls für EGR1-sv mRNA (CI: 1,06 – 2,90, p = 0,022, Mittelwertsquotient = 1,75).

Wir haben gezeigt, daß Hif1 α mRNA und Hif1 α -lv auf den gleichen spezifischen Reiz hin *in vivo* unterschiedliches expressionelles Verhalten zeigen. Deshalb wurde Hif1 α -lv im Folgenden noch einmal genauer untersucht.

3.4. Hif1 α -lv Bestimmung, Sequenzanalyse und Strukturberechnung

Durch eine PCR mit dem Primerpaar 2488 \rightarrow +2045 haben wir ein Hif1 α -lv Produkt erhalten, welches ca. 3000 Basenpaare lang ist. Damit stellt es ein Verbindungsstück zwischen dem konventionellen Hif1 α (Primer 2488 liegt im Exon 14 von Hif1 α) und dem durch Sequenzierung verifizierten Hif1 α -lv Sequenzbereich innerhalb des EST „AW137468“ dar. Es scheint auf Grund seiner Länge verglichen mit der Lokalisation der verwendeten Primer gesplignet zu sein. Die DNA-Proben für diese PCR, waren OdT-Umschriebe aus PBMC-Zellen. Aus Gründen, auf welche später in der Diskussion noch einmal ausführlich eingegangen wird, war es uns bis jetzt noch nicht möglich dieses ca. 3000 Basenpaare umfassende Hif1 α -lv Produkt vollständig zu sequenzieren.

Schaubild 22: Hif1 α -lv PCR-Produkt zwischen Exon 14 und EST „AW137468“

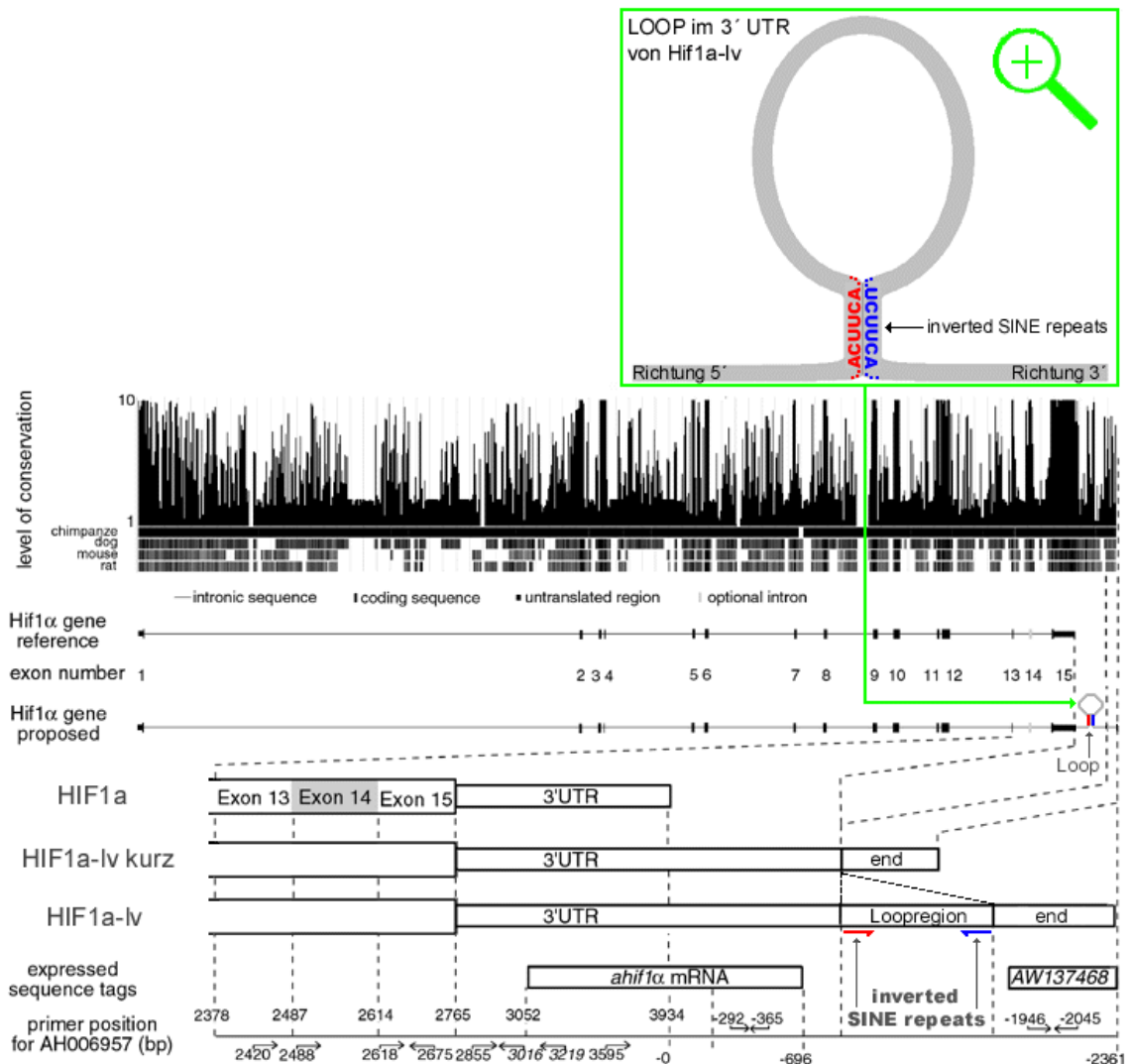


Zur groben Orientierung sind mittig im Schaubild das von uns vorgeschlagene 3'UTR von Hif1 α inclusive dem Exon 14 und 15, die beiden Sequenzbereiche Anti-Hif1 α und „AW137468“, und ein Basenpaarlängenstrahl bezogen auf die Hif1 α mRNA Referenz Sequenz schematisch eingezeichnet. Am linken Schaubildrand sieht man das Bild einer Gelelektrophorese. Links darauf ist eine 123bp Leiter zu erkennen, rechts oben darauf in einem roten Kästchen hervorgehoben, das PCR-Produkt der Länge von ca. 3000 Basenpaaren. Die Primer 2488 und +2045, welche dieses Produkt einrahmen, sind in der Mitte unten (ebenfalls in roten Kästchen hervorgehoben) dargestellt. Sie ziehen von Exon 14 bis in das eingezeichnete EST „AW137468“. Rechts oben kann man blau markiert einen Hif1 α -lv Bereich erkennen, welcher durch die Primer +1946 und Ankerprimer eingerahmt ist. Dieser wurde von uns bereits durch Sequenzierung bestätigt und in 3.2.1. beschrieben.

Weiter zeigte sich bei einer Sequenzanalyse, dass Hif1 α -lv im Gegensatz zu den klassischen Hif1 α mRNA-Varianten zwei *repeating elements* vom SINE-Typ (*Short Interspaced Nuclear Elements*: SINEs sind typischerweise sich häufig wiederholende und im Genom relativ frei verteilte DNA-Sequenzabschnitte mit einer Basenlänge zwischen meistens 100-400bp. In unserem Fall handelt es sich um „*inverted*“ *SINE repeats*. Das sind SINEs, die sich wiederholen aber die zueinander invertiert sind. Würde man den RNA-Strang zwischen diesen SINEs falten, so daß diese aufeinander lägen, wären sie zu einander komplementär) besitzt, welche über eine Länge von fast 150bp komplementär zueinander sind. Diese beiden Sequenzabschnitte liegen innerhalb des 3'UTRs nicht direkt nebeneinander sondern auseinander. In der Folge könnten sie bei Aneinanderlagerung einen *Loop* generieren (dabei würden sie selbst den Stiel des *Loops* bilden). Durch jene Sequenzanalyse und Sequenzabgleiche bleibt außerdem festzuhalten, daß es von Hif1 α -lv mindestens zwei verschiedenen Länge Varianten geben könnte. Nämlich Hif1 α -lv und ihr prozessiertes Produkt ohne den *Loop* innerhalb des 3'UTR (Hif1 α -lv kurz).

Des Weiteren haben wir *in silico* die energetisch günstigste dreidimensionale Struktur von Hif1 α mRNA, Hif1 α -lv und dessen prozessierter Form Hif1 α -lv kurz berechnet.

Schaubild 23: Schematischer Sequenzabgleich von Hif1 α -lv mit und ohne Loop



Dargestellt sind:

Der phylogenetische Sequenzabgleich von Hif1 α zwischen Schimpanse, Hund, Maus und Ratte (oben sieht man eine Reihe schwarzer Peaks, welche lokusbezogen den Grad der Konservierung durch ihre Höhe und Dichte angeben).

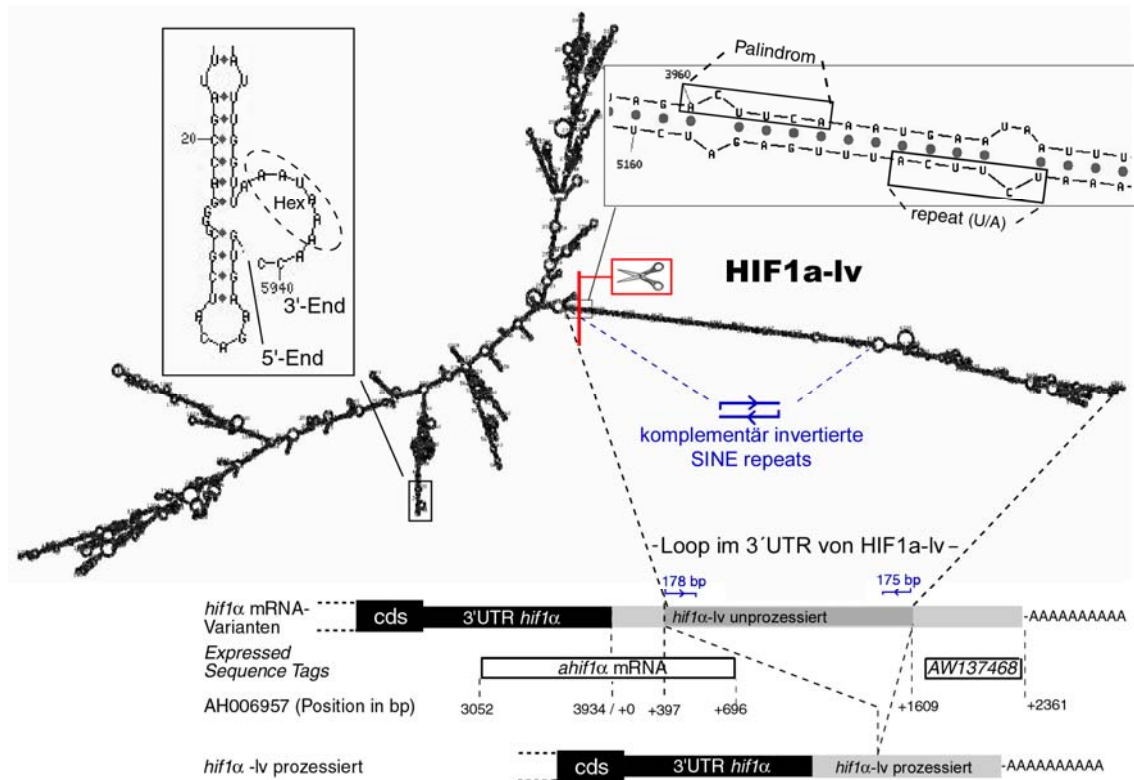
Darunter schematisch dargestellt die publizierte („*Hif1 α gene reference*“) und die von uns vorgeschlagene („*Hif1 α Gene proposed*“) Genlänge von Hif1 α inclusive des eventuellen Loops im 3'UTR (am rechten Schaubildrand mittig eingezeichnet und im Loopstiel markiert. Vergrößert rechts oben schematisch dargestellt mit Auszügen aus den Loopstielbildenden „*inverted SINE repeats*“: „...A(U)CUUCA...“). Die Exons sind von 1 bis 15 nummeriert.

