

Aus dem Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung

Bad Nauheim

Geschäftsführender Direktor: Prof. Wolfgang Schaper

**Identifikation und Analyse
genregulatorischer Elemente
des hypoxieinduzierbaren Faktors 2α der Maus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

(Dr. rer. Physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Stephan Lanz

aus Mainz

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 18. Juli 2003

gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Matthias Clauss

1. Korreferent: Prof. Dr. Guntram Suske

2. Korreferent: Prof. Dr. med. Harald Renz

1	Einleitung	1
1.1	Das Blutgefäßsystem	1
1.2	Die Blutgefäßbildung	2
1.2.1	Vaskulogenese	2
1.2.2	Angiogenese	3
1.3	Klinische Bedeutung der Blutgefäßentwicklung.....	4
1.4	Endotheliale Wachstumsfaktoren	6
1.4.1	VEGF und VEGF-Rezeptoren.....	6
1.4.2	Tie1 und Tie2/Tek	7
1.5	Genexpression und ihre Regulation.....	8
1.6	Wichtige Transkriptionsfaktoren der Angiogenese.....	9
1.6.1	Ets-1.....	9
1.6.2	Die hypoxieinduzierbaren Faktoren HIF-1 und HIF-2.....	11
1.7	Die Funktionen von HIF-1 α und HIF-2 α im Vergleich.....	15
1.8	Endothelspezifische genregulatorische Elemente	17
1.9	Eigene Fragestellungen.....	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Chemikalien.....	20
2.1.2	Enzyme	20
2.1.3	Antikörper.....	21
2.1.4	Fertige Reagenzienansätze	21
2.1.5	Lösungen	21
2.1.5.1	Pufferlösungen.....	21
2.1.5.2	Medien.....	22
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.7	Geräte.....	23
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Bakterien.....	25
2.2.1.1	Verwendete Bakterienstämme.....	25
2.2.1.2	Vermehrung und Lagerung.....	25
2.2.1.3	Herstellung und Transformation kompetenter E.coli-Zellen.....	26
2.2.1.3.1	Chemischkompetente Bakterien	26
2.2.1.3.2	Elektrokompetente Bakterien	27
2.2.2	Arbeiten mit einer Phagen-cDNA-Bank.....	28
2.2.2.1	Ausplattieren einer Phagenbank	29
2.2.2.2	Durchsuchen einer ausplattierten Phagenbank	29
2.2.2.3	Präparation von Phagen-DNA ("Maxi-Präp").....	30
2.2.3	Arbeiten mit RNA	31
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen.....	32
2.2.3.2	Northern Blot-Analyse	33
2.2.3.2.1	Elektrophorese im denaturierenden Formamid-Agarosegel.....	33
2.2.3.2.2	Transfer von RNA auf Membranen durch Kapillar-Blotting	34
2.2.3.2.3	Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Sonden.....	35
2.2.3.3	RNase-Protektionsexperiment.....	35
2.2.3.3.1	Herstellung markierter RNA-Sonden	36
2.2.3.3.2	RNA-RNA-Hybridisierung und RNase-Verdau.....	37
2.2.3.4	Reverse Transkription zur cDNA-Synthese	38
2.2.3.5	Primer-Extensionsexperiment	39
2.2.3.5.1	Didesoxysequenzierung.....	39
2.2.3.5.2	Endmarkierung der Primer	40

2.2.3.5.3	Reverse Transkription und RNaseA-Verdau.....	40
2.2.3.5.4	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	41
2.2.4	Arbeiten mit DNA	42
2.2.4.1	Plasmid-DNA-Präparationen.....	42
2.2.4.1.1	Plasmidisolierung (analytischer Maßstab).....	42
2.2.4.1.2	Plasmidisolierung (präparativer Maßstab).....	43
2.2.4.2	Aufreinigung von DNA	44
2.2.4.2.1	Präzipitation von DNA mit Ethanol oder Isopropanol.....	44
2.2.4.2.2	Gelelektrophoretische Separation von DNA-Fragmenten.....	45
2.2.4.2.3	DNA-Isolation aus Agarosegelen.....	46
2.2.4.2.3.1	Präparation von Fragmenten bis 10 kb.....	46
2.2.4.2.3.2	Präparation von Fragmenten über 10 kb.....	46
2.2.4.2.4	Adsorptionschromatographie.....	47
2.2.4.2.5	Anionen-Austauschchromatographie	47
2.2.4.3	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	48
2.2.4.4	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.4.5	Deletionsklone	49
2.2.4.6	Mutationsklone	50
2.2.4.7	Enzymatische Modifikation von DNA	51
2.2.4.7.1	Sequenzspezifische DNA-Spaltung.....	51
2.2.4.7.2	Generierung glatter Enden aus 5'- und 3'-Überhängen.....	52
2.2.4.7.3	Dephosphorylierung von 5'-Enden	53
2.2.4.7.4	Ligation.....	54
2.2.4.8	Dideoxysequenzierung von DNA	54
2.2.4.9	Markierung von DNA-Molekülen.....	55
2.2.4.9.1	Radioaktive Markierung mittels T4 Polynukleotid-Kinase.....	55
2.2.4.9.2	Radioaktive Markierung mittels Klenow-Polymerase	56
2.2.4.10	Southern Blot-Analyse	57
2.2.5	Arbeiten mit Proteinen.....	58
2.2.5.1	Extraktion von Kernproteinen	58
2.2.5.2	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	60
2.2.6	DNA-Protein-Interaktion.....	60
2.2.6.1	Gelretardierungsexperimente.....	60
2.2.6.2	In vitro DNase I footprint	62
2.2.6.2.1	Chemische Sequenzierung.....	62
2.2.6.2.2	DNase I-Titration.....	64
2.2.6.2.3	Footprint	64
2.2.7	Kultur eukaryotischer Zellen.....	65
2.2.7.1	Verwendete Zelllinien	65
2.2.7.2	Isolation von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen	66
2.2.7.3	Präparation von Retinafaktor.....	67
2.2.7.4	Medien und verwendete Lösungen.....	67
2.2.7.5	Vermehrung, Haltung und Lagerung eukaryotischer Zellen.....	69
2.2.7.6	Transiente Transfektion.....	69
2.2.7.7	Simulierung hypoxischer Bedingungen.....	70
2.2.8	Reportergenanalysen	70
2.2.9	Transgene Mäuse	72
3	Ergebnisse	75
3.1	Hinweise auf eine endothelspezifische Expression von Hif-2 α	75
3.2	Klonierung des 5'-UTR des murinen Hif-2 α -Gens.....	76
3.3	Aktivität des Hif-2 α -Promotors in unterschiedlichen Zelllinien.....	88

3.4	Funktionalität der TATA-Box	89
3.5	Identifikation des Transkriptionsstartpunktes von Hif-2 α	90
3.5.1	Suche nach dem Transkriptionsstart durch RNase-Protektion	91
3.5.2	Definition des Transkriptionsstarts durch Primer-Extension	92
3.5.3	Räumliche Eingrenzung des Transkriptionsstarts durch PCR.....	93
3.6	Suche nach funktionellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen.....	94
3.6.1	Deletionsklonanalyse.....	95
3.6.2	Mutationsklonanalyse.....	101
3.7	Transkriptionsfaktor-Bindungsanalysen.....	104
3.7.1	Gelretardierungsexperimente.....	104
3.7.2	DNaseI footprint-Analyse.....	105
3.8	Analyse des Hif-2 α -Promotors in transgenen Mäusen	107
4	Diskussion	111
4.1	Die Promotoraktivität in unterschiedlichen Zelllinien gibt das Expressionsmuster <i>in vivo</i> wieder	111
4.2	Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Promotorstrukturelemente	112
4.3	Funktionelle Analyse der Hif-2 α - und Ets-1-Bindungsstellen.....	115
4.3.1	Erste Deletionsklon-Analyse	115
4.3.2	Überadditiver Effekt von Ets-1 und Hif-2 α auf den Hif-2 α -Promotor	116
4.3.3	Gezielte Deletionen von Ets-1- und Hif-2 α -Bindungsstellen	117
4.3.4	Gezielte Mutationen von Ets-1- und Hif-2 α -Bindungsstellen	118
4.3.5	Transkriptionsfaktor-Bindungsanalysen.....	119
4.4	Der Transkriptionsstartpunkt von Hif-2 α	119
4.5	Neuronale Expression im Transgenexperiment.....	120
5	Zusammenfassung	122
6	Literaturverzeichnis.....	124
7	Anhang	141
7.1	Oligonukleotide und Plasmide.....	141
7.2	Abkürzungen	146
7.3	Akademische Lehrer.....	148
7.4	Danksagung	149
7.5	Teilpublikationen.....	150

1 Einleitung

Das Verständnis der molekularen Grundlagen der Vaskularbiologie hat im Zusammenhang mit der Behandlung von Tumoren, aber auch sonstiger gefäßassoziiierter Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder Arteriosklerose, zunehmend an Bedeutung gewonnen. Insbesondere den Mechanismen, die der Blutgefäßneubildung zugrundeliegen, kommt bei der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten eine zentrale Rolle zu.

1.1 Das Blutgefäßsystem

Wirbeltiere benötigen ein Gefäßsystem, um die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie ganz allgemein die Aufrechterhaltung des inneren Milieus von Geweben und Organen zu gewährleisten. So werden über dieses System beispielsweise auch anfallende Abfallprodukte entsorgt und der Wasserhaushalt des Organismus reguliert. Das Blutgefäßsystem dient darüberhinaus auch der Lieferung unterschiedlichster Botenstoffe wie Hormone und Wachstumsfaktoren und als Transportweg für Zellen des Immunsystems, die die Blutgefäße über den offenen Kreislauf der Lymphgefäße erreichen können.

Um diese Aufgaben bestmöglichst erfüllen zu können, hat das Blutgefäßsystem der Wirbeltiere einen komplexen Aufbau. Es besteht aus großen Gefäßen, die einen schnellen Bluttransport gewährleisten, sich in den von ihnen versorgten Geweben und Organen dann aber so weit verzweigen, daß die entstehende große Oberfläche ideale Bedingungen für einen Stoffaustausch bietet. Außerdem sind die Blutgefäße durch unterschiedliche Spezialisierung der Endothelzellen, mit denen die Gefäße von innen ausgekleidet sind, optimal auf die Bedürfnisse der sie umgebenden Gewebe abgestimmt (Aird, 1997). Diese Heterogenität der Endothelien wurde auf der Ebene der Zellstruktur, der Antigen-Zusammensetzung, der RNA-Expression und der Zellfunktion beschrieben (Gerritsen, 1987; Kumar *et al.*, 1987; Turner *et al.*, 1987; Tomlinson *et al.*, 1991; Page *et al.*, 1992; Gerritsen und Bloor, 1993). So ermöglichen diskontinuierliche Endothelien in Knochenmark, Milz und Leber einen Austausch von Zellen und Partikeln durch die hier vorhandenen Lücken. Im Gehirn dagegen bildet das Endothel eine Barriere, die die Infiltration von Plasmakomponenten und zirkulierenden Zellen streng reguliert (zur Übersicht s. Risau, 1995). Neben diesen eher morphologischen Unterschieden kann es

aber auch durch die Synthese unterschiedlicher Oberflächenproteine zu einer Spezialisierung von Endothelien kommen. Im Knochenmarkendothel wird beispielsweise durch bestimmte Adäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche der Austausch von Vorläuferzellen und reifen Blutzellen zwischen Knochenmark und Kreislauf reguliert (Abbound, 1995).

1.2 Die Blutgefäßbildung

Das Kardiovaskuläre System ist das erste funktionale Organsystem des Wirbeltier-Embryos. Seine Entstehung erfolgt über zwei unterschiedliche Mechanismen (Risau, 1996). Der erste ist unabhängig von physiologischen Bedürfnissen der Gewebe, genetisch determiniert und damit in gewisser Weise autonom. So wird noch vor Beginn der Zirkulation ein Gefäßsystem angelegt, indem sich Blutgefäße aus Endothelzellen bilden, die sich von mesodermalen Vorläuferzellen, den Angioblasten ableiten. Dieser Vorgang wird als Vaskulogenese bezeichnet (zur Übersicht s. Risau und Flamme, 1995). Beim zweiten Mechanismus, der Angiogenese, entstehen neue Blutgefäße durch Aussprossung aus bereits existierenden Gefäßen. Dabei reagieren die differenzierten Endothelzellen über spezifisch aktivierte Gene und Oberflächenrezeptoren auf Umwelteinflüsse oder parakrine Stimuli, indem sie proliferieren, migrieren, reifen oder absterben. Auf diese Weise ist es dem mit Sauerstoff oder Nährstoffen unterversorgten oder proliferierenden Gewebe möglich, den Endothelzellen seine Bedürfnisse zu signalisieren, damit diese neue Gefäße ausbilden können (zur Übersicht s. Folkman und Shing, 1992).

1.2.1 Vaskulogenese

Der Prozess der Vaskulogenese (Gonzales-Crussi, 1971; Pardanaud *et al.*, 1987; Risau *et al.*, 1988; Risau, 1991; Poole und Coffin, 1989) beginnt im Dottersack, also außerhalb des Embryos. Dort entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle mesenchymalen Ursprungs, dem Hämangioblasten (His, 1900; Sabin, 1920), Zellstrukturen, die sog. Blutinseln. Diese setzen sich aus zwei verschiedenen Zelltypen zusammen: In der Peripherie gelegene, abgeflachte Angioblasten umschließen in ihrem Inneren abgerundete hämatopoetische Vorläuferzellen. Mesoderm-induzierende Faktoren aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) sind entscheidend

für ihre Entstehung (Risau, 1997). Angioblasten wandern aus den endothelialen Hüllen benachbarter Blutinseln aus und nehmen Kontakt miteinander auf. So entsteht ein Netz aus Angioblastensträngen, deren Lumen in die Lichtungen der Blutinseln münden, und damit ein primärer Gefäßplexus. Nur wenig später, im 1-Somiten-Stadium, bilden sich auch intraembryonal die ersten Angioblasten, allerdings ohne die Entstehung hämatopoetischer Vorläuferzellen in unmittelbarer Nähe. Bereits im 2-Somiten-Stadium erfolgt der Zusammenschluß von intra- und extraembryonalem Gefäßplexus. Die äußerst beweglichen intraembryonalen Angioblasten wandern als Einzelzellen oder Zellverbände und können an anderer Stelle in bereits existierende Gefäße eingebaut werden oder dort selber neue Gefäße bilden (Sabin, 1920; Coffin und Poole, 1988; Poole und Coffin, 1989). Die Tatsache, daß die Kopfregion von diesem Migrationsprozeß besonders betroffen ist, legt den Schluß nahe, daß hier Motilitäts- oder chemotaktische Faktoren für Angioblasten gebildet werden (Noden, 1989).

1.2.2 Angiogenese

Der primäre Gefäßplexus gewinnt rasch an Größe und dehnt sich auch in ursprünglich avaskuläre Strukturen wie die Anlage des Zentralnervensystems aus (Lierse, 1963; Nakao *et al.*, 1988). Dieser Vorgang, bei dem sich aus bereits existierenden Gefäßen neue bilden, wird Angiogenese genannt und spielt auch im adulten Organismus bei der Wundheilung, dem weiblichen Reproduktionszyklus oder bei der Vaskularisierung von Tumoren eine Rolle. Man unterscheidet zwischen sprießender und nicht-sprießender Angiogenese (Risau, 1997).

Die sprießende Angiogenese findet intra- und extraembryonal statt. Die proteolytische Aktivität, mit der sprießende Endothelzellen Komponenten der Extrazellulärmatrix degradieren und sich auf diese Weise den Weg bahnen, steht dabei zumindest teilweise unter der Kontrolle verschiedener Blutgefäßwachstumsfaktoren (Bacharach *et al.*, 1992; Pepper *et al.*, 1991). Das Ausmaß des Sprießens wird wahrscheinlich durch das Gleichgewicht zwischen Aktivatoren proteolytischer Enzyme und deren Inhibitoren reguliert.

Bei der nicht-sprießenden Angiogenese werden bereits existierende Gefäße gespalten, indem sich Einstülpungen extrazellulärer Matrix bilden, die das Gefäßlumen unterteilen. Während die sprießende Angiogenese vor allem dort stattfindet, wo bei Beginn eines schnellen Wachstums erst wenige Gefäße existieren, herrscht die nicht-sprießende

Angiogenese in solchen Organen vor, in denen sich endotheliale Vorläuferzellen befanden und die so bereits bei der Vaskulogenese bis zu einem gewissen Grad vaskularisiert wurden. Es ist aber auch eine Abhängigkeit von der Gewebearchitektur zu erkennen. So herrscht in Organen wie Lunge und Leber, in denen Blutgefäße die Zwischenräume vorgegebener Organstrukturen ausfüllen, die nicht-sprossende Angiogenese vor.

Im adulten Organismus stellt die Angiogenese den Hauptmechanismus der Blutgefäßneubildung dar. Es bedarf hierzu allerdings einer Signalgebung von außen, um die ruhende Endothelzelle wieder zu aktivieren (Engerman *et al.*, 1967; Risau, 1995). Als wichtigstes (Re-)Aktivierungssignal ist eine Unterversorgung mit Sauerstoff, die sog. Hypoxie zu nennen (zur Übersicht s. Fandrey, 1995).

Der eigentlichen Angiogenese folgt eine gewebespezifische Reifung der Blutgefäße, an der intra- und extraluminale Faktoren beteiligt sind (Steward und Wiley, 1981), sowie eine Umbildung des Gefäßsystems. Obwohl zunächst unabhängig von der Zirkulation entstanden, wird das Gefäßsystem später von Kräften beeinflusst, die durch den Blutfluß erzeugt werden. So gibt es zahlreiche Gene, die scherkraftsensible Elemente (*shear stress response elements*) enthalten (Resnick *et al.*, 1993; Davies und Tripathi, 1993). Diese sind an der Anpassung der Gefäßwände an die mechanischen Kräfte, denen sie ausgesetzt sind, beteiligt. Außerdem scheint ein ausbleibender Blutfluß den Abbau von Gefäßen zu begünstigen (Herre und Thompson, 1985). Auf diese Weise verkümmert ein Großteil der Kapillaren des primitiven Vaskularplexus. Diese Regression ist eng verbunden mit dem Tod von Endothelzellen und steht unter der Kontrolle der direkten Umgebung, unabhängig vom Ursprung der Endothelzellen (Hallmann *et al.*, 1987; Latker und Kuwabara, 1981).

1.3 Klinische Bedeutung der Blutgefäßentwicklung

Im adulten Organismus findet eine Gefäßneubildung unter physiologischen Bedingungen nur noch während der Wundheilung und dem weiblichen Reproduktionszyklus statt. Unter physiologischen Bedingungen ist die Angiogenese zeitlich genau reguliert. Bei zahlreichen Krankheiten ist diese Regulation nicht mehr gewährleistet, so daß es zu einer ungehemmten Gefäßneubildung kommen kann. So ist die Neovaskularisierung eine Begleiterscheinung vieler entzündlicher Erkrankungen und

wichtig für das Ausmaß ihrer Zerstörung. Bei der Arthritis verursacht beispielsweise das Einwachsen neuer Kapillaren ins Gelenk eine Zerstörung des Knorpels und beim Diabetis Mellitus kommt es durch die Einsprossung von Gefäßen aus der Retina in den Glaskörper zu Blutungen, die zu Blindheit führen (Folkman und Shing, 1992; Bategay, 1995).

Aber auch im Zusammenhang mit Krebserkrankungen spielt die Gefäßneubildung eine zentrale Rolle. So induzieren Tumorzellen über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren eine Migration und Proliferation benachbarter Endothelzellen, was zu deren Einwanderung ins Zentrum des Tumors, zu Gefäßneubildung und letztlich zu einer ausreichenden Versorgung des Tumors mit Sauerstoff führt (Folkman und Klagsburn, 1987; Pepper, 1997). Außerdem können Tumorzellen durch diese Blutgefäße in die Zirkulation gelangen und an anderer Stelle Metastasen bilden.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, ob die unter pathologischen Bedingungen neu entstandenen Gefäße sich von den übrigen unterscheiden und somit als Angriffspunkte für therapeutische Zwecke dienen können (zur Übersicht s. Rak *et al.*, 1995a; Lyden *et al.*, 1999; Baillie *et al.*, 1995). Desweiteren könnte im Hinblick auf die Behandlung bestimmter Krankheiten auch die Frage wichtig sein, ob zwischen Blutgefäßen verschiedener Gewebe unterschieden werden kann. Auch eine generelle Hemmung der Angiogenese ist als Therapiemöglichkeit in der Tumorbehandlung denkbar. So konnten im Tierversuch mit Hilfe verschiedener Angiogenese-Inhibitoren erste Erfolge bei der Behandlung metastasierender Krebserkrankungen erzielt werden (Folkman, 1995; O'Reilly, 1994). Während sich eine solche anti-angiogene Therapie eher zur Bekämpfung kleiner Tumoren oder zur Vermeidung der Metastasierung eignet, bietet sich der Angriff auf bereits existierende Gefäße zur Behandlung großer Tumoren an (Denekamp, 1993).

Aber auch die Induktion einer Neovaskularisierung ischämischer Gewebe, beispielsweise in unterversorgten Gliedmaßen oder Regionen des Herzmuskels, wird als möglicher Therapieansatz betrachtet (Baumgartner *et al.*, 1998; Losordo *et al.*, 1998).

1.4 Endotheliale Wachstumsfaktoren

1.4.1 VEGF und VEGF-Rezeptoren

Im Gegensatz zu den Mitgliedern der FGF-Familie, die vor allem während der Initialphase der Vaskulogenese eine wichtige Rolle spielen und ein breites Spektrum von Zielzellen für ihre mitogene Aktivität besitzen (zur Übersicht s. Baird und Walicke, 1989), ist die Wirkungsweise des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF (Ferrara und Henzel, 1989; Gospodarowicz *et al.*, 1989) als Blutgefäßwachstumsfaktor und spezifisches Mitogen für Endothelzellen klar umrissen. Neben seiner Funktion als Endothelzellwachstumsfaktor (Ferrara, 1993; Flamme *et al.*, 1995c) hat VEGF auch eine permeabilitätssteigernde Wirkung (Connolly *et al.*, 1989; Keck *et al.*, 1989; Connolly, 1991). Außerdem ist es an der Entstehung bzw. am Erhalt der Fenestrierung von Endothelien beteiligt, wie sie z.B. in den Nierenglomeruli und im Plexus choroideus anzutreffen sind (Esser *et al.*, 1998). Es existieren verschiedene VEGF-Isoformen, die durch alternatives Spleißen der mRNA aus einem einzigen Gen entstehen und durch Cystein-Brücken verbundene Dimere bilden (Breier *et al.*, 1997). Die besondere Bedeutung von VEGF für die Blutgefäßentwicklung spiegelt sich in der Tatsache wider, daß VEGF das einzige bekannte autosomale Gen ist, dessen hemizygoter Status letal ist (Ferrara *et al.*, 1996). Außerdem erfüllt VEGF alle Kriterien eines angiogenen Faktors: Es wird durch Hypoxie reguliert, unter angiogenen Bedingungen hochreguliert, von den produzierenden Zellen schnell sezerniert, bindet an endothelspezifische Rezeptortyrosinkinasen und aktiviert sie, während eine Hemmung seiner Aktivität oder seiner spezifischen Rezeptoren Angiogenese verhindert (Risau, 1996).

Zwei hochaffine VEGF-Rezeptoren sind bekannt (zur Übersicht s. Mustonen *et al.*, 1995): VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1 bei der Maus bzw. KDR beim Menschen), die beide fast ausschließlich auf Endothelzellen stark exprimiert werden (De Vries *et al.*, 1992; Terman *et al.*, 1992; Ferrara, 1999). So wird die endothelzell-spezifische Wirkung von VEGF gewährleistet, da VEGF in den verschiedensten Zelltypen exprimiert wird. Es handelt sich bei beiden Rezeptoren um transmembrane Rezeptortyrosinkinasen mit sieben extrazellulären Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen sowie einer geteilten intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Obwohl das

Ausschalten jeweils eines der beiden Rezeptoren bei der Maus letale Folgen hat (Fong *et al.*, 1995; Shalabi *et al.*, 1995) scheint Flk-1 für die Induktion der VEGF-Effekte von größerer Bedeutung zu sein (Waltenberger *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1994). So werden beispielsweise auch Transkription und Proteinexpression von KDR durch die Bindung von VEGF an KDR hochreguliert (Shen *et al.*, 1998). Wie wichtig Flk-1 gerade für die frühe Phase der Gefäßentwicklung ist, zeigt die Tatsache, daß eine Inaktivierung des *flk-1*-Gens die endotheliale Zelldifferenzierung verhindert, was zu einem völligen Ausbleiben der Blutgefäßbildung führt (Shalabi *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist Flt-1 nicht essentiell für die endotheliale Zelldifferenzierung, wohl aber für die Organisation embryonaler Gefäßstrukturen (Fong *et al.*, 1995). Ursache für die schweren Mißbildungen in der Gefäßentwicklung, die bei der Inaktivierung des *flt-1*-Gens beobachtet werden, ist eine starke Erhöhung der Zellzahl endothelialer Vorläuferzellen mesenchymaler Herkunft (Fong *et al.*, 1999). Dabei scheint allerdings die extrazelluläre Domäne, die eine höhere Affinität zu VEGF aufweist als die von Flk-1, von entscheidender Bedeutung zu sein. Mäuse, in denen das *flt-1*-Gen durch homologe Rekombination durch eine *flt-1*-Mutante ersetzt wurde, die keine Tyrosinkinasedomäne mehr enthält („*knock-in*“), weisen selbst im homozygoten Zustand keine abnorme Gefäßentwicklung auf. Die Aufgabe von Flt-1 scheint also nicht, wie bei einer klassischen Rezeptortyrosinkinase, eine starke Signaltransduktion zu sein, sondern die negative Regulation der VEGF-Konzentration in der Umgebung endothelialer Zellen während der Embryogenese durch die Bindung von VEGF (Hiratsuka *et al.*, 1998).

Eine ganze Anzahl von Faktoren reguliert die Expression von VEGF sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene, darunter Hypoxie, Hypoglykämie, Hormone, Zytokine (z.B. TGF- α , PDGF, bFGF) sowie verschiedene Onkogene (z.B. src, ras) und Tumor-Suppressor-Gene (z.B. p53, VHL) (Rak *et al.*, 1995b; Mukhopadhyay *et al.*, 1995 und 1997; Gnarra *et al.*, 1996; Dvorak, 2000).

1.4.2 Tie1 und Tie2/Tek

Bei Tie1 und Tie2 handelt es sich um zwei weitere endothelspezifische Rezeptortyrosinkinasen (Dumont *et al.*, 1992; Schnürch und Risau, 1993). Während für Tie1 noch keine Liganden bekannt sind, kann Tie2 von Angiopoietin-1 aktiviert werden (Davis *et al.*, 1996). Ein zweiter Ligand, Angiopoietin-2, kann Tie2 zwar nicht

aktivieren, konkurriert jedoch mit Angiopoietin-1 um die Bindung an den Rezeptor (Maisonpierre *et al.*, 1997). Tie1-defiziente Embryonen entwickeln fehlerhafte Endothelzellstrukturen: Die einzelne Endothelzelle wird durchlässig für Flüssigkeiten und sogar für ganze Zellen. In der Folge kommt es zu Ödembildung und Blutungen, die den Tod des Fetus herbeiführen (Sato *et al.*, 1995). Beim Ausschalten des *tie2/tek*-Gens kommt es, bedingt durch eine stark verringerte Endothelzellzahl, zu Defekten bei der embryonalen Blutgefäßbildung, die ebenfalls letal wirken (Dumont *et al.*, 1994). In beiden Fällen sterben die Embryonen allerdings erst später als die, denen VEGF oder einer der beiden VEGF-Rezeptoren fehlt, was den Schluß nahelegt, daß Tie1 und Tie2 ihre Wirkung erst in späteren Stadien der embryonalen Gefäßentwicklung ausüben. Beide Signaltransduktionssysteme (VEGF/VEGFR und Ang-1/Tie-2) scheinen kooperativ an der Angiogenese beteiligt zu sein (Yancopoulos *et al.*, 2000).

1.5 Genexpression und ihre Regulation

Die Expression eines Gens erfordert seine Umschreibung (Transkription) in eine mRNA, deren Prozessierung und anschließende Übersetzung (Translation) in ein Protein mit spezifischer Aminosäureabfolge (zur Übersicht s. Lewin, 1997). Zur Initiation der Transkription binden die RNA-Polymerase II und eine Vielzahl von Faktoren an den Transkriptionsstartpunkt des Gens bzw. an verschiedene regulatorische Regionen wie Promotor-, Verstärker- oder Repressorsequenzen. Spricht man bei der Beschreibung eines Gens von 5' bzw. 3', so meint man damit in NH₂-terminaler bzw. COOH-terminaler Richtung gelegen. Ein Promotor liegt in Transkriptionsrichtung vor der für ein Protein kodierenden Region eines Gens, im sog. 5'-flankierenden Bereich (5'-UTR), und steuert dessen Transkription. Zu den typischen Strukturelementen innerhalb eines Promotors zählen TATA-Box, CAAT-Box und GC-Box, die üblicherweise 30, 75 bzw. 90 bp oberhalb des Transkriptionsstarts liegen. Sie sind allerdings nicht bei allen Promotoren zu finden. Bei Verstärker- und Repressorsequenzen handelt es sich um unterstützende bzw. hemmende regulatorische DNA-Bereiche, die weiter entfernt vom Transkriptionsstart, manchmal sogar in benachbarten Introns, liegen können. Bei den Bindungsfaktoren unterscheidet man zwischen basalen, induzierbaren und *upstream*- sowie Transkriptionsfaktoren. Basale Faktoren interagieren mit der RNA-Polymerase, bilden einen den Transkriptionsstartpunkt umgebenden Komplex (basaler Transkriptionsapparat) und

legen damit die Initiationsstelle fest. Verschiedene 5' davon gelegene Konsensussequenzen werden von *upstream*-Faktoren erkannt, die ubiquitär vorkommen, die Effizienz der Initiation erhöhen und deren Aktivität nicht reguliert wird. Beide Klassen von Faktoren zusammen regeln die Expression der sog. Haushaltsgene. Den *upstream*-Faktoren ähnlich sind die induzierbaren Faktoren, die nur zu bestimmten Zeiten oder in bestimmten Geweben synthetisiert oder aktiviert werden, und so eine räumliche bzw. zeitliche Kontrolle über die Transkription ausüben. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die für die Transkriptionsinitiation benötigt werden, aber nicht selbst Teil der RNA-Polymerase sind. Sie erkennen spezifische Zielsequenzen in Verstärkerelementen, Promotoren oder anderen regulatorischen DNA-Regionen und bestehen aus zwei unterschiedliche Domänen, von denen die eine für die DNA-Bindung verantwortlich ist (DNA-Bindungsdomäne) und die andere die Transkription aktiviert (Transaktivierungsdomäne). Nur mit ihrer Hilfe kann die DNA-Polymerase eine Promotorregion erkennen und mit der Transkription beginnen.

Eine Regulation kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Genexpression stattfinden. So kann die DNA-Struktur in einen aktivierten Zustand versetzt werden, der bestimmte Bereiche eines Gens zugänglich und damit transkribierbar macht. Ebenso kann die Genaktivität über den Grad der Methylierung einzelner DNA-Abschnitte geregelt werden. Bei der Transkriptionsinitiation kann über zahlreiche Faktoren die Interaktion zwischen RNA-Polymerase und Promotor reguliert werden. Auch eine Einflußnahme auf den Transport der mRNA ins Zytoplasma ist möglich. Außerdem kann die Translation durch spezifische Proteinfaktoren blockiert werden.

Angiogeneserelevante Transkriptionsfaktoren sind entweder im Endothel (z.B. Ets-1, Scl, GATA-2) oder in Angiogenesefaktor-produzierenden Geweben zu erwarten (z.B. HIF-1 und HIF-2).

1.6 Wichtige Transkriptionsfaktoren der Angiogenese

1.6.1 Ets-1

Die ETS-Domänen-Familie besteht aus über 30 eukaryotischen Transkriptionsfaktoren (Janknecht und Nordheim 1993; Laudet *et al.*, 1993), die entweder als transkriptioneller Aktivator oder Repressor wirken (zur Übersicht s. Sharrocks *et al.*, 1997). Die ETS-DNA-Bindungsdomäne ist charakterisiert durch drei konservierte, durch 17-21 AS

getrennte Tryptophane (Karim *et al.*, 1990) und besteht aus drei α -Helices und einem viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt (Donaldson *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 1995). Die Ets-Proteine gehören zur Superfamilie der geflügelten *helix-turn-helix* (HTH) DNA-bindenden Proteine und binden an DNA-Sequenzbereiche mit der Konsensussequenz GGA^A/_T (Janknecht und Nordheim, 1992; Woods *et al.*, 1992). Die flankierenden Bereiche auf beiden Seiten dieser Kernsequenz machen die Spezifität aus, mit der verschiedene Ets-Proteine an diese Zielsequenz binden, dennoch können *in vitro* mehrere Ets-Proteine mit vergleichbaren Affinitäten an dieselbe Sequenz binden (Brown und McKnight, 1992). Die gezielte Bindung einzelner Ets-Proteine an ganz bestimmte Promotoren wird meist durch eine Kombination aus spezifischer DNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren erreicht. Außerdem werden viele von ihnen über signalabhängige Phosphorylierung reguliert. Daran kann z.B. das Proto-Onkogen Ras beteiligt sein, dessen Aktivierung zur MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase)-vermittelten Phosphorylierung einiger Ets-Proteine führt, darunter auch Ets-1 (Coffer *et al.*, 1994; Wasylyk *et al.*, 1997), und das an der Tumor-Angiogenese mitwirkt (Arbiser *et al.*, 1997). Die unter dem Einfluß von Ras stehenden Ets-Proteine scheinen selbst auch zur Onkogenese beizutragen (Dittmer und Nordheim, 1997). So werden Deregulation und Mutation von Ets-Proteinen hauptsächlich bei humanen Krebserkrankungen beobachtet. Besonders Ets-1 scheint in Bezug auf Metastasierung eine kritische Rolle zu spielen, da Ets-1 oft mit invasivem Verhalten von normalen Zellen sowie Krebszellen in Verbindung gebracht wird (zur Übersicht s. Dittmer und Nordheim, 1998). VEGF, dessen Rezeptoren Flt-1 und KDR den Ras-Raf-Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Pfad stimulieren und die Transkription von Genen aktivieren, die beim Anschalten des Angiogeneseprogramms mitwirken (Hood und Granger, 1998; Kroll und Waltenberger, 1997), induziert in Endothelzellen eine Ets-1-Expression (Iwasaka *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997). Dort wird der Transkriptionsfaktor Ets-1, der zu den transkriptionellen Aktivatoren zählt, während der Blutgefäßentwicklung im Embryo sowie während der Angiogenese im adulten Organismus transient exprimiert (Kola *et al.*, 1993; Pardanaud und Dieterlen-Lievre, 1993; Maroulakou *et al.*, 1994; Wernert *et al.*, 1994). Ein genregulatorisches Element für die spezifische Expression von Ets-1 in Endothelzellen konnte im ersten Intron des *ets-1*-Gens nachgewiesen werden (Jorcyk *et al.*, 1997). Außerdem wurde eine überlappende Expression von VEGFR-2 und Ets-1 während der Vaskulogenese sowie der Tumorangiogenese nachgewiesen (Wernert *et al.*, 1992). Mutmaßliche und

funktionelle Ets-1-Bindungsstellen wurden gefunden in den regulatorischen Sequenzen der Gene der VEGF-Rezeptoren (Kappel *et al.*, 1999; Wakiya *et al.*, 1996), im Tie1- und Tie2-Gen (Schlaeger *et al.*, 1997; Iljin *et al.*, 1999), in den Promotoren von Metalloproteinasen, die am Abbau der Extrazellulärmatrix während der Neubildung von Gefäßen beteiligt sind (Pepper und Montesano, 1990), im Promotor der β_3 -Untereinheit des Integrins $\alpha_v\beta_3$, das sich als wichtiger Faktor bei der Angiogenese herausgestellt hat (Cao *et al.*, 1993; Villa-Garcia *et al.*, 1994), sowie in vielen anderen endothelialen Genen (Iwasaka *et al.*, 1996; Watabe *et al.*, 1998; Schwachtgen *et al.*, 1997). Die DNA-Bindung von Ets-1, aber auch vieler anderer Ets-Proteine, wird über einen autoregulatorischen Mechanismus inhibiert, bei dem mehrere α -Helices außerhalb und innerhalb der ETS-Domäne kooperativ miteinander in Wechselwirkung treten und dabei die DNA-Bindedomäne maskieren (Jonsen *et al.*, 1996 ; Sharrocks *et al.*, 1997). Kalziumabhängige Phosphorylierung führt zu einer Stabilisierung des inhibitorischen Komplexes und unterdrückt auf diese Weise die Proteinaktivität, bis ein geeigneter Bindungspartner der Inhibition entgegenwirkt (Cowley und Graves, 2000). Für Ets-1 scheint es sich beispielsweise bei den beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und Sp1 um solche Bindungspartner zu handeln. So wurden funktionelle ETS- und AP-1-Bindungsstellen in vielen Enhancer-Elementen gefunden, so daß von einer Kooperation beider Faktoren ausgegangen werden kann (Crepieux *et al.*, 1994; Wisdom, 1999).

1.6.2 Die hypoxieinduzierbaren Faktoren HIF-1 und HIF-2

Zur oxidativen Phosphorylierung, der Hauptquelle der ATP-Erzeugung, aber auch für viele andere metabolische Prozesse benötigt die menschliche Zelle O_2 . Hypoxie, der Mangel an O_2 , schaltet eine ganze Serie von Genen an und spielt eine große pathophysiologische Rolle bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen sowie bei Krebsleiden (Fandrey, 1995; Semenza, 2000a). Man unterscheidet zwischen systemischer und lokaler Hypoxie (zur Übersicht s. Semenza, 1996). Lokale Hypoxie ist fast ausschließlich vaskulären Ursprungs und Folge von Gefäßverschlüssen, wobei sowohl die zelluläre O_2 -Versorgung, als auch die Anlieferung energetisch wichtiger Substrate und die Abfuhr der Metaboliten betroffen ist. Viele zellulären Antworten auf eine lokale Hypoxie, die innerhalb von Minuten bis Stunden ablaufen, setzen einen Wechsel in der Genexpression voraus. Schnellere Anpassungsreaktionen gehen auf eine Veränderung (z.B. die Phosphorylierung oder den Redox-Status betreffend) bereits

existierender Proteine zurück. Während bestimmte genetische Antworten zelltypspezifisch sind, scheint eine Hypoxie von allen Zellen detektiert und beantwortet werden zu können (Wang und Semenza, 1993a). Homöostatische Antworten auf Hypoxie können systemischer (z.B. erhöhte Erythropoese und Atmung), lokaler (z.B. Wechsel des Gefäßtonus und Neovaskularisation) oder zellulärer Natur sein (z.B. Übergang von der oxidativen Phosphorylierung zur Glykolyse). Auf zellulärer Ebene schaltet eine Hypoxie die Expression eines ganz bestimmten Satzes von Genen an, während die Aktivität der meisten anderen Gene stark vermindert wird (Fandrey, 1995).

Der hypoxieinduzierbare Faktor HIF-1 wurde bei Genexpressionsstudien des Erythropoietins (EPO) entdeckt, in dessen 3'-UTR er an ein hypoxieinduzierbares Verstärker-Element (HRE) bindet (Semenza und Wang, 1992; Semenza, 1994). Solche in Promotor- oder Verstärkerregionen gelegenen HREs wurden noch in zahlreichen anderen Zielgenen von HIF-1 gefunden, darunter Gene, deren Protein-Produkte an Angiogenese, Erythropoese, anaerobem Stoffwechsel, Zellwachstum und Überlebensfähigkeit, vasomotorischen Antworten, Atmung und Umbau des Gefäßsystems beteiligt sind (zur Übersicht s. Semenza, 2000b). Von besonderer Bedeutung hinsichtlich der Angiogenese ist die Regulation von VEGF durch HIF-1 (Forsythe *et al.*, 1996). Charakterisiert ist ein HRE durch ein oder mehrere HIF-1-Bindungsstellen (HBS) mit der Konsensussequenz 5'-TACGTG-3' sowie durch eine 3' davon gelegene zusätzliche Sequenz (HAS), die im Falle des VEGF-Gens die Konsensussequenz 5'-CAGGT-3' besitzt (Kimura *et al.*, 2001). An diese HAS bindet ein bislang noch nicht identifizierter Faktor HAF. Die Bindung an ein HRE konnte auch für HIF-2 und andere HIF-1-Homologe nachgewiesen werden (Tian *et al.*, 1997; Wiesener *et al.*, 1998; Takahata *et al.*, 1998).