Außerdem sind schematisch die mRNA-Enden von Hif1 α , Hif1 α -lv kurz und Hif1 α -lv dargestellt. Man sieht dort bei Hif1 α -lv kurz, daß die Loopregion fehlt. Unterhalb der Loopregion bei Hif1 α -lv sind wiederum die beiden „*inverted SINE repeats*“ schematisch eingezeichnet.

Weiter ist die Länge von Hif1 α mRNA in Basenpaaren und die Lokalisationen von ahif1 α mRNA und des EST AW137468 angegeben. Ebenfalls dargestellt sind in Ziffern kodiert

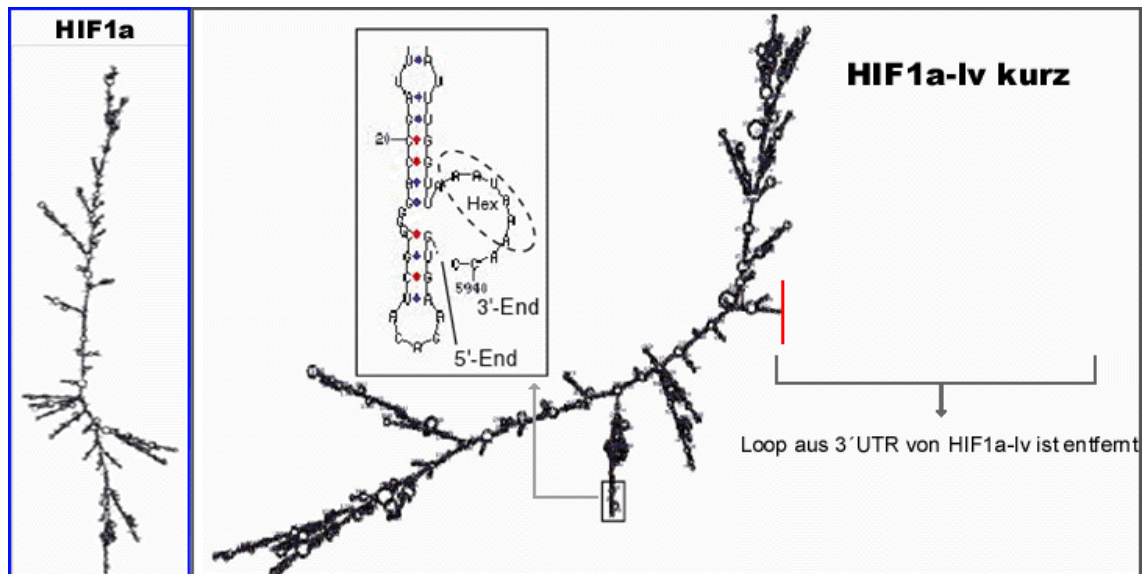
(Basenpaarlänge bezogen auf AH006957) die einzelnen Primer (Primerichtung mit Pfeilen darüber angezeigt)

Schaubild 24: Dreidimensionale Struktur von Hif1 α -lv



Auf diesem Schaubild ist die berechnete dreidimensionale Struktur von HIF1 α -lv dargestellt. Bei den beiden vergrößerten Bereichen handelt es sich zum einen um das 5' Ende und das 3' Ende der mRNA (links oben im Schaubild), zum anderen um einen proximalen Bereich des von uns postulierten Loopstiels (Loopstiel = Sequenzbereich doppelsträngiger RNA, der durch „komplementär invertierte SINE repeats“ gebildet wird. Dieser Bereich ist bei HIF1 α -lv ca. 150bp lang, zu 88% homolog und im Schaubild in blauer Farbe erklärt) im 3'UTR von HIF1 α -lv (rechts oben im Schaubild). In diesem zweiten vergrößerten Bereich befinden sich schräg gegenüber ein Palindrom „ACUUCA“ und eine Wiederholung dieses Palindroms (Repeat) „UCUUCA“ (jedoch mit der ersten Base Uracil anstatt Adenosin). Diese Basensequenzabfolgen weisen im Allgemeinen auf eine mögliche Endonukleaseschnittstelle hin, welche im Schaubild durch einen senkrechten roten Strich markiert und durch das Symbol einer Schere verdeutlicht ist. Weiter ist unten in diesem Schaubild die mögliche Prozession von HIF1 α -lv zu „HIF1 α -lv prozessiert“ (auch „HIF1 α -lv kurz“ genannt) dargestellt. Dabei ist im Schaubild veranschaulicht wie hierbei die gesamte Loopregion aus dem 3'UTR von HIF1 α -lv entfernt werden könnte.

Schaubild 25: Dreidimensionale Struktur von Hif1 α und Hif1 α -lv kurz



Auf der linken Seite des Schaubilds sieht man die berechnete dreidimensionale Struktur von HIF1 α , auf der rechten Seite jene von HIF1 α -lv kurz (=prozessiert).

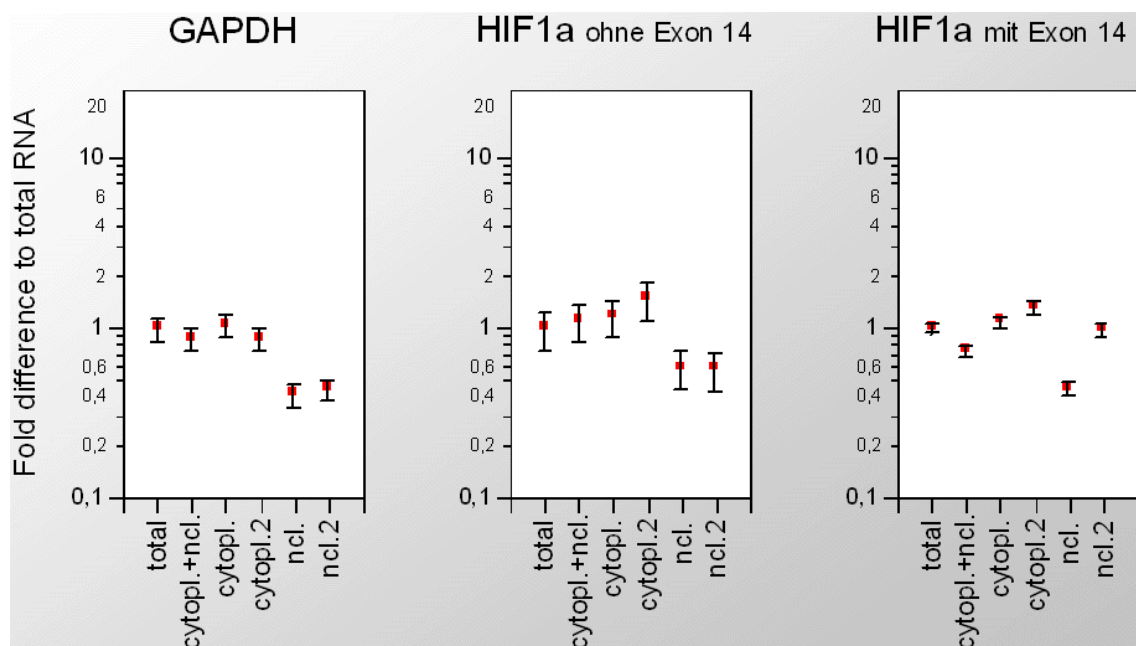
Auf Grund der differentiellen Expression (bei Ausdauerbelastung) und der strukturellen Unterschiede von HIF1 α -lv gegenüber dem konventionellen HIF1 α , waren für uns weiter Untersuchungen der Lokalisation dieser beiden mRNAs innerhalb der Zelle von Interesse.

3.5. Zelluläre Lokalisation von HIF1 α mRNA und HIF1 α -lv

RNAs wie zum Beispiel Xist, hsr- ω -n, CTN-RNA oder 7sk-RNA sind laut Literatur im Zellkern lokalisiert. Nach Vollendung ihrer Prozession werden sie auf irgendeine Art und Weise am Übertritt ins Zytoplasma gehindert und sind nun hauptsächlich im Zellkern zu finden. Obwohl man die Mechanismen der Retention noch nicht ganz erforscht hat, gibt es für einige Hypothesen wie zum Beispiel der Methode des *A-to-I editing* schon gewisse wissenschaftliche Anhaltspunkte (Szymanski and Barciszewski, 2003), (Prasanth et al., 2005). Indem wir Zytoplasma und Zellkern getrennt auf Vorhandensein von Art und Menge von mRNA untersucht haben, kamen wir zu folgendem Ergebnis: Verschiedene mRNAs und auch verschiedene Varianten davon sind in Zellkern und Zytoplasma in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vorhanden. Während Hif1 α -lv (bestimmt mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren) vor allem

im Nukleus zu finden war, fanden wir die konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten (mit und ohne Exon 14 bestimmt) hauptsächlich im Zytoplasma, was mit der Ähnlichkeit der Strukturen der Hif1 α Varianten mit der von mCAT2 und seiner Variante CTN-RNA laut oben genannter Arbeit zu erwarten war. Das untersuchte *Housekeeping* Gen GAPDH, war in unserer Analyse vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Das Gen 7sk dagegen, welches mit seiner 7sk-mRNA in der Literatur als kernständig beschrieben ist, wurde von uns hier als *Housekeeping* Gen des Zellkerns bestätigt und verwendet. Auf der x-Achse der im Folgenden gezeigten Schaubilder sieht man den jeweiligen Extraktionsort der untersuchten mRNAs, wobei es insgesamt je zwei Isolationen für jede Lokalität gegeben hat.

Schaubild 26: Zelluläre Lokalisation der konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten mit und ohne Exon 14 und des zytoplasmatischen *Housekeepinggens* GAPDH



Aufgetragen sind auf den y-Achsen die mit GAPDH als *Housekeepinggen* normalisierten Expressionswerte als „Fold-Difference“ bezogen auf den jeweiligen totalen mRNA Gehalt (Kontrollwert). Die Mittelwerte und die gegen Mehrfachvergleiche adjustierten 95%-Konfidenzintervalle sind jeweils eingezeichnet. Auf den x-Achsen sind jeweils zwei Stufen – wie im Methodenteil beschrieben - der Extraktionen aus Zellkernen (ncl. und ncl.2), zwei Extraktionen aus dem Zytoplasma von Zellen (cytopl. und cytopl.2), eine gemischte Extraktion mit gleichen Anteilen an Zellkern- und Zytoplasmahalt (cytopl. + ncl.) und eine Extraktion aus unspezifischem Zellinhalt (total) - wie oben schon beschrieben der Bezugswert - aufgezeigt.

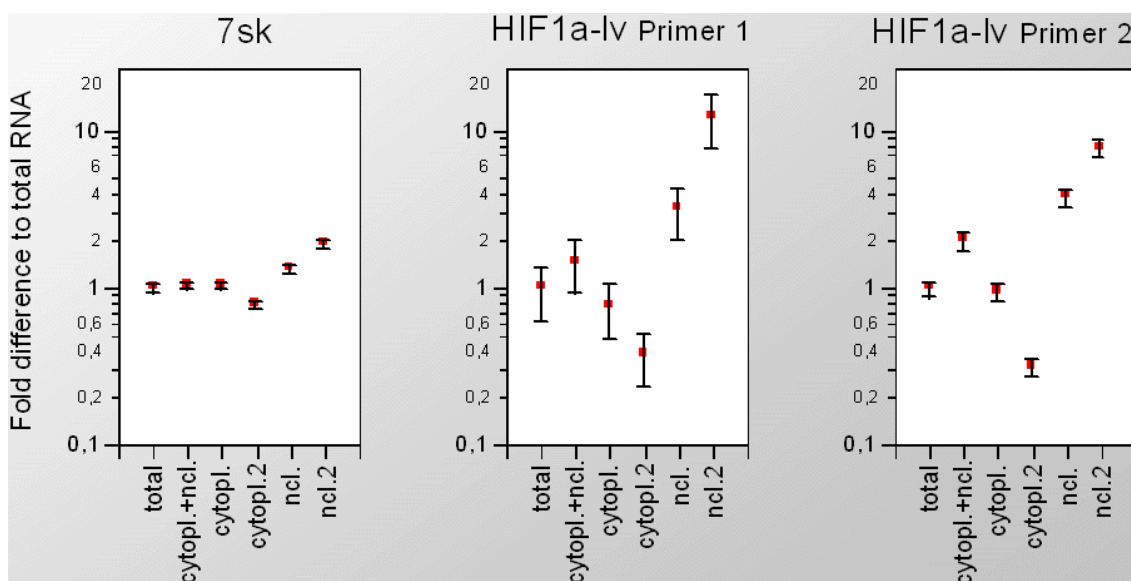
Für Hif1 α ohne Exon 14 haben wir das Primerpaar 2473; 2637 \rightarrow 2675 verwendet. Für Hif1 α mit Exon 14 haben wir das Primerpaar 2488 \rightarrow 2675 verwendet.

Bei GAPDH ist zu sehen, daß die beiden Extraktionen aus dem Zellkern („ncl.“ (CI: 0,35 - 0,47) und „ncl.2“ (CI: 0,37 - 0,51)) signifikant weniger mRNA Gehalt aufweisen als die Extraktion „total“ (CI: 0,85 - 1,15)

Hif1 α ohne Exon 14 zeigt ähnlich wie GAPDH in Bezug zur Extraktion „total“ (CI: 0,75 - 1,25) einen signifikant niedrigeren Gehalt an mRNA in den Extraktionen aus den Zellkernen („ncl.“ (CI: 0,44 - 0,74) und „ncl.2“ (CI: 0,43 - 0,72).

Bei Hif1 α mit Exon 14 erkennt man in Bezug zum Extraktionswert „total“ (CI: 0,91 - 1,09) in der zytoplasmatischen Extraktion „cytopl.2“, daß dort der mRNA Gehalt signifikant hoch ist (CI: 1,23 - 1,47). Wohingegen die Extraktion „ncl.“ einen signifikant niedrigeren mRNA Gehalt aufweist (CI: 0,41 - 0,48). Unerwartet signifikant erniedrigt, aber mit dem Extraktionsmischungsverhältnis von 1.1 zu erklären, erscheint die Extraktionsprobe „cytopl. + ncl.“ (CI: 0,68 - 0,80).

Schaubild 27: Zelluläre Lokalisation von Hif1 α -lv (bestimmt durch zwei unterschiedliche Primer) und dem nucleären *Housekeepinggen* 7sk



Für Hif1 α -lv Primer 1 haben wir das Primerpaar +292 \rightarrow +365 verwendet. Für Hif1 α -lv Primer 2 haben wir das Primerpaar +1946 \rightarrow +2045 verwendet.

Das Gen 7sk, welches wir für diesen Versuch als *Housekeepinggen* des Zellkerns ausgesucht haben, zeigt sich hier mit signifikanter Erniedrigung des mRNA Gehalts in der Extraktion „cytopl.2“ (CI: 0,74 - 0,85) gegenüber dem Kontrollwert „total“ (CI: 0,93 - 1,07). Ebenfalls signifikant, jedoch erhöht, sind die mRNA Gehalte beider Extraktionen aus Zellkernen („ncl.“ (CI: 1,26 - 1,44) und „ncl.2“ (CI: 1,83 - 2,08)).

Das Schaubild von Hif1 α -lv Primer 1, zeigt Ähnlichkeiten in seiner Verteilung des mRNA Gehalts zu derer bei 7sk. Der Gehalt an mRNA ist im Zytoplasma „cytopl.2“ (CI: 0,24 - 0,52) signifikant gering. Im Nukleus dagegen (Extraktionen „ncl.“ (CI: 2,04 - 4,45) und vor allem „ncl.2“ (CI: 7,99 - 17,4)) sind die Gehälter an mRNA in Bezug zum Kontrollwert „total“ (CI: 0,63 - 1,37) signifikant höher.

Für Hif1 α -lv Primer 2 zeigt sich ein ähnlicher Kurvenverlauf wie bei Hif1 α -lv Primer 1, mit dem Unterschied, daß hier die Streuung der Messwerte geringer ist (Konfidenzintervalle sind schmaler). Man sieht, daß der Gehalt an mRNA im Zytoplasma „cytopl.2.“ (CI: 0,28 - 0,35) signifikant gering ist. In den Extraktionen des Nukleus („ncl.“ (CI: 3,38 - 4,32) und vor allem „ncl.2“ (CI: 6,99 - 8,94)) sieht man hingegen, daß der Gehalt an mRNA gegenüber dem Bezugswert „total“ (CI: 0,88 - 1,12) signifikant erhöht ist. Ähnlich wie bei Hif1 α mit Exon 14, jedoch umgekehrt signifikant, ist der Gehalt an mRNA in der Extraktion „cytopl. + ncl.“ (CI: 1,78 - 2,27) erhöht. Dies könnte daran liegen, daß die Konzentrationen an mRNA in den verschiedenen Zellkompartimenten ja jeweils unterschiedlich hoch sind, das Mischungsverhältnis dieser Extraktion jedoch 1:1 „ncl. + cytopl.“ beträgt.

4. Diskussion

4.1. Die wichtigsten Ergebnisse bezogen auf die Arbeitshypothese

In dieser Arbeit haben wir durch Datenbankanalysen im Sinne eines phylogenetischen Sequenzabgleichs und einer EST-Analyse *downstream* der 3'UTR-Hif1 α -Referenz-mRNA im Genom eine Stelle gefunden, welche hoch konserviert ist und ein Polyadenylierungssignal enthält. Diese *in silico* Ergebnisse deuteten auf die tatsächliche Existenz möglicher neuer, noch nicht charakterisierter mRNA Varianten von Hif1 α hin. Nach spezifischer Primerauswahl konnten wir *in vitro* in verschiedenen humanen Zelllinien die Expression eines Sequenzbereiches zeigen, welcher im Genom über 2000 Basen weiter *downstream* des 3'UTR-Endes der Referenz RNA von Hif1 α liegt. Diesen Bereich haben wir als Hif1 α -lv bezeichnet. Für Hif1 α -lv konnten wir in darauf folgenden Experimenten eine differentielle Regulierung *in vitro* und *in vivo* nachweisen. Hierbei zeigten sich auch deutliche Unterschiede zu den klassischen Hif1 α -mRNA Varianten. Hif1 α -lv, nicht aber die konventionellen Hif1 α mRNA Varianten reagierten *in vitro* auf Stimulation mit Kobaltchlorid (Hypoxieinduktion) innerhalb der ersten Stunden mit einem Expressionsanstieg.

Auch *in vivo* haben wir ein Ansteigen der Expression von Hif1 α -lv durch eine Halbmarathonausdauerbelastung zeigen können, nicht aber ein Ansteigen der Expression konventioneller Hif1 α mRNA Varianten. Bei dem Versuch der normobaren Hypoxieexposition (23h Hypoxie) haben wir zeigen können, daß Hif1 α -lv unter Hypoxie ohne körperliche Belastung *in vivo* nicht differentiell reguliert wird. Dahingegen wiesen wir hierbei eine sehr hohe Korrelation der Expression von Hif1 α -lv mit den konventionellen Hif1 α mRNA Varianten nach. Zudem haben wir durch weitere Sequenzabgleiche „*inverted SINE repeats*“ im 3'UTR von Hif1 α -lv gefunden, welche dort auf die Ausbildung eines *Loops* hindeuten. Zuletzt sei noch erwähnt, daß Hif1 α -lv in einem Zelllokalisationsversuch vorwiegend im Zellkern lokalisiert war, die konventionellen Varianten hingegen waren vorwiegend im Zytoplasma zu finden.

4.2. Verschiedene Hif1 α mRNA-Varianten, ihr Expressionsverhalten und ihre Funktion

Wir oben erwähnt, haben wir in dieser Arbeit ein Polyadenylierungssignal ca. 2000 Basenpaare weiter *downstream* der Referenzsequenzen zeigen können. Diese theoretische Sachlage deutet alleine schon auf die mögliche Existenz einer beträchtlichen Vielzahl von verschiedenen mRNA-Varianten von Hif1 α mit möglicherweise sogar unterschiedlich funktioneller Bedeutung hin.

Im Folgenden ist zuerst noch einmal kurz zusammengefasst, welche Varianten von Hif1 α mRNA in der Literatur bereits beschrieben worden sind. Funktionen und Expressionsverhalten dieser mRNAs wurden insofern bekannt schon in der Einleitung unter 1.3.2. beschrieben:

Die Existenz der beiden Hif1 α mRNA-Varianten Hif1 α mit Exon 14 und Hif1 α ohne Exon 14 wurde bisher schon von mehreren unterschiedlichen Arbeitsgruppen verifiziert und gilt deshalb als unumstritten.

Gothie et al. beschrieben im Jahre 2000 zwei verschiedene Hif1 α mRNA-Varianten, die sich durch das Vorhandensein jenes eben angesprochenen Exon 14 und eines Basentriplets TAG im Übergangsbereich von Exon eins zu Exon

zwei unterscheiden (Gothie et al., 2000). Die Variante mit Exon 14 ist dabei wohl die am meisten exprimierte Hif1 α mRNA-Variante überhaupt.

Eine weitere Variante von Hif1 α stellt Hif1 α ohne Exon 10 dar (Lee et al., 2004). 2001 wurden in der Maus zwei Varianten von Hif1 α mRNA beschrieben, die Hif1 α I.1 und Hif1 α I.2 genannt werden und sich in ihrem 5'Ende unterscheiden (Lukashev et al., 2001).

Darüber hinaus wurde 2002 von Chun et al. eine Variante beschrieben, deren Exon 11 und Exon 12 fehlen und die als dominant negative Isoform von Hif1 α mRNA beschrieben worden ist (Chun et al., 2002).

Auch Hif1 α Z, welchem unter der Anwesenheit von Zink-Ionen (Normoxie) das Exon 12 durch alternatives Splicen entfernt wird, wird als dominant negative Isoform von Hif1 α aufgeführt (Chun et al., 2001).

Eine ebenfalls als dominant negative Isoform von Hif1 α mRNA beschriebene Variante wurde 2004 jedoch gewebsspezifisch und nicht ubiquitär exprimiert nur im menschlichen Hoden gefunden (Depping et al., 2004).

Zudem gibt es von Hif1 α nicht nur „sense-mRNA-Varianten“, sondern auch „antisense-mRNA-Varianten“. Hiervon sind vor allem zu nennen:

Thrash-Bingham et al. beschrieben 1999 im nicht papillären, klarzelligem Nierenkarzinom die Überexpression einer aHif1 α . Diese ist 1577 Basenpaare lang, wovon 882 Basenpaare zum 3'UTR von Hif1 α komplementär sind. Die andere Hälfte dieser mRNA ist in 5'Richtung nicht ganz zu 100% komplementär zum nicht kodierenden Strang der Hif1 α Referenz mRNA (Thrash-Bingham and Tartof, 1999). Wie wir heute wissen liegt die Ursache hierfür im „*A to I Editing*“ einzelner Basen der aHif1 α (mündliche Mitteilung durch Herrn Thomas Beiter und David Callau). Mit dieser Erkenntnis lässt sich somit die eindeutige Richtung und deshalb auch die gesicherte Existenz dieser Sequenzabfolge als *antisense* mRNA klären.

Rossignol et al. beschrieben 2002 weiter, daß aHif1 α zu einer Bindung im überlappenden Bereich mit Hif1 α fähig sei. Dadurch werden „*AU-rich elements*“ (Bereiche mit hohem Basengehalt an Adenosin und Uracil) freigelegt, welche vor dieser Hybridisierung in „*hairpins*“ (Haarnadelstrukturen des Basenstranges)

funktionell verborgen gewesen waren. Diese Freilegung hat eine Proteinbindung und darauf hin einen vermehrten Abbau von Hif1 α zur Folge. aHif1 α führt also zu einem vermehrten Abbau von Hif1 α (Rossignol et al., 2002).