Bei den Transkriptionsfaktoren HIF-1 und HIF-2 handelt es sich um *basic helix-loop-helix* (bHLH)-PAS-Heterodimere, bestehend aus einer HIF-1 α - bzw. HIF-2 α - sowie einer HIF-1 β -Untereinheit (Wang und Semenza, 1995; Wang *et al.*, 1995a). Letztere ist identisch mit dem *aryl hydrocarbon receptor (AHR) nuclear translocator* (ARNT), der als Untereinheit des AHR-Komplexes (AHRC), einem Heterodimer aus AHR und ARNT, beschrieben wurde (Hoffman *et al.*, 1991; Hankinson, 1995). Inzwischen wurden noch weitere eng strukturverwandte Proteine gefunden, von denen jeweils eine Untereinheit der Klasse I (HIF-1 α , -2 α oder -3 α) mit einer Klasse II-Untereinheit (ARNT, ARNT2 oder ARNT3) heterodimerisiert. Während HIF-1 α - und ARNT-

mRNA ubiquitär exprimiert wird, zeigen HIF-2 α , HIF-3 α , ARNT2 und ARNT3 ein wesentlich eingeschränkteres Expressionsmuster (Wenger *et al.*, 1996; Wiener *et al.*, 1996; Flamme *et al.*, 1997b; Jain *et al.*, 1998). Da sich sowohl bei HIF-1 α als auch bei HIF-2 α unter hypoxischen Bedingungen die Menge an mRNA nicht verändert, sondern nur die Proteinmenge ansteigt, scheint eine hypoxieabhängige Regulation auf posttranskriptioneller Ebenen stattzufinden (Huang *et al.*, 1996; Wiesener *et al.*, 1998; Hara *et al.*, 1999a). Dabei kommt es im Falle von HIF-1 α bereits nach einer weniger als zwei Minuten andauernden Hypoxie zu einer nachweisbaren Ansammlung von Protein. Der Proteinabbau, auf den später noch genauer eingegangen wird, dauert dagegen wesentlich länger (Jewell *et al.*, 2001).

Die einzelnen Proteindomänen besitzen jeweils unterschiedliche Funktionalitäten. HLH- und PAS(A)-Domäne sind für die Bildung von Heterodimeren verantwortlich, während die DNA-Bindung von der *basic*-Domäne und einer Region vermittelt wird, die die PAS(B)-Domäne beinhaltet (Wenger und Gassmann, 1997). Die PAS-Domäne scheint aber auch die Interaktion mit den an einer spezifischen DNA-Bindung beteiligten *cis*- und *trans*-bindenden Faktoren zu vermitteln (Zelzer *et al.*, 1997). Die beiden Transaktivierungsdomänen TAD-N (NH₂-terminal) und TAD-C (COOH-terminal) wurden in der COOH-terminalen Hälfte von HIF-1 α und HIF-2 α gefunden, umgeben von Sequenzen mit hemmenden und regulatorischen Eigenschaften (Jiang *et al.*, 1997a; Ema *et al.*, 1999; O'Rourke *et al.*, 1999; Maemura *et al.*, 1999).

Die molekularen Mechanismen, durch die ein Wechsel der O₂-Konzentration die Aktivität von HIF-1 und HIF-2 beeinflusst, sind zwar noch nicht abschließend geklärt, das O₂-Signal scheint jedoch in ein Redox-Signal umgewandelt zu werden (Chandel *et al.*, 2000), das eine Kinase-Kaskade anschaltet und/oder den Transkriptionsfaktor direkt reguliert (Chandel und Schumacker, 2000; Lando *et al.*, 2000). An dieser Kinase-Kaskade sind wahrscheinlich auch die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) p42/p44 und die Diazylglyzerolkinase (DGK) beteiligt (Richard *et al.*, 1999; Conrad *et al.*, 1999; Aragonés *et al.*, 2001). Auch die Mitwirkung eines Hämoproteins als O₂-Sensor wird diskutiert, obwohl bislang noch kein entsprechendes Protein gefunden werden konnte (Srinivas *et al.*, 1998; Goldberg *et al.*, 1988; Guillemín und Krasnow, 1997). Außerdem wurden in verschiedenen Zellen O₂-sensitive Ionenkanäle beschrieben (Buckler, 1997; Lopez-Barneo *et al.*, 1997; Peers und Buckler, 1995). Die Signaltransduktion von HIF-1 α und HIF-2 α erfolgt in mehreren unterschiedlichen Schritten, von denen einige aufgeklärt wurden und die alle hypoxieabhängig sind. Ein

Schritt ist der Transport des Proteins in den Zellkern mit Hilfe eines COOH-terminal gelegenen Kernlokalisierungssignals (Kallio *et al.*, 1998; Hara *et al.*, 1999b). Erst hier scheint auch die Heterodimerisierung stattzufinden (Chilov *et al.*, 1999b). Allerdings wurde für HIF-2 α auch eine Translokation in den Kern bereits unter normoxischen Bedingungen beschrieben (Hara *et al.*, 1999b).

Die Aktivität von TAD-C wird dort über eine Interaktion mit CBP/p300 reguliert (Kallio *et al.*, 1998; O'Rourke *et al.*, 1999), das bereits als Co-Aktivator verschiedener Transkriptionsfaktoren beschrieben wurde und mit seiner Histon-Azetyltransferase-Aktivität wahrscheinlich an der Umstrukturierung des Chromatins beteiligt ist (Shikama *et al.*, 1997; Bannister und Kouzarides, 1996). Auf diese Weise könnte CBP/p300 helfen, die DNA-Zielsequenz zugänglich für den Transkriptionsfaktor zu machen. TAD-N ist an der hypoxieinduzierten Stabilisierung des Proteins beteiligt. Bei Normoxie ist TAD-N Ziel des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes, der für den intrazellulären Proteinabbau und die daraus resultierende kurze Halbwertszeit des Proteins bei Normoxie zuständig ist (Pugh *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1996 und 1998; Ema *et al.*, 1999; Ciechanover, 1998; Wang *et al.*, 1995a). Vermittelt wird dieser Vorgang vermutlich durch das Tumorsuppressorgen *VHL* (Tanimoto *et al.*, 2000; Talks *et al.*, 2000). Eine analoge Rolle wird auch für *p53* beschrieben (Ravi *et al.*, 2000). Außerdem wurde die Existenz eines HIF-1 α *proteasome targeting factor* (HPTF) postuliert, dessen Expression unter direkter Kontrolle der HIF-1 α -vermittelten transkriptionellen Aktivität steht und der unter normoxischen Bedingungen durch Bindung an den HIF-1 α /VHL-Komplex dessen Interaktion mit dem Proteasom vermittelt (Berra *et al.*, 2001). Sowohl TAD-N als auch TAD-C zeigen bei HIF-2 α eine niedrigere Induzierbarkeit als bei HIF-1 α . Außerdem konnten Sequenzübereinstimmungen direkt mit funktionellen Gemeinsamkeiten in Verbindung gebracht werden, wobei weniger gut konservierte Regionen auch größere Unterschiede in der Funktion zeigten (O'Rourke *et al.*, 1999).

Der Dimerisierungspartner ARNT ist dagegen bereits bei Normoxie kernlokalisiert (Eguchi *et al.*, 1997). Auch seine transkriptionelle Aktivität und DNA-Bindung sind nicht hypoxieabhängig (Antonsson *et al.*, 1995). Die biologische Aktivität von HIF-1 und HIF-2 hängt also jeweils von der α -Untereinheit und nicht von ARNT ab. Jedoch wirkt ein Ausschalten jedes einzelnen der drei Gene (HIF-1 α , HIF-2 α oder HIF-1 β) embryonal letal (Kozak *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2000; Maltepe *et al.*, 1997).

Obwohl Mechanismen wie positive und negative Regulation der Rekrutierung von Koaktivatoren, Phosphorylierung, zellulärer Redox-Zustand und intrazelluläre Verteilung eine Rolle bei der Regulation der HIF-Aktivität spielen, wird diese doch hauptsächlich von der Stabilisierung ihrer α -Untereinheiten bestimmt (Talks *et al.*, 2000).

Mehrere unterschiedliche Isoformen des HIF-1 α -Proteins wurden bei der Maus, nicht aber beim Menschen beschrieben (Iyer *et al.*, 1998a). So wurden zwei alternative Promotoren und daraus resultierend auch zwei unterschiedliche mRNA-Isoformen mit verschiedenen 5'-UTRs gefunden (Wenger *et al.*, 1997).

1.7 Die Funktionen von HIF-1 α und HIF-2 α im Vergleich

HIF-2 α (HRF/EPAS-1/HLF/MOP-2) ist mit einer Homologie von 48% dem Transkriptionsfaktor HIF-1 α eng verwandt und wurde bereits aus Mensch, Maus, Wachtel und Ratte kloniert (Flamme *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1997; Ema *et al.*, 1997; Hogenesch *et al.*, 1997; Elvert *et al.*, 1999; Ladoux und Frelin, 1997). Beide Faktoren teilen viele Gemeinsamkeiten: Sie heterodimerisieren mit etwa gleicher Affinität mit Arnt (Ema *et al.*, 19997), binden an die gleiche DNA-Zielsequenz (HRE), verhalten sich unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ihre Expression betreffend (Hemmung bzw. Induktion) in übereinstimmender Weise, und auch die Mechanismen, mit denen ihre Expression durch ein O₂-Signal beeinflusst wird, sowie der Ablauf ihrer Signaltransduktion scheint nach einem ähnlichen Muster abzulaufen (Wiesener *et al.*, 1998). Eine weitere Gemeinsamkeit beider Faktoren ist ihre Induktion unter Hypoxie, die jedoch unterschiedlich stark ausfällt. Demnach scheint HIF-2 α unter normoxischen und weniger schwer hypoxischen Bedingungen eine größere Rolle zu spielen als HIF-1 α (Wiesener *et al.*, 1998; O'Rourke *et al.*, 1999).

Eine Abhängigkeit der DNA-Bindung vom Redox-Zustand konnte für HIF-2 α , nicht jedoch für HIF-1 α nachgewiesen werden (Lando *et al.*, 2000). Dies stellt den ersten Beweis für einen Unterschied in der Kontrolle der Aktivität beider Faktoren dar. Ihre NH₂-terminal gelegenen, DNA-bindenden *basic*-Domänen unterscheiden sich in nur einer Aminosäure. An Stelle eines Serins bei HIF-1 α tritt bei HIF-2 α ein Cystein, das durch den Redoxfaktor 1 (Ref-1) im reduzierten Zustand gehalten werden kann. Dieser wurde für viele Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise AP-1, CREB, ATF-1 und p53 als der zur vollen Aktivität notwendige Zustand beschrieben (Lando *et al.*, 2000).

Trotz nahezu identischer bHLH-Domänen wurden für HIF-1 α und HIF-2 α unterschiedliche Zielgene beschrieben, viele Gene werden aber von beiden Faktoren (meist unterschiedlich stark) aktiviert. So wird der VEGF-Promotor beispielsweise stärker von HIF-2 α aktiviert als von HIF-1 α (Wiesener *et al.*, 1998). Andererseits aktiviert HIF-2 α , nicht jedoch HIF-1 α , die Transkription des *Flk-1*- und *Tie2*-Gens, wobei Ets-1 an der Aktivierung des Flk-1-Promotors in synergistischer Weise mitwirkt (Tian *et al.*, 1997; Kappel *et al.*, 1999; Elvert, 2000).

Das Ausschalten der Gene für HIF-1 α und HIF-2 α wirkt zwar in beiden Fällen embryonal letal, die auftretenden Schäden sind aber unterschiedlicher Natur. Im Falle von HIF-1 α kommt es neben einer Verminderung der Anzahl an Somiten und einer fehlerhaften Entwicklung der Neuralfalte zu einem fast vollständigen Ausbleiben der Vaskularisation im Kopfbereich, obwohl Herz und dorsale Aorta normal ausgebildet sind (Ryan *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 1998b). HIF-1 α scheint also eher an der Entwicklung kapillarer Netzwerke als an der Ausbildung großer Gefäße beteiligt zu sein, die wiederum vom Ausschalten des VEGF-Gens stark betroffen sind. HIF-2 α -defiziente Mäuse sterben später, wobei hier zwei völlig unterschiedliche Phänotypen beschrieben wurden. Tian *et al.* (1998) konnte keine augenfälligen vaskulären Defekte feststellen, beobachtete aber einen signifikant erniedrigten Katecholamin-Spiegel und eine ausgesprochene Bradykardie, während Peng *et al.* (2000) trotz normal verlaufender Vaskulogenese fehlerhafte Interaktionen zwischen bereits ausgebildeten Blutgefäßen feststellte, so daß die Embryonen an diesen vaskulären Defekten starben. Dies deutet auf zwei unterschiedliche Aufgaben von HIF-2 α hin, die Regulation der Katecholamin-Produktion und der Gefäßumbildung.

Während HIF-1 α ubiquitär exprimiert wird, wurden für HIF-2 α spezifische Expressionsmuster beschrieben. Eine starke Expression von HIF-2 α -mRNA wurde in Endothelzellen der Hirnkapillaren in Embryo und adultem Organismus, aber auch in anderen vaskulären Strukturen wie Nierenglomeruli, Plexus Choroideus und in Arterien der Milz detektiert. Aber auch in Lunge, Herz, Leber und Plazenta konnten größere Mengen an HIF-2 α -mRNA nachgewiesen werden (Tian *et al.*, 1997; Ema *et al.*, 1997; Flamme *et al.*, 1997). Eine Expression war allerdings nicht auf Endothelien beschränkt, sondern wurde auch in glatten Muskelzellen, Epithelien und Neuronen gefunden. Außerdem konnte eine gewisse Korrelation zur Expression von VEGF festgestellt werden (Flamme *et al.*, 1997, Ema *et al.*, 1997). Die erhöhte Expression von HIF-2 α in Lunge und Endothelzellen könnte auf eine Rolle dieses Faktors bei der Ausbildung

tubulärer Strukturen durch Endothel- und Epithelzellen hindeuten, die zur Entstehung von Bronchien und Blutgefäßen führen (Flamme *et al.*, 1997; Ema *et al.*, 1997). In jüngerer Zeit wurde allerdings im Gegensatz dazu auf Proteinebene in adulten Geweben für HIF-1 α und HIF-2 α eine nur geringe, ubiquitäre Expression beschrieben, mit der Ausnahme des Knochenmarks, wo die Expression von HIF-2 α in einer größeren Anzahl von Makrophagen beobachtet wurde (Talks *et al.*, 2000). Außerdem wurde die Expression von HIF-2 α , aber auch von HIF-1 α in den verschiedensten Tumorzellen beschrieben (Talks *et al.*, 2000).

Darüberhinaus besteht eine enge Verbindung zwischen beiden Faktoren und der Entstehung von Tumoren. So reicht die in der Mikroumgebung von Tumoren herrschende Hypoxie aus, um die HIF-abhängige Genexpression zu aktivieren (Dachs *et al.*, 1997). Auch Mutationen, die Onkogene aktivieren (z.B. *v-src*) oder Tumorsuppressorgene inaktivieren (z.B. *VHL*, *p53*), bewirken eine erhöhte HIF-Aktivität und die Transkription der Gene für VEGF und Enolase 1 (Jiang *et al.*, 1997b; Tanimoto *et al.*, 2000; Maxwell *et al.*, 1997 und 1999; Ravi *et al.*, 2000). HIF-1 α und HIF-2 α werden also in Tumoren konstitutiv stabilisiert, bedingt sowohl durch physiologische Signale (Hypoxie) als auch durch genetische Veränderungen. So spielt HIF-2 α möglicherweise eine Rolle im VEGF-abhängigen Gefäßwachstum in Hämangioblastomas (Flamme *et al.*, 1998). Bei der Untersuchung menschlicher Brustkrebs-Zelllinien wurde für HIF-1 α und HIF-2 α neben ihrer Rolle in der für das Tumorwachstum wichtigen Gefäßeinsprossung eine weitere, zunächst konträr erscheinende Rolle postuliert, die Induktion von Apoptose (Blancher *et al.*, 2000). Für ein aggressives Tumorwachstum müßte demnach einerseits die HIF-vermittelte Apoptose überwunden werden, andererseits wäre eine minimale Induktion von HIF-Protein unablässig für die Tumorangiogenese, so daß der Endeffekt von der Balance zwischen beiden HIF-Wirkungen abhinge. So könnte also eine Tumorthherapie, die auf einer Hemmung der Tumorangiogenese mit HIF als Angriffspunkt beruht, ungewollt zum Überleben der Krebszellen beitragen.

1.8 Endothelspezifische genregulatorische Elemente

VEGF und die VEGF-Rezeptoren repräsentieren den ersten endothelzellspezifischen Signalübertragungsweg, der während der Gefäßentwicklung aktiviert wird (Fong *et al.*, 1995). Bei Mäusen mit einem homozygoten Defekt des VEGF-Rezeptors-2 (*Flk-1*)

fehlen reife Endothelzellen und Blutgefäße vollständig (Shalaby *et al.*, 1995 und 1997). *Flk-1* wird in der späten Embryonalentwicklung stark auf Endothelzellen exprimiert, während in den meisten adulten Blutgefäßen keine *Flk-1*-Expression nachweisbar ist (Yamaguchi *et al.*, 1993). Lediglich in Tumor-Endothelzellen kann eine starke Induktion der *Flk-1*-Expression beobachtet werden (Millauer *et al.*, 1994 und 1996). Um festzustellen, welche Sequenzbereiche für die endothelspezifische Expression von *Flk-1* verantwortlich sind, wurden entsprechende Promotorstudien durchgeführt (Rönicke *et al.*, 1996). Dabei konnte ein 939 bp großer Bereich im *Flk-1*-Promotor und 5'-UTR sowie ein 2270 bp großes Verstärkerelement im ersten Intron von *Flk-1* identifiziert werden, welche zusammen eine endothelzellspezifische Expression in transgenen Mäuseembryonen bewirken. Da das Verstärkerelement aus dem ersten Intron auch *in vivo* den heterologen *tk*-Promotor in Endothelzellen aktivieren kann, und zwar abhängig von seiner Orientierung, erfüllt es alle Kriterien eines autonomen, gewebespezifischen Verstärkerelementes (Kappel *et al.*, 1999). Genau wie beim Endothelrezeptor *TIE2*, enthält auch das Verstärkerelement aus dem ersten Intron von *Flk-1* zahlreiche potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen der Ets- und GATA-Familie.

Auch für den Angiopoietin-Rezeptor *TIE2* wurde ein 1,7 kb großes, autonomes, endothelspezifisches Verstärkerelement im ersten Intron gefunden, das, kombiniert mit einem 2,1 kb großen *TIE2*-Promotorfragment, zu einer ganz spezifischen Aktivierung embryonaler und adulter Endothelzellen führt (Schlaeger *et al.*, 1995 und 1997).

1.9 Eigene Fragestellungen

Nachdem bei Untersuchungen mehrerer Promotoren eine in transgenen Mäusen auf Endothelien beschränkte Expression gezeigt werden konnte (Schlaeger *et al.*, 1995 und 1997; Kappel *et al.*, 1999), stellt sich die Frage, ob auch im Promotor von HIF-2 α Strukturelemente gefunden werden können, die Endothelzellspezifität vermitteln. Zu diesem Zweck mußte der Promotor kloniert, sein Transkriptionsstartpunkt ermittelt und der basale Promotor identifiziert werden. Die bei Sequenzanalysen ermittelten potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen sollten durch Sequenzvergleiche der Gene von HIF-2 α -Orthologen anderer Spezies auf ihre Konservierung hin untersucht und in Reportergermanalysen und Bindungsassays auf ihre Funktionalität hin geprüft werden. Die Aktivität wichtiger Promotorelemente sollten abschließend in transgenen

Mäusen untersucht werden. Dabei lag die Einbeziehung unterschiedlicher Bereiche aus dem ersten Intron nahe, da dort beispielsweise bei Flk-1, Tie2 oder Ets-1 endothelspezifische Verstärkerregionen gefunden werden konnten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

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

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

Das verwendete dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) wurde von Pharmacia/Uppsala (Schweden) bezogen.

2.1.2 Enzyme

Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs/Bad Schwalbach bezogen. Folgende modifizierende Enzyme wurden benutzt: Klenow-Fragment der DNA-Polymerase, RNase A, RNase T1, DNase I, T4 Polynukleotid-Kinase, T4 DNA-Ligase und T4 DNA-Polymerase von der Firma Boehringer/Mannheim, Taq DNA-Polymerase von Promega/Heidelberg, RNAGuard RNase Inhibitor, T7 DNA Polymerase und alkalische Phosphatase (Calf Intestinal Mucosa) von Pharmacia/Uppsala (Schweden), TaKaRa ExTaq von TAKARA SUZO Co. Ltd./ Otsu (Japan), Superscript II Reverse Transkriptase, T3 RNA Polymerase und T7 RNA Polymerase von Gibco BRL/Eggenstein, PfuTurbo DNA Polymerase von Stratagene/La Jolla (USA).

2.1.3 Antikörper

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

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

Polyklonale Antikörper: α -HIF-2 α (Kaninchen; Gerd Elvert, Promotion 2001)

2.1.4 Fertige Reagenzienansätze

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

Die in Reporteranalysen eingesetzten Mutationsklone wurden mit Hilfe des „QuikChange[™] XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene/La Jolla (USA) hergestellt.

Die im Rahmen der Primer-Extensionsexperimente vorgenommenen Sequenzierungen wurden mit dem „T7 Sequencing Kit“ von Amersham/Braunschweig durchgeführt.

Zur Durchführung der RNase-Protektionsexperimente wurde das „RNase Protection Kit“ von Boehringer/Mannheim verwendet.

2.1.5 Lösungen

2.1.5.1 Pufferlösungen

100 x Denhardt's Puffer:	2% (w/v) Ficoll (Typ 400, Pharmacia/Uppsala)
	2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon
	2% (w/v) BSA, Fraktion V
	in DEPC-H ₂ O
PBS:	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	4,3 mM Na ₂ PO ₄
	1,4 mM KH ₂ PO ₄
20 x SSC (NaCl-Natriumzitat):	3 M NaCl
	0,3 M Natriumzitat (pH 7,0)
1 x TBE (Tris-Borat-EDTA):	90 mM Tris-Borat
	2,5 mM EDTA (pH 8,3)

1 x TAE (Tris-Azetat-EDTA):	40 mM Tris-Azetat 1 mM EDTA (pH 8,1)
1 x TE (Tris-EDTA):	10 mM Tris/HCl 0,1 mM EDTA (pH 7,4)
SM-Puffer:	5,8 g NaCl 2 g MgSO ₄ (x 7 H ₂ O) 5 ml 2% (w/v) Gelatine ad 1 l H ₂ O

2.1.5.2

Medien

LB-Medium:	2% (w/v) LB-Broth (Gibco BRL/Eggenstein) in H ₂ O
LB-Agar:	2% (w/v) LB-Broth 1,5% (w/v) Bacto-Agar (Difco/Augsburg) in H ₂ O
Phagen-LB-Medium:	21 g NZYDT-Broth (Gibco BRL/Eggenstein) ad 1 l H ₂ O
Phagen-Bottom-Agar:	1 l Phagen-LB-Medium 15 g Bacto-Agar (Difco/Augsburg)
Phagen-Top-Agar:	1 l Phagen-LB-Medium 8 g Agarose (Gibco BRL/Eggenstein)
NZY+ Medium:	10 g LB-Broth ad 500 ml H ₂ O (pH 7,5) nach dem Autoklavieren 6,25 ml 1 M MgCl ₂ , 6,25 ml 1 M Mg SO ₄ und 5 ml 2 M Glukose zugeben, sterilfiltrieren

Die Medienlösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert. Zur Selektion plasmidtragender Bakterien nach deren Transformation wurden 50 µg Ampizillin bzw. 25 µg Kanamycin (Boehringer/Mannheim) pro ml Medium bzw. die doppelte Menge Antibiotikum pro ml Agarlösung zugesetzt.

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Filme:	X-OMAT LS und BioMax MR Eastman Kodak Comp./Rochester, USA
Gewebekulturgefäße:	Greiner/Frickenhausen, Nunc/Wiesbaden
Pipettenspitzen:	Eppendorf/Hamburg, Starlab/Helsinki, Finnland
Reaktionsgefäße:	Eppendorf/Hamburg, Starlab/Helsinki, Finnland Biozym/Hess. Oldendorf, Becton Dickinson/Heidelberg
Filter und Membranen:	Schleicher&Schuell/Dassel

2.1.7 Geräte

Heizblöcke:	Dry Block Heater (Starlab/Helsinki, Finnland) Thermomixer 5436 (Eppendorf/Hamburg)
Inkubatoren:	Brutschrank für Bakterienkultur BD53 (Binder/Tuttlingen) CO ₂ -begasbarer Brutschrank für Zellkultur EC-CO2 (Heraeus/Hanau) CO ₂ -begasbarer Brutschrank für Zellkultur NU-4500E (Nuair/Plymouth, USA) Schüttelinkubator Certomat HK + U (Braun/Melsungen)
Mikroskope:	Axioskop mit Photoanlage MC80 (Zeiss/Jena) Axiomvert135 (Zeiss/Jena)
Netzgeräte:	Modell E833 (Consort/Turnhout, Belgien) Modell E865 (Consort/Turnhout, Belgien)
PCR-Geräte:	GeneAmpPCR System 9600 (Perkin Elmer/Überlingen) PCR Block Primus (MWG/Ebersberg)
Photometer:	Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech/Little Chalfont, GB)
Pipetten:	Pipettensatz Eppendorf Research (Eppendorf/Hamburg) Pipettensatz PIPETMAN P (Gilson/Villiers-Le-Bel, Frankreich)
Schüttler:	Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc/Bohemia, USA)
Waagen:	Feinwaage Analytic AC210S (Sartorius/Göttingen) Laborwaage EW600-2M (Kern/Albstadt)
Wasserbad:	Julabo U2 (Julabo Labortechnik GmbH/Seelbach)

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

2.2 Methoden

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

2.2.1 Bakterien

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

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

2.2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

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

DH5α

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

XL 1-Blue MRA

Produktinformation Stratagene/La Jolla (USA): Bakterienstamm, der sich zur Vermehrung von Bakteriophagen λ-Vektoren eignet (Borck *et al.*, 1976; Murray *et al.*, 1977)

2.2.1.2 Vermehrung und Lagerung

Die Anzucht von *E.coli*-Zellen erfolgte durch Animpfen von LB-Medium mit einer Einzelkolonie und Vermehrung durch Inkubation in einem Schüttler über Nacht bei 37°C. Für Dauerkulturen zur längeren Lagerung wurden 500 µl Bakteriensuspension mit 215 µl sterilem 50%igem Glycerin vermischt und bei -20°C gelagert.

Um die Bakterien erneut in Kultur zu nehmen, wurde mit einer sterilen Impfföse ein Abstrich der tiefgefrorenen Lagerkultur auf einer LB-Agarplatte gemacht.

2.2.1.3 Herstellung und Transformation kompetenter E.coli-Zellen

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

2.2.1.3.1 Chemischkompetente Bakterien

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

Material:

Bakterienstamm:	DH5 α
LB-Medium	
Kalziumchloridlösung:	0,1 M CaCl ₂
Magnesiumchloridlösung:	0,1 M MgCl ₂
Glyzerin:	100%

Durchführung:

100 ml steriles LB-Medium wurden aus einer Übernachtskultur von *E. coli*-Zellen (DH5 α) angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (bei einer Wellenlänge von 590 nm) von 0,375 inkubiert. Die Zellen befanden sich nun in einer Wachstumsphase, in der sie für die folgende Behandlung besonders empfindlich waren. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und für 15 min im HB-4 Rotor bei 3000 Upm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterienniederschläge vorsichtig in je 100 ml Magnesiumchloridlösung resuspendiert und 5 min bei 2500 Upm und 4°C im HB-4 Rotor zentrifugiert. Die Bakterienniederschläge wurden in 50 ml eiskalter Kalziumchloridlösung aufgenommen und erneut zentrifugiert. Schließlich wurden die Bakterien in 5 ml Kalziumchloridlösung resuspendiert, 880 μ l Glyzerin zugegeben und in 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so präparierten Zellen

konnten direkt für Transformationen verwendet, oder bei -80°C zwei bis drei Monate gelagert werden. Alle Inkubationsschritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt.

Zur Transformation wurden $50\ \mu\text{l}$ kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit $10\ \mu\text{l}$ Plasmidlösung vermischt und $30\ \text{min}$ auf Eis, $2\ \text{min}$ bei 42°C und erneut $2\ \text{min}$ auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von $500\ \mu\text{l}$ LB-Medium wurde der Transformationsansatz $1\ \text{h}$ bei 37°C und $200\ \text{Upm}$ geschüttelt und dann auf LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen. Nach kurzem Antrocknen wurden die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bis zur weiteren Bearbeitung konnten die Platten bei 4°C gelagert werden.

Es wurden mehrere Kontrollen durchgeführt:

Negativkontrolle

Als Negativkontrolle wurden anstatt des Vektors $10\ \mu\text{l}$ H_2O verwendet. So behandelte kompetente Zellen sollten auf LB/Amp-Agarplatten nicht wachsen.

Ligationskontrolle

Wurde bei einer Ligation ein neuer Vektor eingesetzt, so mußte dieser bei der anschließenden Transformation getestet werden. Um zu überprüfen, ob in der Vektorpräparation noch ungeschnittene Vektor-DNA vorhanden war, wurden kompetente Zellen mit dem nichtligierten Vektor transformiert.

2.2.1.3.2 *Elektrokompetente Bakterien*

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

Material:

Bakterienstamm:	DH5 α
LB-Medium	
Glyzerinlösung:	10% (v/v) in sterilem H_2O

Durchführung:

Ein Liter einer Bakterienkultur mit der optischen Dichte von 0,56 bei einer Wellenlänge von 590 nm wurde in Eiswasser abgekühlt und bei 4000 x g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Bakterienniederschlag vorsichtig in 1 l eiskalter Glycerinlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500 ml, 250 ml und schließlich mit 3 ml Glycerinlösung wiederholt. Die Bakteriensuspension wurde in 100 µl Aliquots aufgeteilt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

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

2.2.2 Arbeiten mit einer Phagen-cDNA-Bank

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

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

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

2.2.2.1 Ausplattieren einer Phagenbank

Material:

Phagen-LB-Medium

Phagen-Bottom-Agar

Phagen-Top-Agar

SM-Puffer

Magnesiumsulfatlösung: 10 mM

Bakterienstamm: XL 1-Blue MRA

Lambda Fix[®] II-Phagenbank Stratagene/La Jolla (USA)

Durchführung:

10 ml einer Übernachtskultur von *E.coli* des Stammes XL 1-Blue MRA in Phagen-LB-Medium wurden bei 4000 x g für 10 min zentrifugiert und der Niederschlag in 15 ml Magnesiumsulfatlösung aufgenommen. Diese Suspension wurde mit Magnesiumsulfatlösung auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und bei 4°C gelagert. Die Phagenbank wurde zur Titerbestimmung 1:1000 in SM-Puffer verdünnt, 1 µl, 10 µl und 100 µl Aliquots mit je 600 µl Bakterienlösung vermischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien-Phagen-Suspension wurde mit 6 ml Top-Agar, der auf 48°C vorgewärmt worden war, gemischt und auf eine angewärmte Bottom-Agarplatte gegossen. Nach 12 bis 16 Stunden bei 37°C waren bei ausreichender Verdünnung der Phagen auf dem Bakterienrasen Lyse-Plaques zu erkennen, die jeweils von einem Phagenklon stammten. Nach Auszählen der Plaques konnte der Titer der Phagenbank berechnet werden.

2.2.2.2 Durchsuchen einer ausplattierten Phagenbank

Material:

Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

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

1,5 M NaCl

SM-Puffer

Nitrozellulosefilter: Schleicher&Schuell/Dassel

Durchführung:

6 ml der wie oben beschrieben kultivierten Bakterien wurden mit 500000 pfu (phage forming units) gemischt, 15 min bei 37°C inkubiert und jeweils 600 µl auf einer 10 cm-Schale ausplattiert (s. 2.2.2.1). Nach 12 bis 16 Stunden Inkubation bei 37°C und einer Stunde bei 4°C wurden von jeder Platte zwei Nitrozellulosefilter abgezogen, indem die Filter jeweils für 60 sek aufgelegt und nach Markierung der Position durch Nadelstiche vorsichtig wieder entfernt wurden. Anschließend wurden sie mit der Rückseite erst für 2 min auf ein mit Denaturierungslösung und dann für 5 min auf ein mit Neutralisierungslösung getränktes Papiertuch gelegt. Nach dreiminütiger Inkubation mit 2 x SSC und Lufttrocknung wurde die Phagen-DNA durch zweistündiges Backen bei 80°C kovalent an die Membran gebunden.

Die Identifizierung der gesuchten Phagenklone erfolgte analog 2.2.4.10. Der zweite Nitrozellulosefilter diente dabei als Kontrolle, um falsch positive Signale zu erkennen. Da die Position der Filter beim Abziehen durch Nadelstiche markiert worden war, konnten die positiven Signale auf den Filmen den entsprechenden Phagenklonen zugeordnet werden. Die so identifizierten Plaques wurden mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette aus der Agarose ausgestochen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml SM-Puffer und 20 µl Chloroform für eine Stunde bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Die in den Puffer diffundierten Phagen konnten bei 4°C gelagert werden.

Da beim Ausstechen eines Plaques mehrere Phagenklone gepickt worden sein konnten, wurde die Phagensuspension erneut ausplattiert und hybridisiert, um den positiven Klon zu vereinzeln. Traten neben positiven Lyse-Plaques auch solche auf, die nicht mit der Sonde hybridisierten, wurde wieder ein positiver Phagenklon ausgestochen, ausplattiert und hybridisiert, solange bis alle Lyse-Plaques mit der Sonde hybridisierten.

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

Puffer L1:	20 mg/ml RNase A, 6 mg/ml DNase I, 0,2 mg/ml BSA, 10 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl (pH 7,5)
Puffer L2:	30% (w/v) Polyethylenglycol (PEG 6000), 3 M NaCl
Puffer L3:	100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 7,5)
Puffer L4:	4% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Puffer L5:	2,55 M Kaliumazetat (pH 4,8)

Durchführung:

$2,5 \times 10^7$ Phagen (pfu) wurden mit 5×10^9 Bakterienzellen XL 1-Blue MRA gemischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 250 ml Phagen-LB-Medium damit angeimpft und über Nacht bei 30°C geschwenkt. Mit Hilfe des „Lambda DNA Maxi Preparation Kit“ von Qiagen/Hilden wurde die genomische DNA gewonnen.

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

Analog zu der Präparation von Plasmid-DNA (s. 2.2.4.1.2) erfolgte anschließend die Aufreinigung über Qiagen Tip 500 Säulen, Fällung mit Isopropanol und Waschen mit 70% (v/v) Ethanol. Die kurz getrocknete DNA wurde in 100 µl H₂O aufgenommen.

Zur Identifizierung der präparierten DNA wurden Restriktionsfragmente und/oder durch PCR-Reaktionen erhaltene Abschnitte der DNA sequenziert.

2.2.3 Arbeiten mit RNA

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

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Material:

PBS

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

Durchführung:

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

2.2.3.2 Northern Blot-Analyse

2.2.3.2.1 Elektrophorese im denaturierenden Formamid-Agarosegel

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

Material:

RNA-Gellaufpuffer: (10 x)	200 mM MOPS 50 mM NaAc 10 mM EDTA (pH 7,0)
Elektrophoresepuffer:	einfach konzentrierter Gellaufpuffer
RNA-Ladepuffer: (5x)	1 mM EDTA 0,1% Bromphenolblau (w/v) 0,1% Xylencyanol (w/v) 80% Formamid (v/v) (pH 8,0)
Agarose	
Ethidiumbromid-Färbelösung: DEPC-H ₂ O	20 µg Ethidiumbromid in 100 ml DEPC-H ₂ O
Formaldehyd:	37% (v/v)

Durchführung:

1,2 g Agarose wurden mit 80 ml DEPC- H₂O und 10 ml RNA-Gellaufpuffer aufgeköcht bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde in einen Meßzylinder mit 6 ml Formaldehyd gegeben und mit DEPC-H₂O auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde nach kurzem Abkühlen in eine mit einem Kamm versehene, horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Nach Erstarren der Agaroselösung wurde der Kamm entfernt und das Gel mit Elektrophoresepuffer überschichtet.

10 µg RNA in einem Volumen von 20 µl wurden mit 5 µl RNA-Ladepuffer versetzt, für 1 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die im Gel durch den Kamm entstandenen Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 V bis die untere der beiden Farbstoff-Banden den Gelrand erreicht hatte, wobei etwa nach der Hälfte des

Gellaufes das Gel in der Kammer umgedreht und diese umgepolt wurde, um dem entstandenen Gradienten der Ionenkonzentrationen entgegenzuwirken. Nun wurde das Gel 10 min in Ethidiumbromid-Färbelösung geschwenkt und anschließend weitere 10 min in DEPC-H₂O gespült. Auf einem Transilluminator konnten die RNA-Banden betrachtet und zur Dokumentation mit einem Lineal fotografiert werden.

2.2.3.2.2 *Transfer von RNA auf Membranen durch Kapillar-Blotting*

Die nach Größe fraktionierte RNA wurde auf eine Nylonmembran überführt, wo durch Hybridisierung mit spezifischen, markierten Sonden (s. 2.2.4.9.2) genaue Analysen durchgeführt werden konnten.

Material:

SSC-Lösung

Methylenblau-Färbelösung: 0,04% (w/v) in 0,5 M NaAc (pH 5,2)

Hybond N Nylonmembran

Durchführung:

Für den Kapillarblot wurden die Gele mit der Oberseite nach unten auf drei Lagen Whatman-Filterpapier gelegt, die beidseitig in ein Reservoir mit SSC-Lösung eintauchten. Darauf wurden luftblasenfrei eine Hybond N Nylonmembran, drei mit SSC-Lösung angefeuchtete Whatman-Filterpapiere und eine etwa 5 cm dicke Schicht saugfähiges Papier aufgelegt, die allesamt auf Gelgröße zurechtgeschnitten waren. Beschwert wurde der Aufbau mit ungefähr 150 g. Der Transfer erfolgte über Nacht bei RT. Nach Beendigung des Transfers wurde der Membranfilter zur Entfernung eventuell anhaftender Gelreste in zweifach konzentrierter SSC-Lösung geschwenkt, luftgetrocknet, 2 h bei 80°C gebacken und mit dem UV-Stratalinker UV-quervernetzt (Funktion „auto cross link“). Nun wurde eine Methylenblau-Färbung vorgenommen. Dazu wurde das Gel 10 min in Methylenblau-Färbelösung und anschließend zum Entfärben mehrere Male in H₂O geschwenkt und zur Dokumentation mit einem Lineal fotografiert. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde die Membran in Folie eingeschweißt.

2.2.3.2.3 *Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Sonden*

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

Material:

QuikHyb [®] Hybridisierungslösung:	Stratagene/La Jolla (USA)
Waschpuffer 1:	2 x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschpuffer 2:	0,1 x SSC 0,1% (w/v) SDS
<i>E.coli</i> tRNA:	10 mg/ml
radioaktiv markierte Sonde	

Durchführung:

In einer Glasröhre wurde die Membran für 20 min bei 68°C in einem Hybridisierungssofen mit 10 ml Hybridisierungslösung vorinkubiert. Je 50 µl radioaktive DNA-Sonde (10^6 Zerfälle pro µl bei einer spezifischen Aktivität von 10^9 Zerfällen pro µg) und tRNA wurden für 2 min auf 95°C erhitzt, mit 1 ml warmer Hybridisierungslösung aus der Vorinkubation gemischt und wieder zurück auf die Membran gegeben. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation des *Blot* bei 68°C wurde die Hybridisierungslösung abgegossen, durch den Waschpuffer 1 ersetzt und unter Rotation zweimal für 15 min bei RT gewaschen. Danach folgte ein 30minütiger Waschschriff mit Waschpuffer 2. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. Nach Autoradiographie mit einem Röntgenfilm konnte der *Blot* ausgewertet werden.