In einer Arbeit, die ebenfalls aHif1 α untersucht, momentan aber erst publiziert wird (vorgelegt von Cand. Med. David Callau, Mitglied unserer Arbeitsgruppe um Dr. rer. nat. Dr. med. P. Simon), sind zwei verschiedene aHif1 α mRNA-Varianten beschrieben. aHif1 α Exon 14 und aHif1 α Exon 2. Beide Varianten beginnen direkt *downstream* des in der Literatur beschriebenen CpG Islands (Promotorbereich) im Bereich des 3'UTRs von Hif1 α . *Downstream* bei aHif1 α bedeutet *upstream* bei Hif1 α . Der Unterschied dieser beiden Varianten besteht in deren Länge (aHif1 α Exon 14 reicht von kurz hinter dem *CpG Island* bis ins Exon 14 von Hif1 α (76bp lang). aHif1 α Exon 2 reicht von kurz hinter dem *CpG Island* bis ins Exon 2 von Hif1 α (142bp lang). Es handelt sich hierbei erwiesenermaßen um *antisense* Varianten, da sie typische Exon-Intron und Intron-Exon Übergänge aufweisen (wären es *sense*-Varianten, wären diese Übergänge komplementär). Bei *in vitro* Untersuchungen zur Expression dieser beiden aHif1 α mRNA-Varianten stellte sich heraus, daß sowohl aHif1 α Exon 14 als auch aHif1 α Exon 2 ubiquitär exprimiert gewesen waren. Eine differentielle Regulation dieser mRNAs konnte *in vivo* nicht nachgewiesen werden, jedoch eine positive Korrelation von aHif1 α Exon 14 mit der konventionellen Hif1 α mRNA-Variante ohne Exon14. Zudem wurde in Zelllokalisationsversuchen gezeigt, daß aHif1 α Exon 14 vermehrt im Zytoplasma zu finden war, aHif1 α Exon 2 dagegen vermehrt im Zellkern. Funktionell wäre denkbar, daß das konventionelle Hif1 α ohne Exon 14 in irgendeiner Art und Weise durch aHif1 α Exon 14 reguliert wird. Im Rückschluss wäre somit auch denkbar, daß es eine mRNA-Variante von Hif1 α geben könnte, welcher das Exon 2 fehlt und welche durch aHif1 α Exon 2 reguliert wird. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, daß aHif1 α allgemein oder speziell regulierend wirkt, indem es selbst wiederum Regulation mit dem Ergebnis des Vorhandenseins verschiedener aHif1 α mRNA-Varianten erfährt.

An dieser Stelle sei erwähnt, daß RNA-RNA Interaktion zwischen *sense*- und *antisense*-Varianten ein Problem für die Detektion mittels RT-PCR und Genchips darstellen kann (Simon et al., 2006).

Auf dieses Problem wird in 4.3. noch einmal hingewiesen, wenn es darum geht die eigentliche Länge und Charakterisierung von Hif1 α -lv zu diskutieren.

Im Folgenden werfen wir einen Blick auf das expressionelle Verhalten und die mögliche Funktion von in dieser Arbeit gemessener Hif1 α mRNA und gemessenem Hif1 α -lv verglichen mit Daten aus der Literatur. Die nachfolgenden Vergleiche werden jedoch dadurch erschwert, daß in jenen Arbeiten keine Angaben zur jeweils gemessenen Hif1 α mRNA-Variante gemacht wurden. Außerdem wurden in den einzelnen Arbeiten jeweils verschiedene Versuchsprotokolle und Studiendesigns verwendet und das Probenmaterial war teilweise ebenfalls unterschiedlicher Abstammung. Wenn man davon ausgeht, daß in den vorangegangenen Arbeiten vom kürzeren 3'UTR-Ende von Hif1 α (siehe Schaubild 3) ausgegangen worden war, dann liegt es nahe zuerst unsere gemessenen konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten mit diesen Arbeiten zu vergleichen.

Wir bestätigen hiermit durch das Ergebnis der Expression der konventionellen Hif1 α RNA-Varianten im Myotubenhypoxieversuch (3.2.2.) die Arbeit von Uchida et al. aus dem Jahre 2004 (Uchida et al., 2004). Beide Arbeiten zeigen ein zuerst konstantes Expressionsniveau von Hif1 α *in vitro* unter zellulärer Hypoxie für einige Zeit, um danach ein signifikantes Sinken beider ähnlicher Expressionsverläufe zu beschreiben. Hierbei bleibt zu erwähnen, daß bei Uchida et al. Lungenepithelzellen verwendet worden sind und das Absinken der Expression bereits nach sechs Stunden beginnt, wohingegen dieser Effekt in unserer Arbeit erst nach zwanzig Stunden zu sehen war (die auf die Zellen wirkenden spezifischen Hypoxieintensitäten beider Versuche sind dabei nicht exakt vergleichbar).

Ähnlich wie in den Arbeiten von Ameln, Gustafsson, et al. 2005 (Ameln et al., 2005), Gustafsson, Puntchart, et al. 1999 (Gustafsson et al., 1999), Ookawara, Suzuk, et al. 2002 (Ookawara et al., 2002) und teilweise von Lundby,

Gassmann, et al. 2006 (Lundby et al., 2006) wo im Muskel nach Ausdauerbelastung kein signifikanter Expressionsanstieg für Hif1 α mRNA gezeigt wurde, fanden wir in unseren *in vitro* und *in vivo* Hypoxieversuchen ebenfalls zu keiner Zeit ein signifikanter Expressionsanstieg der konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten. Anzumerken ist, daß die *in vivo* Proben unserer Versuche von PBMCs aus venösem Blut gewonnen wurden und daß sich die Versuchsdesigns (Trainingszustand der Probanden, Belastungsart und Belastungsintensität, Umweltbedingungen und vor allem Entnahmezeit/Zeitmesspunkte) jener oben genannten Arbeiten von einander unterscheiden.

In der zuletzt genannten Arbeit von Lundby, Gassmann, et al. 2006 wurde in Proben aus untrainiertem Muskel 6h nach einer Ausdauerbelastung ein transienter Expressionsanstieg von Hif1 α mRNA gezeigt, während wir nur für Hif1 α -lv beim Myotubenhypoxieversuch oder beim Ausdauerbelastungsversuch durch einen Halbmarathon eine differentielle Regulierung nachweisen konnten. Dies wäre unter Anderem erklärbar durch ein ungünstiges Versuchsdesign in unserer Arbeit bezogen auf die Messung der konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten, da wir weder Muskelgewebe, noch eine Kombination aus Bewegung und Hypoxie als Stimulus untersucht haben. Zum Beispiel haben Vogt, Puntchart, et al. 2001 einen Expressionsanstieg von Hif1 α mRNA im Muskel 24 Stunden nach Belastung gemessen, jedoch nicht bei Normoxie, sondern nur unter zusätzlicher Gewebshypoxie (Vogt et al., 2001).

Ebenfalls einen Widerspruch zu unseren Ergebnissen der gemessenen konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten stellt die Arbeit von Connolly, Caiazzo, et al. 2004 dar (Connolly et al., 2004). Diese haben gezeigt, daß für Hif1 α mRNA eine Stunde nach einer dreißig Minuten andauernden Ausdauerbelastung ein signifikanter Expressionsanstieg zu messen war. Da die Proben dieses Ergebnisses aus venösem Blut von PBMCs stammen, lässt sich diese Arbeit gut mit der unseren, speziell mit dem Halbmarathonversuch vergleichen. Auch hier steht der Expressionsanstieg zwar im Widerspruch zu den Ergebnissen unserer konventionellen Hif1 α mRNA Varianten, nicht aber zu unseren Ergebnissen für Hif1 α -lv. Die Arbeit von Connolly, Caiazzo, et al.

bezieht sich allerdings nur auf ein Genchip Ergebnis, welches nicht durch eine *real-time* RT-PCR abgesichert wurde und in dem der Expressionsunterschied gerade mal Faktor 1,26 betrug. Ebenfalls unklar ist, welcher Sequenzbereich von Hif1 α in der Studie erfasst wurde.

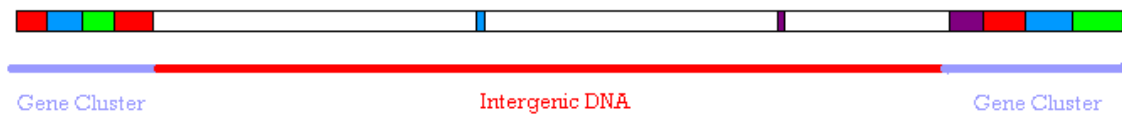
Unsere Arbeit bestätigt somit dass in Bezug auf die konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten über unsere Versuche hinweg die Ergebnisse früherer Studien, denen zu Folge eine transkriptionelle Regulation von Hif1 α im Gegensatz zur posttranslationalen Regulation initial keine Bedeutung zu haben scheint. Vielmehr wird nach Hypoxie erst nach vielen Stunden und wahrscheinlich im Sinne einer Gegenregulation wie von Uchida et al. postuliert ein Absinken der Normvarianten beobachtet.

Ganz im Gegensatz hierzu stehen unsere Ergebnisse bezüglich Hif1 α -lv, was darauf hinweist, dass es sich bei Hif1 α -lv womöglich um keine Normvariante von Hif1 α handelt. Vielmehr lassen die unterschiedliche und unabhängige, differentielle Regulation von Hif1 α -lv gegenüber den konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten auf funktionelle Besonderheit schließen. Dabei ist nicht klar ob Hif1 α -lv ausschließlich in Akutsituationen oder überhaupt für das gleiche Protein kodiert, wie die konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten, oder ob es eventuell nur ein Regulationstool der Zelle zur Prozesssteuerung darstellt.

4.3. Hif1 α -lv eine exprimierte *intergenic region* oder eine mRNA?

Eine „*intergenic region*“ ist ein DNA-Sequenzbereich mit keinen oder nur wenigen Genen zwischen zwei DNA-Sequenzbereichen höherer Gen-Konzentration. „*intergenic regions*“ gehören wie die Introns von Genen zur so genannten „*Junk DNA*“, welche 97% unseres Genoms ausmacht und für welche größtenteils keine spezifische Funktion bekannt ist. Manchen „*intergenic regions*“ wird eine Art Kontrollfunktion über bestimmte Gene zugesagt.

Schaubild 28: Schema einer „*intergenic region*“



An den beiden Enden des schematisch dargestellten Genomstrangs befindet sich jeweils ein Bereich höherer Genkonzentration („*Gene Cluster*“ aus vier mit bunter Farbe markierten Genen bestehend). Dazwischen liegt ein Bereich in welchem nur zwei ESTs enthalten sind. Dieser Bereich stellt eine „*intergenic region*“ dar.

Im Folgenden diskutieren wir Argumente dafür, daß Hif1 α -lv entweder eine „*intergenic region*“, oder eine mRNA (vielleicht sogar eine mRNA-Variante von Hif1 α) ist.

Die exakte Länge von Hif1 α -lv ist immer noch unbekannt, da es uns in dieser Arbeit nicht gelungen ist, eine PCR vom etablierten 5'UTR der Hif1 α Referenz-mRNA bis zum von uns vorgeschlagenen Ende des längeren 3'UTRs komplett durchzuführen. Auch ist es uns bisher noch nicht gelungen wenigstens eine vollständige Sequenzierung über die gesamte Länge des Hif1 α -lv Sequenzbereichs zwischen den Primerlokalisationen 2488 \rightarrow +2045 erfolgreich zu zeigen. Eine mögliche Ursache für Probleme bei Umschrieb, PCR und Sequenzierung sehen wir in der Insuffizienz der verwendeten Polymerasen einen Basenstrang über Bereiche von Doppelsträngigkeit hinweg zu synthetisieren. Zum einen stellt dies ein Problem bei der Ausbildung von *Loopstrukturen* dar. Hif1 α -lv bildet, siehe oben, wahrscheinlich innerhalb seines längeren 3'UTRs einen *Loop* aus, welcher in seinem Stiel doppelsträngig ist. Zum anderen stellt dies ein Problem bei der Hybridisierung zweier Einzelstränge zu einem partiellen Doppelstrang dar, wie dies der Fall bei einer partiellen Hybridisierung von Hif1 α -lv mit Anti-Hif1 α wäre. Noch komplizierter wäre es der Überlegung nach, wenn zwei RNAs nicht nur jeweils Strukturen wie zum Beispiel *Loops* usw. ausbilden würden, sondern dabei auch noch hybridisierten. Gegebenenfalls ist hier nach einer neuen Methode zur Amplifikation von strukturell komplizierten Basensträngen zu suchen.