2.2.3.3 *RNase-Protektionsexperiment*

Das RNase-Protektionsexperiment diente in dieser Arbeit zusammen mit dem Primer-Extensionsexperiment (s. 2.2.3.5) der Identifikation des Transkriptionsstarts der Hif-2α-mRNA. Bei dieser Methode wurde eine radioaktiv markierte RNA-Sonde hergestellt, die komplementär zu der zu untersuchenden mRNA-Sequenz war, und mit zellulärer RNA inkubiert. Das markierte Transkript bildete mit der spezifischen mRNA

im Bereich der Homologie einen Doppelstrang, der beim anschließenden RNase-Verdau vor dem Abbau geschützt blieb, während einzelsträngige RNA degradiert wurde. Die Länge des geschützten Fragments gab somit die Länge des komplementären Bereichs an.

2.2.3.3.1 Herstellung markierter RNA-Sonden

Radioaktiv markierte RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription von DNA-Sequenzen hergestellt, die in T3/T7-Transkriptionsvektoren kloniert waren.

Material:

T3 bzw. T7 RNA-Polymerase:	50 U/μl, Gibco BRL/Eggenstein
T3/T7-Puffer:	0,2 M Tris/HCl (pH 8,0)
(5 x)	40 mM MgCl ₂
	10 mM Spermidin-(HCl) ₃
	125 mM NaCl
α-UTP (³² P-markiert):	10 μCi/μl; Amersham/Braunschweig
UTP:	100 μM
(AGC)TP:	10 mM
DTT:	100 mM
RNAguard RNase Inhibitor:	37 U/μl, Pharmacia/Uppsala (Schweden)
DNase I:	10 U/μl, RNase-frei, Boehringer/Mannheim
Hefe-tRNA (5mg/ml)	} Bestandteile des „RNase Protection Kit“ von Boehringer/Mannheim
Kontroll-DNA	

Durchführung:

Als Vorlage für die *in vitro*-Transkription wurden etwa 300 ng linearisierte, in einen T3/T7-Transkriptionsvektor klonierte DNA eingesetzt. Dabei wurde die Linearisierung so vorgenommen, daß einmal der T3- und einmal der T7-Promotor von der zu transkribierenden Sequenz abgetrennt wurde. Diese Vorlage wurde dann mit 0,5 μl T3 bzw. T7 RNA-Polymerase transkribiert, so daß *sense*- und *antisense*-Transkript entstanden. Im 10,5 μl-Reaktionsansatz enthalten waren außerdem 2 μl T3/T7-Puffer, 0,4 μl (AGC)TP, 0,25 μl DTT, 0,6 μl RNAguard, 5 μl α-UTP und 1,25 μl UTP. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C wurde 1 μl DNase I zugegeben und für weitere 15 min bei

37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 4 µl tRNA und eine Aufreinigung durch Adsorptionschromatographie (s. 2.2.4.2.4).

Als Größenmarker wurden linearisierte Plasmide geeigneter Länge sowie eine Kontroll-DNA transkribiert.

2.2.3.3.2 RNA-RNA-Hybridisierung und RNase-Verdau

Die radioaktiv markierte RNA-Sonde wurde mit zellulärer RNA hybridisiert und anschließend die einzelsträngige, nichthybridisierte RNA abgebaut.

Material:

Hybridisierungspuffer
RNase-Verdauungspuffer
Kontroll-RNA
RNase A (3,5 mg/ml)
RNase T1 (10 U/µl)
Proteinase K (20 mg/ml)
20% SDS (v/v)
Hefe-tRNA (5 mg/ml)
Ladepuffer

Bestandteile des
„RNase Protection Kit“
von Boehringer/Mannheim

Durchführung:

Für die RNA-RNA-Hybridisierung und den RNase-Verdau wurde das „RNase Protection Kit“ von Boehringer/Mannheim verwendet. Es wurde nach dem mitgelieferten Protokoll vorgegangen. Dabei wurde auf die im Originalprotokoll enthaltene Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung verzichtet, um die Verluste möglichst gering zu halten, und stattdessen direkt $\frac{1}{4}$ des Ansatzes mit Ethanol gefällt. Als Negativkontrolle wurde sowohl die im Kit enthaltene tRNA als auch RNA aus Zellen verwendet, von denen bekannt war, daß sie die zu untersuchende mRNA nicht enthalten. Als Positivkontrolle diente die durch die Transkription einer Kontroll-DNA entstandene RNA (s. 2.2.3.3.1).

Die Auswertung erfolgte mittels Elektrophorese im denaturierenden, 4%igen Polyacrylamidgel (s. 2.2.3.5.4).

2.2.3.4 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-Sequenz mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in eine cDNA-Sequenz umgeschrieben, die dann, im Gegensatz zur RNA-Sequenz, mittels PCR amplifiziert werden kann.

Material:

DNase I:	1 U/ μ l, Gibco BRL/Eggenstein
DNase I-Puffer:	200 mM Tris/HCl (pH 8,4)
(10 x)	20 mM MgCl ₂
	500 mM KCl
DEPC-H ₂ O	
EDTA:	25 mM
Zufallsprimer:	500 ng/ μ l, Gibco BRL/Eggenstein
dNTP-Mix:	10 mM
DTT:	0,1 M
Primärstrang-Puffer:	250 mM Tris/HCl
(5 x)	375 mM KCl
	15 mM MgCl ₂ (pH 8,3)
Reverse Transkriptase Superscript™ II:	200 U/ μ l, Gibco BRL/Eggenstein
RNAguard RNase Inhibitor:	37 U/ μ l, Pharmacia/Uppsala (Schweden)

Durchführung:

Um sicherzustellen, daß die neusynthetisierte cDNA nicht durch zelluläre DNA verunreinigt ist, wurde zuerst ein DNase I-Verdau durchgeführt. Dazu wurden unter Verwendung von DEPC-H₂O in einem 10 μ l-Ansatz 2-3 μ g zelluläre RNA mit 1 μ l DNase I und 1 μ l DNase I-Puffer für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe von 1 μ l EDTA und Inkubation für 10 min bei 65°C inaktiviert und der gesamte Ansatz zur reversen Transkription eingesetzt. Nach Zugabe von 0,5 μ l Zufallsprimer (hauptsächlich Hexamere), die durch ihre zufällige Sequenzabfolge gleichmäßig auf der gesamten RNA-Matrize verteilt binden, erfolgte für 10 min eine Denaturierung bei 70°C und eine anschließende schnelle Abkühlung auf Eis. Nun wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert, mit 4 μ l Primärstrang-Puffer, 2 μ l DTT und 1 μ l dNTP-Mix für 2 min bei 42°C inkubiert und nach Zugabe von 1 μ l Reverse

Transkriptase sowie 1 µl RNAGuard für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Nachdem das Enzym für 15 min bei 70°C inaktiviert worden war, konnte die cDNA als Vorlage für eine PCR-Reaktion verwendet werden.

2.2.3.5 Primer-Extensionsexperiment

Das Primer-Extensionsexperiment diente in dieser Arbeit zusammen mit dem RNase-Protektionsexperiment (s. 2.2.3.3) der Identifikation des Transkriptionsstarts der Hif-2 α -mRNA.

Dazu wurde mit radioaktiv markierten Primern an Gesamt-RNA eine reverse Transkription durchgeführt. Nachdem die RNA anschließend durch RNase-Inkubation verdaut worden war, wurde die entstandene cDNA auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetragen. Ihre Länge gab die Basenzahl zwischen Primer und 5'-Ende der RNA wieder. Eine gleichzeitig mit aufgetragene Sequenzierungsreaktion ermöglichte die genaue Lokalisation des Transkriptionsstartes innerhalb der Promotorsequenz.

2.2.3.5.1 Didesoxysequenzierung

Die Didesoxysequenzierung (s. 2.2.4.8) wurde mit Hilfe des „T7 Sequencing Kit“ von Pharmacia/Uppsala (Schweden) durchgeführt.

Material:

A-, C-, G- und T-Mix-Kurz	}	Bestandteile des „T7 Sequencing Kit“ von Pharmacia/Uppsala (Schweden)
T7 DNA-Polymerase		
Enzym-Verdünnungspuffer		
<i>annealing</i> -Puffer		
Markierungs-Mix-dCTP		
Stop-Lösung		
DMSO:		50% (w/v)
NaOH:		2 M
NaAc:		3 M (pH 5,0)
Ethanol:		absolut
α -dCTP (³² P-markiert):		10 µCi/µl, Amersham/Braunschweig

Durchführung:

2 µg Matrizen-DNA wurden in einem Volumen von 32 µl mit 8 µl NaOH für 10 min bei RT denaturiert. Nach der anschließenden Ethanol-fällung wurden die Niederschläge in 7 µl H₂O resuspendiert und zusammen mit 3 µl DMSO, 10 pmol Oligonukleotidprimern und 2 µl *annealing*-Puffer für 20 min bei 37°C sowie für weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl Markierungs-Mix-dCTP, 0,5 µl α-dCTP und 2 µl 1:5 verdünnter T7 DNA-Polymerase erfolgte eine fünfminütige Inkubation der Markierungsreaktion bei RT. Während dieser Zeit wurden je 2,5 µl A-, C-, G- und T-Mix-Kurz für mindestens 2 min bei 37°C vorgewärmt und dann jeweils 4,5 µl der Markierungsreaktion zugegeben. Nach weiteren 5 min bei 37°C wurden 5 µl Stop-Lösung zugegeben und die Sequenzierungsreaktionen bis zur Gelelektrophorese bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.5.2 *Endmarkierung der Primer*

Die Endmarkierung der Oligonukleotidprimer erfolgte mit Hilfe der T4 Polynukleotid-Kinase (s. 2.2.4.9.1). Nach der Ethanol-fällung mit Ammoniumazetat wurden die Niederschläge in je 20 µl 0,3 M Ammoniumazetat aufgenommen und für die reverse Transkription eingesetzt.

2.2.3.5.3 *Reverse Transkription und RNaseA-Verdau*

Material:

Radioaktiv markierte Primer

Hybridisierungspuffer:	Bestandteil des „RNase Protection Kit“ von Boehringer/Mannheim
RNAguard RNase Inhibitor:	37 U/µl, Pharmacia/Uppsala (Schweden)
DEPC-H ₂ O	
dNTP-Mix:	10 mM
DTT:	0,1 M
Primärstrang-Puffer:	250 mM Tris/HCl
(5 x)	375 mM KCl
	15 mM MgCl ₂ (pH 8,3)
Reverse Transkriptase Superscript™ II:	200 U/µl, Gibco BRL/Eggenstein

Actinomycin D:	5 mg/ml
RNaseA:	10 mg/ml
Stop-Lösung:	Bestandteil des „T7 Sequencing Kit“ von Pharmacia/Uppsala (Schweden)

Durchführung:

20 µg Gesamt-RNA wurden zusammen mit radioaktiv markiertem Primer (1×10^6 cpm) mit Ethanol gefällt, in 30 µl Hybridisierungspuffer gelöst und für 10 min bei 95°C denaturiert. Nach einem einstündigen *annealing* bei 55°C folgte eine weitere Ethanolfällung. 17,5 µl DEPC-H₂O und 6 µl Primärstrang-Puffer wurden gemischt und darin der Niederschlag bei 42°C resuspendiert. Nach Zugabe von 2 µl dNTP-Mix, 3 µl DTT, 1 µl RNAGuard, 0,5 µl Actinomycin D und 1 µl Reverse Transkriptase folgte eine 50minütige Inkubation bei 42°C sowie die Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 70°C. Nun wurde ein RNase-Verdau mit 0,5 µl RNaseA für 40 min bei 37°C durchgeführt, eine letzte Ethanolfällung vorgenommen und der in 5 µl Stop-Lösung resuspendierte Niederschlag bis zum Gelauftrag bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.5.4 *Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Die bei der reversen Transkription entstandene cDNA und die Sequenzierungsreaktion wurden auf einem 6%igen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) aufgetrennt.

Material:

Acrylamid-Mix:	30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid
Harnstoff	
10 x TBE	
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
APS:	100 mg/ml Ammoniumpersulfat
Sigmacote:	Sigma/Deisenhofen

Durchführung:

Für einen 75 ml-Ansatz Gellösung wurden 37,5 g Harnstoff in 15 ml Acrylamid-Mix, 7,5 ml 10 x TBE und der entsprechenden Menge H₂O gelöst und anschließend sterilfiltriert. Eine der zwei Sequenzgelplatten wurde mit Sigmacote behandelt, damit das Gel nach der Elektrophorese nur an einer Platte haftet, sich von der anderen aber ablösen läßt. Zur Gellösung wurden 600 µl APS und 23 µl TEMED zugegeben und damit die Polymerisation in Gang gesetzt. Nun wurde die Lösung zwischen die durch 2 mm dicke Abstandhalter getrennten, leicht schräggestellten Platten gegossen, bis sie durch Kapillarkräfte am anderen Ende der Platten angekommen war. Nach vollendeter Polymerisation konnten Platten und Gel in eine vertikale Sequenzgelapparatur eingebaut werden, die anschließend mit 1 x TBE als Laufpuffer aufgefüllt wurde. In die mit Hilfe eines Haifischzahn-Kammes erzeugten Taschen konnten nun die für 5 min bei 95°C denaturierten und auf Eis abgekühlten Proben eingefüllt werden. Nach der Elektrophorese für 2 h bei 150 V wurde eine der beiden Platten vorsichtig vom Gel abgehoben, dieses auf ein Whatman-Filterpapier aufgezogen und für 2 h bei 80°C auf dem Gelrockner getrocknet. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Autoradiographie.

2.2.4 Arbeiten mit DNA

2.2.4.1 Plasmid-DNA-Präparationen

Die Plasmid-Präparationen wurden mit Hilfe des „Qiagen Plasmid Midi bzw. Maxi Kit“ durchgeführt.

2.2.4.1.1 Plasmidisolierung (analytischer Maßstab)

(nach Birnboim und Doly, 1979)

Material:

Puffer P1:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
(Resuspension)	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
Puffer P2:	200 mM NaOH
(Lyse)	1% (w/v) SDS

Puffer P3:	3.0 M Kaliumazetat (pH 5,5)
Isopropanol:	absolut
Ethanol:	70%

Durchführung:

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

2.2.4.1.2 *Plasmidisolierung (präparativer Maßstab)*

Material:

Bei der Plasmidisolierung im präparativen Maßstab können, ausgehend von 100 ml (500 ml) Übernachtskultur bis zu 100 μ g (500 μ g) Plasmid-DNA gewonnen werden. Es werden dieselben Puffer benutzt wie bei der Plasmidisolierung für analytische Zwecke (s. 2.2.4.1.1).

Zusätzlich:

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

Durchführung:

Mit 100 ml einer Übernachtskultur von plasmidtragenden DH5 α -Zellen wurde zunächst so wie bei der Plasmidisolierung im analytischen Maßstab verfahren (s. 2.2.4.1.1). Nach der Resuspendierung in 4 ml P1, der Lyse mit 4 ml P2 und der Präzipitation mit 4 ml P3 wurde die DNA-Lösung auf die mit Puffer QBT äquilibrierten Säulen aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml Puffer QC wurde die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 VT Isopropanol gefällt, 30 min bei 13000 x g zentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 100 μ l H₂O aufgenommen.

2.2.4.2 Aufreinigung von DNA

2.2.4.2.1 Präzipitation von DNA mit Ethanol oder Isopropanol

Mit dieser Methode wird DNA als Natrium- bzw. Ammoniumsalz aus wässrigen Lösungen gefällt.

Material:

Natriumazetatlösung:	3 M Natriumazetat (pH 5,0)
Ammoniumazetatlösung:	5 M Ammoniumazetat
Isopropanol:	absolut
Ethanol:	absolut
	70% (v/v)

Durchführung:

Die Nukleinsäurelösung wurde entweder nach Zugabe von Natriumazetat oder von Ammoniumazetat mit einer Endkonzentration von 0,3 M Natriumazetat bzw. 3 M Ammoniumazetat mit 2,5 VT eiskaltem Ethanol (absolut) für mindestens 30 min bei -80°C gefällt. Bei größeren DNA-Mengen wurden 0,7 VT Isopropanol (RT) zugegeben. Danach wurde bei 4 °C und 10000 x g für 30 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Der Niederschlag wurde durch Resuspendieren in 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Abschütten des Überstandes 1 min getrocknet. Anschließend wurde er in H₂O oder einem geeigneten Puffer gelöst.

2.2.4.2.2 Gelelektrophoretische Separation von DNA-Fragmenten

Die Größenfraktionierung von Nukleinsäuren erfolgte in einer Gelmatrix aus Agarose. Aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppen im "Rückgrat" der DNA wandert sie nach Anlegen eines elektrischen Feldes von der Kathode zur Anode. Da die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente in erster Linie von deren Größe abhängt, können unterschiedlich große DNA-Fragmente auf diese Art aufgetrennt werden. Ein Marker mit definierten DNA-Fragmentgrößen ermöglicht eine Größenabschätzung. Durch Anfärbung der Nukleinsäuren mit der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid können die DNA-Banden auf einem Transilluminator (Wellenlänge 312 nm) sichtbar gemacht werden.

Material:

Tris-Azetat-Puffer (TAE):	500 mM Tris/HCl
(10 x)	200 mM NaAc
	20 mM EDTA (pH 7,8)
Elektrophoresepuffer:	einfach konzentrierter TAE-Puffer
Auftragspuffer:	s. 2.2.4.7.1
Ethidiumbromidlösung:	1 mg/ml in H ₂ O
Agaroselösung:	0,8% bis 1,5% (w/v) in Elektrophoresepuffer
Standardmarker:	λ-DNA, gespalten mit Hind III; 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL/Eggenstein)

Durchführung:

Entsprechend der gewünschten Konzentration wurde Agarose mit Elektrophoresepuffer aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Nach Zugabe von 0,01% Ethidiumbromid und Abkühlung auf etwa 60°C wurde diese Lösung in eine mit einem Kamm versehene horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Nach Erstarren der Agaroselösung wurde der Kamm entfernt und das Gel mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Proben und Marker wurden mit jeweils $\frac{1}{5}$ VT Auftragspuffer versetzt und in die im Gel durch den Kamm entstandenen Taschen pipettiert. Die angelegte Spannung richtete sich nach dem Abstand der Elektroden und lag im allgemeinen zwischen 30 und 120 V. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn aufgrund der Wegstrecke, die der im Auftragspuffer enthaltene Farbstoff zurückgelegt hatte, mit einer ausreichenden Auftrennung

gerechnet werden konnte. Anschließend wurden präparative und analytische Gele zur Dokumentation unter UV-Licht (280 bis 320 nm) fotografiert und bei präparativen Gelen die zu isolierende Bande ausgeschnitten.

2.2.4.2.3 *DNA-Isolation aus Agarosegelen*

Nach Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente auf einem Agarosegel wurde die Bande der gewünschten Größe (Vergleich mit dem aufgetragenen Größenmarker) auf einem UV-Schirm ausgeschnitten.

2.2.4.2.3.1 *Präparation von Fragmenten bis 10 kb*

DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 10 kb wurden in einem chaotropen Puffer gelöst und anschließend durch Adsorptionschromatographie aufgereinigt (s. 2.2.4.2.4).

2.2.4.2.3.2 *Präparation von Fragmenten über 10 kb*

Sollten aus einem Gel DNA-Fragmente isoliert werden, die eine Größe von 10 kb überschritten, wurde eine Aufreinigung mittels Elektroelution vorgenommen. Dazu wurde aus einem Flachbett-Agarosegel mit einem Skalpell ein etwa 1 x 5 cm großes Gelstück ausgeschnitten, so daß eine größere Tasche entstand. Das die DNA enthaltende Agarosegelblöckchen wurde zusammen mit einer kleinen Menge Elektrophoresepuffer in ein Stück Dialyseschlauch eingebracht, der anschließend auf beiden Seiten mit Bindfaden fest zugebunden wurde. Dieses „Säckchen“ wurde nun so in die Tasche eingelegt, daß der Gelblock auf der der Anode zugewandten Seite anliegt, von dieser nur durch die Membran des Dialyseschlauches getrennt. Bei Anlegen einer Spannung von 100 V über einen Zeitraum von etwa 30 min wanderte die DNA aus dem Gel heraus und lagerte sich von innen an die Membran des Dialyseschlauches an, von der sie am Ende des Vorganges durch eine Umpolung für 2 min abgelöst wurde. Der im Dialyseschlauch befindliche Elektrophoresepuffer wurde entnommen, die darin enthaltene DNA gefällt und gewaschen.

2.2.4.2.4 *Adsorptionschromatographie*

Mit Hilfe des „Qiagen PCR Purification Kit“ und des „Qiagen Gel Extraction Kit“ wurde DNA aus Reaktionsansätzen bzw. Agarosegelen aufgereinigt. Dabei wurden Säulen mit einer Silicagelmembran benutzt. Material und Durchführung der Aufreinigung entsprachen den Vorgaben des Herstellers.

2.2.4.2.5 *Anionen-Austauschchromatographie*

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

Material:

AAC-Puffer:	1,5 M NaCl
(2 x)	100 mM MOPS (pH 7,0)
Qiagen Tip 20 Säulen	
Puffer QBT, QC und QF	s. 2.2.4.1.2
Isopropanol:	absolut
Ethanol:	70% (v/v)
T0,1E-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	0,1 mM EDTA
	Zellkulturwasser (Gibco BRL/Eggenstein)

Durchführung:

50 µl DNA-Lösung wurden mit DEPC-H₂O und ACC-Puffer auf 1 ml aufgefüllt, so daß der Puffer einfach konzentriert war. Diese Lösung wurde auf die mit 1 ml Puffer QBT äquilibrierten Qiagen Tip 20 Säulen aufgetragen, dreimal mit 1 ml Puffer QC gewaschen und mit 800 µl Puffer QF eluiert. Nach Fällung mit 560 µl Isopropanol, dreimaligem Waschen mit 70% Ethanol und Lufttrocknung wurde die DNA in T0,1E-Puffer gelöst.

2.2.4.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung wird die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA, gegen das Lösungsmittel als Bezugswert gemessen. Dabei entspricht eine Extinktion E_{260} von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μ l. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Hier ist das Absorptionsmaximum von Proteinen. Der Quotient E_{260}/E_{280} sollte bei 2 liegen.

2.2.4.4 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(nach Saiki *et al.*, 1988)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden zwei zu den Randbereichen des zu amplifizierenden DNA-Bereiches komplementäre Oligonukleotide als Primer verwendet. Diese zum *sense*- bzw. *antisense*-Strang komplementären Primer hybridisieren mit der Matrizen-DNA und dienen so als Startpunkt der Polymerase, die dann den jeweiligen Strang synthetisiert. Da die Primer im Überschuß vorliegen und die Polymerase hitzestabil ist, kann die Reaktion nach Denaturierung der entstandenen Doppelstränge erneut beginnen.

Material:

dNTP-Mix:	je 2 mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP
MgCl ₂ :	25 mM
Oligonukleotide (Primer):	10 pmol/ μ l
Taq-Polymerase:	5 U/ μ l
Taq-Reaktionspuffer:	750 mM Tris/HCl (pH 9,0)
(10 x)	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
	0,1% (w/v) Tween 20
DMSO:	50% (w/v)

Durchführung:

In einem 200 μ l-Reaktionsgefäß wurden etwa 50 ng Matrizen-DNA mit 2,5 μ l Reaktionspuffer, 1 μ l dNTP-Mix, je 1 μ l *sense*- und *antisense*-Primer, 1,25 μ l Magnesiumchloridlösung und 0,5 μ l Taq-Polymerase mit H₂O auf 25 μ l aufgefüllt. In

einem Thermo-Cycler wurde zunächst für 5 min bei 94°C denaturiert und anschließend der folgende Reaktionszyklus 25 mal durchlaufen:

60 sek Denaturierung bei 94°C

60 sek Hybridisierung bei 60°C

60 sek Polymerisation bei 72°C

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

Bei präparativen PCR-Reaktionen, insbesondere bei längeren DNA-Fragmenten, wurde eine Taq-Polymerase mit *proofreading*-Aktivität verwendet. Dabei handelte es sich um das Enzym Ex-Taq der Firma Takara/Otsu (Japan), das zusammen mit passendem Reaktionspuffer und einem dNTP-Mix geliefert wurde und bezüglich der Polymerisation ein Temperaturoptimum von 74°C besitzt. Außerdem wurde gegebenenfalls $\frac{1}{10}$ des Reaktionsvolumens an DMSO eingesetzt, um die Bildung von störenden Sekundärstrukturen zu verhindern.

2.2.4.5 Deletionsklone

Um sich einen groben Überblick über die Funktion bestimmter Abschnitte eines Promotors zu verschaffen, wurden aus einem den gesamten zu untersuchenden Promotorbereich enthaltenden Ausgangsklon entweder mittels sequenzspezifischer DNA-Spaltung einzelne Teilstücke ausgeschnitten oder die gewünschten Abschnitte durch PCR generiert. Diese wurden anschließend in der gleichen Orientierung in denselben Vektor ligiert, in dem auch der gesamte zu untersuchende Promotorbereich vorlag. Nach der Transformation kompetenter Zellen mit diesem Konstrukt erhielt man die gewünschten Deletionsklone, die jeweils nur einen genau definierten Abschnitt des Promotors enthielten.

2.2.4.6 Mutationsklone

Um bestimmte Sequenzmotive, wie etwa Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, zu inaktivieren, wurden mit Hilfe des „QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene/La Jolla (USA) an den entsprechenden Stellen im Promotorbereich sequenzspezifische Mutationen eingeführt. Dazu wurden an einem Plasmid, das den entsprechenden Promotorbereich enthielt, Mutageneseprimer angelagert und durch deren Verlängerung der Rest des Plasmids repliziert. Nach enzymatischem Abbau der Ausgangs-DNA wurden ultrakompetente Zellen mit dem mutierten Plasmid transformiert.

Material:

PfuTurbo DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	}	Bestandteile des “QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit” von Stratagene/La Jolla (USA)
10 x Reaktionspuffer		
Restriktionsenzym DpnI (10 U/μl)		
dNTP-Mix		
QuickSolution		
XL 10-Gold ultrakompetente Zellen		
XL 10-Gold β-Mercaptoethanol-Mix (β-ME)		
Mutageneseprimer		
15 ml Falcon-Polypropylen-Röhrchen 2059		(Becton Dickinson/Heidelberg)
NZY+ Medium		

Durchführung:

Zur sequenzspezifischen Mutation wurde ein 50 μl-Ansatz mit 5 μl 10 x Reaktionspuffer, 10 ng Doppelstrang-DNA (zu mutierendes Plasmid), je 125 ng Mutageneseprimer (zwei Oligonukleotide, die beide die gewünschte Mutation enthielten und komplementär zu derselben Sequenz auf den beiden entgegengesetzten Strängen des Plasmids waren), 1 μl dNTP-Mix, 3 μl QuickSolution und 1 μl PfuTurbo DNA-Polymerase in einem PCR-Gerät bei folgendem Programm inkubiert:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	1 min
2	18	95°C 60°C 68°C	50 sek 50 sek 2 min/kb Plasmidlänge
3	1	68°C	7 min
4	1	10°C	5 min

Anschließend wurde für 1 h bei 37°C mit 1 µl DpnI-Restriktionsenzym inkubiert. DpnI schneidet ausschließlich methylierte DNA und baut nichtmutierte Ausgangs-DNA enzymatisch ab, da es sich bei dieser um methylierte Plasmid-DNA handelt. Für die anschließende Transformation wurden 45 µl-Aliquots auf Eis aufgetauter ultrakompetenter Zellen in vorgekühlten 15 ml Falcon-Röhrchen zusammen mit 2 µl β-ME für 10 min auf Eis inkubiert und dabei alle 2 min geschüttelt. Nach Zugabe von 2 µl DpnI-behandelter DNA und erneutem Schütteln folgten Inkubationen für 30 min auf Eis, 30 sek bei 42°C und 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl auf 42°C vorgewärmtem NZY+ Medium wurden die Zellen 1 h bei 37°C und 200 Upm geschüttelt und anschließend der gesamte Ansatz auf LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Lücken im anfangs noch nicht geschlossenen mutierten Plasmidring wurden nach der Transformation von den ultrakompetenten Zellen geschlossen.

2.2.4.7 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.4.7.1 Sequenzspezifische DNA-Spaltung

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

Material:

Restriktionsendonukleasen:	(s. 2.1.2), mit zugehörigen 10 x Reaktionspuffern	
Auftragspuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau	} Farb-Banden laufen bei etwa 4 kb und 500 bp
(5 x)	0,25% (w/v) Xylencyanol	
	10 mM EDTA	
	40% (w/v) Saccharose	
	30% (w/v) Sucrose	} Farb-Bande läuft bei etwa 50 bp
	0,35% (w/v) Orange G Natriumsalz	
	5 mM EDTA	

Durchführung:

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

Zu der DNA-Lösung wurden $\frac{1}{10}$ VT des entsprechenden Reaktionspuffers und pro µg DNA 1 bis 10 U Enzym hinzugegeben. Bei der Enzymdosierung mußte beachtet werden, daß einige Restriktionsendonukleasen bei einer Glycerinkonzentration von über 5% die DNA auch unabhängig von den spezifischen Schnittstellen spalten. Da im Aufbewahrungspuffer der Enzyme Glycerin enthalten war, mußte das Endvolumen entsprechend gewählt werden.

Es wurde dann für mehrere Stunden oder über Nacht bei der für das jeweilige Enzym angegebenen Temperatur, meistens bei 37°C, im Wasserbad inkubiert. Da in der Regel eine Auftrennung im Agarosegel folgte, wurde die Reaktion durch Zugabe von $\frac{1}{5}$ VT Auftragspuffer abgestoppt. Sollten hingegen im Anschluß weitere enzymatische Reaktionen durchgeführt werden, wurde die Restriktionsendonuklease entweder hitzeinaktiviert oder durch Aufreinigung mittels Adsorptionschromatographie (s. 2.2.4.2.4) von der DNA getrennt.

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

Werden für Klonierungen glatte Enden von DNA-Fragmenten benötigt, müssen 5'-Überhänge mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase zum Doppelstrang aufgefüllt werden. Zum Abbauen von 3'-Überhängen wird dagegen die 3'→5' Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase genutzt. Bei hohen Konzentrationen aller vier dNTPs wird der

Abbau gestoppt, sobald der doppelsträngige Bereich der DNA erreicht ist. Bei PCR-Produkten muß darüberhinaus eine Phosphorylierung erfolgen.

Material:

T4 DNA-Polymerase-Puffer: (5 x)	250 mM Tris/HCl 75 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 35 mM MgCl ₂ 0,5 mM EDTA 50 mM 2-Mercaptoethanol 0,1 mg/ml BSA (pH 8,5)
T4 DNA-Polymerase	(Boehringer/Mannheim)
dNTP-Mix:	2 mM
T4 PNK	(Boehringer/Mannheim)
ATP:	1 mM
EDTA-Lösung:	0,5 M

Durchführung:

Zum Auffüllen der 5'-Überhänge bzw. zum Abbauen von 3'-Überhängen wurde die DNA in einem Ansatz von 60 µl zusammen mit 6 µl 2 mM dNTPs, 12 µl T4 DNA-Polymerase-Puffer und 1 U T4 DNA-Polymerase für 20 min bei RT inkubiert. Bei PCR-Produkten enthielt der Reaktionsansatz außerdem 6 µl ATP sowie 0,5 µl T4 PNK (5 U) und es wurden nach der Inkubation bei RT 6 µl EDTA zugegeben. Anschließend wurden die DNA-Fragmente über Adsorptionschromatographie (s. 2.2.4.2.4) aufgereinigt.

2.2.4.7.3 *Dephosphorylierung von 5'-Enden*

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

Dafür wurde die DNA in einfach konzentriertem Dephosphorylierungspuffer mit 1 U Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) im mitgelieferten Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA über Adsorptionschromatographie aufgereinigt (s. 2.2.4.2.4).

2.2.4.7.4 Ligation

Nach enzymatischer Spaltung von Insert und Vektor mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen kann durch Ligation der passenden Enden ein geschlossener Plasmidring hergestellt werden. Durch Transfektion kompetenter Bakterien mit diesem Plasmidring kann er anschließend vermehrt werden.

Material:

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

Durchführung:

Vektor- und Insert-DNA wurden so eingesetzt, daß die zu ligierenden Enden in äquimolaren Konzentrationen vorlagen. Der Gesamtansatz sollte bei einem Reaktionsvolumen von 10 µl maximal 100 ng DNA enthalten.

Die Ligation wurde in einfach konzentriertem Ligationspuffer und mit 1 U Ligase bei RT für mindestens 3 h, bei 4°C über Nacht oder bei 37°C für 1 h inkubiert.

2.2.4.8 Didesoxysequenzierung von DNA

(nach Sanger *et al.*, 1987)

Diese Methode beruht auf selektiven Kettenabbrüchen bei der DNA-Synthese durch den statistischen Einbau von Didesoxynukleotiden. Die einzelnen 2',3'-Didesoxynucleotidtriphosphate waren dabei mit vier in unterschiedlichen Farben fluoreszierenden Chromophoren modifiziert. Zur Sequenzierung wurden 200-1000 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

Sequenzierungen dieser Arbeit wurden zum Teil als Serviceleistung am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung in Bad Nauheim an einem ABI 373A DNA-Sequencer von Perkin Elmer/Überlingen, zum Teil im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln mit Hilfe des ABI Prism[®] 377 DNA-

Sequencers von Perkin Elmer/Überlingen jeweils nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.9 Markierung von DNA-Molekülen

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

2.2.4.9.1 Radioaktive Markierung mittels T4 Polynukleotid-Kinase

Bei der Endmarkierung durch Kinasierung werden dephosphorylierte DNA-Moleküle oder synthetisierte DNA-Oligonukleotide, die keine 5'-Phosphatgruppe besitzen, radioaktiv markiert. Sollen doppelsträngige Oligonukleotide markiert werden, müssen vorher einzelsträngige Oligonukleotide (*sense* und *antisense*) hybridisiert werden.

Material:

Phosphorylierungspuffer:	500 mM Tris/HCl
(10 x)	100 mM MgCl ₂
	1 mM EDTA
	50 mM DTT
	1 mM Spermidin (pH 8,2)
γ -ATP (^{32}P -markiert):	10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; Amersham/Braunschweig
T4 PNK	(Boehringer/Mannheim)

Durchführung:

Für die Hybridisierung einzelsträngiger Desoxyoligonukleotide wurden je 500 pmol *sense*- und *antisense*-Oligonukleotid in 20 μl 1 x SSC gelöst, 5 min auf 95°C erhitzt und zusammen mit dem Heizblock langsam auf RT abgekühlt. Es ergab sich eine Konzentration von 25 pmol Doppelstrang-DNA/ μl (= 50 pmol 5'-Enden).

5 pmol der doppelsträngigen Desoxyoligonukleotide bzw. 20 pmol einzelsträngige Oligonukleotidprimer wurden mit 2 μl Phosphorylierungspuffer, 6 μl (20 pmol) γ -ATP

(60 μCi), 1 μl T4 PNK (10 U) versetzt, mit H_2O auf 20 μl aufgefüllt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung wurde entweder mit „NucTrap Probe Purification Columns“ der Firma Stratagene/La Jolla (USA) oder durch Ethanolfällung mit Ammoniumazetat durchgeführt. Die spezifische Aktivität der Probe wurde nach Messung im Szintillationszähler berechnet.

2.2.4.9.2 Radioaktive Markierung mittels Klenow-Polymerase

Mit Hilfe des Klenow-Enzyms können DNA-Fragmente markiert werden, indem radioaktive Desoxynukleotide in den DNA-Strang eingebaut werden. Dabei findet eine Verlängerung von Hexanukleotiden statt, die gleichmäßig auf dem komplementären DNA-Strang verteilt sind.

Material:

10 x Hexanukleotid-Mix	(Boehringer/Mannheim)
α -dCTP (^{32}P -markiert):	10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, Amersham/Braunschweig
d(AGT)TP:	1 mM
Klenow-Polymerase	(Boehringer/Mannheim)
EDTA-Lösung:	0,5 M

Durchführung:

Die gleichmäßige Markierung des ganzen DNA-Stranges erfolgte nach der Hybridisierung der Hexanukleotide mit der Matrizen-DNA. Dazu wurden 50 ng DNA zunächst 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, mit 2 μl Hexanukleotid-Mix, 5 μl α -dCTP, 1,5 μl nichtradioaktiven Desoxynukleotiden (d(ATG)TP) und 1 μl Klenow-Polymerase (2 U) gemischt und mit H_2O auf 20 μl aufgefüllt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 μl 0,5 M EDTA-Lösung abgestoppt.

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

2.2.4.10 Southern Blot-Analyse

Wie RNA beim *Northern Blot*, so kann auch DNA nach der Auftrennung auf einem Agarosegel durch *Kapillar-Blotting* auf eine Nylonmembran transferiert und dort nach Hybridisierung mit einer radioaktiven DNA-Sonde mittels Autoradiographie detektiert werden.

Material:

Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung:	0,5 M Tris/HCl (pH 7,0) 1,5 M NaCl
Hybridisierungspuffer:	Formamid, 40% (v/v) bei heterologen Sonden 50% (v/v) bei homologen Sonden 5 x SSC 5 x Denhardt's Lösung 1% (w/v) SDS 50 µg/ml tRNA aus <i>E. coli</i>
Waschpuffer 1:	2 x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschpuffer 2:	1 x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschpuffer 3:	0,1 x SSC 0,1% (w/v) SDS

radioaktiv markierte Sonde

Durchführung:

Die Auftrennung auf dem Agarosegel erfolgte wie bereits beschrieben (s. 2.2.4.2.2). Danach wurde das Gel für je 30 min in Denaturierungslösung und anschließend in Neutralisierungslösung geschwenkt. Beim *Kapillar-Blotting* auf eine Nylonmembran entfiel die Methylblau-Färbung (s. 2.2.3.2.2).

Die Membran mit der quervernetzten DNA wurde in einem Hybridisierungsofen mit 10 ml Hybridisierungspuffer für 1 h bei 42°C vorinkubiert. Nachdem die radioaktive DNA-Sonde für 5 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt worden war, wurde

so viel Sonde zu der Membran in den Hybridisierungspuffer gegeben, daß bei einer spezifischen Aktivität von 10^8 Zerfällen pro μg DNA eine Endkonzentration von 10 ng/ml vorlag. Über Nacht wurde die Membran unter Rotation bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgegossen, durch den Waschpuffer 1 ersetzt und die Membran zweimal für 15 min bei 42°C gewaschen. Danach folgten jeweils zwei Waschschrte mit Waschpuffer 2 und 3. Die in Frischhaltefolie eingeschlagene Membran konnte nach Autoradiographie mit einem Röntgenfilm ausgewertet werden.

2.2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.2.5.1

Extraktion von Kernproteinen

Material:

hypotonischer Puffer:	10 mM Hepes (pH 7,9)
	1,5 mM MgCl_2
	10 mM KCl
	0,2 mM PMSF
	0,5 mM DTT
Hochsalzpuffer:	20 mM Hepes (pH 7,9)
	25% Glyzerin
	1,5 mM MgCl_2
	1,2 M KCl
	0,2 mM EDTA
	0,2 mM PMSF
	0,5 mM DTT
Niedrigsalzpuffer:	20 mM Hepes (pH 7,9)
	25% Glyzerin
	1,5 mM MgCl_2
	0,02 M KCl
	0,2 mM EDTA
	0,2 mM PMSF
	0,5 mM DTT

Dialysepuffer:	20 mM Hepes (pH 7,9)
	25% Glyzerin
	100 mM KCl
	0,2 mM EDTA
	0,2 mM PMSF (PMSF und DTT wurden erst
	0,5 mM DTT direkt vor Gebrauch zugegeben).