Argumente dafür, daß Hif1 α -lv eine mRNA ist, sind folgende: Wir haben 2000 Basenpaare weiter *downstream* des bisher publizierten 3'UTR Endes von Hif1 α

ein phylogenetisch hoch konserviertes Polyadenylierungssignal gefunden, welches innerhalb des EST „AW137468“ liegt. Dies legt nahe, daß es eine mRNA kommend von 5' in Richtung 3' bis zu diesem Stoppsignal geben könnte, welche in Bezug auf die Referenz-mRNA von Hif1 α in sense-Richtung, und nicht in antisense-Richtung (wie aHif1 α mRNA), exprimiert ist. Weiter haben wir mit dem Primerpaar +1946 → Ankerprimer einen Sequenzbereich innerhalb des oben genannten EST amplifizieren können, welchen wir durch eine Sequenzierung bereits fast vollständig (400 von ca. 450 Basenpaaren) bestätigen konnten. Auf Grund des Ergebnisses einer weiteren PCR, die von Exon 14 der Referenz mRNA von Hif1 α bis in das EST „AW137468“ reicht (dabei überlappt das ca. 3000bp lange Produkt sowohl das konventionelle Hif1 α als auch den von uns sequenzierten Bereich am Ende der potentiellen 3'UTR), kann man Hif1 α -lv zum Gen Hif1 α zuordnen.

Jedoch ist nicht ganz auszuschließen, daß es eine anti-sense Variante von Hif1 α gibt, die in unserem gemessenen Bereich von 1946-2045 verläuft und welcher Hif1 α -lv zugeordnet werden kann.

Zur vollständigen Klärung der charakteristischen Natur unseres gemessenen Bereiches Hif1 α -lv wäre in zukünftigen Forschungsarbeiten zusätzlich zu der bereits von uns durchgeführten 3'RACE-Untersuchung (welche für Hif1 α -lv eher als sense-Sequenz spricht), die Durchführung von Northernblots und die Klonierung der vollständigen Sequenz von Hif1 α -lv zum Beispiel nach kompletter 5'RACE von Interesse.

4.4. Hif1 α -lv: Lokalisation und Funktion

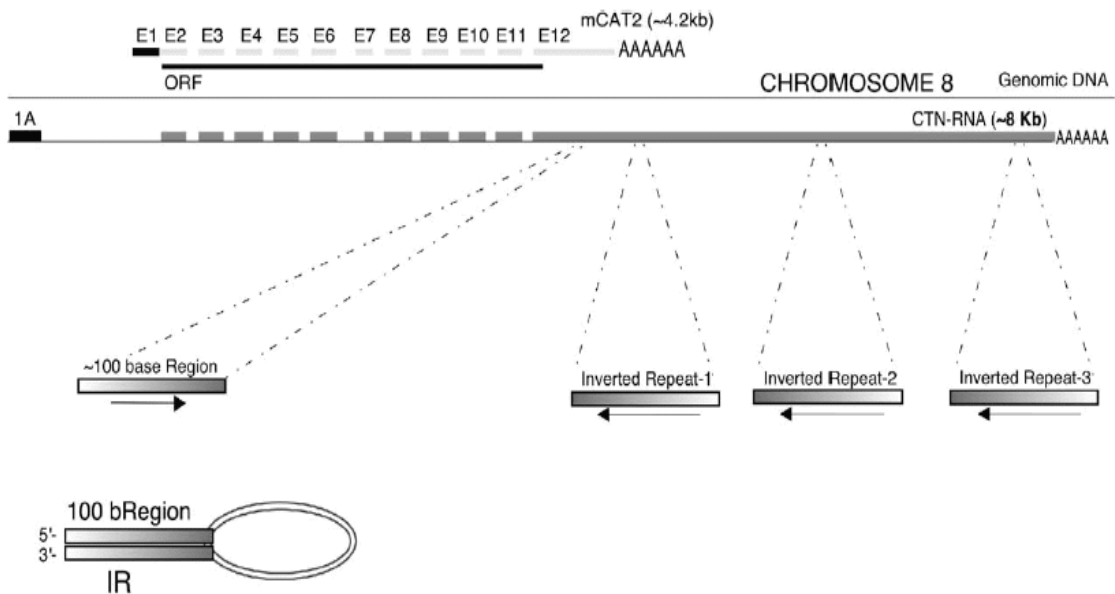
Es ist bekannt, dass nur ein sehr kleiner Teil unseres Genoms für die Herstellung von Proteinen Information trägt, welche man zum Beispiel in den Exons der mRNAs lokalisiert weiß. Ein Großteil unserer genetischen Information kodiert nicht für Proteine, sondern man nimmt an, dass diese Sequenzabschnitte wichtige regulatorische Rollen im Alltag einer Zelle spielen (Mattick, 2003), (Suzuki and Hayashizaki, 2004).

In einer Studie von 2005, die in ihrer Materie der Vorliegenden ähnelt, haben Prasanth et al. eine mRNA namens CTN-RNA entdeckt, welche eine im

Zellkern zurückgehaltene, polyadenylierte, längere Variante der mRNA des Gens mCAT2 darstellt. Das längere 3'Ende dieser langen Variante enthält ein „*A-to-I editing*“ (Zhang and Carmichael, 2001), welches die mRNA unter normalen Umständen daran hindert den Zellkern zu verlassen und im Zytoplasma translatiert zu werden. „*A-to-I editing*“ beschreibt den einzelnen Basentausch von Adenosin zu Inosin. Dieser Prozess kommt vor allem bei doppelsträngiger RNA vor. Loopstiele und RNA-Hybride sind partiell doppelsträngig. Inosin wird erkannt und darauf hin wird die RNA zum Beispiel im Zellkern zurückgehalten. Nach Abspaltung, Deletion oder Editierung dieser Base kann dann eine Translokation der RNA in ein anderes Zellkompartiment erfolgen. Interessanter Weise wird CTN-RNA unter zellulärem Stress posttranskriptionell, enzymatisch gespalten um darauf hin als funktionsfähige mRNA in das Zytoplasma entlassen und in ein mCAT2-Protein translatiert zu werden. Dieser wichtige, zelluläre Reaktions-/Regulationsmechanismus erlaubt die unverzügliche Bereitstellung großer Mengen Protein kodierender mRNA (Prasanth et al., 2005). Man könnte über CTN-RNA auch sagen, daß sie die im Zellkern lokalisierte mRNA-Speicherform ihrer eigentlichen konventionellen mRNA Variante mCAT2 im Zytoplasma darstellt. Der Nukleus hier also als eine Art „mRNA-Speicher“ für Notfallsituationen.

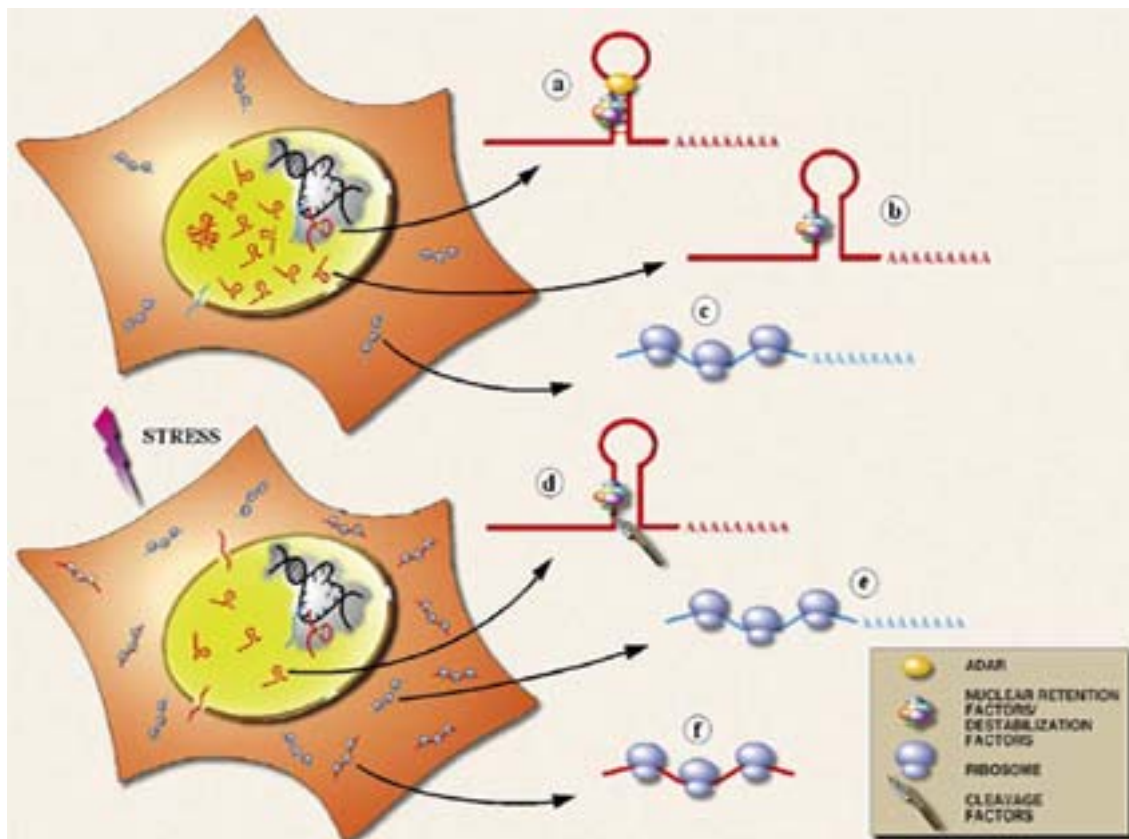
Da wir im 3'UTR von Hif1 α -lv ebenfalls eine Loopausbildung auf Grund der vorkommenden *inverted SINE repeats* propagieren und Hif1 α -lv ebenfalls vorwiegend im Zellkern lokalisiert zu sein scheint, wäre ein ähnlicher Zellkernretentionsmechanismus auch hier vorstellbar. Das Vorkommen eines Palindroms als mögliche Endonukleaseschnittstelle hatten wir bereits weiter oben angedeutet. Zudem wäre es in nachfolgenden Arbeiten interessant den Loopstielbereich von Hif1 α -lv auf „*A-to-I editing*“ zu untersuchen.

Schaubild 29: Schematischer Sequenzvergleich von CTN-RNA mit mCAT2 mRNA nach Prasanth et al. 2005



Auf dem Schaubild (Darstellung nach Prasanth) ist oben schematisch der Basenstrang von mCAT2 und der von CTN-RNA dargestellt. Das Gen befindet sich auf Chromosom 8. Beide Stränge enthalten 12 Exons, wobei CTN-RNA ein fast doppelt so langes 3'UTR besitzt wie mCAT2. Weiter unten sind die *SINE-repeats* im 3'UTR von CTN-RNA dargestellt. Ein *SINE-repeat* zu Anfang der 3'UTR bildet zusammen mit drei darauf folgenden *inverted-SINE-repeats* den Loopstiel. In der untersten Abbildung des Schaubilds ist der komplette *Loop* inclusive des 100bp umfassenden Loopstiels mit Bezeichnung der 3'- und 5'Enden schematisch dargestellt.

Schaubild 30: Regulation der Genexpression durch zellnukleäre mRNA-Retention



Das Schaubild von Prasanth et al. 2005 zeigt zwei Zellmodelle.

Im oberen Zellmodell ist die Retention von CTN-mRNA im Nucleus zu sehen. In a) ist die Transkription von CTN-mRNA dargestellt. Dazu sieht man im Zellkern schematisch den partiell geöffneten und in schwarzer Farbe dargestellten DNA-Doppelstrang, die einen *Loop* ausbildende CTN-mRNA (in roter Farbe mit polyadenyliertem 3'Ende dargestellt) und die nicht im Zellkern zurückgehaltene, sondern direkt ins Zytosol wandernde mCAT2 mRNA (in hellblauer Farbe dargestellt). In b) sieht man, daß der *Loop* im 3'UTR von CTN-mRNA stabilisiert erhalten bleibt, worauf in c) die Translation von ausschließlich mCAT2 aus dem Zytosol (hellblau markierter, polyadenylierter Strang wird von drei Ribosomen hintereinander in Protein translatiert) gezeigt wird.

Im unteren Zellmodell ist die stressinduzierte Prozessierung von CTN-mRNA gezeigt, mit darauf folgender Entlassung ins Zytosol und dortiger Translation in ein Protein. In d) bekommt man gezeigt, daß der *Loop* am proximalen Teil des Loopstiels entfernt wird (die Entfernung ist mit einem Messer angedeutet). e) stellt die auch unter Stress fortlaufende Translation von mCAT2-mRNA dar, wohingegen f) die dazukommende Translation der prozessierten und ins Zytosol entlassenen CTN-mRNA zeigt.

Auch für Hif1 α könnte man sich ähnliche Regulationsmechanismen und funktionelle Bedeutungen vorstellen, wobei dann die konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten mCAT2-mRNA entsprechen würden, und Hif1 α -lv CTN-mRNA.

Hif1 α -lv könnte zur Familie der „*Nuklear Regulatory RNA*“ (nrRNA) gehören, wie es einige Studien für eine signifikante Gruppe von RNAs für riboregulatorische und strukturelle Aufgaben in der Zelle vorschlagen (Herman et al., 1976), (Huang et al., 1994). Zwei in dieser Hinsicht in Säugetierzellen gut untersuchte nrRNAs sind Xist-RNA (Plath et al., 2002) und Tsix-RNA (Lee et al., 1999). Für die Retention im Zellkern ist die Struktur des 3'UTR-Endes einer mRNA wichtig. Das weiter oben angesprochene „*A-to-I editing*“, welches überwiegend in den nicht kodierenden Regionen einer mRNA, wie zum Beispiel im 5'Ende, 3'Ende oder in Introns vorkommt, wird bei einer Vielzahl von menschlichen RNAs erwartet (Athanasiadis et al., 2004). Das „*A-to-I editing*“ betrifft vor allem mittelmäßig sich wiederholende Sequenzabschnitte, siehe „*inverted SINE repeats*“ im 3'Ende von Hif1 α -lv. Das stressinduzierte posttranskriptionelle Zerschneiden der CTN-RNA zur mCAT2-RNA sagen Prasanth et al. in einer Region im 3'Ende *upstream* der bei beiden mRNA Varianten vorkommenden Bindungsstelle für Faktoren des Degradationsprozesses voraus. Diese Bindungsstelle ist auch bei den konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten und bei Hif1 α -lv bekannt.

Hinsichtlich der Hypothese eines ähnlichen Regulationsmechanismus für Hif1 α -lv ist außer den Argumenten des Vorhandenseins einer Loopstruktur und der zellulären Lokalisation weiter die differentielle Expression von Hif1 α -lv im Vergleich zu den konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten von Bedeutung. In Anlehnung an die CTN-mRNA nach Prasanth ist für unser Hif1 α -lv festzuhalten: Hif1 α -lv ist im Gegensatz zu den konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten vorwiegend im Zellkern lokalisiert, bildet wahrscheinlich eine Loopstruktur in seinem längeren 3'UTR aus und wird im Gegensatz zu den konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten differentiell *in vitro* unter Hypoxie und *in vivo* bei Ausdauerbelastung (beides Zellstress) exprimiert.

4.5. Ausblicke

Hif1 α : Ein Gen - eine mRNA - eine Funktion. Eine Aussage, die spätestens nach dieser Arbeit als höchst fragwürdig zu beurteilen ist. Welche Fragen werfen sich jetzt auf und was kann getan werden um einer umfassenden Hif1 α Regulations-Kenntnis ein Stück näher zu kommen?

Von Hif1 α mRNA sind in der Literatur schon einige Varianten beschrieben worden. Teils konnte man diesen unterschiedliche Proteine und Funktionen zuordnen, teils hat man gewebsspezifische Expressivität beobachtet. Angesichts der noch bestehenden Unklarheit über die charakteristische Natur von Hif1 α -lv sind in Zukunft weiter oben genannte Untersuchungen durchzuführen. Wenn Hif1 α -lv (gemessen bisher von 2488 \rightarrow +2045 und verifiziert von +1946 \rightarrow +2361) dabei tatsächlich als sense-mRNA verifiziert wird, dann könnte daraus ein beeindruckender Variantenreichtum für Hif1 α mRNA abgeleitet werden. Es würde sich die Frage stellen wie weit Hif1 α -lv in Richtung 5' reicht und welche Exons dabei enthalten sind. Es wären dabei verschiedenste Primerkombinationen zu untersuchen und PCR-Produkte zu sequenzieren. Weiter könnte man verschiedenste Gewebe (auch Tumorgewebe) und Stimuli auf spezifische Hif1 α mRNA-Expression untersuchen und miteinander vergleichen. Außerdem wäre es sinnvoll gleichzeitig zur Hif1 α mRNA-Detektion die spezifische Hif1 α Proteinexpression zu messen. Ganz bestimmt jedoch sollte man in Zukunft, wann immer man Hif1 α mRNA zu messen versucht die dabei verwendeten Primer und damit die gemessene Sequenz angeben um das Ergebnis überhaupt interpretieren zu können. Des Weiteren macht es in unseren Augen keinen Sinn sich bei Messungen von Hif1 α auf nur eine mRNA-Variante dieses Gens zu beziehen.

In Zukunft gilt es jedoch gleichfalls methodische Probleme zu lösen. Wie oben schon einmal angesprochen sind komplexe Strukturen wie *Loops* oder RNA-Hybride ein Problem schon beim Umschrieb von RNA in DNA. Weiter dann ein Problem bei der Quantifizierung mittels PCR und letztlich auch ein Problem bei der Sequenzierung der PCR-Produkte. Wir vermuten, daß die verwendeten Polymerasen zum Beispiel bei partieller Basenstrang-Doppelsträngigkeit entweder die Synthese abbrechen, den Basenstrang wechseln, oder den

Problembereich einfach überspringen könnten (zudem ist nicht sicher wie konsequent so ein Ausweichmechanismus stattfinden würde). Gerade im längeren 3'UTR von Hif1 α wo wir nicht nur eine Loopstruktur vermuten, sondern auch mit RNA-Hybriden rechnen, sollte ein weiteres Augenmerk auf das Vorhandensein von verschiedenen antisense-Varianten von Hif1 α gelegt werden.

Von den Synthese- und Detektionsproblemen abgesehen wäre es zudem interessant diese Strukturen und Hybride auf Prozession, Interaktion und funktionelle Bedeutung hin genauer zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Einleitung

Der „*Hypoxia Inducible Factor 1 (Hif1)*“, bestehend aus den Proteinuntereinheiten Hif1 α und Hif1 β , ist ein DNA-Transkriptionsfaktorkomplex. Wird der Organismus bestimmten Belastungen wie zum Beispiel Hypoxie ausgesetzt, so vermittelt Hif1 zelluläre Anpassungsreaktionen basierend auf der Induktion spezifischer Gene. Zu nennen sind hierbei vor allem die Umstellung von aerober auf anaerobe Glykolyse und eine Verbesserung der Durchblutung und des Sauerstoffangebots (Induktion von VEGF und EPO). In der Literatur beschrieben wurde bisher vor allem auf posttranskriptioneller Ebene das Protein Hif1 untersucht, wobei man lediglich für die α -Untereinheit sauerstoffabhängige Regulation nachweisen konnte. Verschiedene Arbeiten zeigen weiter auf transkriptioneller Ebene eine differentielle Expression von Hif1 α mRNA, ohne dabei jedoch den genauen untersuchten Sequenzbereich innerhalb der Hif1 α mRNA zu nennen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind zum Teil sehr widersprüchlich. Festzuhalten ist, dass von Hif1 α mRNA mehrere strukturell unterschiedliche und auch gewebsspezifische Varianten bekannt sind, deren Expressionsverhalten, Funktion und Bedeutung weitgehend unklar ist. Ebenfalls sind bereits Antisense Varianten von Hif1 α beschrieben worden, welche man in Bezug auf RNA-RNA-Interaktion nicht ausser Acht lassen darf.

Arbeitsanstrengungen

In dieser Arbeit untersuchen wir die Existenz neuer, noch nicht charakterisierter mRNA-Varianten von Hif1 α . Die neuen Varianten und die bereits bekannten Referenz mRNA-Varianten von Hif1 α werden nachfolgend auf Ihre Expression und insbesondere auf ihre Induzierbarkeit *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Hierdurch erhoffen wir uns einen ersten Beitrag zur Aufklärung der bislang bestehenden Widersprüchlichkeiten bezüglich der transkriptionellen Regulation von Hif1 α zu leisten.

Vorgehen

Neue mRNA-Kandidaten von Hif1 α werden zunächst durch Datenbankanalysen der *Expressed Sequence Tags* (ESTs) im Bereich des Hif1 α Gens, der phylogenetischen Konservierung der jeweiligen ESTs, sowie des phylogenetischen Abgleichs der Referenz mRNA Sequenzen ermittelt.

Die differentielle Expression der Kandidaten und der Referenzsequenzen wird nach Zellaufreinigung und Probenisolation mittels Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), *3' Rapid amplification of cDNA ends* (3'RACE) und quantitativer *real-time* RT-PCR in verschiedenen Geweben und Zelllinien untersucht. Bestätigte Kandidaten-ESTs werden sequenziert und anschließend in Zelllinien *in vitro* und in aus Probanden gewonnenen PBMCs *in vivo* auf ihre differentielle Regulierung hin untersucht.

Ergebnisse

Als Ergebnis eines phylogenetischen EST und mRNA Referenz-Sequenz-Abgleichs fanden wir als neuen Kandidaten ein längeres 3'UTR von Hif1 α beim Menschen als bisher beschrieben. In dem 2000 Basenpaare weiter *downstream* des bisher angenommenen 3'UTR-Endes von Hif1 α liegenden Kandidaten Hif1 α -long variant (Hif1 α -lv) findet sich ein hoch konserviertes Polyadenylierungssignal.

Nach geeigneter Primerwahl haben wir *in vitro* durch eine 3'RACE und nachfolgender Sequenzierung des Produktes Hif1 α -lv in einigen Zelllinien und Geweben als polyadenyliertes EST nachgewiesen. Im Rahmen der *in vitro*

Untersuchung von Hif1 α -lv und den konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten in Kobaltchloridbehandelten Myotuben, kamen wir zu dem Ergebnis, dass lediglich bei Hif1 α -lv ein Expressionsanstieg als Reaktion auf Hypoxie zu messen war. Dieses differentielle Expressionsverhalten zeigte sich auch *in vivo* bei einem Halbmarathonwettkampf, nicht jedoch beim Versuch der Belastung durch normobare Hypoxieexposition, wo alle gemessenen Sequenzbereiche nicht signifikant in ihrem Expressionsverlauf waren.

Nach Zellfraktionierung ließ sich Hif1 α -lv überwiegend im Zellkern nachweisen, während die konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten vor allem im Zytoplasma lokalisiert waren. Mittels RT-PCR konnten wir eine Konnektion von Hif1 α -lv mit dem Exon 14 und somit mit der Referenz mRNA von Hif1 α mRNA aufzeigen.