Trypanblau

Durchführung:

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

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen und anschließend in frischem PBS mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 300 x g wurde der Überstand verworfen und das Volumen des Niederschlages (pcv = packet cell volume) bestimmt. Die Zellen wurden schnell in 5 pcv hypotonischem Puffer resuspendiert, 5 min bei 4000 x g abzentrifugiert und in 3 pcv hypotonischem Puffer aufgenommen. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis, in der die Zellen anschwellen und zum Teil aufplatzen, wurde die Suspension im Potter homogenisiert. Die Vollständigkeit des Zellaufschlusses wurde unter dem Mikroskop nach Trypanblaufärbung überprüft. Die nun freiliegenden Zellkerne wurden bei 4000 x g für 15 min zentrifugiert und erneut das Niederschlagvolumen (pnv = packet nuclear volume) bestimmt. Der Kernniederschlag wurde in $\frac{1}{2}$ pnv Niedrigsalzpuffer resuspendiert und unter Rühren langsam mit $\frac{1}{2}$ pnv Hochsalzpuffer versetzt (Endkonzentration KCl = 300 mM). Die Lösung wurde 30 min gemischt, 30 min bei 10000 x g abzentrifugiert und schließlich zweimal 1 h gegen Dialysepuffer dialysiert. Nach abschließender Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Kernextrakt aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Material:

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

Durchführung:

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

2.2.6 DNA-Protein-Interaktion

2.2.6.1 Gelretardierungsexperimente

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

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

Material:

10 x TAE	
Acrylamid-Mix:	30% Acrylamid 2% Bisacrylamid
APS:	100 mg/ml Ammoniumpersulfat
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Carrier-DNA:	poly(di-dc)

EMSA-Puffer: 100 mM Tris/HCl (pH 7,5)
 500 mM KCl
 500 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM EDTA
 50% Glyzerin

radioaktiv markiertes Doppelstrang-Desoxyoligonukleotid
Kernproteinextrakt

Durchführung:

Für das native Polyacrylamidgel wurden 6 ml 10 x TAE, 11,1 ml Acrylamid-Mix und 42,9 ml H₂O zusammengegeben und sterilfiltriert. Nach Zugabe von 150 µl 30% APS und 70 µl TEMED wurde die Gellösung zwischen mit Abstandhaltern versehene Glasplatten gegossen und ein Kamm eingesteckt. Die Polymerisation erfolgte in ca. 30 min bei RT. In der Zwischenzeit wurde die Bindungsreaktion durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden dazu 0,3 µl Carrier-DNA (poly(di-dc); 0,3 µg), 1 µl 10 x EMSA-Puffer, 0,5 µl 0,1 M DTT, 1 µl radioaktives Oligonukleotid (10000 cpm) und 15 µg Kernextrakt zusammengegeben. Bei einer Kompetition wurde noch zusätzlich das nichtradioaktive Oligonukleotid in entsprechender Verdünnung (1:1, 1:10, 1:100, 1:500) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 4°C inkubiert.

Für den spezifischen Nachweis des DNA-bindenden Proteins wurden in *Supershift*-Analysen anschließend an die Bindungsreaktion etwa 25 µg Antikörper/Präserum bzw. unspezifisches IgG zugegeben und 2 h bei 4°C inkubiert.

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

2.2.6.2 In vitro DNase I footprint

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

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

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

Das zu untersuchende Promotorfragment, das laut Sequenzanalyse Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten könnte, wurde durch eine PCR hergestellt. Der 5'-Primer enthielt eine Not I-Schnittstelle, die mit radioaktivem α -dCTP und α -dGTP durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (s. 2.2.4.9.2) aufgefüllt werden sollte, der 3'-Primer einen AT-Überhang, der eine zufällige Markierung des 3'-Endes verhindern sollte. Im Anschluß an die PCR-Reaktion erfolgte die Aufreinigung über ein Agarosegel und Gelextraktion (s. 2.2.4.2.3).

2.2.6.2.1 Chemische Sequenzierung

(nach Maxam und Gilbert, 1977)

Material:

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

FA-Ladepuffer:	1 mM EDTA
(5x)	0,1% (w/v) Bromphenolblau
	0,1% (w/v) Xylencyanol
	80% (v/v) Formamid (pH 8,0)

Durchführung:

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

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

2.2.6.2.2 *DNase I-Titration*

Material:

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

Durchführung:

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

2.2.6.2.3 *Footprint*

Material:

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

Durchführung:

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

2.2.7 Kultur eukaryotischer Zellen**2.2.7.1 Verwendete Zelllinien**

Zelltyp	Referenz	Beschreibung
Cos	Gluzman, 1981	immortalisierte Nierenzellen der Grünen Meerkatze
3T3	ATCC	immortalisierte murine Fibroblastenzellen (NIH 3T3 CRL-1658)
Q2nB	Stocker und Bissel, 1981	Wachtelfibroblasten
L929	ATCC	Mausfibroblasten
CEF	Labor Dr. Flamme	primäre Hühnerfibroblasten
BAE	Schwartz 1978	primäre Endothelzellen aus der Rinderaorta
HEK/293	ATCC	humane embryonale Nierenzellen, E1A-transformiert (CTRL1573)
HEP1C4	Gradin <i>et al.</i> , 1996	HIF-1 β -defiziente Maus-Hepatomezellen
HUVEC	Gimbrone, 1976	primäre humane Nabelschnurendothelzellen
HUE	ATCC	spontan immortalisierte humane Endothelzellen

2.2.7.2 Isolation von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen

(nach Jaffe *et al.*, 1973)

Um Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) zu gewinnen, wurden diese mit Kollagenase von der Gefäßinnenwand abgelöst, ausgeschwemmt und in Kultur genommen.

Material:

Kollagenaselösung: 0,03% (w/v) Kollagenase in PBS
(CLS3, 180U/mg; PAN Systems/Aidenbach)

Medium: HUVEC-Medium (s. 2.2.7.4)
10 µg/ml Heparin
2 µg/ml Amphotericin B (Serva/Heidelberg)
0,3% (v/v) Retina-Faktor (s. 2.2.7.3)

FCS

sterile Knopfkanüle

sterile OP-Klemmen

sterile Kompresse

autoklaviertes PBS

autoklavierte Bindfadenstücke

Durchführung:

Die Nabelschnüre wurden direkt nach der Abnabelung in sterile Becher gegeben, im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb von 48 h präpariert. Nach der Durchsicht auf Verletzungen wurde die Nabelschnur (Mindestlänge 15 cm) mit einer sterilen Kompresse gesäubert und ungefähr 1 cm an jedem Ende mit einer sterilen Schere abgeschnitten (eventuell vorhandene Abklemmmale wurden mit abgeschnitten). Nach kurzem Spülen in PBS wurde eine sterile Knopfkanüle in die Vene eingeführt, mit Bindfaden befestigt und die Vene kurz mit 4-6 ml Kollagenaselösung ausgespült. Anschließend wurde die Vene unten mit einer Klemme verschlossen, unter leichtem Dehnen mit Kollagenaselösung gefüllt und nun auch unterhalb der Kanüle abgeklemmt. Nach einer Inkubation von 20 min bei 37°C im Brutschrank wurde die Vene leicht massiert, damit sich die Endothelzellen besser vom Subendothel ablösen. Die Klemmen wurden entfernt und der Gefäßinhalt in ein steriles Falcon-Röhrchen, gefüllt

mit 2 ml FCS, überführt. Nun wurde die Vene mit dem gleichen Volumen PBS nachgespült, das anschließend im selben Falcon-Röhrchen wie die Kollagenaselösung aufgefangen wurde. Nach dem Auffüllen auf 50 ml mit PBS folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1000 x g. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, der Niederschlag in etwa 3 ml Medium resuspendiert, auf gelatinisierte 6 cm-Schalen ausgesät und bei 7% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach 2 Tagen konnten Blutzellen und sonstige Verunreinigungen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und das Medium gewechselt werden.

2.2.7.3 Präparation von Retinafaktor

(modifiziert nach Mascarelli *et al.*, 1987)

Retinafaktor ist ein wäßriger Extrakt aus Rinderretinae, der als Endothelzellmitogen im wesentlichen bFGF enthält. Aus frisch entnommenen Rinderaugen wurden die Retinae herauspräpariert und mit dem gleichen Volumen an PBS bis zum nächsten Tag bei 4°C inkubiert. Die Präparation wurde mehrmals vorsichtig gemischt. Die festen Bestandteile wurden zuerst durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 Upm und 4°C (Kühlzentrifuge Biofuge fresco, Heraeus/Hanau) abgetrennt und der Überstand anschließend nochmals für 30 min bei 10000 Upm (Ultrazentrifuge Centrikon T-1180, Rotor A 8.24, Kontron/Zürich, CH) zentrifugiert. Der leicht gelbliche Überstand der zweiten Zentrifugation wurde nacheinander durch Filter der Porengröße 0,8 µm, 0,45 µm und 0,22 µm aufgereinigt und in 2 ml-Aliquots bei -20°C eingefroren.

Die Präparation von Retinafaktor erfolgte als Serviceleistung im Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung in Bad Nauheim.

2.2.7.4 Medien und verwendete Lösungen

Folgende Grundmedien und Lösungen wurden verwendet:

DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (NUT MIX F-12) mit 4500 mg/ml Glukose; Gibco BRL/Eggenstein), MCDB 131 (Gibco BRL/Eggenstein), Optimem 1 (Gibco BRL/Eggenstein), FCS (fetales Kälberserum; Firma PAA/Marburg und Boehringer/Mannheim), Chicken Serum (Sigma/Deisenhofen), Pen/Strep. (10000 U µg/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin; Sigma/Deisenhofen), β-Mercapto-

ethanol, NEAA-Lösung (Amimed/Allschwill (CH)), Pyruvat (100 mM NaCH₃COCO₂, Amimed/Allschwill (CH)), Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA; Firma PAA/Marburg), Accutase (Firma PAA/Marburg), Glutamin (Gibco BRL/Eggenstein), Geneticin G-418 (Gibco BRL/Eggenstein), ECGS/H2 (endothelialer Zellwachstumszusatz/Heparin; PromoCell/Heidelberg)

Die Kulturmedien setzten sich folgendermaßen zusammen:

Zelltyp	Medienzusammensetzung
Cos 3T3 L929	10% (v/v) FCS 1% (w/v) Glutamin (200 mM) 0,5% (v/v) Pen./Strep. (10000 IU/ml; 10000 µg/ml) DMEM
Q2nB CEF	8% (v/v) FCS 2% (v/v) Chicken Serum 1% (w/v) Glutamin 0,5% (v/v) Pen./Strep. DMEM
BAE ACE	10% (v/v) FCS 1% (w/v) Glutamin 0,5% (v/v) Pen./Strep. 1 ml ECGS (0,4%) / 250 ml DMEM
HEK HEP1C4	10% (v/v) FCS 2% (w/v) Glutamin 1% Pen./Strep. 1% (v/v) NaPyruvat (100mM) 1% (v/v) NEAA 1 µl Mercaptoethanol/250ml DMEM
HUE HUVEC	8% (v/v) FCS 2% (w/v) Glutamin 1% (v/v) Pen./Strp. MCDB 131

2.2.7.5 Vermehrung, Haltung und Lagerung eukaryotischer Zellen

In Gewebekulturschalen oder –flaschen wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 90% bei 37°C und Begasung mit 7% CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre inkubiert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen durch Inkubation entweder mit Trypsin/EDTA-Lösung oder mit Accutase abgelöst und bei der Trypsinierung die Reaktion durch Zugabe von DMEM abgestoppt. HEK-Zellen konnten wegen ihrer lockeren Bodenhaftung ohne Zugabe von Trypsin/EDTA bzw. Accutase vom Boden des Kulturgefäßes abgespült werden. Anschließend wurde die Suspension durch fünfminütige Zentrifugation bei 1000 x g sedimentiert. Nach Resuspendierung in frischem Nährmedium wurden die Zellen in entsprechenden Verdünnungen (je nach Wachstumsgeschwindigkeit) in neuen Kulturgefäßen ausgesät.

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

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

2.2.7.6 Transiente Transfektion

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

Transiente Transfektionen wurden entweder mit der Transfektionsreagenz SuperFect von Qiagen/Hilden oder durch Elektroporation erreicht.

Für die transiente Transfektion wurden die Zellen am Vortag so ausgesät, daß sie am Tag des Versuches zu etwa 70% konfluent gewachsen waren. Für die Transfektion in 6-Loch-Platten wurden pro Loch insgesamt 2 µg DNA mit Grundmedium auf 120 µl aufgefüllt und mit 10 µl SuperFect Reagenz (Qiagen/Hilden) vermischt. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurde das Gemisch zu den Zellen gegeben, die vorher mit 5 ml frischem Nährmedium überschichtet wurden. Am folgenden Tag wurde das Medium erneuert.

Bei der Elektroporation wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, vom Untergrund abgelöst und durch Zentrifugation sedimentiert (s. 2.2.7.5). Der Zelniederschlag wurde in 3 ml Elektroporationsmedium Optimem 1 resuspendiert und auf Eis gelagert. Nachdem mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt worden war, wurde die Konzentration auf 3×10^6 Zellen pro ml eingestellt und für die Transfektion in 6-Loch-Platten pro Ansatz ein 200 μ l-Aliquot in einer 4 mm-Küvette auf Eis vorbereitet. Nach Zugabe von insgesamt 25 μ g DNA in maximal 20 μ l wurde für 30 min auf Eis sowie für 30 sek bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die anschließende Elektroporation erfolgte im Gene Pulser (BioRad/Hercules, USA) bei 290 V und 500 μ F über etwa 20 msec. Nachdem 30 min bei RT inkubiert worden war, wurden die Zellen mit einer sterilen Pasteurpipette und 800 μ l Kompletmedium aus der Küvette gespült und nach Zugabe von 1 ml Kompletmedium ausgesät.

2.2.7.7 Simulierung hypoxischer Bedingungen

Durch Zugabe von zweiwertigen Schwermetallionen wie Ni^{2+} oder Co^{2+} oder von Metall-Chelatoren wie Desferroxamin (DFO) ist es möglich, in Säugerzellen eine ähnliche adaptive Antwort zu induzieren, wie sie auch bei Hypoxie auftritt.

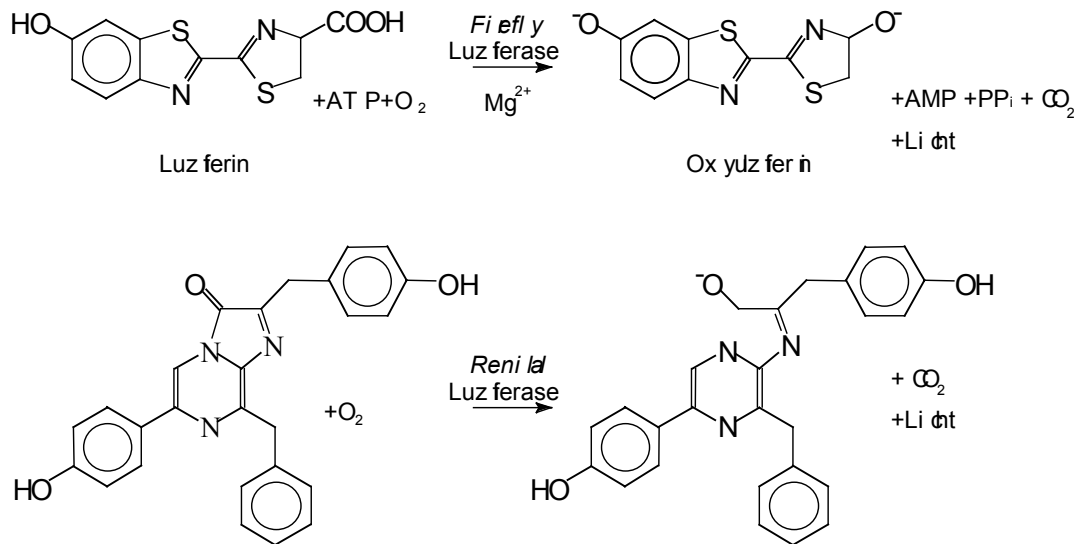
Zu diesem Zweck wurden dem Nährmedium 100 μ mol CoCl_2 bzw. Natrium-desferroxamin zugesetzt und die Zellen anschließend noch 16 h im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Danach konnte die Genaktivität z.B. durch Reporteranalysen überprüft werden.

2.2.8 Reporteranalysen

Für die Untersuchung der Aktivierung von Promotorkonstrukten durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wurde der zu untersuchende Promotor in einen Reporter-genvektor kloniert, in dem das Luziferase-Gen aus *Photinus pyralis* (firefly) als Reporter-gen fungierte. Über die Quantifizierung der Luziferaseaktivität konnten Rückschlüsse auf die Promotoraktivität gezogen werden. Um die Reporter-genwerte zu standardisieren und Schwankungen durch ungleiche Zellzahlen oder Transfektions-effizienzen zu eliminieren, wurde ein zweites Reporter-gen (aus *Renilla reniformis*), das unter der Kontrolle eines TK-Promotors stand, kotransfiziert. Die Reporter-genanalysen

wurden mit Hilfe des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System von Promega/Heidelberg durchgeführt.

Folgende Reaktionen fanden statt:



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

Material:

- | | | |
|---|---|---|
| Lysispuffer | } | Bestandteile des
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System
von Promega/Heidelberg
(Qiagen/Hilden) |
| LAR II-Puffer | | |
| Stop&Glow-Lösung | | |
| Superfect | | |
| z.B. A293-Zellen | | human embryonic kidney (HEK) |
| Nährmedium | | |
| Grundmedium | | |
| Reportergenplasmid, Standardisierungsplasmid,
Transkriptionsfaktor (in einen Expressionsvektor kloniert) | | |

Durchführung:

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

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

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

Zur Messung wurden 15 µl Lysat pro Loch einer 96-Loch-Platte in einem Luminometer mit 75 µl LAR II-Puffer (Bestandteil des Promega-Reagenziensatzes) versetzt. Nach 2 sek Verzögerung, die der Durchmischung dienen, wurde die Lichtemission 8 sek lang gemessen. Anschließend wurden 75 µl Stop&Glow-Lösung eingespritzt und erneut gemessen.

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

2.2.9 Transgene Mäuse

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

Zur Charakterisierung eines Promotors gehört die Untersuchung des Expressionsmusters *in vivo*. Zu diesem Zweck wird ein Reporter-genkonstrukt generiert, in dem das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle des Promotors bzw. seiner Mutanten steht. Bevor ein Konstrukt im Transgenexperiment eingesetzt wird, testet man es in der Zellkultur. Kann man hier eine Anfärbung durch das Konstrukt beobachten, wird die DNA linearisiert und durch Mikroinjektion in einen der Pronukleoli einer befruchteten Mausoozyte gebracht, wo sie an zufälligen Stellen in das Genom integriert wird. Nach dem Transfer in den Eileiter einer pseudoträchtigen Maus kann sich ein transgenes Tier entwickeln, das zu einem bestimmten Anteil aus Zellen besteht, welche die fremde DNA in ihr

Genom integriert haben. Die pseudoträchtigen Weibchen wurden aus Verpaarungen mit vasktomierten NMRI-Albino-Männchen gewonnen. Durch Kreuzung kann das Transgen an Nachkommen weitergegeben werden, welche dann heterozygot für das Transgen sind.

Material:

Pipes-Puffer:	0,1 M Pipes 2 mM MgCl ₂ 2 mM EDTA 2% Paraformaldehyd (pH 6,9)
Formaldehydlösung:	37%
Färbelösung I:	5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ 2 mM MgCl ₂ 0,02% NP-40 0,25 mM Desoxycholat 0,1% X-Gal in PBS
Färbelösung II:	9 µl NBT 7 µl X-Phosphat in 2 ml Äquibrierungspuffer
NBT:	100 mg/ml 4-Nitroblue-tetrazolium-HCl in 70% (v/v) Dimethylformamid
X-Phosphat:	50 mg/ml 5-Bromo-4-chlor-3-indoylphosphat in Dimethylformamid
Äquibrierungspuffer:	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ (pH 9,5)
PBS	

Durchführung:

Um Transgenkonstrukte auszutesten, wurden sie in HEK-Zellen transfiziert (s. 2.2.7.6) und diese einen Tag später fixiert und angefärbt. Zur Fixierung wurde nach Absaugen des Mediums entweder 1 h mit kaltem Pipes-Puffer auf Eis inkubiert, oder für 30 min kopfüber auf einem in Formaldehydlösung getränkten Tuch dampffixiert. Anschließend

wurde zweimal mit kaltem PBS nachgewaschen, 600 µl Färbelösung I pro Loch einer 6-Loch-Platte zugegeben und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auszählung der angefärbten Zellen.

Die Etablierung der transgenen Tiere und deren genotypische Analyse erfolgte als Serviceleistung im Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung in Bad Nauheim; die phänotypischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Regina Heidenreich durchgeführt.

Für die Genotypisierung wurde die genomische DNA aus Embryonen oder aus den Schwanzspitzen neugeborener Mäuse durch PCR-Reaktionen analysiert.

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

3 Ergebnisse

3.1 Hinweise auf eine endothelspezifische Expression von Hif-2 α

Für den Transkriptionsfaktor Hif-2 α konnte bei Mensch, Maus und Huhn eine endotheliale Expression gezeigt werden (Tian *et al.*, 1997; Flamme *et al.*, 1997; Favier *et al.*, 1999). Wir konnten darüberhinaus auch in der Wachtel eine Expression in Blutgefäß-Endothelzellen nachweisen (Elvert *et al.*, 1999). Um die Möglichkeit einer endothelzellspezifischen Expression weiter zu untersuchen, wurde von der Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien ein Northern-Blot angefertigt. Der Northern-Blot wurde anschließend mit einem 719 bp langen, radioaktiv markierten PCR-Fragment hybridisiert, das mit sequenzspezifischen Primern aus dem murinen cDNA-Klon *HIF2 FLAG pcDNA3* generiert worden war. Diese Sonde hybridisierte nur mit RNA aus menschlichen Nabelschnur-Endothelzellen (HUE), während für RNA nicht endothelialer Zellen keine Hybridisierung zu sehen war (s. Abb. 3.1).

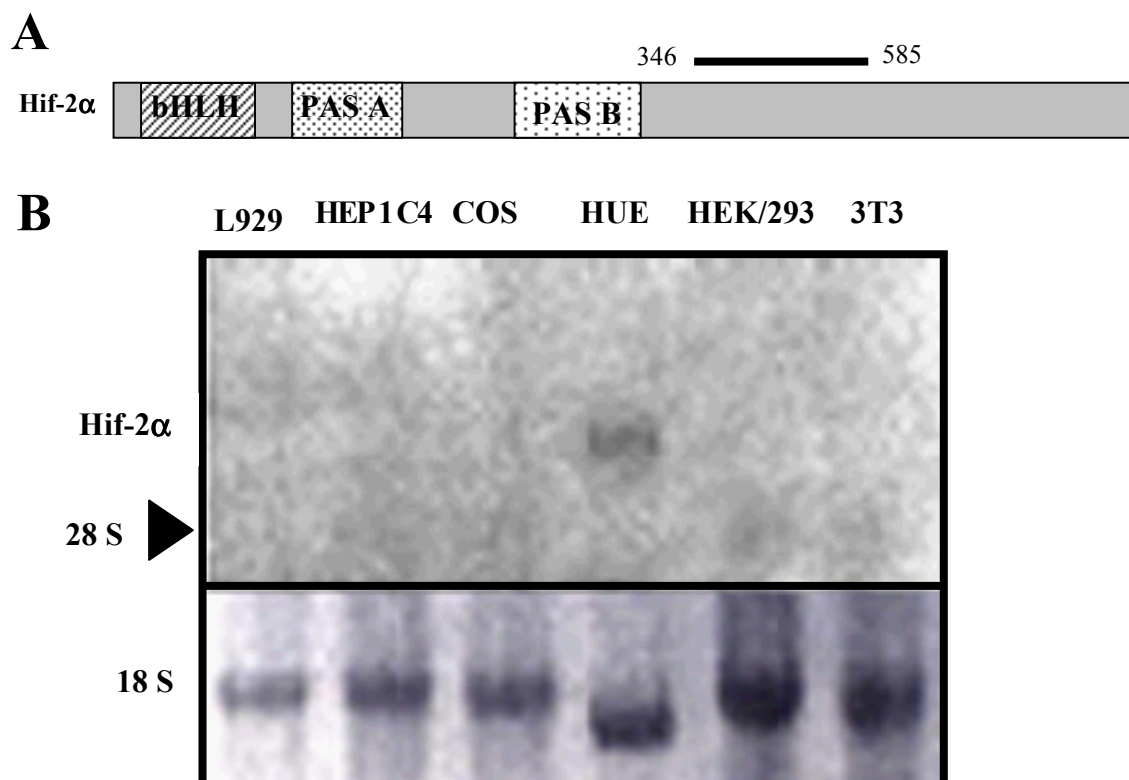


Abb. 3.1: **A** Lage der Hybridisierungssonde im Vergleich zur genomischen Struktur von Hif-2 α . Die angegebenen Ziffern beziehen sich auf die AS-Numerierung des Hif-2 α -Proteins. **B** Northern-Blot-Analyse. Aufgetragen wurde Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien. Hybridisiert wurde mit einer radioaktiv markierten Hif-2 α -Sonde (oben). Als Referenz ist die vor der Hybridisierung auf der Membran angefärbte 18 S-RNA-Bande abgebildet (unten).

Dieses Ergebnis deutet auf eine endothelspezifische Expression von Hif-2 α hin.

Für die Steuerung der Expression eines Gens verantwortlich sind bei Eukaryonten der basale Promotor, weite Bereiche des 5'-UTR mit zahlreichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen sowie eventuell vorhandene, weiter entfernt liegende Verstärker- oder Repressor-Elemente. Sie alle sind bei der Analyse eines Promotors zu berücksichtigen. Da diese Elemente außerhalb der Bereiche liegen, die in der mRNA repräsentiert werden, muß ihre Analyse auf genomischer Ebene stattfinden.

3.2 Klonierung des 5'-UTR des murinen Hif-2 α -Gens

Aus dem Plasmid λ m 70415-3 (murine HIF-2 α -cDNA in pB KSII (+), Dr. I. Flamme) wurde mit den Restriktionsendonukleasen NotI und PvuII ein 190 bp langes Fragment ausgeschnitten, das 183 bp aus dem 5'-UTR sowie die ersten sieben bp des ersten Exons von Hif-2 α enthielt (PvuII-Sonde, s. Abb. 3.4b). Mit diesem Fragment als Sonde wurde eine genomische Maus-Bibliothek des Mausstammes 129SVJ im Bakteriophagen λ nach Klonen durchsucht, die den 5'-Bereich des murinen Hif-2 α -Gens enthalten sollten. Bei der Hybridisierungsanalyse von 300000 Phagen-Klonen konnten die drei positiven Klone 3.3, 10.1 und 12.2 isoliert werden. Die aufgereinigte Phagen-DNA dieser drei Klone wurde einer Restriktionsanalyse mit neun verschiedenen Restriktionsendonukleasen unterzogen, um ein zur Klonierung geeignetes Restriktionsfragment zu finden. Beim Southern-*Blot* der Restriktionsverdauungen und anschließender Hybridisierung mit derselben PvuII-Sonde, mit der auch schon die Hybridisierungsanalyse der Phagen-Klone durchgeführt worden war, tauchten bei jeder Restriktionsverdauung mehr als nur eine hybridisierende Bande auf (s. Abb. 3.2). Dies deutete auf eine unvollständige Verdauung hin, wobei jeweils die kleinste Bande das gesuchte hybridisierende Fragment darstellte.

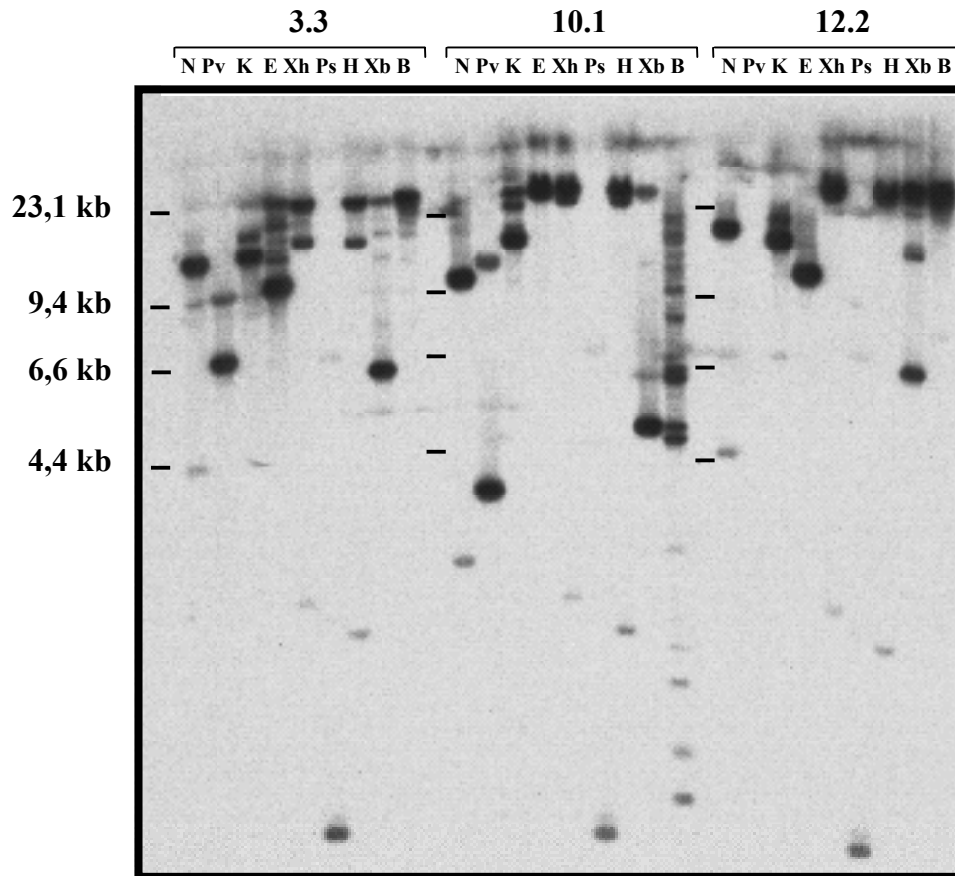


Abb. 3.2: Southern-*Blot*-Analyse der Phagenklone 3.3, 10.1 und 12.2. Jeweils 1 μ g Phagen-DNA wurde mit 10-20 U NotI (N), PvuII (Pv), KpnI (K), EcoRI (E), XhoI (Xh), PstI (Ps), HindIII (H), XbaI (Xb) und BamHI (B) verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hybridisiert wurde mit der PvuII-Sonde.

Die bei der Restriktionsverdauung mit XbaI entstandenen Fragmente schienen eine zur Klonierung geeignete Länge aufzuweisen. Ihnen konnte bei Wiederholung der Restriktionsanalyse eine ungefähre Länge von 4,7 kb, 6,5 kb bzw. 6,7 kb zugeordnet werden (s. Abb. 3.3).

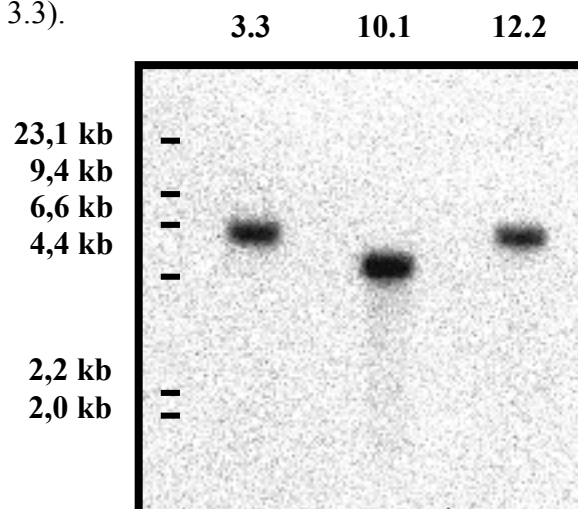


Abb. 3.3: Southern-*Blot*-Analyse der Phagenklone 3.3, 10.1 und 12.2. Jeweils 1 μ g Phagen-DNA wurde mit 12 U XbaI verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hybridisiert wurde mit der PvuII-Sonde.

Die XbaI-Fragmente wurden in den Plasmid-Vektor pZErO-2 kloniert. Das 4,7 kb große 10.1Xba-Fragment erwies sich nach Sequenzierung als geeignet für die durchzuführende Promotoranalyse, da es 3383 bp 5'-UTR enthielt. Durch eine PCR am Plasmid *HIF-2 10.1Xba in pZErO* mit den pZErO-Vektorprimern SP6 und T7 sowie den internen Primern HIF-2 e1u1 und HIF-2 e1d1 (s. Abb. 3.4b) wurde die 3'→5'-Orientierung des klonierten 10.1Xba-Fragmentes nachgewiesen. Außerdem konnte durch diese PCR nachgewiesen werden, daß das 4,7 kb große 10.1Xba-Fragment neben dem 27 bp großen Exon 1 etwa 3,4 kb 5'-UTR und 1,3 kb des ersten Introns von Hif-2 α enthielt. Durch anschließende Sequenzierungen wurde die komplette Sequenz des insgesamt 4662 bp langen 10.1Xba-Fragmentes ermittelt. Außerdem sequenziert wurde der komplette Intronbereich des Konstruktes *HIF-2 Intron1-Fragment A*, das freundlicherweise von Herrn Dr. Brusselmans vom *Center for Transgene Technology and Gene Therapy* in Leuven/Belgien zur Verfügung gestellt worden war. Das durch Zusammensetzen beider Sequenzen erhaltene 9047 bp lange Hif-2 α -Fragment wurde mit Hilfe des Programmes TRANSFAC der GBF, Braunschweig (Wingender *et al.*, 2000) auf potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen hin durchsucht (s. Abb. 3.4a). Dabei wurde neben mehreren potentiellen Hif-2 α -, Ets-1-, Sp1- und GATA-Bindungsstellen sowie einer CAAT-Box auch eine potentielle TATA-Box gefunden, die etwa 610 bp oberhalb des Start-ATG lag. Außerdem wurden zwei scherstreß-induzierbare Elemente (SSRE), eine potentielle Transkriptionshaltestelle im ersten Intron und weitere potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Promotorstrukturelemente identifiziert.