Diskussion

Auf Grund fehlender Informationen bezüglich des exakten Anfangs, Endes und der vollständigen Sequenzabfolge von Hif1 α -lv, ist aktuell noch nicht ganz klar ob es sich hierbei wirklich um eine mRNA-Variante von Hif1 α handelt. Wenn ja, dann schließt sich die Frage der Expressionsrichtung an: →wurde mit Hif1 α -lv eine (wie von uns bisher angenommen) sense-mRNA gemessen, oder eventuell eine antisense-mRNA? Weiter ist nicht klar ob Hif1 α -lv im Falle der Identität einer mRNA-sense-Variante von Hif1 α ausschließlich in Akutsituationen oder überhaupt für das gleiche Protein kodiert, wie die konventionellen Hif1 α mRNA-Varianten. Die phylogenetisch hoch konservierte Polyadenylierungsstelle, die ubiquitäre Expression und die von Hif1 α unterschiedliche, unabhängige, differentielle Regulation sprechen in jedem Falle für eine funktionelle Besonderheit des Polyadenylierten ESTs Hif1 α -lv.

Im 3'UTR von Hif1 α -lv wurden weitere Anzeichen für Loopbildung gefunden, was verantwortlich für die Zellkernretention von Hif1 α -lv sein könnte.

In Zukunft sollte man beim Messen von Hif1 α mRNA die dabei verwendeten Primer und damit den gepriimten Sequenzbereich angeben um das Ergebnis überhaupt interpretieren zu können. Auch macht es in unseren Augen keinen Sinn sich bei Messungen von Hif1 α auf nur eine mRNA-Variante zu beziehen.

Ebenfalls sollten in Zukunft weitere Untersuchungen bezüglich der Bedeutung und Funktion der verschiedenen Hif1 α mRNA-Varianten angestrengt werden, sowie methodische Probleme bei der Detektion mittels PCR, die RNA-RNA Interaktion und komplexe RNA-Strukturen betreffen, gelöst werden.

6. Schlussbemerkung

Wir leisten mit dieser Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung und zum Verständnis der Regulation des Gens Hif1 α . Jedoch ist nach dieser Arbeit für mich persönlich auch festzustellen, dass man manchmal dem Tatendrang und der abenteuerlichen Entdeckungslust des Forschergeistes folgend durch die Lösung einer Frage oder eines Problems, zwei neue Fragen gestellt bekommt. Die Natur erscheint komplexer und das Leben unbegreiflicher denn je. Aber obwohl man den Weg vor einem durch jeden Schritt neu erworbenes Wissen nur zu teilen vermag, lohnt es sich trotzdem weiter zu entdecken, denn es gibt nichts menschlicheres und aufregenderes als die Dinge begreifen und die Welt um uns herum verstehen zu wollen.

7. Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>Amino Acid</i>
A	Adenosin
aHif	Anti-Hif
ARNT	<i>Aryl Receptor Nuclear Translocator</i>
AS	<i>Alternative Splicing Sequence</i>
AS	Amino-Säuren
A-to-I editing	<i>Adenosin to Inosin editing</i>
ATP	Adenosin Tri Phosphat
bHLH	<i>basis Helix-Loop-Helix</i>
BLAT	<i>BLAST Like Alignment Tool</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Cand.	Candidatus
cDNA	<i>Complementary Desoxyribo-Nuclein-Acid</i>
CHR	Chromosom
CI	Konfidenz-Intervall
CoCl ₂	Kobaltchlorid
CRP	C-Reaktives-Protein
CTN-RNA	<i>CAT2 Transcribed Nuclear RNA</i>
CT-values	<i>Cycle Treshold Value</i>
cytopl.	<i>Cytoplasma</i>
DAGs	<i>Directed Acyclic Graphs</i>
DMSO	Di-Methyl-Sulf-Oxyd
DNA	<i>Desoxyribo-Nuclein-Acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy Adenosin/Thymin/Guanin/Cytosin Tri Phosphat
EGR-sv /-lv	<i>Early Growth Response Gen short variant/long variant</i>
EPO	Erythropoietin
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EtOH	Ethanol

FCS	<i>Foetal Calf Serum</i>
FHA/SV40	Fetale, Humane, immortalisierte Astrozytomzellen
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoff Konzentration
FITC	Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
Fold Diff	<i>Fold Differences</i>
for	<i>forward</i>
G	Guanosin
GAPDH	Glycerin Aldehyd 3 Phosphat Dehydrogenase
GO	<i>Gene Ontology</i>
GTP	Guanosin Tri Phosphat
HBS	<i>Hif Binding Site</i>
HCL	Chlorwasserstoff
HEX	Hexamer
hHif1 α -te	Humanes Hif1 α Testis
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
Hif1 α -lv	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 alpha long variant</i>
Hif1 α Z	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 alpha Zink</i>
hnRNA	Hetero-Nukleäre RNA
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
ICAM	<i>Intra Cellular Adhesion Molecule</i>
IDA	<i>Inferred from Direct Assay</i>
IEA	<i>Inferred from Electronic Annotation</i>
IEP	<i>Inferred from Expression Pattern</i>
IL	Interleukin
IL7R	Interleukin 7 Rezeptor
IPI	<i>Inferred from Physical Interaction</i>
ISS	<i>Inferred from Sequence or structural Similarity</i>
kD	Kilo Dalton
LN229	(ist eine humane Gehirntumorzelllinie)
mCAT2-mRNA	<i>mouse Cationic Amino Acid Transporter 2 mRNA</i>
MgCl ²	Magnesium Chlorid

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
MNE	<i>Mean Normalized Expression</i>
mRNA	<i>messenger Ribo-Nuclein-Acid</i>
mV	Millivolt
NaCl	Natrium Chlorid
NAS	<i>Non-Traceable Author Statement</i>
ncl.	<i>Nucleus</i>
ng	Nano-Gramm
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i>
NR	<i>Not Recorded</i>
ODD	<i>Oxygen Dependent Degradation Sequence</i>
OligoT (OdT)	Oligo Thymin
p53	Tumor-Suppressor-Protein 53
PAI	<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>
PAS Domäne	<i>Period circadian protein, Ah receptor nuclear translocator protein, Single minded protein Domäne</i>
PBMC	Periphere Mononukleäre Zellen des Blutes
PBS Puffer	<i>Phosphate-Buffered Saline Puffer</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	Privat Dozent
pO ₂	Sauerstoff Partialdruck
Poly-A	Poly-Adenosin
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
rev	<i>reverse</i>
RLT Puffer	<i>(Qiagen RNeasy Lysis Buffer)</i>
RNA	<i>Ribo-Nuclein-Acid</i>
ROS/RNS	freie Sauerstoff- /Stickstoffradikale
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRR-alpha-Tocopherol	Vitamin E

RT-	Reverse Transkriptase-
SINE	<i>Short Interspaced Nuclear Elements</i>
7sk	<i>(abundant small nuclear RNA)</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
T	Thymin
TAD	<i>Trans-Activation-Domain</i>
TAE-Puffer	Tris Acetat EDTA Puffer
TAS	<i>Traceable Author Statement</i>
THP	(humane monozytäre Zelllinie THP)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris-Puffer	((hydroxymethyl) aminomethan Puffer)
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UTR	<i>Un-Translated-Region</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	Von Hippel Lindau Protein
VO _{2max}	Maximale Sauerstoff Aufnahme
WWW	<i>world wide web</i>

8. Literaturverzeichnis

Agani,F.H., Pichiule,P., Chavez,J.C., and LaManna,J.C. (2000). The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J. Biol. Chem.* 275, 35863-35867.

Alessio,H.M., Hagerman,A.E., Fulkerson,B.K., Ambrose,J., Rice,R.E., and Wiley,R.L. (2000a). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 1576-1581.

Alessio,H.M., Hagerman,A.E., Fulkerson,B.K., Ambrose,J., Rice,R.E., and Wiley,R.L. (2000b). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32, 1576-1581.

Ameln,H., Gustafsson,T., Sundberg,C.J., Okamoto,K., Jansson,E., Poellinger,L., and Makino,Y. (2005). Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. *FASEB J.* 19, 1009-1011.

Athanasiadis,A., Rich,A., and Maas,S. (2004). Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. *PLoS. Biol.* 2, e391.

Bailey,D.M. and Davies,B. (1997). Physiological implications of altitude training for endurance performance at sea level: a review. *Br. J. Sports Med.* 31, 183-190.

Bailey,D.M. and Davies,B. (2001). Acute mountain sickness; prophylactic benefits of antioxidant vitamin supplementation at high altitude. *High Alt. Med. Biol.* 2, 21-29.

Bertges,D.J., Fink,M.P., and Delude,R.L. (2000). Hypoxic signal transduction in critical illness. *Crit Care Med.* 28, N78-N86.

Boutillier,R.G. and St Pierre,J. (2000). Surviving hypoxia without really dying. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* 126, 481-490.

Bunn,H.F. and Poyton,R.O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev.* 76, 839-885.

Calbet,J.A. (2003). Chronic hypoxia increases blood pressure and noradrenaline spillover in healthy humans. *J. Physiol* 551, 379-386.

Cayre,A., Rossignol,F., Clottes,E., and Penault-Llorca,F. (2003). aHIF but not HIF-1alpha transcript is a poor prognostic marker in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 5, R223-R230.

Cheng,J., Kapranov,P., Drenkow,J., Dike,S., Brubaker,S., Patel,S., Long,J., Stern,D., Tammana,H., Helt,G., Sementchenko,V., Piccolboni,A., Bekiranov,S., Bailey,D.K., Ganesh,M., Ghosh,S., Bell,I., Gerhard,D.S., and Gingeras,T.R. (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308, 1149-1154.

Chinda,D., Nakaji,S., Umeda,T., Shimoyama,T., Kurakake,S., Okamura,N., Kumae,T., and Sugawara,K. (2003). A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. *Luminescence.* 18, 324-329.

Chun,Y.S., Choi,E., Kim,T.Y., Kim,M.S., and Park,J.W. (2002). A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1alpha gene. *Biochem. J.* 362, 71-79.

- Chun, Y.S., Choi, E., Yeo, E.J., Lee, J.H., Kim, M.S., and Park, J.W. (2001). A new HIF-1 alpha variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. *J. Cell Sci.* **114**, 4051-4061.
- Connolly, P.H., Caiozzo, V.J., Zaldivar, F., Nemet, D., Larson, J., Hung, S.P., Heck, J.D., Hatfield, G.W., and Cooper, D.M. (2004). Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Appl. Physiol.* **97**, 1461-1469.
- Cuzzocrea, S., Riley, D.P., Caputi, A.P., and Salvemini, D. (2001). Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* **53**, 135-159.
- Depping, R., Hagele, S., Wagner, K.F., Wiesner, R.J., Camenisch, G., Wenger, R.H., and Katschinski, D.M. (2004). A dominant-negative isoform of hypoxia-inducible factor-1 alpha specifically expressed in human testis. *Biol. Reprod.* **71**, 331-339.
- Floyd, R.A. (1999). Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1346-1355.
- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196**, 261-282.
- Goldfarb, A.H., Patrick, S.W., Bryer, S., and You, T. (2005). Vitamin C supplementation affects oxidative-stress blood markers in response to a 30-minute run at 75% VO₂max. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **15**, 279-290.
- Gothie, E., Richard, D.E., Berra, E., Pages, G., and Pouyssegur, J. (2000). Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* **275**, 6922-6927.
- Greiwe, J.S., Hickner, R.C., Shah, S.D., Cryer, P.E., and Holloszy, J.O. (1999). Norepinephrine response to exercise at the same relative intensity before and after endurance exercise training. *J. Appl. Physiol.* **86**, 531-535.
- Gustafsson, T., Knutsson, A., Puntchart, A., Kaijser, L., Nordqvist, A.C., Sundberg, C.J., and Jansson, E. (2002). Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. *Pflugers Arch.* **444**, 752-759.
- Gustafsson, T., Puntchart, A., Kaijser, L., Jansson, E., and Sundberg, C.J. (1999). Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **276**, H679-H685.
- Herman, R.C., Williams, J.G., and Penman, S. (1976). Message and non-message sequences adjacent to poly(A) in steady state heterogeneous nuclear RNA of HeLa cells. *Cell* **7**, 429-437.
- Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H., and 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**, 8581-8593.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., and Bunn, H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.* **271**, 32253-32259.

- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7987-7992.
- Huang, S., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., and Spector, D.L. (1994). In vivo analysis of the stability and transport of nuclear poly(A)⁺ RNA. *J. Cell Biol.* 126, 877-899.
- Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H., and Gassmann, M. (2001). Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 15, 1312-1314.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R., and Semenza, G.L. (1996b). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 271, 17771-17778.
- Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., and Marti, H.H. (1996a). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol* 271, C1172-C1180.
- Jurka, J. (2000). Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet.* 16, 418-420.
- Karolchik, D., Baertsch, R., Diekhans, M., Furey, T.S., Hinrichs, A., Lu, Y.T., Roskin, K.M., Schwartz, M., Sugnet, C.W., Thomas, D.J., Weber, R.J., Haussler, D., and Kent, W.J. (2003). The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Res.* 31, 51-54.
- Kent, W.J. (2002). BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* 12, 656-664.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M., and Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 12, 996-1006.
- Kimura, K., Wakamatsu, A., Suzuki, Y., Ota, T., Nishikawa, T., Yamashita, R., Yamamoto, J., Sekine, M., Tsuritani, K., Wakaguri, H., Ishii, S., Sugiyama, T., Saito, K., Isono, Y., Irie, R., Kushida, N., Yoneyama, T., Otsuka, R., Kanda, K., Yokoi, T., Kondo, H., Wagatsuma, M., Murakawa, K., Ishida, S., Ishibashi, T., Takahashi-Fujii, A., Tanase, T., Nagai, K., Kikuchi, H., Nakai, K., Isogai, T., and Sugano, S. (2006). Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res.* 16, 55-65.
- Leach, R.M. and Treacher, D.F. (1998). Oxygen transport-2. Tissue hypoxia. *BMJ* 317, 1370-1373.
- Lee, J.T., Davidow, L.S., and Warshawsky, D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat. Genet.* 21, 400-404.
- Lee, K.H., Park, J.W., and Chun, Y.S. (2004). Non-hypoxic transcriptional activation of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in concert with a novel hypoxia-inducible factor-1 α isoform. *Nucleic Acids Res.* 32, 5499-5511.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Lukashev, D., Caldwell, C., Ohta, A., Chen, P., and Sitkovsky, M. (2001). Differential regulation of two alternatively spliced isoforms of hypoxia-inducible factor-1 α in activated T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 48754-48763.
- Lundby, C., Gassmann, M., and Pilegaard, H. (2006). Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1 α and HIF-2 α mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur. J. Appl. Physiol* 96, 363-369.

- Mattick, J.S. (2003). Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *Bioessays* 25, 930-939.
- McCarthy, D.A. and Dale, M.M. (1988). The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med.* 6, 333-363.
- Meehan, R.T. (1987). Immune suppression at high altitude. *Ann. Emerg. Med.* 16, 974-979.
- Michiels, C., Arnould, T., and Remacle, J. (2000). Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1497, 1-10.
- Morwenna, S. and Ratcliffe, W.P. (1997). Mammalian oxygen sensing and hypoxia inducible factor-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1419-1432.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. (1997). GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* 4:14.
- Niess, A.M., Baumann, M., Roecker, K., Horstmann, T., Mayer, F., and Dickhuth, H.H. (1998). Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 38, 111-115.
- Niess, A.M., Dickhuth, H.H., Northoff, H., and Fehrenbach, E. (1999). Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exerc. Immunol. Rev.* 5, 22-56.
- Ookawara, T., Suzuk, K., Haga, S., Ha, S., Chung, K.S., Toshinai, K., Hamaoka, T., Katsumura, T., Takemasa, T., Mizuno, M., Hitomi, Y., Kizaki, T., Suzuki, K., and Ohno, H. (2002). Transcription regulation of gene expression in human skeletal muscle in response to endurance training. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 111, 41-54.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., and Pedersen, B.K. (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J. Physiol* 515 (Pt 1), 287-291.
- Peake, J.M. (2002). Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc. Immunol. Rev.* 8, 49-100.
- Petersen, E.W., Ostrowski, K., Ibfelt, T., Richelle, M., Offord, E., Halkjaer-Kristensen, J., and Pedersen, B.K. (2001). Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280, C1570-C1575.
- Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D.A., and Panning, B. (2002). Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* 36, 233-278.
- Prasanth, K.V., Prasanth, S.G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S.M., Bennett, C.F., Zhang, M.Q., and Spector, D.L. (2005). Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* 123, 249-263.
- Prior, S.J., Hagberg, J.M., Phares, D.A., Brown, M.D., Fairfull, L., Ferrell, R.E., and Roth, S.M. (2003). Sequence variation in hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1A): association with maximal oxygen consumption. *Physiol Genomics* 15, 20-26.
- Ratcliffe, P.J., O'Rourke, J.F., Maxwell, P.H., and Pugh, C.W. (1998). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* 201, 1153-1162.
- Rosignol, F., de Laplanche, E., Mounier, R., Bonnefont, J., Cayre, A., Godinot, C., Simonnet, H., and Clottes, E. (2004). Natural antisense transcripts of HIF-1alpha are conserved in rodents. *Gene* 339, 121-130.

- Rosignol,F., Vache,C., and Clottes,E. (2002). Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1alpha are detected in different normal and tumour human tissues. *Gene* 299, 135-140.
- Sauer,H., Wartenberg,M., and Hescheler,J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 11, 173-186.
- Schroedl,C., McClintock,D.S., Budinger,G.R., and Chandel,N.S. (2002). Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 283, L922-L931.
- Semenza,G.L. (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 551-578.
- Semenza,G.L. (2000). Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J. Clin. Invest* 106, 809-812.
- Shephard,R.J. (1998). Immune changes induced by exercise in an adverse environment. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 76, 539-546.
- Simon,P. (2003). Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics.* 19, 1439-1440.
- Simon,P., Fehrenbach,E., and Niess,A.M. (2006). Regulation of immediate early gene expression by exercise: short cuts for the adaptation of immune function. *Exerc. Immunol. Rev.* 12, 112-131.
- Simon,P., Schott,K., Williams,R.W., and Schaeffel,F. (2004). Posttranscriptional regulation of the immediate-early gene EGR1 by light in the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* 20, 3371-3377.
- Subudhi,A.W., Jacobs,K.A., Hagobian,T.A., Fattor,J.A., Fulco,C.S., Muza,S.R., Rock,P.B., Hoffman,A.R., Cymerman,A., and Friedlander,A.L. (2004). Antioxidant supplementation does not attenuate oxidative stress at high altitude. *Aviat. Space Environ. Med.* 75, 881-888.
- Suzuki,K., Nakaji,S., Yamada,M., Totsuka,M., Sato,K., and Sugawara,K. (2002). Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kinetics. Exerc. Immunol. Rev.* 8, 6-48.
- Suzuki,M. and Hayashizaki,Y. (2004). Mouse-centric comparative transcriptomics of protein coding and non-coding RNAs. *Bioessays* 26, 833-843.
- Szymanski,M. and Barciszewski,J. (2003). Regulation by RNA. *Int. Rev. Cytol.* 231, 197-258.
- Thrash-Bingham,C.A. and Tartof,K.D. (1999). aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 143-151.
- Tian,B., Hu,J., Zhang,H., and Lutz,C.S. (2005). A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res.* 33, 201-212.
- Topisirovic,I., Culjkovic,B., Cohen,N., Perez,J.M., Skrabanek,L., and Borden,K.L. (2003). The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *EMBO J.* 22, 689-703.
- Uchida,T., Rosignol,F., Matthay,M.A., Mounier,R., Couette,S., Clottes,E., and Clerici,C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J. Biol. Chem.* 279, 14871-14878.

- Viitala,P.E., Newhouse,I.J., LaVoie,N., and Gottardo,C. (2004). The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. *Lipids Health Dis.* 3, 14.
- Vogt,M., Puntchart,A., Geiser,J., Zuleger,C., Billeter,R., and Hoppeler,H. (2001). Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J. Appl. Physiol* 91, 173-182.
- Wagner,P.D. (2001). Skeletal muscle angiogenesis. A possible role for hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 502, 21-38.
- Wang,G.L. and Semenza,G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270, 1230-1237.
- Wang,J.S. and Huang,Y.H. (2005). Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *Eur. J. Appl. Physiol* 95, 290-297.
- Wenger,R.H. (2000). Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J. Exp. Biol.* 203, 1253-1263.
- Witt,E.H., Reznick,A.Z., Viguie,C.A., Starke-Reed,P., and Packer,L. (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.* 122, 766-773.
- Yan,S.F., Fujita,T., Lu,J., Okada,K., Shan,Z.Y., Mackman,N., Pinsky,D.J., and Stern,D.M. (2000). Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat. Med.* 6, 1355-1361.
- Yan,S.F., Zou,Y.S., Gao,Y., Zhai,C., Mackman,N., Lee,S.L., Milbrandt,J., Pinsky,D., Kisiel,W., and Stern,D. (1998). Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8298-8303.
- Yan,S.F., Zou,Y.S., Mendelsohn,M., Gao,Y., Naka,Y., Du,Y.S., Pinsky,D., and Stern,D. (1997). Nuclear factor interleukin 6 motifs mediate tissue-specific gene transcription in hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 4287-4294.
- Zhang,Z. and Carmichael,G.G. (2001). The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* 106, 465-475.
- Zou,A.P., Yang,Z.Z., Li,P.L., and Cowley,A.W., Jr. (2001). Oxygen-dependent expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in renal medullary cells of rats. *Physiol Genomics* 6, 159-168.

9. Danksagungen

Zunächst möchte ich all jenen danken, welche im Rahmen dieser Arbeit aktiv mitgearbeitet haben.

An erster Stelle ist dabei Peri zu nennen. Er war durch seine Ideen und Verbesserungsvorschläge maßgeblich an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt. Auch in schweren Zeiten war er immer Optimist, voller Mut und Tatendrang. Seine Nerven müssen Drahtseile sein, sein Gehirn ein Super-Computer. Ich kann mir keinen besseren Doktorvater / Betreuer vorstellen → Vielen Dank!

Weiter sei der ganzen Arbeitsgruppe um Peri gedankt. Meinen studentischen Mitstreitern David (ihm sei ein ganz besonderes Dankeschön gesagt, wir haben viele Stunden gemeinsam im Labor erlebt), Tabea und Annette, außerdem den Fachkräften im Labor des sportmedizinischen Instituts Tuebingen Thomas und Lenka.

Auch danken möchte ich sämtlichen Probenspendern, welche in der Tabelle 1 unter 2.2. namentlich aufgeführt sind, so wie dem Physiologischen Institut Tuebingen für die Benutzung der Gelelektrophorese Hardware, der Thorax-Herz-Chirurgie Tuebingen für die Benutzung der PCR Geräte und der Transfusionsmedizin Tuebingen für die Möglichkeit zur Probenisolation.

Ebenfalls ein Dankeschön an Professor Dr. A. M. Niess, der durch seine Unterstützung und Engagement diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Last but not least, Danke Franzi und Danke meiner Familie, ihr wart immer für mich da.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexander Böhringer
Geburtsdatum	27.11.1980
Geburtsort	Ulm, an der Donau

Schullaufbahn

1987-1991	Grundschule Merklingen/Nellingen
1991-2000	Albert-Schweitzer-Gymnasium Laichingen
Juni 2000	Abitur am Albert-Schweitzer-Gymnasium Laichingen

Zivildienst

Juli 2000	Individuelle Schwerstbehindertenbetreuung beim ASB-Ulm
-----------	---

Studium

April 2002	Beginn des Humanmedizinstudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tuebingen
März 2004	Ärztliche Vorprüfung
04.11.2008	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)