XbaI

```

-2805 CTAGAGCTCG CGGCCGCGAG CTCTAATACG ACTCACTATA GGGCGTCGAC TCGATCTGCC TGTCTCTGCC TCTCAGGTTTC TGGGATTAAA GGTGTGGGCC
-2705 AGCAGTGCCT GGCCAGTCTC ATCTCTTAGT AAAATAGCTA GGCAAACATT CCTTTGATGT CACAGTCTTT GCAGTACCTC AGAGGGCTGA GACACGCGGG
-2605 TGAGGAGACT TTCTAGGAGA TGTGTGATCT GTGTACCCCC TTCGCCGCTT TAAGCAGCAT GAGAGTTTGA CTPTAAGATG CCTTCTGCTG CTATGTGAGC
-2505 CTAACACAGA TGCTTCCAGA GACACTCATG TAAAGCTAAG GTCTTAGCCC CTCCAAAACC GTACCATCTT TATTCGGAGC TGCCCCCCTT TAGTTTCCAC
-2405 TGGAGGCCAA GACCTCAAAG AAGTCTATGT CTGGCTTACA TGCTCAGCTC CTACAAAAGA CTGCTGACAC CATGTCTTCT CTGGAAGACA TCTTAAGAGG
-2305 TCTTTAGGCC ACCTGGCTCT GCTCTATGCA AGTCTGTGTC TAGTCTGGGG AATCTTTGAG GCGCACTTAA TTTGTAGGTT AGAAGAGGG GATGCAACTA
-2205 ACATAGGGAA AGTTGAAGTA GTCTTGAGTG ACCTCTTACA TCTCTCCCTT CCATCTCCCC CAAACTGGGT TTCCTGTAT AACCTGGCT GACTAGGAAC

-2105 TTTTTTTTTT TTTTGTAAAC CAGGCTGGCC CGTGTGGGG GATGGTCTTG CGCTGTGIAT TCTGATGCTG ATTTCCACGC CAGGACAACT GGTTCAGATC
ARNT (-)
c-Ets-1(+) ARNT(+) c-Ets-1(-) Oct1(+)
-2005 GGGACTTGGC GTGGTCAAGC ATCTCCGGT TTAGATGTTAT GCTAAAAATG TTTTCCCTCA GGACTGGAAC TCTGCGGTCT GCCTGCCTCT GCCTCTTGAA
Apal
-1905 TGCTGGGATT AAGGGTGTGA GCCAGTATGT CCGACCAGAA CCCTACTTIT AGAAGTAACT GTGAATTAGG GATTGAATCC AGGGCCCTTA TCTTTCCTCT
Oct1(+) AP-1(-)
-1805 TAAAAATCAA AAACCTTCTA AACGAATTC ATAACCTCAA GCTATTGAA ATGTTCCCTG CGGGTTAAAG GCATCCCCA GTCACCTGTC AAGTACAGCT
NFKB(+)
-1705 CAAATCCAGC AGAAGCTCTG GTGAAAAACA ATGTCTGGGG CCTTGAAGCT GTCGAAGTGC TTAAGGTTTT TTATTGTCTG GTCTTTCCCT CCCTCCCTCC
-1605 CTCCTCCCT CCATTCCAAT CTCAAGAGAA TATATAAAAT AAAGCAAACA AAATATGTTT ATATTTTATT ACTACTGTGT CTACCAATTT GAATTTCTTA
AP-1(-) AP-1
-1505 TTAAGACCCA GGGTGTCTGG ATGTAATAAT GTCATAGGAA ATCATCCACC AGCCTCCAAG AGTGAAAAGG GTCTGGTCTT TGAATCACC CTCAGGTTG

```

(-) E-Box GATA (+) GATA (-)

-1405 TCAACTGATT TCCAAAGTCT CAAGCACTCA TTCCTTCAGA TACTCTCCCA AGACTTTCAA AAAGTATCA CCTTCTTCAT GCTTAAACAA ACTTAAAAAT

AP-1 (-) GATA (+)

-1305 CGCCCCACC CCAAGACACA GTCACACACA CAGTCTCTGG TTATAATTTT ACTAGGAAC TTGTGTTTAA GAATAGTTCC GGAAGCACAA ACTTTAGATA

AP-2 (+) NcoI

-1205 CCAGGGCAGC CCAATTTGAG GGACCGTGTCT TTCTCCGCAA TTCACAACATA TGGAGCCCGT TGGCTCTTCC CCTAGCCTTC AAAAATCCAT GGCTGCCCTT

NFkB (-)

-1105 CTTCCTTCTG GAGATTTTCC TGCAGAAGTA GGAATGGGA AAGTGTCTAA GATCAAAGCA AGAGTGGGCA TCTCACAGGT GGAAGGCCA AAGAACCCTC

AP-1 (+) c-Ets-1 (+) ARNT

-1005 TGACTGCTTA GGAAGAGGA GACTTCATAA CACCACGTCC TGCAAGTTGC TGTATCCTTC GAACCCCGGA AGGGLACATC CAGTGATTG GAAACACGCT

(-) Oct1 (-) GATA (+) SacI

-905 ATCAACACAT CCCACATCA CACTCAGBAA CTCTCTGGGG AGCCACCGT GATCTGGGG TATTGAGAGC GGGCAGAGGC CTGAGGGAGC TCAAGGCTC

-805 TCCTCTCAGG CATACTACTA AACCTAACAG TCTACCACGA GCACCTCAA ACCCATAAAC TGGTTGAGGA AGACAAAGGC AGGAGCAACC CTAGATCATT

AP-1 (-)

-705 TTTGTCCAG TTTCTCCAC AACTTTCTGC CACTCGGGAC TCAGAAGTCA AGTTCAGTTT GGCCAAAGAG AGCGCACCTC CAAGGCAGAC AAGAACAAGA

c-Ets-1 (+)

-605 GCCGACAGG TCCTGGGGAT CATTACCACC GGCCGAAGGG AGCCAAGCGG ATGGTTTAGG GGACTATAGC AGTACCUGGA AGCCGGGGG GGGGTTGGCT

ARNT (-)

-505 GGGCGCTCCG TGCACGCCCT AGCTGGCTC GCGATCTCCG ACCCAGCGCT CTGCGCCTAG CCTAGCTCTT AGGGGAAAAG TGAGGCTGAA AGGACACTGG

-405 CGCAAAGGCA TACTCCGAAC TTGGGTAGCA GATCCCCGCC ATTACTCAGT CTGCGCTAA CTGCGCTTCC ATTTGGAGTC CCATATAGTT ACTCGCCACC

CAGATCTG *Sp* Palindrom (Cawen et al., 1998)

-305 AGCGACTCA AAAACAAGTC GCAGTTCTGC GGAAGGASGA GGAAGGGCAG GCGCGGCC GAAGAGCGCA GCTTCAGAGA AAGGGGAGGG ACGGGGTCAG

CAAT (-) ARNT (+) Sp1 (+) Sp1 (-)

-205 GBCAGAAGCT GTGGCCGCGC CTCCTATTG GCGGGACAC GGTGGGAAGT CGGGGCAAGC AGCCAGCGG GCGGGCGGG CTTCCTGGA GCCCGCCCTC

Sp1 (-) SacII Sp1 (+) TATA-Box (+) AP-1 (+) c-Ets-1

-105 GCGCGCCGCC CCAACCCGAT GTCCCACTCC CGCGCCCTC GCGCCCTCC GCGGGCGGC GCGCCGATT TTAAAGTGG CACTCACGCC CAGGAGCCCG

(+) +1 elu3 c-Ets-1 (+)

-5 GACATTGAG AGCGCCGGT GTACAGCTCC GGAAGTCCCA GCGCTCCGCT CCAGCTCTCC TGAGGCGGCC GTACAATCCT CGGCAGTGC CTGAGACTCT

AP-1 (-) c-Ets-1 (+)

+96 ATGCTCATCT CAGCGGCCG ACTCGCTTC CCGCGGATTT TTTTCCAAC TGTCTCTTC GAGCCATTT TTTTCTTTT TTTCTTTTC TTTTTTTCT

AP-1 (-) AP-1 (+)

+196 TTTTCTTTT TGGTTGGTTG GTTTTATTG GTCAGATCCC AGAAAGTGA CTCTGTCTCG GGGCTAAAG GAACCTCAGG TCCTTGTGCG CTGCTCTCTC

Sp1 (-) ATF/AP-1/CREB (-)

+296 TTTTGGCGTC TTACAACCTC CTCCCACCTC TTTCCCAGC CCGCCCTCCT CCTGCAGGTT CTTCCCTCC ACCCCCTCC TCCTCTCTCC TCCTCCGCAC

+396 CTAGCCAGCC CTCTGCAAAC TTCCACCTGA TTGAGCGGGA TCTCGGACCT GCGAGCACTA AAGACCTTTC ACACCTGCC GGGCAGACGA AAGCTCGGGA

SSRE Bsal Pvull

+496 GGGCCACAGC AAAGAGAGCG GCTGCAGCCC CTACGGGGTT AAGGAACCCA GGTGCTCCG GCTCTCSAGG GCCACGCGCA CATGACAGC TGACAAGGAG

K K R Intron1 AP-1 (-)

+596 AAAAAAAGG AAGCGGAGT CAAGCTGGC GACCGACTTG GTCCACGGCA TTGGCGAAC TGCGCGTGGC GGGCGGACC CGGGCGAGC GGGAGAGGGG

+696 TCGAGAGTT CTCGGAGGCT GGAGGACCG TGTGAGGGG CTTTGTAGTAA GCGAGTCGGT GATGCCTTTA GGGACAAGGA GCTGCGGTGT CCCATTAAG

GATA (+) AP-1 (-)

+796 TTGCAAAGC GATATTCG AAACCTTGA ACACGGAAAG ATGGCCCG AGGTACGGG TGCTTCCGG GCGCCTTCA AAGTCTGTGT CCCTGGAGCA

ARNT (-)

+896 CCAAGCTTCC CTAGCGAGTG TTTTGAATG TTTCTGGCT GATGCCCTCC ACTCTTAGG TTTCCATGCT GGAGCAGTAA ACACGCCTTT TTTTCTCTAA

Oct1 (-)

+996 AACCTCTAG GTTCTTCCG AAAGCGTTCC NTATGCGGGC TTTTGGCCCA CAAACTAGCA TGGAACAGAG GGGCAAAGC CAACTCTGGG GTGCGCCCTG

c-Ets-1 (+) AP-1 (-) c-Ets-1 (-)

+1096 ACCGAGAGC CGGATCACTG TCAAGGTCC TGCTCCAGAC GGCACCCAAG TTTGTTCAAC CCCCTTAACC TTACCCTACA CCTAGACTCC GCGAGAGAGT

AP-1 (+) AP-2 (-) AP-1 (+)

+1196 GGGAGTCCG TGACCTGGAT TCCCTGCGG GGGCAGTGC TGTAGTGTGC AGAGAGAGGA CCGTGACACC CCGCGCTCC GAGTGTCTGA TTCTTAAGAC

c-Ets-1 (-) Sp1 (-)

+1296 GAAGGGCAGC CACGAAGGTT TGCCCTCGCG AACCTTTCGG CACTGGGTGA GAGGCAACTC CCGGCAACTC GCGCTGCCCT CGAGCCTCCT TCAATCGGCC

```

+1396 E-Box CREB (+) AP-1 (+) Sp1 (-)
CCGATCTG IGACTTGACA CCCAGCTCTA GGAGCTGAGG TGGGAACACA GTGACCC GCGCAGACC TGGGTACATT CTCGTCGCCT GCAAAAGTTT

+1496 ARNT (+) c-Ets-1
ATAGTGGCC GCCTGGCACT TTGCTCCTGT TCGATCGGT GCGTGCCGGG GGTTAGAGCT TCCAGCACTG CGCTCCGTGG CGACTTAGCT GGGGTGTCG

+1596 (+) ARNT (+)
GAATGGTACG CGTGACCCA GAATGGCGCG AGTCTGCTGT AGATCCGTGG CCAGACTGGA AAAGACTGGC GGTGAGGACC CAGCCCCGAG CAAACGGGCT

+1696 GATA (-) GATA (+) GATA (+)
TTTTGTTGG GCTTCCACTT AGGACATGA GCCAGAACT GTGATCTTT TGGTCGAAAG CTGCAGCTCC CACCTCAGGG CACCGATAG GAGTTGATAA

+1796 AP-2 (+) XbaI GATA (-)
ACTCCAGCGA ATCGCACCCG TCCTBGCCCG GCGCCGCGC CCTGCGCTGG CGGATCTTA GACTAGATTG CCATFATC CCCACCAAAC AACTCTGAGG

+1896 TTCTGTGTAC TTTGAGGTA GAGAAGGAGA AGCAAGAGAG AGAGAGAGAG AGAAAAGACT AAGATTCTAG CTCAAACTGT AAAACCAGCC AGAGGGTAAT

+1996 CACAAACCAT CAAAACCGCG AAGTTGGACG GCAGAGTAGC CAGGAGCACT TTTTGAACAC TTTATTACTG CTTGTCTAT AP-1 (+)
GGTGACTGT CGCATTGTTG

+2096 SSRE AP-1 (+) E-Box GATA (-) AP-1 (-) Oct1
CGAGATBAGA CCGACAGTA ATCAGTGA AGTGCATCT TGCTCTTAGG TCFATCATCT CTGGGAGAG TCAGGBATCA GTGGGGAAAG CTATTTCCAT

+2196 (-) AP-1 (-) Oct1 (-) AP-1 (+) GATA (-)
ACCCAGCTTG CAGAGACTCT TTGCCGAGGG CTGGCAGGGA STATAGTCAG AGCCTAGAAG AACGTTGCAT AAAGACTA CAATFATC ACAACAGCGG

+2296 CCACTTTAAG AACCAGTG ACACAGTTG TGAACCTCCT AGGAATCTTC GGCCGTAGT GCAGTGCCCC AGTGGTAGCC AGGCCCCGAG GGTGTGTGTG

+2396 TGTGTCCAAA AAACAGGGCA AGCAGTGTAG GTTCAGTGA GTTCAGACT TCCAAAGCCT GTTAGGATAA TGGTTTTGAG ATCTCTGGTA AP-1
ATTGACTGA

+2496 (+) ATF/CREB/AP-1 (-) Oct1 (-)
CTTCTGGGG CGCTCATAT GTAGTTGAAA ATTGTGAAGC AGGCATCAA AAGTTAMTG CCCTTAAATG GCTGCCCGA GCTTCCCGA GCGCCTCAGG

+2596 AAATCAATGT GAGCAGCAAG GGTCCGGA TTGGGATAC CACCACCTAG TGGTTCAAGG GCCGGTCTT CTCCAGGGGA TAACTGAGCA TTTGTATGGT

+2696 TCCTCTGGA AACAGCCCCT CCAGAGGCCA GAAGGCTTGT TTTAGTCCA AACATCCTTG TGTGGTGA TATATTCCTT CATGGTAGTC AGGAGCCAGT

+2796 CTTTTATTG TTGGCTGGTT AGCAGACTGG GGGAGCCACA GCAAGCTCTC TTGAGTTCT CATCAACCA GCAGATTCC TGATTCTAGG AAGAGCCAAG E-Box

+2896 Oct1 (-)
TGGGATGCT CTCAAGTGGG GATTTGTAGA AGLATTAAGA TAAAGGAAG TGAGGTCTTT GGGTGGCCAG GAATCCAAGT CCAGGCACAA AGCTAGACTC

+2996 TGGGTCCAAG TACCTTTCAG GAGTGTCTCT GGTATTGGT GCCAGGGCAA AGATGGGCAA GGAATTGGAG ATACTGGAC CTTCAGTTT TCTAACTGTG

+3096 GCTGGCTTTT GATGGCAGCA GATTTAATTG TTCCTCTGTT AAAATAAACC CAAGTCCAT CAGTTTCCC AGCCGAGGAG ACAATGTCTG CTGGGCTTCT

+3196 TGAGTGAAGC TTATCTCCTA ACTAGTGTTC CTTCAAGTT TGACAACAGT CTAGCCTGGT AGAGAAGTGC TGTACGACAC TATCAGCCTG GCATTTAAAC

+3296 TGTACTAAG AP-1 (+)
ATGACTTTCT TAGAGTTTTG GTTTTTTGT TTTGTTTTGT TTTTGGGTT TTTTTTTTG TTTTTTGTG GTTGTTTTTG TTTTTTGTG

+3396 TTGTTGTTTT TTTCAGTTTT ATTGTGAGGC TTGAAGATTA TTTTATAAGC AAGTATGAAA GCCATAACA TATTTTCTCT TTCTGATAA GGCTCAAGGA

+3496 AGGTAATAA ATCCCTCTCG GTACAAGGAA AATTAGTGCT GATAAGAATC AGAAAGTTGG TTCATTACAA TCAGTTAGCA TGTGAACAGC AGAGCCTCCC
AGGCCAGGGC Transkriptionshaltstelle
| | | | | (Morishita et al., 1995)
+3596 ACCCATCCC CCACCCCCC ACCCCCCC CACCCCGCC ATGGCATGCC TCTTGCCACT GAGGATTCC AAAGATTAG TGCAGCTCAC CATCACCATA

+3696 CCTCCACCAC CACCACCAGA CCCCTGAACC TTCAAGACAG AGGTTTACTT TCCTGATAA TTGCAAGAGC CTTGTCTGTA GCTGAGGCAG GAGAGATGTC

+3796 AP-1 (-)
AACCAGTCAG TGGCGTGCT CTGTGAGTT AAAAACTTTG GGAATCGGA ATCCATTGGT TGAGTACCTT TCCTTTATT CAGTTAGGG AAAACAAAAA

+3896 ACAAACAACA ACAAACAACA ACAAACAACA AAAGACCCCA ACAAACCCTA CTACTCGAGG TATAAATAA AACCAATGCA AGCACCTCC TGGTCTCTGG

+3996 ATGTAGCAAG TTGCTTTGTG AAGTAGAGGA CATTCCACAG CTAAGTAGATT GTTGCCTGGT GTGATTAGGC AATTTTCAG GGATGAAAGC CTGAACTGAA

+4096 AACAGGCTAC TTTGTTACG TTGTCACAA AGCCTCTCTG CTGCTGTTTC TCTGCCTCTG TGCATGTGTG TGTTTACATG GCCTGCCCA GGGTCTAGG
    
```

```

+4196 AATCTATGTT GTTTAGAGAG AGAAGGAACC AAGTAGTTAA TTCTAGTGC TGTAGGGCTT AP-2 (+)
                                         GAGCCCGCTG GGTGTGAAAG TGCCTCCTTC AAGGCTGAGC
+4296 CTTTTCCATC TTTGAGGAAA TCTTTTCTGT GCAGCGTTTA CTTGCTTTAA AACTGCAAC AACAAAGCAA AAACGGTCTT GATA (-) GATA (+)
                                         GTCCATCTTC AAATATATAG
+4396 GGTCTCCTT CGTTTATCT TGATGAATCT TTCCTTAGTC CTAAGGAAAG TTTTGTGGTA CACAAACTAC CGAGCTTTTT ACCAAGTTAC TGAGTAAGTT
                                         AP-1 (+) GATA (+)
+4496 CTGTTTTTCTC CCAGGGCCTT ATTATTAGC TTTGCACAT CCAGAAACAT GCTGGTGAGT CTCACAAATGA CATCTATACC AP-1 (+)
                                         AAAGATACTAA CCAGTGGGTC
+4596 TGGAAAAACA GTGCTGAAAA CTAAGAAATG E-Box AP-1 (-)
                                         GGCATCTGTC TCATTACTCC CAATTGCTTG GTCTGATGGG AP-1 (-)
                                         GGTCAAGCTG GGGGACAGG ACCACCCAAG
+4696 AAACCGTTGG GGTATCAGCC ACTCATGGGT GTTTTCTTTG GTAGGGTTCA AATATTGAA GCTAAAGAAA AGAAATTCGT AATGGTATTT CAGTTGTGTA
                                         Oct1 (+) ATF/CREB/AP-1 (-) GATA (+)
+4796 CCGTACACCA TTATTGAATG Oct1 (+) ATF/CREB/AP-1 (-)
                                         GCAATCGTCA TTGAGGAAG TGGCTCTGTG TCCCTGATAT GATA (+)
                                         AATAAACGGT AGATGCTGGA CACCAGCATA AACTGGATCT
+4896 CAGAGAGAGT GTGGTGGTAG CREB (+) Oct1 (-) AP-1 (+)
                                         ACGTTAATAAC TTGAGAGATG Oct1 (-)
                                         AACATAAA AATACGATG CTCCACAGCG GTTCTGCACC ATGAAC AP-1 (+)
                                         TTGACACATGAC
+4996 AAATGACTA AP-1 (+) CCAATTGGTT GGTTTTTTTT TTTTTTAAA GATTATTAA TTATTATACC TAAGTTCACT CREB/AP-1 (+)
                                         GTACCTGACT TCATACACAC CAGAAAGGGG
+5096 AP-1 (-) AP-1 (-)
                                         TCTCAGATCT CATTATGGGT GGTGTGAGC CACCATGTG TTGCTGGAT TTGAAGCTCAG GACCTTCGGA AP-1 (-)
                                         GAGCAGTCA GTSCCCCTTTA CCTGCCAGC
+5196 CATCTCACCA GCCCGGTAC CGAGTTAAC TGCTTGATG ACACACTTGT E-Box TTTGGTGGGA GAATTTGCAG GGAGGACACT TACTGGCCTC AP-1
                                         CACAGTGGCA
+5296 ACCAAGGTT TCTGTTTCCA CTGAGGACAA CGGTGGCCTT AP-1 (+) c-Ets-1 (-)
                                         GACTGACTCC GTGAAGGCCG AGAAGGGGGG GGAGTACTTT c-Ets-1 (-)
                                         TCCGGGAGCC TTGTAATGTA
+5396 c-Ets-1 (-) TAGTAATAGA TCTCTAAAAT TCTATAGAGT GTATGTTTTG TTCTCTGGGT TTTTTTTTTT Oct1 (+)
                                         GCTTCCGGG Oct1 (+)
                                         ATGTTAATCT CAATCTCCCC TCTTCATGAA
+5496 GAGTGAACCC AGAGCTTTGC ACGGGCTGG GATA (+) ATAGCAATTCT CTACCACTGA GCTGGATGC CACCCTTTGT TCAGCTCCTA AP-1 (-)
                                         ATAGCAATTCT AP-1 (-)
                                         GTCACCTTTC AAAGGTGGTG
+5596 TGAAGAGAAA ATACCTTCTT CCGTCTTGC TGTCTAGCAC CCAAGAGCTC CCCTCCCTGA GTTCTAGGCT ACAGGCTGCC TGTCTCACA Oct1 (+)
                                         TTTCAATGCC
+5696 AGCGTCTTGT CTTGCTCTAG GGAGTGTCTA TAAGACATGT TTTCCACTAT CCCTGCTAT CTGGAGATTC TTTTGAACCT TAGAAATGGA TGTGCTCTTG
                                         c-Ets-1 (+)
+5796 GGAGAAATGA GCTACATAGG CAGAAGGACA AGATGGAAAG CTGAGCGGCT CAATCTTCCC GTGCCAGCGG CTGTCCTCAG AAACCTTCCG c-Ets-1 (+)
                                         GATTAATTTT
+5896 GTTAATCCTT GTAACAACCC TGTAAGATAA GCCCTGTTAT TATCTCCAGT TCACTAGTGG GAACTCAGGT GCAGCAAGGT TGCTGCCGT AP-1 (-)
                                         TGTCAACAGC
+5996 AGTATATCTT GGAGCTGAGA CTCTCCAGAG TCCCACTCT CACCCACCGT TCCTTGCCCTC CTGCCTTACC TAAAAGGCC ATAAAGCATT TAATACCATT
                                         GATA (+)
+6096 TCTGAATGTG GTAAGCACTC TATAAATGAT GATA (+) AACTTCTTTT GTTGCCTGTT Oct1 (-) AP-1 (+) AP-1 (+)
                                         TATAAATGAT Oct1 (-) AP-1 (+) AP-1 (+)
                                         TTTCTCGTGA CTCATCCCTT GTATCAAACC
+6196 TCACACACAC AGGCAGGAAC TGAAGACCCA AAGGCTATTCT CTGAATT

```

Abb. 3.4a: 9047 bp genomische Hif-2 α -Sequenz der Maus (mHif-2 α), die sich aus 3382 bp 5'-UTR, dem Exon 1 (27 bp) und 5638 bp des ersten Introns von Hif-2 α zusammensetzt. Eingezeichnet sind potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Promotorstrukturelemente, Transkriptionsstart (+1), Start-ATG, die neun AS des ersten Exons sowie einige wichtige Restriktionsenzymchnittstellen.

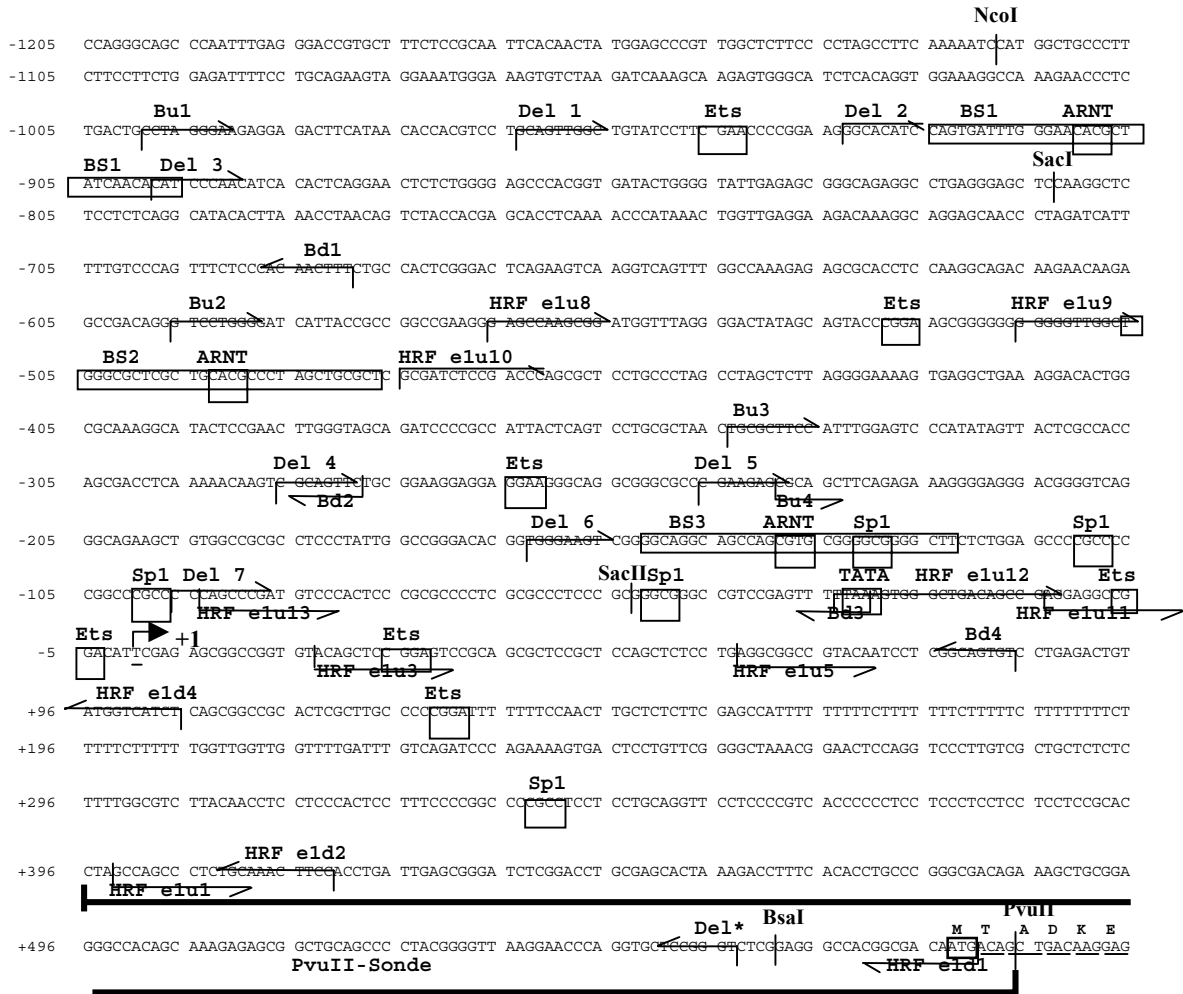


Abb. 3.4b: Ausschnitt aus der in Abb. 3.4a wiedergegebenen Sequenz von mHif-2 α . Eingezeichnet sind die wichtigsten im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer sowie die PvuII-Sonde.

Darüberhinaus wurde bei der Suche nach möglichen Sequenzhomologien mit Hilfe des Programmes BLAST SEARCH des NCBI (Madden *et al.*, 1996) eine auffällige Ähnlichkeit des 5'-UTR von mHif-2 α mit einem Sequenzstück aus dem humanen Chromosom 2 gefunden, das am 22.03.2001 von Waterston, R.H. als Arbeitsentwurf unter der Zugangsnummer AC016696 veröffentlicht worden waren. Dies stimmt mit dem Befund von Tian *et al.* von 1997 überein, der das humane Hif-2 α -Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 (Banden p16-21) lokalisieren konnte. Es handelt sich bei Waterstons Arbeitsentwurf also um einen Abschnitt aus dem humanen Hif-2 α -Gen, der Promotor, erstes Exon und Teile des ersten Introns enthält. Beim Sequenzvergleich konnte die Konservierung promotorspezifischer Strukturelemente gezeigt und auch im Intron konservierte Bereiche nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5).

Hif-2 α	-1541	ttta-ttactactgtgtct-accaatgtgaatttcttattaagaccagggtgtctg-ga	-1485
AC016696	39808	tccagttactccggaggctgagccacaagaatcgctggg--aag-cggaggttg-cagtga	39753
Hif-2 α	-1484	tgtagaaatgtcataggaatcatc-caccagcctccaagagtgaaaagggtctg-gtct	-1427
AC016696	39752	-gtcagatgg---ggcca-cagcactccagcctggcgacagagt-gggactcagtct	39700
Hif-2 α	-1426	ttgaaatcaccctcaggtgtgtca-actgatttccaagtgtcaagcactcattctttca	-1368
AC016696	39699	caaaaaaaaaaaaaaagtatttccaattctctcgtcagttttt--gcctc--tccc-ca	39645
Hif-2 α	-1367	gata-cctcccccaagactttcaaaaagtatc-caccttctcatgct-taaacaaactta	-1311
AC016696	39644	cttcgccttctccaggctcctgaaaagtatctcccccaacccttctgtgtacacgggga	39585
Hif-2 α	-1310	aaaatcgccccacccc-a--a-gacacagtcacacacacagtctctggttataatttta	-1255
AC016696	39584	aaacacgtgttcatttttattatggcgctgaaacctaccct-tctcttcaaatcgcttct	39526
Hif-2 α	-1254	ctaggaaacttgt-gtttaagaatagtt-cgggaagcacaactttagataccagggcag	-1197
AC016696	39525	gtag-atcgttctagtataa-aat-gtggcaagaggctaaagggagagatat-agaccag	39470
Hif-2 α	-1196	cccaatgtgaggaccgtgctttct--ccgcaattcacaactatggagcccgttggtctct	-1139
AC016696	39469	ttc--tttg--gcctcgtttccaacttcaagttacacctgtgaaactcatgggtcct	39415
Hif-2 α	-1138	tcccctagccttcaaaaatccatggctgccttcttctcct-tctggagat-t--ttcctg	-1084
AC016696	39414	tccac-agccttcaaaaactaaggcgctcccctgt-cctctcccagatgtcccttccc-	39358
Hif-2 α	-1083	ca--gaag-taggaatgggaaagtgtctaagatcaaagcaag--ag---tgggc-----	-1037
AC016696	39357	catcgccggtagcgagtgaggagacag-ctcagcgcggggcaggggagcactgggcccga	39299
Hif-2 α	-1036	-atctca--cag-gtggaaag-gcca----agaaccct-----ctgac---tgcttagg	-994
AC016696	39298	gatggaaggcagcgtcaaaagcgcgctggaaaatccctgagcgttaaccggttgctgtg	39239
Hif-2 α	-993	gaagagg--aga-cttcataacaccacgtcctgcag--ttggctgt-----a--tcct	-948
AC016696	39238	tgagcccttaaatctacaaaatccaacacctgtagcctttgggtttcccaggactcca	39179

Hif-2 α	-947	t c g a a c c - - - c - c - - - - - g g a a g g g c - - a c a t c c a g t g a t t t g g g a a c a c g c t a t c a a	-901
AC016696	39178	t c g a c c c t g g c g g c a g a g a g g g c a g g c c t g a g a t g c a g t g a c t t g a g g g c a c - a t g g c c a	39120
Hif-2 α	-900	c a c a t c c c a a c a t c a c a c t c a g g a a c t c t c t g g g g a g c c c a c g g t g a - t a c t g g g t a t t	-842
AC016696	39119	- a c - t c - - - t t g t c a c t c - c a a g a t c a c a c t g g g g a - a c c a g a c t g a c t t c t - - c c a a t t	39069
Hif-2 α	-841	g a g a g c g g g c a g a g g c c t g a g g g a g c t c c a a g g c t c t c c t c t c a g g c a t - - a c a c t t a a a	-784
AC016696	39068	c t g a a c t c g c c c c g g c c t c g g g c g g t c a a a g g c c t c c t c t g c g c a t c c c c g c c a a a a	39009
Hif-2 α	-783	c c t a a c a g t c t a c c a c g a g c a c c t c a - a a c c c a t a a a c t g g t t g a - g g a a g a c a a a g g c	-726
AC016696	39008	c c a a a c c g c c t g g c a c a a g c g g t a a g c a a c c a c c c t g c t g g g a g a g g g a a g - g a a g a g t	38950
Hif-2 α	-725	a g g a g c a a c c c t a g a t c a t t t t t g t c c c a g t t t t c c c a c a a c t t t c t g c c a c t c g g g a c	-666
AC016696	38949	a g g c g c a g c c c t a g a t c a a t t - - - t c c - - - t t - - - g c a c t g c - t t c t c c c a g a c g g - - -	38904
		AP-1 (-)	
Hif-2 α	-665	t c a g a a g t c a a g g t c a g t t t g g c c a a a g a g a g c g c a c c t c c a a g g c a g a c a a g a a c a a g a	-606
AC016696	38903	t c - - a a g t c a - g c t g c g t c c c a c c g a a a a g g g c a t c g c c c a c g c - - c c g a - a a c - g c a	38851
Hif-2 α	-605	g c c g a c a g g g t c c t g g g g a t c a t t a c c g c c - g g c c g a a g g g a g c c a a g c g g a t g g t t t a g	-547
AC016696	38850	g c c g c t g g g g g c c g a g a a a t t a t c c c c a c c t g g c c c g a g g - - g c c - a g - g g a c g - - - c a g	38798
Hif-2 α	-546	g g g a c t a t a g c a g t a c c c g g a a g c g g g g g g g g g t g g c t g g g c g c t c g c t g c a c g c c c	-487
AC016696	38797	g a g - c - g c a g c a g - - c g t g g a - - - g g g g c t c c g c g t g g c c c g g c g c t - g c - - c - c g c g g	38749
Hif-2 α	-486	t a g c t g c g c t c g c g a t c t c c g a c c a g c g c t c c t g c c c t a g c c t a g c t t a g g g g a a a a	-427
AC016696	38748	t - c c t g c c c t c g - - - t - t c c - a - - - a g g g c - a c g g c - - - g c c - - g - - - g t a c g a g g a c a	38708
Hif-2 α	-426	g t g a g g c t g a a a g g a c a c t g g c g - c a a a g g c a - t a c t c c g a a c t t g g g t a g c a g a t c c c c	-369
AC016696	38707	c c g a c g c t g t g g c g a a c t g c c g t c c c c c g c a g c a a t c c - - - c - - g g a g c c c g g t c c c g	38653
Hif-2 α	-368	g c c a t t a c t c a g t c c t g c g t a a c t g - c g t t c c - - a t t t g g a g t c c c a t a t a g t t a c t c	-312
AC016696	38652	g c c g c c c c t c g g c c c t g c g c a g g t g c c t c t c c c g a c g c g g a g t c c c a c c c c g t a c c c	38593
Hif-2 α	-311	g c c - a c c a g - c g a c c t c a a a a c a a g t c g c a g t t c t g c g g a a g - g a g g a g g a a g g g c a g g	-255
AC016696	38592	g c c g c c c a g a c g a c c t c a t a a a c a a g t c - c - - - t c - - - - g a a g t g c g g a g g c a g g - - a g g	38543
		AP-1 (-)	
Hif-2 α	-254	c g g g c g c c c g a a g a g c g c a g c t t c a g a g a a g g g g a g g a c g g g t c a g g g c a g a a g c t g	-195
AC016696	38542	c g g g - g c g c - - - - a g c g c g g g g c a g - g a - - - - g g c g g c c a g g g t c a g g g c a g a g g c t g	38493
		CAAT (-)	
Hif-2 α	-194	t g g c c g c g c c t c c c t a t t g g c c g g g a c a c g g t g g g a a g t c g g g g c a g g c a g c a g c g t g c	-135
AC016696	38492	c g g c c g c g c t c c c c a t t g g c c g g g a c g c a g t g a g c c g c c c g g - - a g c t c g g c - g c g g g c	38436
		Sp1 (-)	
Hif-2 α	-134	g g g g c g g g g t t c t c t g g a g c c c g c c c - c c g g c c c g c - c c c c a g c c c g a t g t c c - c a c t	-78
AC016696	38435	g g g g c c t g c c g g c g c - - g t g - c c c g c c a c a c a c c c g c c c g g t g c c c g c c c c c g c c c t	38379
		TATA-Box (+)	
Hif-2 α	-77	c c - c g c g c c c c t c g c g c c c t c c c c g g g g c g g g c c g t c c g a g t t t t a a a g t g g g t g a c a	-19
AC016696	38378	c c g c g c c c g c c c c g t g c c c g c c c - c a a g c c g g c c g a c g g a g t t t t a a a g t g g g t g c c g	38320
		+1	
Hif-2 α	-18	g c c g a g g a g g c c g g a c a t t c g a g a g c g g - c c g g t g t a c a g t c c c g a g t c c g c a g c g c - t	+40
AC016696	38319	g c c g c g g g a g c t t a c a c t c g c a g c g g a c c g c c a c a c g g g t c c g g t g c c c g c t g c g c t t	38260
		c-Ets-1 (-)	

AP-1

Hif-2 α	+635	ggtcccaggcattggcggaaactgcgcgtggcgggcccgcgacccggggcagtcgggagagggg	+694
AC016696	37743	ggtccgaggccaggccgggctgcgcggggcagggcgcgaccgagagtggttgggagaaga	37684
Hif-2 α	+695	gtgc-gagagttc-tcggaggctggaggaccgctgttgaggggctttgagtaagcaggtc	+752
AC016696	37683	gtgctgagaggtcttcgga-gctcgaggctcggg-ttgaggggctgtgagggggagagca	37626
Hif-2 α	+753	ggtgatgccttttagggac---a--aggagc--tgcggg-gtcccat-taaag-ttgca-	+800
AC016696	37625	tgtgcccgggttgggggcccggatcagcagcttgcagtgagagacttctgcccgcggag	37566
Hif-2 α	+801	aag-cggatagttccg-aaacctgagacacgga-----a---agatggccctggaggtc	+850
AC016696	37565	gagtggggatttgcgcgcacggcgaggccaggaggccgagggagatgg-cctggaggtc	37507
Hif-2 α	+851	aggggtgcttccgcggcgccttccaaagtct---gtgtccctggagca-ccaagcttcc	+905
AC016696	37506	ggaggtgcttccgcgggcttggaaaatctcccagccgccccgcagcagattaccgtgg	37447
Hif-2 α	+906	ctagcgagtgtttgaaatgtttctgggctg-atgccctccactct-tagggtttc-cat	+962
AC016696	37446	ccaccg-gcgccttgaaaatgtttgtggg-tgcatgtcctcgactttctctggtctctcat	37389
Hif-2 α	+963	gctggagcagtaaacacgcctttcttttct-aaaacctctaggttctttccgaaagcg	+1021
AC016696	37388	tttggggcagcatccacgtctctatcttctctggattcgc-ggagtccttccaaatgcg	37330
Hif-2 α	+1022	ttcctatgcccggcttttgcgccccaaactagc--atggaacagaggggcaaagcgcaac	+1079
AC016696	37329	ctcc-tgtgcccgc-gccgcggcccaagtgggcaaagggggcgggagggcggagagcggc	37272
Hif-2 α	+1080	tctgggggtgcg-ccctgaccgagaagccggaacactgtca-ag-g---g-t-cc-tgct	+1129
AC016696	37271	tcagggacacgatcct-accgaggagccaggaccct-tcagagcgcccgcctgcccgggct	37214
Hif-2 α	+1130	ccagacggcacccaagttgttcaacccccttaaccttacctacacctagactccggca	+1189
AC016696	37213	ccagaccccaccgaaggttggaacaccactt--cctcgtgcccacacttgactctgg-g	37157
Hif-2 α	+1190	gagagtggggagtgagtgadctggattgccctgcggggcaggtgctgtagtgtgcagag	+1249
AC016696	37156	gagagttaggtagtgagtgadctggattgccctgcggggcagatggttcgggtgttagga	37097
Hif-2 α	+1250	agaggaccgtgacac-----cc--ggcgggctccgagtgctgattcttaa---gac--	+1295
AC016696	37096	agcggacggcaacactggatgtccctggcaggtccgggtgtctgtctccaagaggacag	37037
Hif-2 α	+1296	-gaagggcagccacga--ag---gtttgcctcgcgaacctttcggcactgggtgagagg	+1349
AC016696	37036	agaagggcagccacgatctgcccgcctgcctcgcgagcctctcggcactgggtgagagg	36977

ARNT (-)

AP-1 (+)

AP-2 (-)

ausschließlich 5'-UTR und 5'-flankierende Sequenzen von Hif-2 α enthielt, aus *HIF-2 10.1Xba* in *pZErO* ausgeschnitten, in den Luziferasevektor pGL2-Basic kloniert und *HIF-2 XbaI* genannt.

Zuerst mußte festgestellt werden, ob dieser Sequenzabschnitt überhaupt eine Promotoraktivität hat.

3.3 Aktivität des Hif-2 α -Promotors in unterschiedlichen Zelllinien

Um der Frage nachzugehen, ob die in dieser Arbeit analysierte, 3366 bp lange 5'-flankierende Sequenz von Hif-2 α im Klon *HIF-2 XbaI* Promotoraktivität besitzt, und wenn ja, ob diese Promotoraktivität eine Endothelspezifität aufweist, wurde die Aktivität von *HIF-2 XbaI* im Reporterassay in unterschiedlichen Zellen ins Verhältnis zur Aktivierung durch den leeren Vektor pGL2-Basic gesetzt. Dazu wurde die in HUVEC-, BAE-, HEK/293-, 3T3-, Cos-, Q2nB-, CEF- und HEP 1 C4-Zellen gemessene Aktivität des Leervektors jeweils gleich Eins gesetzt und die Aktivität von *HIF-2 XbaI* als ein Vielfaches davon angegeben und diese Werte dann vergleichend aufgetragen (s. Abb. 3.7). Da sich BAE-Zellen nicht mit der Transfektionsreagenz *Superfect* transfizieren ließen, wurde hier die Methode der Elektroporation angewendet. Alle anderen Zellen wurden mit *Superfect* transfiziert.

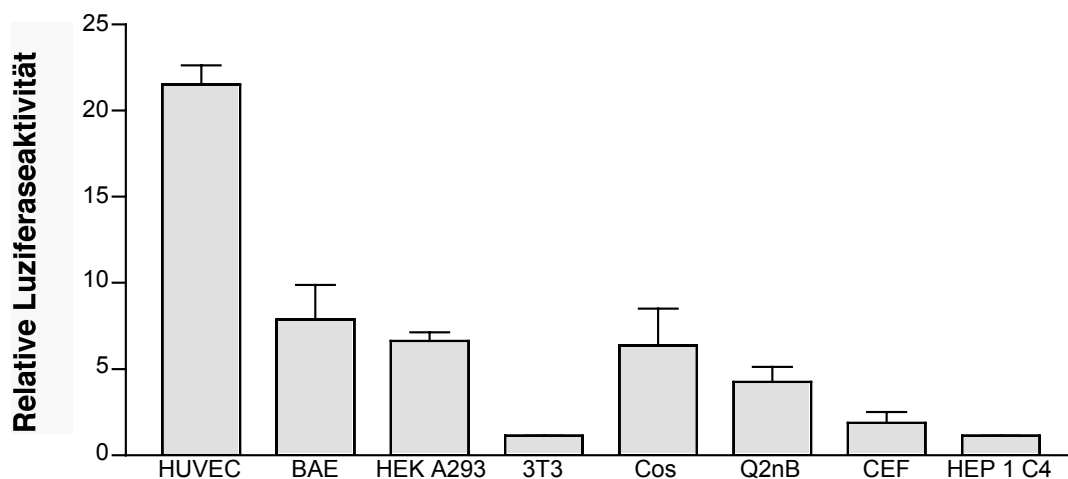


Abb. 3.7: Vergleich der Aktivität des 3,4 kb langen Hif-2 α -Promotorfragmentes in *HIF-2 XbaI* in unterschiedlichen Zellen, angegeben als Vielfaches der Aktivierung durch den leeren Vektor pGL2-Basic.

HIF-2 mut1 im Vergleich zum Ausgangsplasmid *HIF-2 XbaI* um den Faktor fünf erniedrigt war, die Inaktivierung der TATA-Box also zu einem deutlichen Rückgang der Reportergenaktivität führte (s. Abb. 3.8). Selbst im Vergleich mit dem sehr viel kürzeren, gerade noch die TATA-Box enthaltenden Deletionsklon *HIF-2 SacII* war bei *HIF-2 mut1* eine deutliche Halbierung der Aktivität zu beobachten. Die Funktionalität der TATA-Box konnte somit nachgewiesen werden.

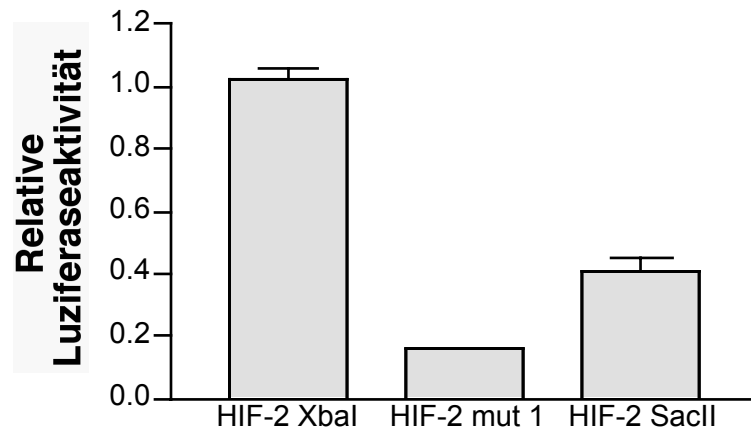


Abb. 3.8: Vergleich der basalen Aktivität des Mutationsklons *HIF-2 mut 1* mit inaktivierter TATA-Box mit der des entsprechenden Klons *HIF-2 XbaI* sowie des Deletionsklons *HIF-2 SacII*, die beide die aktive TATA-Box enthalten.

3.5 Identifikation des Transkriptionsstartpunktes von *Hif-2 α*

Die RNA-Polymerase II (RNA PII) ist vor allem für die Transkription derjenigen eukaryontischen Gene verantwortlich, die ein Protein kodieren (zur Übersicht s. Lewin, 1997). Voraussetzung hierfür ist die Bindung des basalen Transkriptionsapparates am Transkriptionsstart. Dies geschieht in den meisten Fällen an einem etwa 30 bp oberhalb des Transkriptionsstarts gelegenen konservierten Strukturelement, der sog. TATA-Box, kann aber auch durch eine sog. Initiatorsequenz vermittelt werden oder ganz ohne erkennbare Bindungssequenz ablaufen (zur Übersicht s. Zawel und Reinberg, 1995). Desweiteren gibt es Gene, die mehrere Transkriptionsstarts aufweisen. Entscheidend für die Bindung der RNA PII an die DNA ist außerdem der basale Transkriptionsfaktor TFIID, der sich aus dem TATA-bindenden Protein (TBP) und verschiedenen TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammensetzt (Pugh und Tjian, 1991; Timmers und Sharp, 1991). Auch TATA-lose Promotoren werden von spezifischen TBP/TAF-

Komplexen erkannt (Roy *et al.*, 1991). Um den Promotor von Hif-2 α näher zu charakterisieren, sollte zuerst der Transkriptionsstart dieses Gens ermittelt werden.

3.5.1 Suche nach dem Transkriptionsstart durch RNase-Protektion

Bei der RNase-Protektion kann mit Hilfe einer radioaktiv markierten RNA-Sonde indirekt die Länge einer Ziel-mRNA ermittelt werden. So kann z.B. durch Verwendung einer markierten RNA-Sonde, die komplementär zur Promotorregion eines Gens ist, die Länge des 5'-UTR der mRNA, und damit der Transkriptionsstartpunkt ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde eine zur Promotorregion von Hif-2 α komplementäre radioaktive RNA-Sonde mit zellulärer RNA *in vitro* hybridisiert und anschließend alle nichthomologen, einzelsträngigen Bereiche durch RNase-Verdau abgebaut, während der Bereich der Homologie als Doppelstrang vorlag und erhalten blieb. Aus seiner Länge konnte unter Berücksichtigung des genau definierten 5'-Endes der RNA-Sonde die ungefähre Lage des Transkriptionsstarts errechnet werden.

Zur Herstellung der benötigten *antisense* RNA-Sonde wurde das mit HindIII linearisierte Plasmid Nco 31 mit der T7 RNA-Polymerase transkribiert. Als eine Negativkontrolle diente die am XbaI-linearisierten Plasmid mit der T3 RNA-Polymerase generierte *sense* Sonde. In einer im „RNase Protection Kit“ enthaltenen Kontrollreaktion wurde außerdem ein 255 bp langes RNA-Fragment erzeugt. Die zur Hybridisierung verwendeten RNA-Proben stammten aus einem Mausembryo des 15. Tages der Trächtigkeit sowie aus der Niere einer adulten Maus. Als Negativkontrollen diente RNA aus 3T3-Zellen und tRNA aus der Hefe. Das 255 bp lange Kontrollfragment wurde mit β -Aktin mRNA hybridisiert, wobei ein 210 bp großes geschütztes Fragment entstehen sollte. Als Größenmarker fand ein Mix aus radioaktiv markierten RNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge Verwendung, der zusammen mit den aus der RNase-Verdauung hervorgegangenen geschützten Fragmenten gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. So konnte bei dem Ansatz mit Nieren-RNA eine deutliche, etwa 560 bp große Bande detektiert werden und auch bei dem Ansatz mit embryonaler RNA konnte eine allerdings sehr viel schwächere Bande gleicher Größe nachgewiesen werden (s. Abb. 3.9). Daraus ließ sich ein Transkriptionsstartpunkt ableiten, der ungefähr 580 bp oberhalb vom Start-ATG liegt.

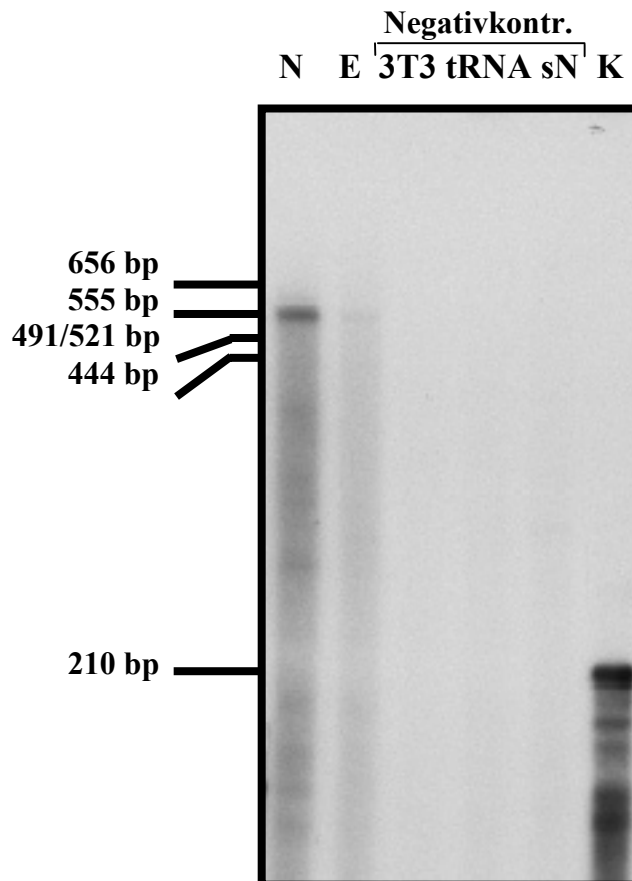


Abb. 3.9: RNase-Protektionsexperiment. Es wurden je 12 μg Mausembryo- (E) und Mausnieren-RNA (N), 1 μg 3T3-RNA und 10 μg Hefe-tRNA mit je 5×10^5 cpm radioaktiv markierter *antisense*-Sonde und 12 μg Mausnieren-RNA mit 6×10^5 cpm radioaktiv markierter *sense*-Sonde (sN) hybridisiert und anschließend die einzelsträngigen Bereiche enzymatisch abgebaut. In einer im „RNase Protection Kit“ enthaltenen Kontrollreaktion (K) wurde ein 210 bp großes geschütztes Fragment generiert. Als Größenmarker wurden mit der T3 RNA-Polymerase aus verschiedenen geschnittenen Plasmiden radioaktiv transkribierte RNA-Fragmente unterschiedlicher Länge auf das Gel aufgetragen.

3.5.2 Definition des Transkriptionsstarts durch Primer-Extension

Bei der Primer-Extension kann der Transkriptionsstart durch direkten Vergleich mit einer Sequenzierungsreaktion bis auf wenige Basenpaare genau lokalisiert werden. Dazu wurde an Gesamt-RNA mit dem radioaktiv markierten Primer HRF e1d4 (s. Abb. 3.4b) eine reverse Transkription durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde aus HEK/293-Zellen isoliert, die vorher mit dem Plasmid *HIF-2 XbaI* sowie einem *Hif-2 α* - und einem *Ets-1*-Expressionsplasmid transient transfiziert worden waren. Nach dem enzymatischen Abbau der Gesamt-RNA wurde die entstandene cDNA zusammen mit einer Sequenzierungsreaktion, die mit demselben radioaktiven Primer HRF e1d4 am Plasmid *HIF-2 SacI* durchgeführt worden war, gelelektrophoretisch aufgetrennt. So

konnte nach der Autoradiographie des Sequenzgels die Bande der Primer-Extensionsreaktion einem Thymidin 580 bp oberhalb des Start-ATG zugeordnet werden, das folglich den Transkriptionsstartpunkt repräsentiert (s. Abb. 3.10).

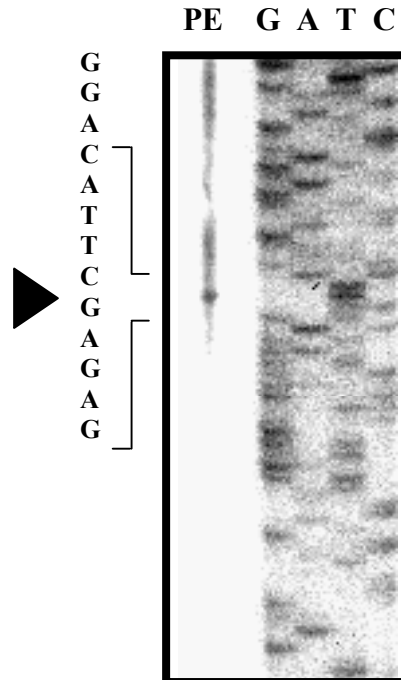


Abb. 3.10: Primer-Extensionsexperiment. An 20 μg Gesamt-RNA aus transfizierten HEK/293-Zellen wurde mit 14×10^5 cpm radioaktiv markiertem Primer HRF e1d4 eine reverse Transkription durchgeführt und anschließend die RNA enzymatisch abgebaut. Zusammen mit der bei dieser Primer-Extensionsreaktion entstandenen cDNA (PE) wurde eine mit dem gleichen Primer durchgeführte Sequenzierungsreaktion in der Reihenfolge G, A, T, C auf das Gel aufgetragen.

3.5.3 Räumliche Eingrenzung des Transkriptionsstarts durch PCR

Um den mit Hilfe der Primer-Extension ermittelten Transkriptionsstartpunkt zu bestätigen, wurde an cDNA aus Mäusehirn eine 40 Zyklen-PCR mit unterschiedlichen Primern durchgeführt, die teilweise unterhalb, teilweise oberhalb des Transkriptionsstarts binden. Hierfür wurden die Primer HRF e1u5/u3/u11/u12/u13 und als Gegenprimer HRF e1d2 verwendet (s. Abb. 3.4b). Als Negativkontrollen wurden PCRs an cDNA aus HEK/293-Zellen, in denen Hif-2 α nicht nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.1), und ganz ohne DNA-Vorlage durchgeführt. 25 ng des Plasmids *HIF-2 10.1Xba in pZErO* dienten als DNA-Vorlage bei der Positivkontrolle. Mit den Primern, die unterhalb bzw. auf Höhe des Transkriptionsstarts lagen (HRF e1u5/3/11), ließen sich erwartungsgemäß Fragmente der entsprechenden Größe amplifizieren,

während die weiter 5' gelegenen Primer (HRF e1u12/13) kein PCR-Produkt ergaben. Nach einem Southern-Blot ließen sich die entstandenen Fragmente bei der anschließenden Hybridisierung mit einer komplementären Sonde als Hif-2 α -spezifische Amplifikate nachweisen (s. Abb. 3.11). Als Hybridisierungssonde diente ein 360 bp langes, radioaktiv markiertes PCR-Fragment, das mit den Primern HRF e1d2 und HRF e1u5 generiert worden war (s. Abb. 3.4b).

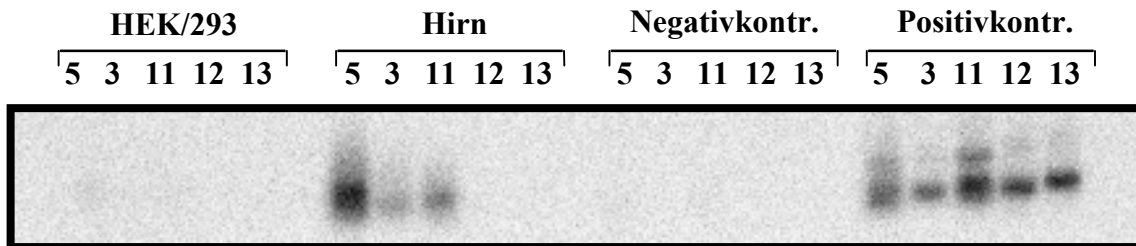


Abb. 3.11: Southern-Blot-Analyse. An cDNA aus 2,5 μ g HEK/293- und 2,1 μ g Mäusehirn-RNA (Hirn) wurde mit den Primern HRF e1u5/3/11/12/13 und HRF e1d2 eine PCR durchgeführt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Neben der PCR an cDNA aus Hif-2 α -defizienten HEK/293-Zellen wurde als weitere Negativkontrolle eine PCR ohne DNA-Vorlage durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine PCR an 25 ng des Plasmids *HIF-2 10.1Xba in pZErO*. Hybridisiert wurde mit einem 360 bp langen, radioaktiv markierten PCR-Fragment, das mit den Primern HRF e1d2 und e1u5 generiert worden war.

Nachdem nun der Transkriptionsstart von Hif-2 α definiert war, zeigte sich, daß die potentielle TATA-Box in einem Abstand vom Transkriptionsstart liegt, in welchem dieses Strukturelement typischerweise in einem Promotor zu finden ist.

In der Nähe des Transkriptionsstartpunktes bzw. in einem mehr oder weniger genau definierten Abstand zu diesem ist aber über die TATA-Box hinaus noch mit weiteren, für den Promotorbereich typischen Strukturelementen zu rechnen.

3.6 Suche nach funktionellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Als nächstes stellte sich die Frage, an welche der potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die bei der computergestützten Suche im Hif-2 α -Promotor gefunden worden waren, auch tatsächlich Transkriptionsfaktoren binden. Dabei wurden die Analysen auf die beiden in diesem Zusammenhang am wichtigsten erscheinenden Transkriptionsfaktoren beschränkt: Ets-1, der spezifisch in Endothelzellen exprimiert wird, sowie Hif-2 α selbst, im Hinblick auf eine mögliche Autoregulation. Außerdem

sollte die Frage nach einer Interaktion beider Transkriptionsfaktoren bei einer möglichen Aktivierung des Hif-2 α -Promotors geklärt werden.

3.6.1 Deletionsklonanalyse

Zuerst wurden unter Verwendung mehrerer im Hif-2 α -Promotor gelegener Restriktionsschnittstellen Deletionsklone von *HIF-2 XbaI* generiert, um die für die Aktivierung verantwortlichen Bereiche grob einzugrenzen. Dazu wurden mit den Restriktionsenzymen *ApaI*, *NcoI*, *SacI* bzw. *SacII* einerseits, und dem kurz oberhalb des Start-ATG schneidenden *BsaI* andererseits Promotorfragmente unterschiedlicher Länge aus *HIF-2 XbaI* ausgeschnitten und in ihrer ursprünglichen Orientierung in den Luziferasevektor pGL2-Basic kloniert. Es entstanden folgende Deletionsklone, wobei in Klammern die Länge des eingefügten Promotorfragments angegeben ist: *HIF-2 ApaI* (2380 bp), *HIF-2 NcoI* (1679 bp), *HIF-2 SacI* (1374 bp) und *HIF-2 SacII* (614 bp). In Ermangelung einer geeigneten Schnittstelle wurde darüberhinaus ein 565 bp langes PCR-Fragment kloniert, das mit den Primern HRF e1u3 und HRF e1d1 generiert worden war (s. Abb. 3.4b) und die Bezeichnung *HIF-2 e1u3* erhielt (s. Abb. 3.12 A). Zwischen den einzelnen Schnittstellen liegen jeweils ein oder mehrere potentielle Ets-1- und/oder Hif-2 α -Bindungsstellen (s. Abb. 3.13 A). Die basale Promotoraktivität dieser fünf Deletionsklone sowie des Ausgangsklons *HIF-2 XbaI* wurde nun in HEK/293-Zellen im Reporterassay mit der des leeren pGL2-Basic-Vektors verglichen (s. Abb. 3.12 B). Dabei zeigte sich, daß zwischen *HIF-2 SacI* und *HIF-2 SacII* ein großer und zwischen *HIF-2 SacII* und *HIF-2 e1u3* noch einmal ein kleinerer Rückgang der basalen Promotoraktivität zu beobachten ist. Die Aktivität des Deletionsklons *HIF-2 e1u3*, der die TATA-Box nicht mehr enthält, liegt etwa auf dem gleichen Niveau wie der Vergleichswert von pGL2-Basic, dem leeren Luziferasevektor.

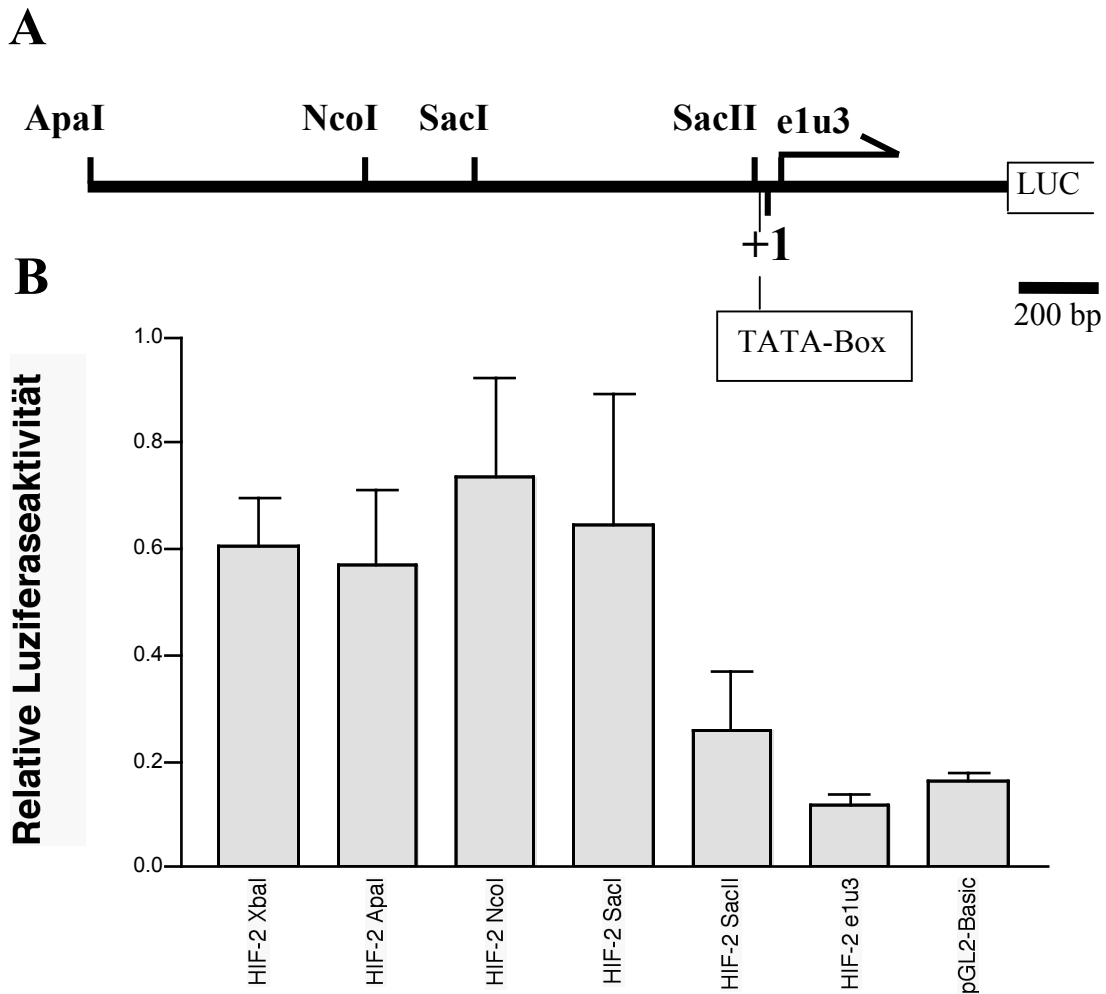
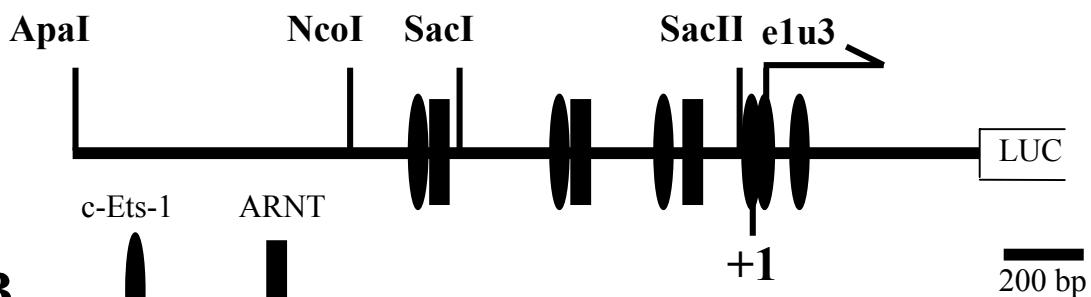


Abb. 3.12: **A** Überblick über Schnittstellen und Primer innerhalb des Hif-2 α -Promotorbereichs. **B** Vergleich der basalen Aktivität verschiedener Deletionsklone des Hif-2 α -Promotorbereichs.

Um nun die Aktivierbarkeit des Hif-2 α -Promotors durch Ets-1 und Hif-2 α sowie eine mögliche Interaktion dieser beiden Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung des Promotors zu untersuchen, wurde mit denselben Deletionsklonen noch einmal ein Reporterassay durchgeführt. Neben der basalen Promotoraktivität wurde dabei durch Kotransfektion der/des entsprechenden Expressionsplasmide/s auch die Promotoraktivität bei zusätzlicher Ets-1-, Hif-2 α - bzw. Ets-1/Hif-2 α -Expression betrachtet (s. Abb. 3.13 B). Innerhalb dieser einzelnen Ansätze ist das Verhältnis der Aktivitäten der verschiedenen Deletionsklone zueinander ähnlich dem bei der basalen Promotoraktivität beobachteten Verhältnis. Die beiden unterschiedlich hohen „Aktivitätssprünge“ zwischen *HIF-2 SacI* und *HIF-2 SacII* bzw. zwischen *HIF-2 SacII* und *HIF-2 e1u3* sind hier teilweise noch wesentlich deutlicher zu erkennen. Außerdem zeichnet sich ein „Ausbrechen“ der Aktivität von *HIF-2 NcoI* aus dem relativ

einheitlichen Niveau der Aktivitäten von *HIF-2 XbaI*, *HIF-2 ApaI* und *HIF-2 SacI* ab. Die Expression von Ets-1 oder Hif-2 α führte jeweils zu einer erhöhten Aktivität aller Hif-2 α -Promotorfragmente außer *HIF-2 elu3*. Bei *HIF-2 SacII* fiel diese allerdings wesentlich geringer aus als bei den übrigen vier Konstrukten. Zu einer wirklich beachtlichen Aktivitätssteigerung kam es bei der Ko-Expression von Ets-1 und Hif-2 α . Die Erhöhung der Aktivität aller Konstrukte außer *HIF-2 elu3* fiel deutlich überadditiv aus. Aus den so gewonnenen Ergebnissen ließen sich allerdings keine direkten Rückschlüsse auf die Funktionalität einzelner Transkriptionsfaktorbindungsstellen ziehen, da jeweils mehrere Bindungsstellen gleichzeitig deletiert wurden (s. Abb. 3.13 A).

A



B

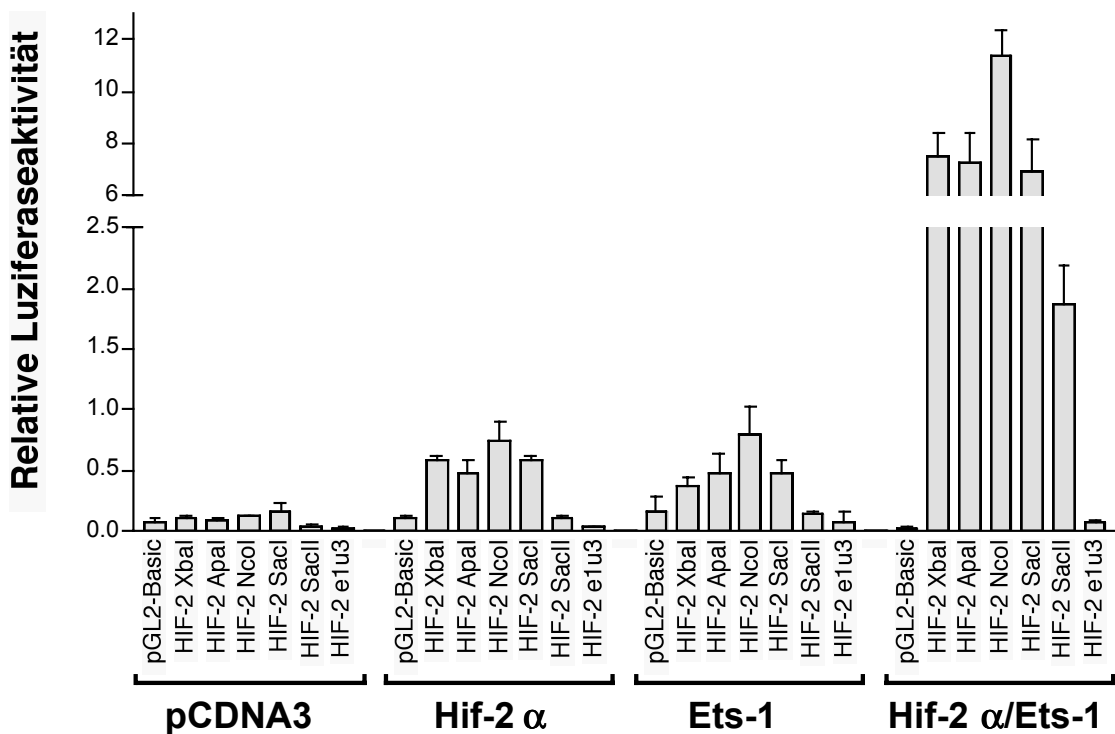


Abb. 3.13: **A** Überblick über potentielle ARNT- und Ets-1-Bindungsstellen innerhalb der einzelnen Deletionsklone des Hif-2 α -Promotorbereichs. **B** Vergleich der Aktivität verschiedener Deletionsklone des Hif-2 α -Promotorbereichs mit und ohne Kotransfektion von Hif-2 α und/oder Ets-1.

Um eine Relation zwischen einzelner Bindungsstelle und Promotoraktivität im Reporterassay herzustellen, wurden Deletionsklone konstruiert, die sich jeweils nur um eine potentielle Hif-2 α - bzw. Ets-1-Bindungsstelle unterschieden. Dies wurde durch PCR mit den Primern Del 1, Del 2, Del 3, e1u8, e1u9, e1u10, Del 4, Del 5, Del 6 und Del 7 sowie dem Gegenprimer Del* erreicht (s. Abb. 3.4b), die jeweils eine interne KpnI- bzw. HindIII-Schnittstelle enthielten. Die einzelnen PCR-Fragmente wurden anschließend in 5' \rightarrow 3'-Orientierung in den mit den Restriktionsenzymen KpnI und HindIII geschnittenen Luziferasevektor pGL2-Basic kloniert. Die dabei entstandenen Deletionsklone *HIF-2 del 1-7*, *HIF-2 e1u8*, *HIF-2 e1u9* und *HIF-2 e1u10* wurden zusammen mit dem stärksten und schwächsten Deletionsklon der letzten Versuchsreihe (*HIF-2 NcoI* bzw. *HIF-2 e1u3*) im Reporterassay miteinander verglichen (s. Abb. 3.14). Beim Vergleich der basalen Aktivitäten der einzelnen Promotorkonstrukte zeigten die Klone bis einschließlich *HIF-2 Del 5* ein uneinheitliches Bild. Erst von *HIF-2 Del 5* zu *HIF-2 Del 6* kam es zu einem deutlichen Rückgang der Aktivität, ebenso von *HIF-2 Del 6* zu *HIF-2 Del 7* und noch einmal von *HIF-2 Del 7* zu *HIF-2 e1u3*, einhergehend mit dem Verlust der CAAT-Box, dreier Sp1-Bindungsstellen bzw. der vierten Sp1-Bindungsstelle und der TATA-Box (s. Abb. 3.4).

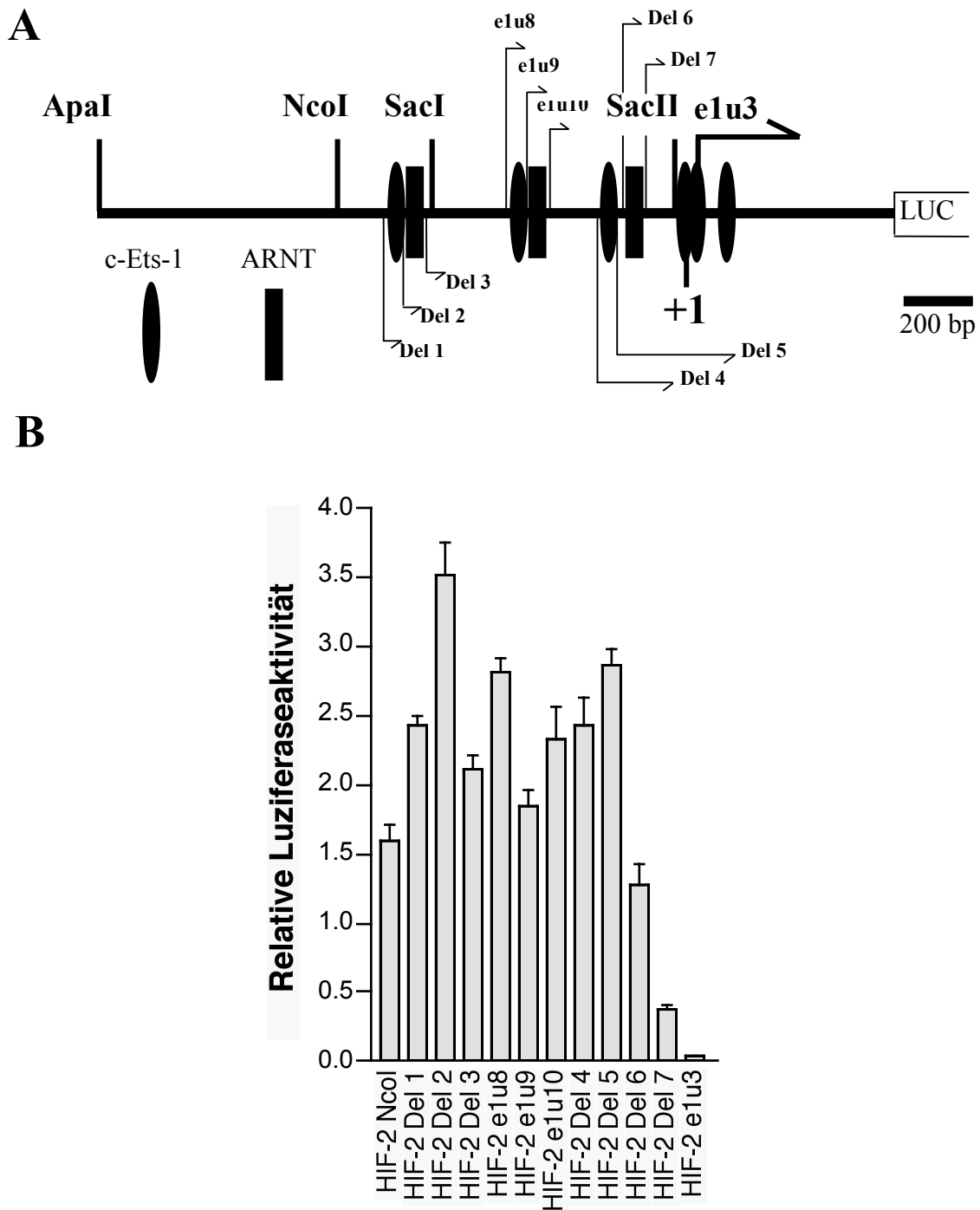


Abb. 3.14: **A** Überblick über die 5'-Enden der einzelnen PCR-generierten Deletionsklone in Relation zu den potentielle ARNT- und Ets-1-Bindungsstellen des Hif-2 α -Promotorbereichs. **B** Vergleich der basalen Aktivität der PCR-generierten Deletionsklone des Hif-2 α -Promotorbereichs.

Beim Vergleich derselben Deletionsklone unter Expression von Hif-2 α , Ets-1 bzw. Hif-2 α und Ets-1 fanden sich die bereits bei der basalen Aktivität beobachteten Aktivitätseinbußen bestätigt (s. Abb. 3.15). Außerdem zeigte sich hier zusätzlich eine deutliche Aktivitätseinbuße von *HIF-2 elu8* zu *HIF-2 elu9*, die sich um eine potentielle Ets-1-Bindungsstelle unterscheiden (s. Abb. 3.14 A).

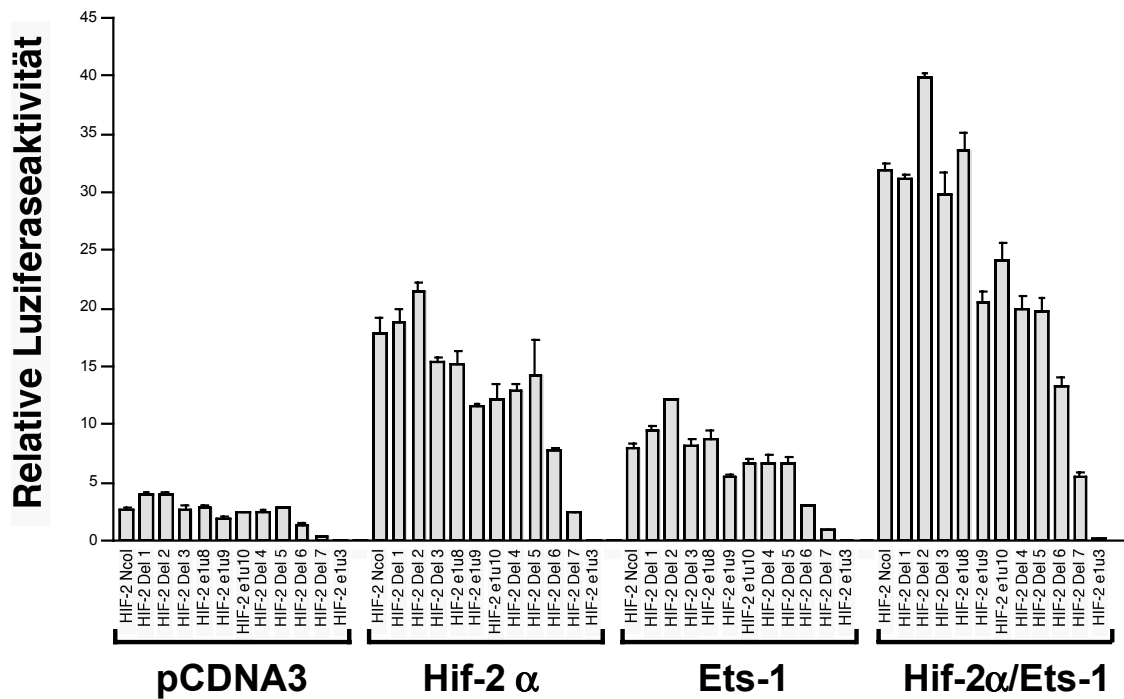


Abb. 3.15: Vergleich der Aktivität der PCR-generierten Deletionsklone des Hif-2 α -Promotorbereichs mit und ohne Kotransfektion von Hif-2 α und/oder Ets-1.

Da die verminderte Aktivität von *HIF-2 Del 6*, *HIF-2 Del 7* und *HIF-2 elu3* im Reporterassay wohl eher auf den Verlust basaler Promotorstrukturelemente zurückzuführen war, ließ sich auch mit dem Einsatz dieser speziell entworfenen Deletionsklone immer noch keine Aussage zur Funktionalität der einzelnen Hif-2 α - und Ets-1-Bindungsstellen machen. Aus diesem Grund wurden nun die einzelnen Bindungsstellen durch gezielte Mutationen inaktiviert und im Reporterassay untersucht.

Beim Vergleich der Mutationsklone miteinander und mit dem Ausgangsplasmid *HIF-2 XbaI* zeigte sich im Reporterassay, daß die basale Promotoraktivität fast aller Konstrukte auf ein und demselben Niveau lag. Lediglich bei *HIF-2 mut 8* war sie um mehr als die Hälfte erniedrigt (s. Abb. 3.16). Außerdem war die Promotoraktivität aller acht Mutationsklone niedriger als die des Wildtyp-Konstruktes *HIF-2 XbaI*.

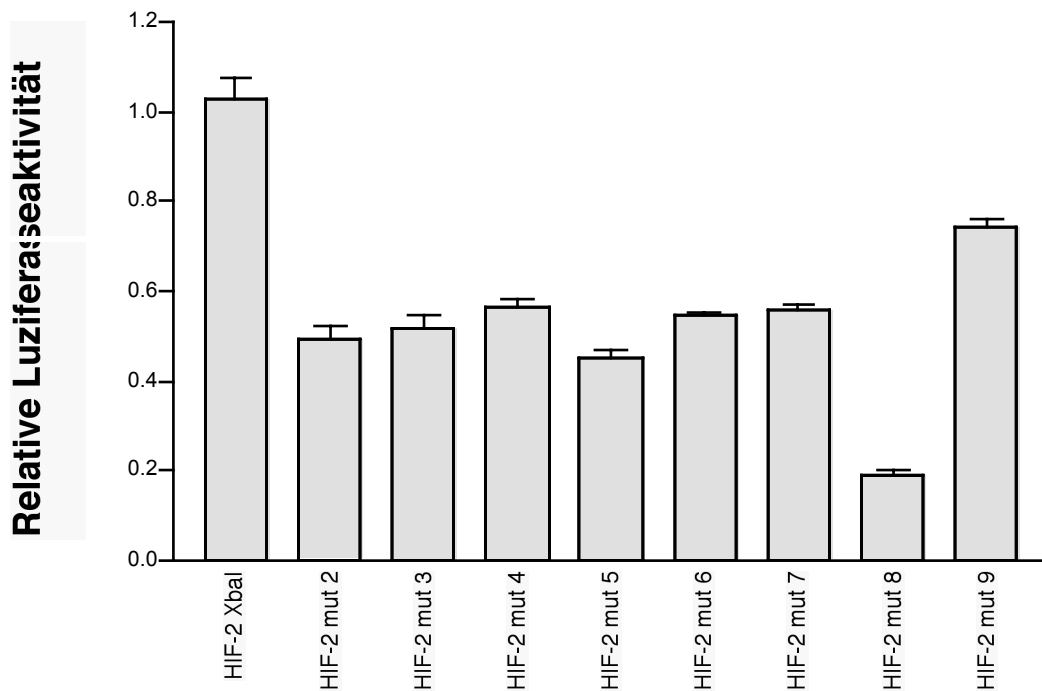
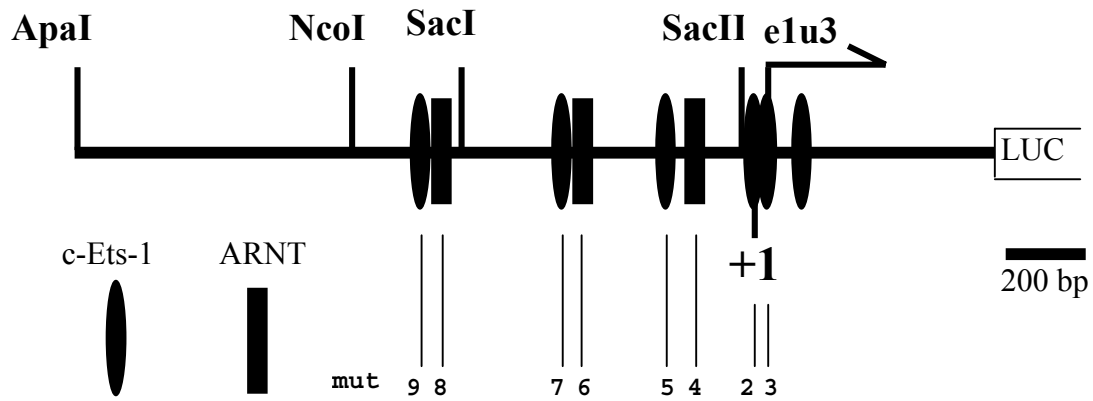


Abb. 3.16: Vergleich der basalen Aktivität der verschiedenen Mutationsklone.

Auch bei zusätzlicher Expression von Hif-2 α sowie Hif-2 α und Ets-1 war eine um über die Hälfte reduzierte Aktivität von *HIF-2 mut 8* zu erkennen (s. Abb. 3.17 B). Wurde nur Ets-1 exprimiert, trat dagegen ein ziemlich inhomogenes Aktivitätsmuster der einzelnen Mutationsklone auf. Außerdem war bei Koexpression von Hif-2 α und Ets-1 wieder ein deutlich überadditiver Effekt zu erkennen.

A



B

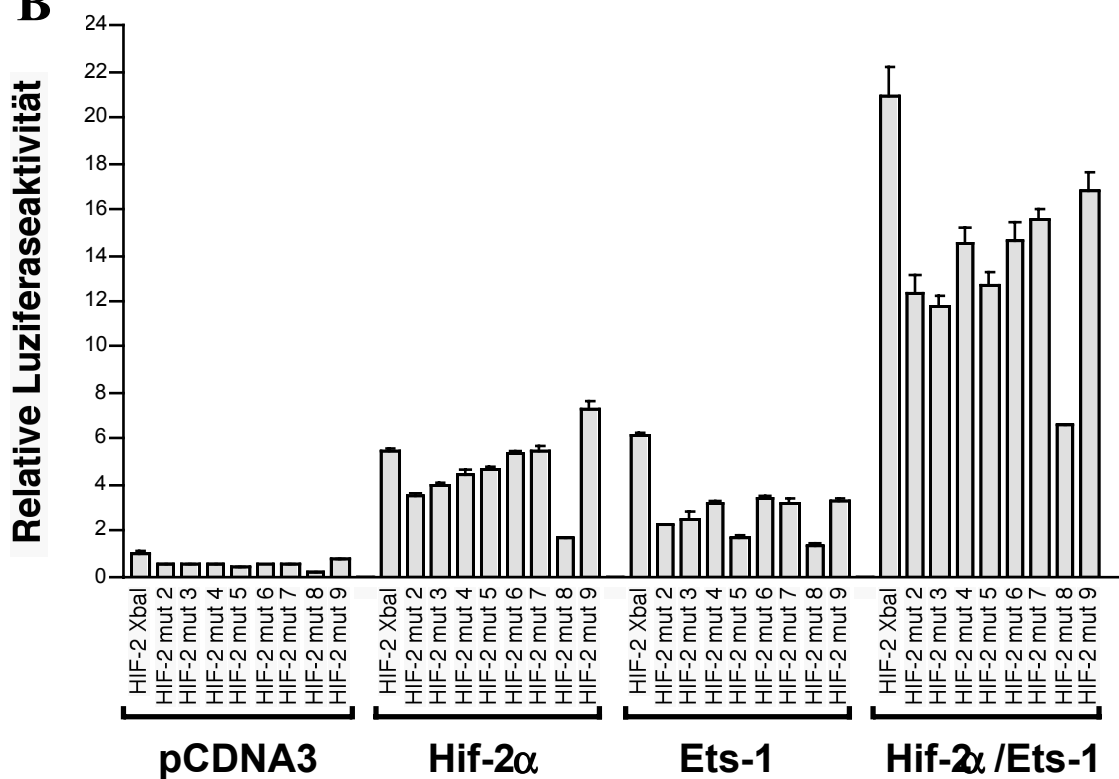


Abb. 3.17: **A** Überblick über die mutierten ARNT- und Ets-1-Bindungsstellen der einzelnen Mutationsklone. **B** Vergleich der Aktivität verschiedener Mutationsklone des Hif-2 α -Promotorbereichs mit und ohne Kotransfektion von Hif-2 α und/oder Ets-1.

Bis auf die HIF-2-Bindungsstelle, die in *HIF-2 mut 8* mutiert worden war und der offensichtlich eine besondere Rolle zukommt, schienen die untersuchten Transkriptionsfaktorbindungsstellen alternativ benutzt zu werden, da die einzelne Inaktivierung der übrigen Bindungsstellen zu keinerlei Aktivitätseinbußen führte. Um eine direkte Interaktion von Transkriptionsfaktor und Bindungsstelle nachzuweisen, bedurfte es daher weiterer Experimente.

3.7 Transkriptionsfaktor-Bindungsanalysen

Mit Gelretardierungsexperimenten kann man untersuchen, ob potentielle Bindungsstellen durch Transkriptionsfaktoren besetzt werden oder nicht. Durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern ist es anschließend möglich, in einem Bindungskomplex einen ganz bestimmten Transkriptionsfaktor nachzuweisen.

Durch eine DNaseI *footprint* Analyse können für einen begrenzten Sequenzabschnitt evtl. vorhandene Bindungskomplexe sichtbar gemacht werden, ohne allerdings eine Aussage darüber treffen zu können, welche Faktoren an der Bindung beteiligt sind.

3.7.1 Gelretardierungsexperimente

Inkubiert man radioaktiv markierte Oligonukleotide, die bestimmte Bindungsstellen enthalten, mit den daran bindenden Transkriptionsfaktoren, so ist bei einer anschließenden Gelelektrophorese eine Bandenverschiebung gegenüber dem Oligonukleotid ohne daran gebundenes Protein zu beobachten. Die Intensität der Banden kann durch Zugabe von nichtmarkiertem Oligonukleotid (Kompetition) abgeschwächt, der Komplex selbst durch Bindung eines spezifischen Antikörpers vergrößert und die Bande dementsprechend noch weiter verschoben werden (*supershift*).

Als erstes wurde ein *annealing* der einzelsträngigen Oligonukleotide BS1-3 und BS1-3 ns mit den zu diesen reverskomplementären Oligonukleotiden BS1-3 rk bzw. BS1-3 rk ns durchgeführt (s. Abb. 3.4b). Die dabei entstandenen doppelsträngigen Oligonukleotide beinhalteten jeweils eine der drei ARNT-Bindungsstellen an Position -910, -490 bzw. -140 in nichtmutierter (CAGAGA, BS1-3) bzw. in der zu einer *nonsense* Bindungsstelle mutierten Form (GGCGTG, BS1-3 ns). Nach deren Inkubation mit Kernextrakt normoxischer BAE-Zellen konnte zunächst eine Bandenverschiebung (*shift*) bei BS1 und BS3 im Vergleich zu BS1 ns und BS3 ns beobachtet werden, die jedoch nicht reproduzierbar war. Auch der Versuch, mit anti HIF-2 α Antiserum einen *supershift* zu erreichen, mißlang, da hier ebenfalls der anfänglich beobachtete *shift* nicht erfolgte. Eine Aussage über eine mögliche HIF-2 α -Bindung an eine der drei ARNT-Bindungsstellen konnte also mit Hilfe der Gelretardierungsexperimente nicht getroffen werden.

3.7.2 DNaseI footprint-Analyse

Lagern sich *in vitro* an einen Abschnitt nackter DNA Proteine an, wird an dieser Stelle eine statistische Spaltung durch DNase I verhindert, so daß hier bei der Betrachtung der Restriktionsleiter protegierte Bereiche sichtbar werden. Diese werden häufig von DNase I-hypersensitiven Bereichen flankiert.

Für die DNaseI *footprint*-Analyse wurden mit den Primern Bd1-4 und Bu1-4 (s. Abb. 3.4b) etwa 320 bp große Fragmente generiert (HRF 1-4), die jeweils eine oder mehrere potentielle ARNT- bzw. Ets-1-Bindungsstellen beinhalteten (s. Abb. 3.18 A), und zusammen mit BAE-Kernextrakt im Experiment eingesetzt. Dabei wurde zwischen der in HRF 1 enthaltenen ARNT- und Ets-1-Bindungsstelle (Pos. -910 und -940) ein deutlich protegierter Bereich gefunden, der von DNase I-hypersensitiven Bereichen umgeben war (s. Abb. 3.18 B links). Stromaufwärts direkt im Anschluß lag ein weiterer protegierter Bereich, dem allerdings keine potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstelle zugeordnet werden konnten. Bei einer Wiederholung des Experimentes mit nichtendotheliale HEK/293-Kernextrakt konnte gezeigt werden, daß die beiden im vorangegangenen Experiment protegierten Bereiche nun nicht mehr protegiert wurden, was auf endothelspezifische Bindungsstellen hindeutet (s. Abb. 3.18 B rechts). Für die anderen untersuchten ARNT- und Ets-1-Bindungsstellen konnte mit der DNaseI *footprint*-Analyse keine Proteinbindung nachgewiesen werden.

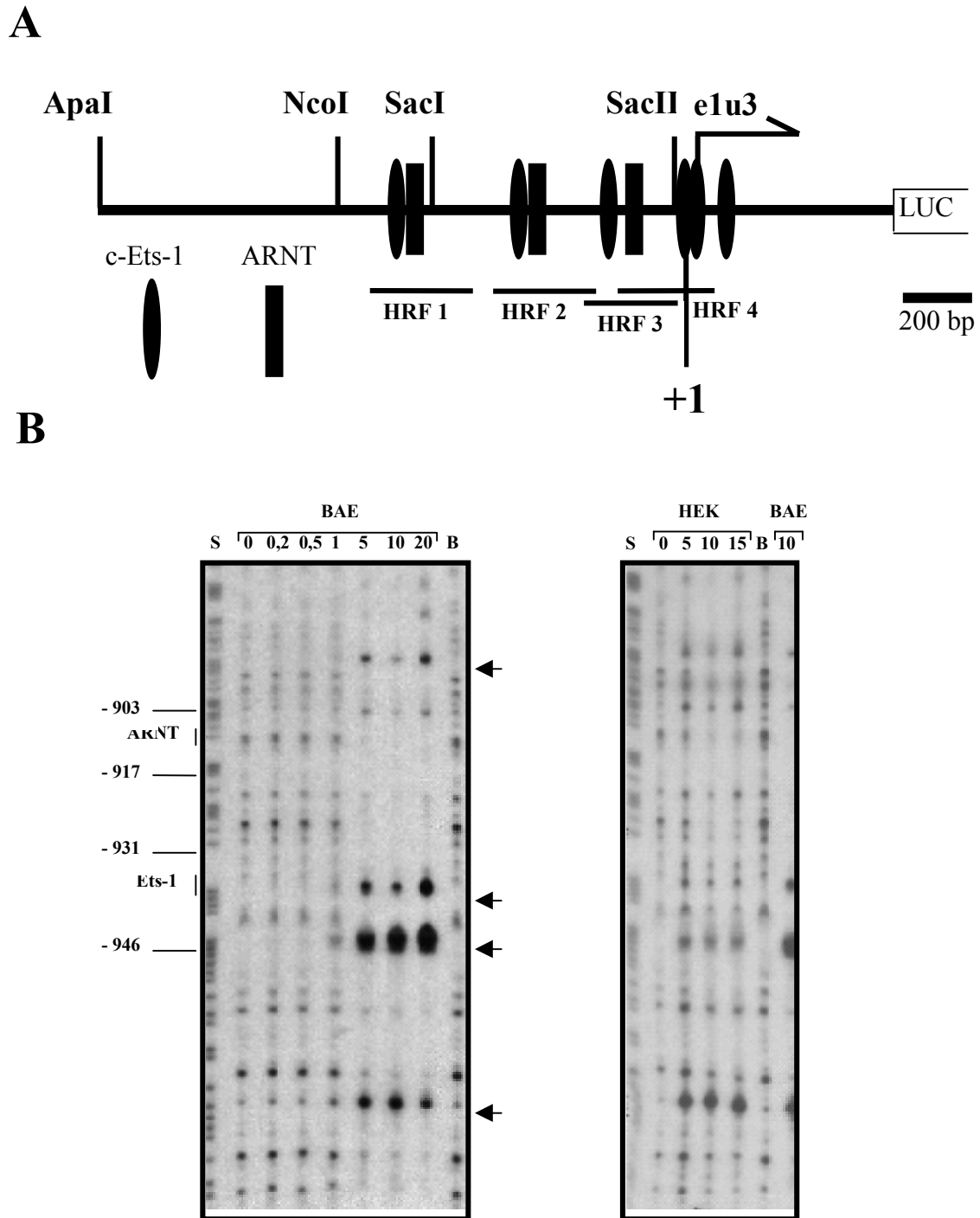


Abb. 3.18: **A** Überblick über die zur DNaseI *footprint*-Analyse eingesetzten Fragmente HRF 1-4 in Relation zu den potentielle ARNT- und Ets-1-Bindungsstellen des Hif-2 α -Promotorbereichs. **B** DNaseI *footprint*-Analyse des Fragmentes HRF 1 mit BAE- (links) und HEK/293-Kernextrakt (rechts); die eingesetzte Menge ist in μg angegeben. Links ist jeweils die GA-Leiter einer Maxam-Gilbert-Sequenzierungsreaktion aufgetragen (S). Als Kontrolle ist ein Ansatz mit 10 μg BSA statt Kernextrakt aufgetragen (B). DNaseI-hypersensitive Bereiche sind mit Pfeilen markiert

Die ARNT-Bindungsstelle an Pos. -910, deren Mutation im Klon *HIF-2 mut 8* bereits zu einem deutlichen Aktivitätsverlust im Reporterassay geführt hatte (s. Abb. 3.17 B), scheint also an der Bindung eines größeren Proteinkomplexes beteiligt zu sein. Darüberhinaus sieht es so aus, als sei diese Bindung endothelspezifisch, da sie nur mit Kernextrakt endothelialer BAE-Zellen zu beobachten war.

Eine noch offene Frage war, ob die Spezifität des Promotors *in vivo* für endotheliale Expression stark genug sein würde, um diese auch in transgenen Mäusen wiederzufinden.

3.8 Analyse des Hif-2 α -Promotors in transgenen Mäusen

Um eine mögliche, durch den Hif-2 α -Promotorbereich vermittelte endotheliale Expression auch *in vivo* nachzuweisen, wurde zunächst ein entsprechendes β -Galaktosidase-Reportergenkonstrukt hergestellt. Dazu wurden 2380 bp Hif-2 α -Promotor aus *HIF-2 ApaI* ausgeschnitten und in *pcDNA3.1/Myc-His/lacZ* vor die LacZ-Kassette kloniert, die das Gen enthält, welches für die Synthese der β -Galaktosidase aus *E.coli* kodiert. Das so entstandene Konstrukt erhielt den Namen *HIF-2 Apa in pcDNA*. Nachdem bei seiner transienten Transfektion in HEK/293-Zellen eine Expression von LacZ nachgewiesen werden konnte, wurde es für die Oozyteninjektion zur Erzeugung transgener Mäuseembryonen eingesetzt. Speziell aufgereinigte DNA wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie in Bad Nauheim in Pronuklei von Mausoozyten injiziert. Hierbei wird die Fremd-DNA an zufälligen Stellen des Genoms integriert. Anschließend wurden die Oozyten in den Eileiter einer pseudoträchtigen Maus transferiert. Die Integration des Reportergenkonstruktes im Genom der Embryonen wurde durch Genotypisierung nachgewiesen. Durch histochemischen Nachweis des β -Galaktosidase-Reporters konnte keine endothelspezifische Expression gezeigt werden, sondern lediglich eine Expression im ZNS. Eine deutliche, durch den histochemischen Nachweis von LacZ erzeugte Blaufärbung ist in Rückenmark und Kleinhirnanlage zu erkennen (s. Abb. 3.19 sowie Tab. 3.1).

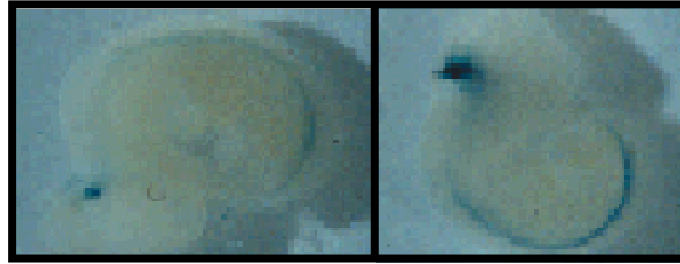


Abb. 3.19: LacZ-Färbung zweier transgener Mausembryonen (Tag 10,5 der Embryonalentwicklung, 20fache Vergrößerung). Das Reportergen steht unter der Kontrolle eines 2380 bp großen Hif-2 α -Promotorfragmentes.

Der Promotor alleine ist also offenbar nicht ausreichend für eine endothelspezifische Expression von Reportergenen. Es stellte sich nun die Frage, ob für eine endotheliale Expression von Hif-2 α weitere Elemente benötigt werden, wie dies beispielsweise für Flk-1 und TIE2 beschrieben wurde (Kappel *et al.*, 1999; Schlaeger *et al.*, 1997). An der endothelialen Expression dieser beiden Rezeptortyrosinkinasen sind Verstärkerelemente im ersten Intron maßgeblich beteiligt. Also wurde das Reportergenkonstrukt *HIF-2 lacZ prom/int 5* hergestellt, bei dem der 1,27 kb große Intron 1-Bereich aus *HIF-2 10.1Xba* in *pZErO* (20 bp Exon 1, 1265 bp Intron 1) in das Konstrukt *HIF-2 XbaI/LacZ* in einiger Entfernung (getrennt durch die 3,4 kb große LacZ-Kassette) hinter den 3,37 kb großen Hif-2 α -Promotorbereich kloniert wurde (s. Abb 3.20 A). Doch auch diesmal wurde das Reportergen nicht endothelspezifisch sondern neuronal wie im vorangegangenen Transgenexperiment exprimiert (s. Abb. 3.20 B sowie Tab. 3.1).

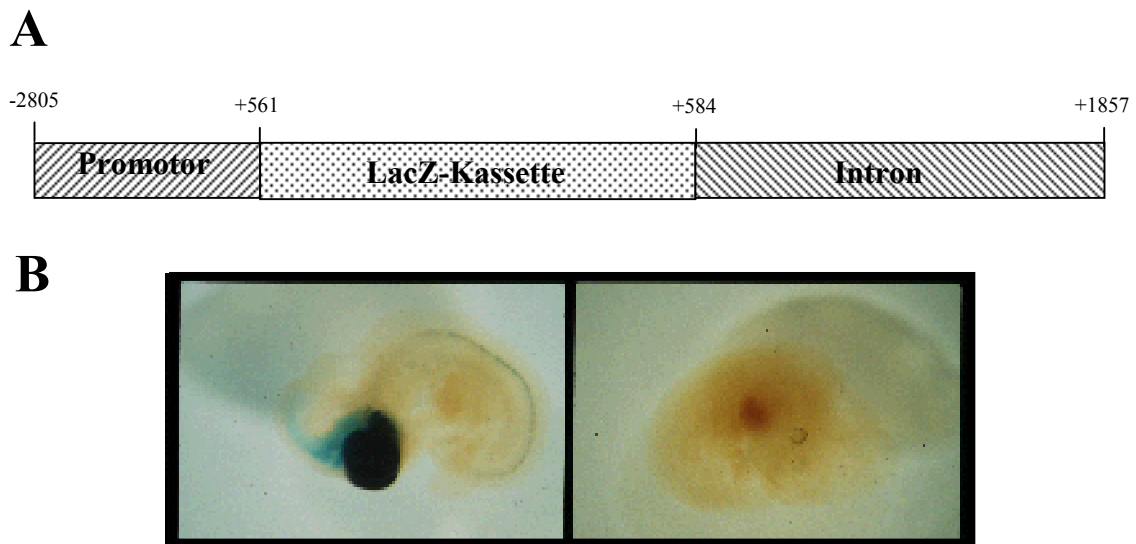


Abb. 3.20: **A** Aufbau des Reportergenkonstruktes *HIF-2 lacZ prom/int 5*. Das β -Galaktosidase-Gen in der LacZ-Kassette steht unter der Kontrolle des 3366 bp großen Hif-2 α -Promotorfragmentes (-2805 bis +562) und des 1273 bp großen mutmaßlichen Verstärkerelementes im ersten Intron von Hif-2 α (+584 bis +1857). **B links**: LacZ-Färbung eines transgenen Mausembryonen (Tag 10,5 der Embryonalentwicklung, 18fache Vergrößerung). Das Reportergen steht unter der Kontrolle eines 3366 bp großen Hif-2 α -Promotorfragmentes sowie eines 1273 bp großen mutmaßlichen Verstärkerelementes aus dem ersten Intron von Hif-2 α . **rechts**: Einer der transgenen Embryonen aus der gleichen Versuchsreihe, bei dem es zu keiner LacZ-Färbung kam.

Das 1,27 kb lange Fragment aus dem ersten Intron von Hif-2 α schien die für eine endotheliale Expression notwendigen Elemente also nicht zu enthalten. Deshalb wurde ein Reportergenkonstrukt generiert, welches ein größeres Stück vom Intron 1 enthielt (*HIF-2 Intron 5,5/XbaI/LacZ*). Dazu wurde aus dem Konstrukt *HIF-2 Intron1-Fragment A* (s. Abs. 3.2) ein 5658 bp großes Fragment ausgeschnitten, das neben 20 bp aus dem Exon 1 auch 5638 bp des ersten Introns von Hif-2 α enthielt. Dieses wurde nun ebenfalls in *HIF-2 XbaI/LacZ* hinter die LacZ-Kassette kloniert und im Transgenexperiment eingesetzt (s. Abb. 3.21 A). Bei den aus diesen Experimenten hervorgegangenen transgenen Embryonen ließ sich in keinem einzigen Fall eine Expression von LacZ nachweisen (s. Abb. 3.21 B sowie Tab. 3.1).

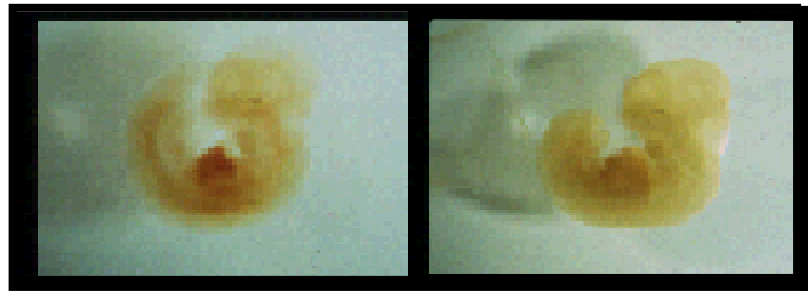
A**B**

Abb. 3.21: **A** Aufbau des Reportergenkonstruktes *HIF-2 Intron 5,5/XbaI/LacZ*. Das β -Galaktosidase-Gen in der LacZ-Kassette steht unter der Kontrolle des 3366 bp großen Hif-2 α -Promotorfragmentes (-2805 bis +562) und des 5658 bp großen mutmaßlichen Verstärkerelementes im ersten Intron von Hif-2 α (+584 bis +6242). **B** Zwei der fünf transgenen Mausembryonen (Tag 10,5 der Embryonalentwicklung, 18fache Vergrößerung), bei denen keine LacZ-Färbung auftrat. Das Reporter gen steht unter der Kontrolle eines 3366 bp großen Hif-2 α -Promotorfragmentes sowie eines 5658 bp großen mutmaßlichen Verstärkerelementes aus dem ersten Intron von Hif-2 α .

Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse der Transgenanalyse zusammen:

Konstrukt	transgene Embryonen	neuronale Expression	ektopische Expression	keine Expression
<i>HIF-2 Apa in pcDNA</i>	7	4	1	2
<i>HIF-2 lacZ prom/int 5</i>	12	5	1	6
<i>HIF-2 Intron 5,5/XbaI/LacZ</i>	5	0	0	5

Tab. 3.1: Statistische Auswertung der drei verschiedenen Ansätze von Transgenexperimenten.

Die Transgenexperimente zeigten somit zwei Dinge ganz deutlich: Weder der untersuchte Hif-2 α -Promotorbereich noch der untersuchte Intronbereich von Hif-2 α sind in der Lage, eine endotheliale Expression von Reporter genen zu induzieren. Darüberhinaus hat der untersuchte Bereich aus dem Intron 1 keinerlei die Expression verstärkende Wirkung, da er die vom Promotor induzierte neuronale Expression in keinster Weise verstärkt, sondern im Gegenteil sogar zu hemmen scheint. Somit könnten in dem Teil des Introns, der nur im größeren untersuchten Intronfragment enthalten war, Sequenzbereiche mit hemmender Wirkung liegen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Promotor des murinen Hif-2 α -Gens charakterisiert. Ein Abschnitt von 820 bp Länge stromaufwärts des Start-ATG repräsentiert den minimalen Promotor. Hierin finden sich mehrere Konsensus-Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Hif-2 α . In zellulären Reporter-Gen-Tests konnte eine stark überadditive Aktivierung der durch den Hif-2 α -Promotor getriebenen Transkription durch Hif-2 α und Ets-1 nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang könnte die vorwiegend endotheliale Expression des Hif-2 α -Gens begründen, da auch Ets-1 ein stark endothelial exprimierter Transkriptionsfaktor ist (Vandenbunder et al., 1989; Wernert et al., 1992), der somit kooperativ die Autoregulation der Hif-2 α -Expression unterstützen und als Stellglied für die Expression des Hif-2 α während der Entwicklung fungieren könnte. Sowohl Ets-1 als auch Hif-2 α sind in Endothelzellen während der Angiogenese sowohl im Embryo als auch in pathologischen Geweben (z.B. Tumoren) hoch exprimiert (Wernert et al., 1994; Flamme et al., 1997; Favier et al., 1999; Elvert et al., 1999; Jones et al., 2001). Im Gegensatz hierzu finden sich im Promotor des eng verwandten Hif-1 α -Gens keinerlei Bindungsstellen für endothelspezifische Transkriptionsfaktoren. Überdies zeigt die Expression der Hif-1 α -mRNA kein gewebespezifisches Muster. Die spezifischen Hif-2 α - und Ets-1-Bindungsstellen im Hif-2 α -Promotor dienen jedoch offenbar nur als Verstärkerelemente der endothelialen Expression, bestimmen aber nicht die Endothelspezifität der Expression. Dies konnte durch Transgenexperimente in dieser Arbeit gezeigt werden. Die endothelialen Restriktionselemente des Hif-2 α -Gens liegen offenbar außerhalb des hier identifizierten Promotorbereichs.

4.1 Die Promotoraktivität in unterschiedlichen Zelllinien gibt das Expressionsmuster *in vivo* wieder

Bei der Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde wurde Hif-2 α im Northern-*Blot* in der Gesamt-RNA der endothelialen HUE-Zellen nachgewiesen, während bei allen nicht endothelialen Zelllinien (L929, HEP 1 C4, COS, HEK/293 und 3T3) keine Hif-2 α -mRNA detektiert werden konnte. Ebenso zeigte sich mit einem 3,4 kb langen Hif-2 α -Promotorfragment im Reporter-Genassay in den endothelialen HUVECs eine mindestens

dreifach höhere Promotoraktivität im Vergleich zu den verwendeten nicht endothelialen Zelllinien (HEK/293, 3T3, COS, Q2nB, CEF und HEP 1 C4). Bei der zweiten getesteten endothelialen Zelllinie (BAE) war die gemessene Promotoraktivität allerdings nur unwesentlich höher als bei denjenigen nicht endothelialen Zellen mit der größten Aktivität (HEK/293 und COS). Ein Grund hierfür könnte die Tatsache sein, daß sich BAE-Zellen nicht mit der für alle übrigen Zelllinien verwendeten Transfektionsreagenz transfizieren ließen und hier deshalb die Methode der Elektroporation angewendet wurde. Auch damit ließen sich die BAE-Zellen nur sehr schlecht transfizieren und die gemessenen Aktivitäten lagen um mehrere Zehnerpotenzen unter denen der übrigen Zellen. Dadurch könnte u.U. die Vergleichbarkeit nur noch bedingt gewährleistet sein. Eine endothelspezifische Promotoraktivität von Hif-2 α konnte mit den Ergebnissen aus Northern-*Blot* und Reporterassay eindeutig gezeigt werden. Es bestand also die berechtigte Hoffnung, bei einer Analyse des Hif-2 α -Promotors Strukturelemente zu identifizieren, die eine endothelzellspezifische Expression vermitteln.

4.2 Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Promotorstrukturelemente

Genexpression wird weniger bestimmt durch einen einfachen, additiven Einfluß der unterschiedlichen an einem Promotor bindenden Transkriptionsfaktoren, als vielmehr durch eine Interaktion in unmittelbarer Nachbarschaft bindender Transkriptionsfaktoren. Dabei bilden sich aus Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren und anderen Proteinen zusammengesetzte Multiproteinkomplexe, die durch unterschiedlich stark ausgeprägte hemmende und synergistische Effekte eine spezifische Genexpression erst möglich machen.

Im folgenden werden die im Promotorbereich und im ersten Intron von Hif-2 α identifizierten potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Promotorstrukturelemente im Hinblick auf andere endothelspezifische Promotoren diskutiert.

Sp1- und GATA-Bindungsstellen wurden bereits in einer Vielzahl von Promotoren endothelial exprimierter Gene gefunden. So wurden beispielsweise funktionelle Sp1-Bindungsstellen *in vitro* für eine maximale endotheliale Expression der Promotoren von KDR/Flk-1, PDGF, eNOS und ICAM-2 benötigt, während GATA-Bindungsstellen als positive Regulatorelemente in P-Selektin-, von Willebrand Faktor-, Endothelin-1-, VCAM-1-, PECAM-1-, ICAM-2- und eNOS-Promotoren identifiziert wurden (Cowan

et al., 1998; Zhang *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1993; Patterson *et al.*, 1997; Jahroudi *et al.*, 1994; Khachigian *et al.*, 1994 und Lee *et al.*, 1991; Gumina *et al.*, 1997). Aber auch im *KDR/flk-1*-Gen wurden GATA-Konsensusmotive und im *flt-1*-Gen Sp1-Bindungsstellen gefunden (Patterson *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1996). Das GATA-bindende Protein GATA-2 wird in Endothelzellen exprimiert (Wilson *et al.*, 1990). Für das endothelial exprimierte Präproendothelin-1-Gen wurde eine synergistische Aktivierung durch GATA-2 und AP-1 beschrieben, ein Transkriptionsfaktor, der durch zellulären und oxidativen Stress sowie durch eine Vielzahl anderer Stimuli aktiviert wird (Kawana *et al.*, 1995). Da GATA-2, AP-1 und Sp1 aber in sehr vielen verschiedenen Geweben auftreten, spielen diese Faktoren wohl eher eine Nebenrolle bezüglich der endothelspezifischen Expression der aufgezählten Gene. Dennoch wurde für den KDR/Flk-1-Promotor gezeigt, daß wichtige Sp1-Bindungsstellen *in vivo* nur in endothelialen Zellen besetzt sind, in nicht-endothelialen Zellen Sp1 aber von der Bindung ausgeschlossen ist, wahrscheinlich bedingt durch einen Wechsel in der Chromatinstruktur (Patterson *et al.*, 1997).

E-Box-Motive wurden außer im *KDR/Flk-1*- und im *PECAM-1*-Promotor beispielsweise im Promotorbereich von *APEG-1* (*aortic preferentially expressed gene-1*) gefunden, wo es als zellspezifisches Verstärkerelement wirkt (Patterson *et al.*, 1995; Gumina *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1999). Für die beiden E-Box-bindenden Transkriptionsfaktoren USF1 und USF2 wurde im Promotor von *TGF-beta2* eine kritische Rolle in Bezug auf dessen Promotoraktivität nachgewiesen (Scholtz *et al.*, 1996).

An Position -286 des Hif-2 α -Promotors findet sich eine Sequenz von 8 bp, die bis auf eine Abweichung in einem Basenpaar einem palindromischen Oktamer (CAGATCTG) gleicht, das ursprünglich im Promotor von *Tie1* bei der Maus entdeckt wurde (Korhonen *et al.*, 1995b). Aber auch im *Tie2*-Gen der Maus und im menschlichen *ICAM-2*-Gen sowie (bei einer Konservierung von sieben der acht Basenpaare) im *Tie1*-Promotor des Menschen und im *ICAM-2*-Promotor der Maus konnte es nachgewiesen werden (Schlaeger *et al.*, 1997; Cowan *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1992). Diese Sequenz konnte zwar noch keiner Transkriptionsfaktorbindungsstelle zugeordnet werden, ihre besondere Rolle in Bezug auf die Genregulation wird aber z.B. daran deutlich, daß bei einer Mutation innerhalb der palindromischen Sequenz die Promotoraktivität von ICAM-2 in BAEC-Zellen um 70% zurückgeht (Cowan *et al.*, 1998).

In unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstartpunktes an Position -175 des Hif-2 α -Promotors (s. 4.5) findet sich auf dem nicht kodierenden Strang eine CAAT-Box, eines der wenigen typischen RNA Polymerase II-Promotorelemente (Bucher, 1990). CAAT-Boxen in dieser Orientierung wurden schon in vielen eukaryotischen Genen gefunden (Graves *et al.*, 1986; Benoist *et al.*, 1980; Kim und Lee, 1991). Noch näher am Transkriptionsstartpunkt an Position -37 konnte eine TATA-Box identifiziert werden, die dem Konsensusmotiv einer Muskel-TATA-Box entsprach (Bucher, 1990). Obwohl die meisten endothelspezifisch exprimierten Gene TATA-lose Promotoren besitzen (*Ets-1*, *eNOS*, *KDR/Flk-1*, *Tie1*, *Tie2*, *VE cadherin*, *PECAM-1*, *ICAM-2*), weisen auch einige eine TATA-Box auf, wie z.B. *flt-1* an Position -31 oder *von Willebrand Faktor* an Position -30 (Mavrothalassitis *et al.*, 1990; Patterson *et al.*, 1995; Marsden *et al.*, 1993; Korhonen *et al.*, 1995a; Dube *et al.*, 1999; Gory *et al.*, 1998; Almendro *et al.*, 1996; Cowan *et al.*, 1998; Morishita *et al.*, 1995). Die Tatsache, daß CAAT- und TATA-Box bei Hif-2 α in einem für diese Elemente üblichen Abstand vom Transkriptionsstartpunkt liegen und daß sie in der Promotorsequenz zwischen Maus und Mensch zu 100% konserviert sind sowie der im Reporterassay bei ihrer Deletion bzw. Mutation beobachtete signifikante Rückgang der Promotoraktivität lassen eine Funktionalität beider Strukturelemente als gesichert erscheinen.

Die Expression zahlreicher endothelialer Gene kann durch vom Blutfluß verursachte Scherkräfte beeinflusst werden (zur Übersicht s. Topper und Gimbrone, 1999). Vermittelt wird dies durch sog. Scherstreß-induzierbare Elemente (SSREs), deren konservierte Kern-Bindungssequenz GAGACC in den Promotoren vieler endothelialer Gene gefunden wurde (Resnick *et al.*, 1993). Zwei mögliche SSREs wurden auch bei Hif-2 α an Position +555 im 5'-UTR sowie an Position +2102 im ersten Intron gefunden, wobei erwähnt werden muß, daß alle anderen bisher identifizierten SSREs oberhalb des Transkriptionsstartpunktes liegen. Es bliebe also zu untersuchen, ob für Hif-2 α eine Scherstreß-Induzierbarkeit nachgewiesen werden kann, die evtl. auf eines dieser SSREs zurückzuführen ist.

Im *Flt-1*-Promotor ist im 5'-UTR ein *cyclic AMP (cAMP)-responsive element* (CRE) zu finden, das sich als essentiell für die basale Transkription herausstellte (Morishita *et al.*, 1995). Außerdem weist vieles darauf hin, daß eine enge kooperative Verbindung zwischen dem CRE-bindenden Protein (CREB) und Ets-1 besteht, für welches im *Flt-1*-Promotor in unmittelbarer Nähe des CRE eine Bindungsstelle gefunden wurde (Wakiya *et al.*, 1996). Eine solche CRE findet sich auch im 5'-UTR von Hif-2 α . Das CREB-

bindende Protein (CBP) vermittelt Interaktionen zwischen verschiedenen DNA-bindenden Proteinen und gilt u.a. als wichtiger Vermittler der synergistischen und antagonistischen Interaktionen zwischen Ets-1 und seinen zahlreichen Transkriptionsfaktor-Partnern (Yang *et al.*, 1998). Einige dieser mit Ets-1 kooperierenden Faktoren können auch eine Bindung mit CBP eingehen; ein Beispiel hierfür ist AP-1 (Wasylyk *et al.*, 1990).

Funktionelle Ets-1-Bindungsstellen sind in den Promotoren vieler endothelspezifisch exprimierter Gene zu finden, darunter *Flt-1*, *eNOS*, *vWF*, *Tie1*, *Tie2*, *VE-Cadherin* und *ICAM-2* (Morishita *et al.*, 1995; Karantzoulis-Fegaras *et al.*, 1999; Schwachtgen *et al.*, 1997; Iljin *et al.*, 1999; Dube *et al.*, 1999; Gory *et al.*, 1998; Cowan *et al.*, 1998). Ebenso konnte in einem im ersten Intron von *Tie2* gelegenen Verstärkerelement eine funktionelle Ets-1-Bindungsstelle nachgewiesen werden (Schläger *et al.*, 1997). Aber auch das *Ets-1*-Gen selbst, in dessen Promotor Ets-1-Bindungsstellen zu finden sind, kann durch eine Überexpression von Ets-1 transkriptionell hochreguliert werden (Seth und Papas, 1990). Da auch der *Hif-2 α* -Promotor Hif-2 α - bzw. ARNT-Bindungsstellen enthält, könnte hier eine ähnliche Autoregulation stattfinden. Es lag also nahe, die im Promotor von Hif-2 α lokalisierten Hif-2 α - und Ets-1-Bindungsstellen auf ihre Funktionalität hin zu untersuchen.

4.3 Funktionelle Analyse der Hif-2 α - und Ets-1-Bindungsstellen

4.3.1 Erste Deletionsklon-Analyse

Um den Hif-2 α -Promotor in einzelne Bereiche unterteilen zu können, die dessen Aktivität erhöhen, hemmen oder keinen Einfluß auf die Promotoraktivität nehmen, wurde der im Klon *HIF-2 XbaI* enthaltene Promotorbereich (-2805 bis +561) im Reporterassay mit verschiedenen Deletionsklonen verglichen, die jeweils vom 5'-Ende her um ein unterschiedlich langes Stück verkürzt waren. Dabei unterschied sich der Deletionsklon *HIF-2 ApaI* (-1819 bis +561) in seiner Promotoraktivität praktisch nicht vom Ausgangskonstrukt *HIF-2 XbaI*. Die etwa 1000 bp am 5'-Ende des Hif-2 α -Promotorbereichs scheinen demnach nicht an dessen Aktivierung beteiligt und die in diesem Bereich liegenden Ets-1- und Hif-2 α -Bindungsstellen nicht funktionell zu sein. Im Vergleich dazu konnte beim Deletionsklon *HIF-2 NcoI* (-1118 bis +561) eine zunächst nur schwach, unter geänderten Versuchsbedingungen (Koaktivierung durch

Ets-1 und Hif-2 α , s.u.) jedoch signifikante Erhöhung der Promotoraktivität beobachtet werden, während die Aktivierung durch *HIF-2 SacI* (-813 bis +561) wieder auf dem Ursprungsniveau lag. Ein möglicher Erklärungsversuch dieser Erhöhung wäre das Zusammenspiel zweier unterschiedlicher Faktoren: Ein 5' der NcoI-Schnittstelle gelegenes hemmendes regulatorisches Element, dessen Wegfall bei *HIF-2 NcoI* zu einer Aktivitätserhöhung führen sowie zwei nebeneinanderliegende funktionelle Transkriptionsfaktorbindungsstellen für Ets-1 (-935) bzw. Hif-2 α (-910) zwischen NcoI- und SacI-Schnittstelle, deren Wegfall bei *HIF-2 SacI* trotz des fehlenden hemmenden Elements eine Erniedrigung der Aktivität im Vergleich zu *HIF-2 NcoI* bewirken könnte. Bei *HIF-2 SacII* (-53 bis +561) kommt es noch einmal zu einer deutlichen Aktivitätseinbuße, die vom Verlust der zwischen SacI- und SacII-Schnittstelle liegenden Ets-1- und Hif-2 α -Bindungsstellen herrühren könnte. In diesem Abschnitt liegen an Position -525 und -490 in unmittelbarer Nähe zueinander zwei potentielle Bindungsstellen für Ets-1 bzw. Hif-2 α sowie eine weitere Ets-1- (-265) und Hif-2 α -Bindungsstelle (-135). Außerdem ist in *HIF-2 SacII* die CAAT-Box nicht mehr enthalten, was zwangsläufig zu einer Behinderung der Transkriptionsmaschinerie und damit ebenfalls zu einem Rückgang der Promotoraktivität im Reporterassay führen müßte. Der vollständige Aktivitätsverlust bei *HIF-2 elu3* (+18 bis +580) muß mit dem Verlust der TATA-Box erklärt werden.

4.3.2 Überadditiver Effekt von Ets-1 und Hif-2 α auf den Hif-2 α -Promotor

Um die Möglichkeit der Autoregulation von Hif-2 α sowie eine mögliche Regulation des Hif-2 α -Promotors durch Ets-1 zu untersuchen, wurde der Reporterassay mit den unterschiedlichen Deletionsklonen wiederholt und Expressionsplasmide von Ets-1 und Hif-2 α einzeln sowie in Kombination kotransfiziert. Während Ets-1 und Hif-2 α alleine jeweils schon zu einer deutlichen Aktivitätserhöhung führten, bewirkte die Kotransfektion mit beiden Faktoren eine Erhöhung der Aktivität, die deutlich über dem aufaddierten Wert aus den jeweiligen Einzelwerten für Ets-1 und Hif-2 α lag. Dieser überadditive Effekt, der bisher nur von unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde, deutet auf eine kooperative Interaktion von Ets-1 und Hif-2 α hin, wie sie bereits im Zusammenhang mit der Aktivierung des Flk-1-Promotors nachgewiesen werden konnte (Elvert *et al.*, 2003). Eine positive Autoregulation der Hif-2 α -Expression wurde inzwischen auch von Sato *et al.*, 2002 beschrieben.

Für die spezifische DNA-Bindung der einzelnen Proteine der Ets-Familie scheinen Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren von besonderer Wichtigkeit zu sein (Janknecht und Nordheim, 1993). So wurde beispielsweise in einer distalen Verstärkerregion des Promotors von HIV-1 aufeinanderfolgende E-Boxen und Ets-1-Bindungsstellen gefunden und eine kooperative Interaktion von E-Box-bindendem Protein USF-1 und Ets-1 nachgewiesen (Sieweke *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel für eine Ets-1-Beteiligung an kooperativer Genregulation ist die Interaktion zwischen AML1 (der α BI-Untereinheit von PEBP2/CBF) und Ets-1 in der Transaktivierung des T-Zell-Rezeptor (TCR) β -Ketten-Verstärkerelementes, bei der es durch direkte Interaktion beider Faktoren zu einer reziproken Stimulation ihrer DNA-Bindungsaktivitäten sowie einer Aktivierung ihrer transaktivierenden Funktion kommt (Kim *et al.*, 1999).

Bei den erhöhten Aktivitäten durch die Kotransfektion von Hif-2 α und/oder Ets-1 ist im Vergleich der einzelnen Deletionsklone im großen und ganzen dasselbe Aktivitätsmuster zu erkennen, das bereits für die Deletionsklone ohne Kotransfektion beschrieben wurde. Die Aktivitätserhöhung von *HIF-2 NcoI* gegenüber dem Aktivitätsniveau, das von *HIF-2 XbaI*, *HIF-2 ApaI* und *HIF-2 SacI* gebildet wird, fällt jedoch wesentlich deutlicher aus, ebenso wie der Aktivitätsabfall von *HIF-2 SacII* gegenüber demselben Niveau. Dies deutet auf die besondere Bedeutung der Ets-1- und Hif-2 α -Bindungsstellen für die beobachteten Aktivitätsunterschiede hin (vgl. 4.4.1).

4.3.3 Gezielte Deletionen von Ets-1- und Hif-2 α -Bindungsstellen

Um von den Aktivitätsunterschieden der Deletionsklone besser auf deren eventuelle Abhängigkeit von Ets-1- oder Hif-2 α -Bindungsstellen rückschließen zu können, wurden durch PCR ganz gezielt Deletionsklone generiert, die sich jeweils durch Vorhandensein bzw. nicht Vorhandensein einer Ets-1- oder Hif-2 α -Bindungsstelle voneinander unterscheiden. Berücksichtigt wurden hierbei die Ets-1-Bindungsstellen an den Positionen -935, -525 und -265 sowie die Hif-2 α -Bindungsstellen an den Positionen -910, -490 und -135. Im Reporterassay zeigten die meisten dieser Konstrukte allerdings ein nicht signifikantes auf und ab an Aktivitäten, das keine Rückschlüsse auf die Bedeutung einzelner Bindungsstellen zuließ. Erst bei Deletionen in der Nähe des Transkriptionsstartes konnten deutliche Aktivitätsunterschiede gezeigt werden. Die Aktivitätseinbuße von *HIF-2 Del 5* (-246 bis +557) zu *HIF-2 Del 6* (-163 bis +557)

erklärt sich aus dem Verlust der CAAT-Box, die von *HIF-2 Del 6* zu *HIF-2 Del 7* (-95 bis +557) wahrscheinlich aus dem Verlust dreier Sp1-Bindungsstellen, obwohl hier im Unterscheidungsbereich auch eine Hif-2 α -Bindungsstelle liegt. Beim Vergleich von *HIF-2 Del 7* mit dem bereits in der ersten Deletionsklonanalyse verwendeten Konstrukt *HIF-2 elu3* (+18 bis +580) konnte nocheinmal beeindruckend der fast vollständige Rückgang der Aktivität bei Verlust einer Sp1-Bindungsstelle, der TATA-Box und des Transkriptionsstartpunktes belegt werden, wie er schon beim Vergleich von *HIF-2 SacII* (-53 bis +561) mit *HIF-2 elu3* gezeigt wurde (s. 4.4.1). Es könnten hier allerdings auch zwei im Unterscheidungsbereich liegende Ets-1-Bindungsstellen an den Positionen -5 und +26 eine Rolle spielen, obwohl dies eher unwahrscheinlich erscheint. Bei der Kotransfektion mit Hif-2 α und/oder Ets-1 war wieder eine deutliche Aktivitätserhöhung (Hif-2 α , Ets-1) sowie eine überadditive Aktivitätserhöhung (Hif-2 α und Ets-1) zu beobachten. Außer der bereits beschriebenen Effekte zeigte sich hier noch ein deutlicher Aktivitätsrückgang bei Deletion der Ets-1-Bindungsstelle an Position -525 (Vergleich von *HIF-2 elu8* und *HIF-2 elu9*), der auf eine besondere Bedeutung dieser Bindungsstelle hinweisen könnte. Darüberhinaus konnte bei dieser Versuchsreihe aber immer noch keine klare Aussage über mögliche Funktionalitäten der verschiedenen Ets-1- und Hif-2 α -Bindungsstellen gemacht werden.

4.3.4 Gezielte Mutationen von Ets-1- und Hif-2 α -Bindungsstellen

Da für die Funktionalität von Transkriptionsfaktorbindungsstellen die nähere und fernere Umgebung auf der DNA von erheblicher Wichtigkeit sein kann, wurden in einem neuen Versuchsansatz Mutationsklone hergestellt, die sich jeweils nur durch die Mutation (Zerstörung) der Kern-Bindungssequenz einer Bindungsstelle voneinander unterscheiden, ansonsten aber den gleichen Hif-2 α -Promotorbereich wie *HIF-2 XbaI* repräsentieren (-2805 bis +561). Im Reporterassay zeigte sich bei Mutation der Ets-1-Bindungsstellen an den Positionen -935, -525, -265, -5 und +26 und gleichermaßen bei Mutation der Hif-2 α -Bindungsstellen an den Positionen -490 und -135 ein Rückgang der Promotoraktivität gegenüber *HIF-2 XbaI* um etwa die Hälfte. Nur der Mutationsklon, bei dem die Hif-2 α -Bindungsstelle an Pos. -910 zerstört war, wich von diesem einheitlichen Aktivitätsniveau ab; er zeigte nur noch $\frac{1}{5}$ der Aktivität von *HIF-2 XbaI*. Dieses Aktivitätsmuster fand sich auch bei durch Kotransfektion mit Hif-2 α und/oder Ets-1 erhöhten bzw. überadditiv erhöhten Aktivitäten wieder. Das

einheitliche Aktivitätsniveau der meisten Bindungsstellen deutet ganz klar auf ihre alternative Nutzung hin: Eine Zerstörung einzelner Bindungsstellen hat keinen Aktivitätsverlust zur Folge, dennoch lassen sich verschiedene Deletionsklone mit Ets-1 und Hif-2 α aktivieren, was auf die Funktionalität mehrerer Bindungsstellen hinweist.

Betrachtet man vor dem Hintergrund der offenbar hervorragenden Rolle der Hif-2 α -Bindungsstelle an Pos. -910 noch einmal die Ergebnisse der Deletionsklonanalyse und vergleicht nur die beiden Konstrukte *HIF-2 Del 2* (-933 bis +557) und *HIF-2 Del 3* (-898 bis +557), die sich um ganze 35 bp inklusive der besagten Hif-2 α -Bindungsstelle voneinander unterscheiden, so findet man auch hier einen beachtlichen Aktivitätsrückgang. Dieser Aktivitätsunterschied paßt jedoch nicht so recht in den Gesamtzusammenhang der Deletionsklon-Analyse, da *HIF-2 Del 2* im Reporter-gen-assay eine besonders hohe Aktivität zeigt, und deshalb die Aktivität von *HIF-2 Del 3* zwar deutlich niedriger als die von *HIF-2 Del 2*, nicht jedoch als die der meisten übrigen Deletionsklone ist.

4.3.5 Transkriptionsfaktor-Bindungsanalysen

Zwar konnte im Gelretardierungsexperiment für keine der drei Hif-2 α -Bindungsstellen an den Positionen -910, -490 und -135 die tatsächliche Bindung von Hif-2 α nachgewiesen werden, doch scheint dies an suboptimalen Versuchsbedingungen gelegen zu haben und sollte zur weiteren Klärung der Fragestellung in einem neuen Versuchsansatz geklärt werden. In der DNaseI *footprint*-Analyse konnte nämlich im Bereich der Ets-1- und Hif-2 α -Bindungsstelle (Pos. -935 bzw. -910) die endothelzellspezifische Bindung eines größeren Proteinkomplexes gezeigt werden, der vermutlich Ets-1 und Hif-2 α beinhaltet.

4.4 Der Transkriptionsstartpunkt von Hif-2 α

Als Base, bei der die RNA-Polymerase II bei Hif-2 α mit der Transkription der mRNA beginnt, konnte im Primer-Extensionsexperiment ein Thymin 578 bp oberhalb des Start-ATG identifiziert werden. Von der beim RNase-Protektionsexperiment detektierten Bande konnte ein Transkriptionsstart etwa 580 bp oberhalb des Start-ATG abgeleitet und damit das Thymin aus dem Primer-Extensionsexperiment bestätigt werden. Als drittes wurde dieser Befund von einer räumlichen Eingrenzung durch PCR

aus mRNA untermauert. Dabei zeigte sich, daß bei einem Gegenprimer an Pos. -419 nur mit solchen Primern ein PCR-Transkript entstehen konnte, die unterhalb bzw. auf Höhe des Transkriptionsstartes lagen, nicht jedoch bei oberhalb gelegenen Primern.

Betrachtet man im Hif-2 α -Promotor die Umgebung des in dieser Arbeit identifizierten Transkriptionsstartpunktes, findet man CAAT-Box, TATA-Box und mehrere Sp1-Bindungsstellen in einem für eukaryontische Promotoren üblichen Abstand (s. 4.3).

4.5 Neuronale Expression im Transgenexperiment

Es sollte untersucht werden, ob in den isolierten genregulatorischen Sequenzen des Hif-2 α die Elemente vorhanden sind, die für eine endothelzellspezifische Expression *in vivo* notwendig bzw. hinreichend sind. Ein 2380 bp großer Bereich aus dem Promotor von Hif-2 α (-1819 bis + 561) trieb im Transgenexperiment stark die Expression von *E. coli* β -Galaktosidase als Reportergen in neuronalen Geweben des Mausembryos an, während eine endotheliale Expression nicht beobachtet werden konnte. Deshalb wurden Teile des etwa 25 kb großen ersten Introns von Hif-2 α im Transgenexperiment untersucht, da im ersten Intron mehrerer endothelial exprimierter Gene für diese spezifische Expression verantwortliche Sequenzbereiche nachgewiesen werden konnten. So vermittelt beispielsweise ein 939 bp großes Fragment aus der Promotorregion von *Flk-1* nur in Kombination mit einem 510 bp großen Bereich des ersten Introns eine endothelspezifische Expression des Reportergens in transgenen Mäusen (Kappel *et al.*, 1999). Diese unabhängig von der Orientierung aktive Intronsequenz erfüllt alle Kriterien eines gewebespezifischen Verstärkerelementes. Ein solches Element konnte bereits in einem 1,7 kb großen Intronfragment des *TIE-2*-Promotors gefunden werden und wurde außerdem in den ersten 9 kb des Introns 1 von *Ets-1* lokalisiert (Schlaeger *et al.*, 1997; Jorcyk *et al.*, 1997). Mit dem Transgenkonstrukt *HIF-2 lacZ prom/int 5*, bei dem in 3,4 kb Abstand zum 3366 bp großen Hif-2 α -Promotorbereich (-2805 bis +561) ein 1265 bp großes Intron 1-Fragment eingefügt wurde (+584 bis +1857; 20 bp Exon 1, 1265 bp Intron 1), zeigte sich eine neuronale Expression wie im vorangegangenen Versuchsansatz mit dem Promotorfragment allein. Daraufhin wurde das Konstrukt *HIF-2 Intron 5,5/XbaI/LacZ* im Transgenexperiment eingesetzt, das anstatt der 1265 bp nun 5638 bp des ersten Introns enthielt (+584 bis +6242). Bei den aus diesen Experimenten hervorgegangenen transgenen Embryonen ließ sich in keinem einzigen Fall eine Expression von LacZ

nachweisen. Die vorher beobachtete neuronale Expression scheint hier durch ein im Intron gelegenes hemmendes Element unterbunden worden zu sein. Ähnliches wurde bereits für *Ets-1* beschrieben. Dort scheint die von einer 2,4 kb großen 5'-flankierenden Sequenz vermittelte Expression im ZNS durch ein im ersten Intron gelegenes hemmendes Element unterdrückt zu werden (Jorcyk *et al.*, 1997).

Im ersten Intron von Hif-2 α findet sich an Position +3584 ein etwa 20 bp langer Sequenzabschnitt, der eine auffällige Ähnlichkeit mit einer von Morishita *et al.* 1995 für den *flt-1*-Promotor beschriebenen Transkriptionshaltestelle besitzt. Morishita *et al.* leiten von der Existenz dieser Transkriptionshaltestelle die Hypothese ab, daß die bei *flt-1* beobachtete, durch das erste Intron vermittelte negative Regulation der Genexpression ihre Ursache in einem Anhalten der Transkriptionsmaschinerie bedingt durch ebenjenen Sequenzabschnitt hat. Bei Hif-2 α liegt die potentielle Transkriptionshaltestelle in dem Bereich des ersten Introns, durch den sich die beiden im Transgenexperiment eingesetzten Reportergenkonstrukte *HIF-2 lacZ prom/int 5* und *HIF-2 Intron 5,5/XbaI/LacZ* voneinander unterscheiden. Mit ersterem, in dem die potentielle Transkriptionshaltestelle nicht enthalten ist, wird eine neuronale Expression des Reportergens erreicht, während mit dem die potentielle Transkriptionshaltestelle enthaltenden Konstrukt *HIF-2 Intron 5,5/XbaI/LacZ* keine Expression des Reportergens mehr zu beobachten ist. Die Transkriptionshaltestelle könnte also auch bei Hif-2 α aktiv sein und durch ein Anhalten des Transkriptionsapparates zu einer Hemmung der Promotoraktivität und demnach zu einem Expressionsstop des Reportergens im Transgenexperiment führen.

Abschließend bleibt zu sagen, daß die spezifischen Hif-2 α - und Ets-1-Bindungsstellen im Hif-2 α -Promotor offenbar nur als Verstärkerelemente der endothelialen Expression dienen, für die Endothelspezifität der Expression aber nicht bestimmend sind. Die für eine endotheliale Expression des Transkriptionsfaktors Hif-2 α *in vivo* verantwortlichen Elemente sind also offensichtlich außerhalb des in dieser Arbeit analysierten Bereiches zu suchen.

5 Zusammenfassung

Das Blutgefäßsystem ist das zentrale Versorgungs- und Kommunikationssystem des Körpers. Es dient dem Transport von Atemgasen, Nährstoffen, Abfallprodukten, Zellen der Immunabwehr und Botenstoffen. Sowohl physiologisches Organwachstum aber auch das Wachstum von Tumoren und chronisch entzündliche Erkrankungen hängen in ihrem Fortschreiten von der Neubildung von Blutgefäßen ab (Angiogenese). Angiogenese beginnt mit der Proliferation von Endothelzellen, die als inneres Epithel alle Blutgefäße auskleiden. Sauerstoffmangel (Hypoxie) und metabolische Faktoren befördern als Schlüsselreize in wachsenden und erkrankten Geweben die Angiogenese und eine Adaptation des Stoffwechsels. Diese Vorgänge werden über Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren (HIFs) reguliert. Der Hypoxie-induzierbare Faktor-2 α (HIF-2 α) ist ein vorwiegend in Endothelzellen exprimierter Transkriptionsfaktor und wird als wichtiger Regulator der Genexpression des Vaskulären Endothelzellwachstumsfaktors (VEGF) und seines Rezeptors KDR/Flk-1 diskutiert, die als Schlüsselmoleküle der Angiogenese gelten. Hierin gleicht er dem ebenfalls endothelial exprimierten Ets-1 Transkriptionsfaktor. Ziel der Arbeit war es, die regulatorischen Sequenzen des HIF-2 α -Gens der Maus zu identifizieren und hierin diejenigen Elemente aufzufinden, die für die endotheliale Expression des Transkriptionsfaktors verantwortlich sind. Mit einer cDNA Sonde, komplementär zur 5'-untranslatierten Region der Maus HIF-2 α mRNA wurde aus einer genomischen Phagenbibliothek ein genomischer Klon isoliert, der einen 4,7 kp großen Bereich des HIF-2 α -Gens enthielt, welcher das erste Exon beinhaltete. Der 3383 bp lange Abschnitt stromaufwärts des Start-ATGs wirkte als Promotor für ein heterologes Reporterogen (Luciferase) nach Transfektion in verschiedenen eucaryoten Zellkulturzellen. Die relativ stärkste Aktivität entfaltete der Promotor in humanen Nabelschnurendothelzellen. Der Transkriptionsstart wurde mittels Primer Extension, RNase-Protektionsexperimenten und PCR bei Nukleotid -578 bezogen auf das Start-ATG gefunden. Eine TATA-Box wurde bei Nukleotid -37 (bezogen auf den Transkriptionsstart) gefunden und durch Mutagenese ihre Funktion nachgewiesen. Durch Deletionsanalyse wurde gezeigt, daß ein Abschnitt von 1,1 kb stromaufwärts des Transkriptionsstartes hinreichend positiv aktive Elemente enthielt, um als Promotor zu fungieren. Von den zahlreichen potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen im HIF-2 α -Promotor wurden diejenigen für HIFs und Ets-Transkriptionsfaktoren näher untersucht. Beide Transkriptionsfaktoren transaktivierten HIF-2 α -Promotor-Reporterkonstrukte und

zeigten stark kooperative Wirkung. Durch DNaseI *footprint*-Analyse konnte gezeigt werden, daß die für Ets und HIF benachbart liegenden potentiellen Bindungsstellen bei -935 und -910 im HIF-2 α -Promotor durch Proteine aus endothelialen Kernextrakten besetzt werden, nicht jedoch aus nicht endothelialen Kernextrakten. Die Funktionalität der HIF-Bindungsstelle konnte ferner durch Mutagenese nachgewiesen werden. In Transgenexperimenten trieb ein 2380 bp großes Promotorfragment stark die Expression von *E. coli* β -Galaktosidase als Reporter gen in neuronalen Geweben des Mausembryos an. Auch ein Reporter genkonstrukt, das darüberhinaus einen 1,27 kb großen Intron 1-Bereich des HIF-2 α -Gens enthielt, zeigte dieselbe neuronale Expression. Nach Hinzufügen weiterer Abschnitte aus dem ersten Intron (5,64 kb) verschwand die neuronale Expression. Eine endotheliale Expression wurde jedoch nicht gewonnen. Es kann hieraus gefolgert werden, daß der HIF-2 α -Promotor stark positiv wirkende Elemente enthält, die durch endotheliale Transkriptionsfaktoren erkannt werden, wobei HIF-2 α seine eigene Transkription aktiviert. Diejenigen Elemente, die letztlich für eine endotheliale Expression des Transkriptionsfaktors *in vivo* verantwortlich sind, dürften aber außerhalb des hier analysierten Bereichs liegen.

6 Literaturverzeichnis

Abbound, C.N. (1995): Human bone marrow microvascular endothelial cells: elusive cells with unique structural and functional properties *Exp Hematol.* 23, 1-3

Aird, W.C., Edelberg, J.M., Weiler-Guettler, H., Simmons, W., Smith, T.W. und Rosenberg, R.D. (1997): Vascular Bed-specific Expression of an Endothelial Cell Gene Is Programmed by the Tissue Microenvironment. *The Journal of Cell Biology*, 138, 1117-1124

Almendro, N., Bellón, T., Rius, C., Lastres, P., Langa, C., Corbí, A. und Bernabéu, C. (1996): Cloning of the human Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. *J. Immunol.* 157, 5411-5421.

Antonsson, C., Arulampalam, V., Whitelaw, M.L., Pettersson, S. und Poellinger, L. (1995): Constitutive function of the helix-loop-helix/PAS factor Arnt. Regulation of target promoters via E box motif. *J. Biol. Chem.* 270, 13968-13972

Aragonés, J., Jones, D.R., Martín, S., San Juan, M.A., Alfranca, A., Vidal, F., Vara, A., Mérida, I. und Landázuri, O. (2001): Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of hypoxia-inducible transcription factor-1 by low oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 276 (13), 10548-10555

Arbiser, J.L., Moses, M.A., Fernandez, C.A., Ghiso, N., Cao, Y., Klauber, N., Frank, D., Brownlee, M., Flynn, E., Parangi, S., Byres, H.R. und Folkman, J. (1997): Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 861-866

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1994): *Current protocols in molecular biology*, Wiley.

Bacharach, E., Itin, A. und Keshet, E. (1992): In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10686-10690

Baillie, C.T., Winslet, M.C. und Bradley, N.J. (1995): Tumour vasculature – a potential therapeutic target. *British Journal of Cancer* 72, 257-267

Baird, A. und Walicke, P.A. (1989): Fibroblast growth factors. *British Medical Bulletin* 45, 438-452.

Battegay, E.J. (1995): Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med.* 73, 333-346

Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K. und Isner, J.M. (1998): Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97, 1114-1123

Benoist, C., O'Hare, K., Breathnach, R. und Chambon, P. (1980): The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Res.* 8, 157-142.

Berra, E., Richard, D.E., Gothié, E. und Pouyssegur, J. (2001): HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 α degradation. *FEBS Letters* 491, 85-90

Birnboim, H. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-23.

- Blancher, C., Moore, J.W., Talks, K.L., Houlbrook, S. und Harris, A.L. (2000): Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 60, 7106-7113
- Breier, G., Damert, A., Plate, K.H. und Risau, W. (1997): Angiogenesis in Embryos and Ischemic Diseases. *Thrombosis and Haemostasis* 78, 678-683
- Brown, T.A. und McKnight, S.L. (1992): Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins *Genes Dev.* 6, 2502-2512
- Bucher, P. (1990): Weight matrix descriptions of four eucaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* 212, 563-578.
- Buckler, K.J. (1997): A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. *J. Physiol (Lond)* 498, 649-662
- Cao, X., Ross, F.P., Zhang, L., MacDonald, P.N., Chappel, J. und Teitelbaum, S.L. (1993): Cloning of the promoter of the avian integrin β 3 subunit gene and its regulation by 1,25-dihydroxyvitamine D3. *J. Biol. Chem.* 268, 27371-27380
- Chandel, NS., McClintock, DS. und Feliciano, CE (2000): Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize HIF-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *JBC* 275, 25130-8.
- Chandel, N.S. und Schumacker, P.T. (2000): Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J. Appl. Physiol.* 88, 1880-1889
- Chen, Z., Fisher, R.J., Riggs, C.W., Rhim, J.S. und Lautenberger, J.A. (1997): Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res.* 10, 2013-2019
- Chilov, D., Camenisch, G., Kvietikova, I., Ziegler, U., Gassmann, M. und Wenger, R.H. (1999): Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1. *J. Cell. Sci.* 112, 1203-1212
- Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life *EMBO Journal* 17, 7151-7160
- Coffer, P., de Jonge, M., Mettouchi, A., Binetruy, B., Ghysdael, J. und Kruijer, W. (1994): junB promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. *Oncogene* 9, 911-921
- Coffin, J.D., Poole, T.J. (1988): Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development* 102, 735-748
- Connolly, D.T., Heuvelman, D.M., Nelson, R., Olander, J.V., Eppley, B.L., Delfino, J.J., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M. und Feder, J. (1989): Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84, 1470-1478.
- Connolly, D.T. (1991): Vascular permeability factor: A unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 47, 219-223
- Conrad, P., Freeman, T., Beitner-Johnson, D. und Millhorn, DE. (1999): EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem.* 274, 33709-13.

- Cowan, P.J., Tsang, D., Pedic, C.M., Abbot, L.R., Shinkel, T.A., d'Apice, A.J.F. und Pearse, M.J. (1998): The human ICAM-2 promoter is endothelial cell-specific *in vitro* and *in vivo* and contains critical Sp1 and GATA binding sites. *J Biol Chem* 273, 11737-11744.
- Cowley, D.O. und Graves, B.J. (2000): Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev.* 14, 366-376
- Crepieux, P., Coll, J. und Stehelin, D. (1994): The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit Rev Oncog.* 5, 615-38.
- Dachs, G.U., Patterson, A.V., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J., Townsend, K.M.S., Stratford, I.J. und Harris, A.L. (1997): Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat. Med.* 3, 515-520
- Davies, P.F. und Tripathi, S.C. (1993): Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circ. Res.* 72, 239-245
- Davis, S., Aldrich, T., Jones, P., Acheson, A., Compton, D., Jain, V., Ryan, T., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P. und Yancopoulos, G. (1996): Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87, 1161-1169.
- Denekamp, J. (1993): Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *The British Journal of Radiology* 66, 181-196
- De Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. und Williams, L.T. (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vasculare endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991.
- Dittmer, J. und Nordheim, A. (1998): Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1377, F1-11.
- Donaldson, L.W., Petersen, J.M., Graves, B.J. und McIntosh, L.P. (1996): Solution structure of the ETS-domain from murine Ets-1: a winged helix-turn-helix motif. *EMBO J.* 15, 125-134
- Dube, A., Akbarali, Y., Sato, T.N., Libermann, T.A. und Oettgen, P. (1999): Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular- specific Tie2 gene. *Circ. Res.* 84, 1177-85.
- Dumont, D., Gradwohl, G., Fong, G., Puri, M., Gertsenstein, M., Auerbach, A. und Breitman, M. (1994): Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 8, 1897-1909.
- Dumont, D.J., Yamaguchi, T.P., Conlon, R.A., Rossant, J. und Breitman, M.L. (1992): tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 7, 1471-80.
- Dvorak, H.F. (2000): VPF/VEGF and the Angiogenic Response. *Seminars in Perinatology* 24, 75-78
- Eguchi, H., Ikuta, T., Tachibana, T., Yoneda, Y. und Kawajiri, K. (1997): A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1 β is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J. Biol. Chem.* 272, 17640-17647
- Elvert, G., Lanz, S., Kappel, A. und Flamme, I. (1999): mRNA cloning and expression studies of the quail homologue of HIF-2 α . *Mech. Dev.* 87, 193-197

- Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G. und Flamme, I. (2003): Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):7520-30.
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L. und Fujii-Kuriyama, Y. (1999): Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J* 18, 1905-14.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. und Fujii-Kuriyama, Y. (1997): A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1a regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 94, 4273-4278.
- Engerman, R.L., Pfaffenbach, D. und Davis, M.D. (1967): Cell turnover of capillaries. *Lab. Invest.* 17, 738-743
- Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T. und Risau, W. (1998): Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 140, 947-959.
- Fadel, B.M., Boutet, S.C. und Quertermous, T. (1998): Functional Analysis of the endothelial cell-specific Tie2/Tek promoter identifies unique protein-binding elements. *Biochem. J.* 330, 335-343
- Fandrey, J. (1995): Hypoxia-inducible gene expression. *Respiration Physiology* 101, 1-10
- Favier, J., Kempf, H., Corvol, P. und Gasc, J.-M. (1999): Cloning and expression pattern of EPAS1 in the chicken embryo. *FEBS Letters* 462, 19-24
- Ferrara, N. (1993): Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc. Med.* 3, 244-250
- Ferrara, N. (1999): Vascular endothelial growth factor: Molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237, 1-30
- Ferrara, N., Carvermoore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O Shea, K.S., Powellbraxton, L., Hillan, K.J. und Moore, M.W. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Ferrara, N. und Henzel, W.J. (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 851-8.
- Flamme, I. und Risau, W. (1995b): Mechanismen der Neubildung von Blutgefäßen. *Ann Anat* 177, 493-502
- Flamme, I., von Reutern, M., Drexler, H., Syed ali, S. und Risau, W. (1995c): Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev. Biol.* 171, 399-414
- Flamme, I., Fröhlich, T. und Risau, W. (1997a): Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 173, 206-210.

- Flamme, I., Fröhlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A. und Risau, W. (1997b): HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to Hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mech. Dev.* 63, 51-60.
- Flamme, I., Krieg, M. und Plate, K.H. (1998): Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF-2 α . *Am. J. Pathol.* 153, 25-9.
- Folkman, J. und Shing, Y. (1992): Angiogenesis *J. Biol. Chem.* 267, 10931-10934
- Folkman, J. (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.
- Folkman, J. und Klagsbrun, M. (1987): Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447
- Fong, G., Zhang, L., Bryce, D. und Peng, J. (1999): Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in Flt-1 knock-out mice. *Development* 126, 3015-25.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. und Breitman, M.L. (1995): Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.-H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D. und Semenza, G.L. (1996): Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604-4613
- Gerritsen, M.E. (1987): Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2701-2711
- Gerritsen, M.E. und Bloor, C.M. (1993): Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J.* 7, 523-532
- Gnarra, J.R., ZHOU, S., Merrill, M.J., Wagner, J.R., Krumm, A., Papavassiliou, E., Oldfield, E.H., Klausner, R.D. und Linehan, W.M. (1996): Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10589-10594
- Goldberg, M.A., Dunning, S.P. und Bunn, H.F. (1988): Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242, 1412-1415
- Gonzales-Crussi, F. (1971): Vasculogenesis in the chick embryo: An ultrastructural study. *Am. J. Anat.* 130, 441-460
- Gory, S., Dalmon, J., Prandini, M.-H., Kortulewski, T., de Launoit, Y. und Huber, P. (1998): Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for Vascular Endothelial Cadherin gene transcription. *J. Biol. Chem.* 273, 6750-6755.
- Gospodarowicz, D., Abraham, J.A. und Schilling, J. (1989): Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7311-7315
- Graves, B.J., Johnson, P.F. und McKnight, S.L. (1986): Homologous recognition of a promoter domain common to the MSV LTR and the HSV tk gene. *Cell* 44, 565-576.

- Guillemin, K. und Krasnow, M. (1997): The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 89, 9-12.
- Gumina, R.J., Kirschbaum, N.E., Piotrowski, K. und Newman, P. (1997): Characterization of the Human Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 promoter: Identification of a GATA-2 binding element required for optimal transcriptional activity. *Blood* 89, 1260-1269.
- Hallmann, R., Feinberg, R.N., Latker, C.H., Sasse, J. und Risau, W. (1987): Regression of blood vessels precedes cartilage differentiation during chick limb development. *Differentiation* 34, 98-105
- Hankinson, O. (1995): The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 307-340
- Hara, S., Kobayashi, C. und Imura, N. (1999a): Molecular cloning of cDNAs encoding hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and -2 α of bovine arterial endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1445, 237-243
- Hara, S., Kobayashi, C. und Imura, N. (1999b): Nuclear localization of hypoxia-inducible factor-2 α in bovine arterial endothelial cells. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 2, 119-123
- Herre, J.M. und Thompson, J.A. (1985): Polymorphic ventricular tachycardia and ventricular fibrillation due to *N*-acetyl procainamide. *Am. J. Cardiol.* 55, 227-228
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. und Shibuya, M. (1998): Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9349-9354.
- His, W. (1900): Lecithoblast und Angioblast der Wirbelthiere. *Abhandl. K. S. Ges. Wiss. Math.-Phys.* 22, 171-328.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.-F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A. und Hankinson, O. (1991): Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252, 954-958
- Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H. und Bradfield, C.A. (1997): Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272, 8581-93.
- Hood, J. und Granger, H.J. (1998): Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 36, 23504-23508
- Hsieh, C.M., Yet, S.F., Layne, M.D., Watanabe, M., Hong, A.M., Perrella, M.A. und Lee, M.E. (1999): Genomic cloning and promoter analysis of aortic preferentially expressed gene-1. Identification of a vascular smooth muscle-specific promoter mediated by an E box motif. *J Biol Chem* 274, 14344-14351.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M. und Bunn, H.F. (1996): Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 32253-32259
- Huang, L., Gu, J., Schau, M. und Bunn, H. (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.

- Ikeda, T., Wakiya, K. und Shibuya, M. (1996): Characterization of the promoter region for flt-1 tyrosine kinase gene, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 13, 151-62.
- Iljin, K., Dube, A., Kontusaari, S., Korhonen, J., Lahtinen, I., Oettgen, P. und Alitalo, K. (1999): Role of Ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *Faseb J* 13, 377-86.
- Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M. und Sato, Y. (1996): Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell. Physiol.* 169, 522-531.
- Iyer, N.V., Leung, S.W. und Semenza, G.L. (1998a): The Human Hypoxia-Inducible Factor 1 α Gene: *HIF1A* Structure and Evolutionary Conservation. *Genomics* 52, 159-165
- Iyer, N.V., Kotch, E.L., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y. und Semenza, G.L. (1998b): Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 12, 149-162
- Jahroudi, N. und Lynch, D.C. (1994): Endothelial-cell-specific regulation of von Willebrand factor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 14, 999-1008.
- Jain, S., Maltepe, E., Lu, M.M., Simon, C. und Bradfield, C.A. (1998): Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 α , HIF2 α and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech. Dev.* 73, 117-123
- Janknecht, R. und Nordheim, A. (1993): Gene regulation by Ets proteins. *Biochim Biophys Acta* 1155, 346-56.
- Janknecht, R. und Nordheim, A. (1992): Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding *Nucleic Acids Res.* 20, 3317-3324
- Jefferies, W.A., Brandon, M.R., Hunt S.V., Williams, A.F., Gatter, K.C. und Mason, D.Y. (1984): Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* 312, 162-163
- Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H. und Gassmann, M. (2001): Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *The FASEB Journal* 15, 1312-14
- Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. und Semenza, G.L. (1997a): Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 272, 19253-60.
- Jiang, B.H., Agani, F., Passaniti, A. und Semenza, G.L. (1997b): V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* 57, 5328-5335
- Jones, A., Fujiyama, C., Blanche, C., Moore, J.W., Fuggle, S., Cranston, D., Bicknell, R. und Harris, A.L. (2001): Relation of Vascular Endothelial Growth Factor production to expression and regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Hypoxia-Inducible Factor-2 α in human bladder tumors and cell lines. *Clin. Cancer Res.* 7, 1263-1272.
- Jonsen, M.D., Petersen, J.M., Xu, Q.-P. und Graves, B.J. (1996): Characterisation of the co-operative function of inhibitory sequences in Ets-1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2065-2073

- Jorcyk, C., Garrett, L., Maroulakou, I., Watson, D. und Green, J. (1997): Multiple regulatory regions control the expression of Ets-1 in the developing mouse: vascular expression conferred by intron I. *Cell Mol Biol* 43, 211-25.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V., Fang, G., Dumont, D., Breitman, M. und Alitalo, K. (1995): Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3566-3570.
- Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. und Poellinger, L. (1998): Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO Journal* 17, 6573-6586
- Kappel, A. (1999): Analyse der regulatorischen Elemente des *Flk-1* Gens. Dissertationsarbeit am Fachbereich Humanbiologie der Philipps-Universität Marburg, Deutschland.
- Kappel, A., Ronicke, V., Damert, A., Flamme, I., Risau, W. und Breier, G. (1999): Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood* 93, 4284-92.
- Karantzoulis-Fegaras, F., Antoniou, H., Lai, S.-L.M., Kulkarni, G., D'Abreo, C., Wong, G.K.T., Miller, T.L., Chan, Y., Atkins, J., Wang, Y. und Marsden, P.A. (1999): Characterization of the Human Endothelial Nitric-oxide Synthase promoter. *J. Biol. Chem.* 274, 3076-3093.
- Karim, F.D., Urness, L.D., Thummel, C.S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beueren, C., Maki, R.A., Gunther, C.V., Nye, J.A. und Graves, B.J. (1990): The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognises a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev.* 4, 1451-1453
- Kawana, M., Lee, M., Quartermous, E. und Quartermous, T. (1995): Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4225-4231.
- Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J. und Connolly, D.T. (1989): Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312
- Khachigian, L.M., Fries, J.W.U., Benz, M.W., Bonthron, D.T. und Collins, T. (1994): Novel cis-acting elements in the human platelet-derived growth factor B-chain core promoter that mediate gene expression in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 269, 22647-22656.
- Kim, W.Y., Sieweke, M., Ogawa, E., Wee, H.J., Englmeier, U., Graf, T. und Ito, Y. (1999): Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *Embo J* 18, 1609-20.
- Kim, Y.K. und Lee, A.S. (1991): Identification of a 70-base-pair cell cycle regulatory unit within the promoter of the human thymidine kinase gene and its interaction with cellular factors. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2296-2302.
- Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M. und Esumi, H. (2001): Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 276, 2292-2298

- Kola, I., Brookes, S., Green, A.R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T.S. und Seth, A. (1993): The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7588-7592
- Korhonen, J., Lahtinen, I., Halmekyto, M., Alhonen, L., Janne, J., Dumont, D. und Alitalo, K. (1995a): Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. Blood 129, 895-898.
- Korhonen, J., Lahtinen, I., Halmekyto, M., Alhonen, L., Janne, J., Dumont, D. und Alitalo, K. (1995b): Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. Blood 86, 1828-1835.
- Kozak, K.R., Abbott, B. und Hankinson, O. (1997): ARNT-deficient mice and placental differentiation. Dev. Biol. 191, 297-305
- Kroll, J. und Waltenberger, J. (1997): The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. J. Biol. Chem. 51, 32521-32527
- Kumar, S., West, D.C. und Ager, A. (1987): Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. Differentiation 36, 57-70
- Ladoux, A. und Frelin, C. (1997): Cardiac expressions of HIF-1 alpha and HLF/EPAS, two basic loop helix/PAS domain transcription factors involved in adaptative responses to hypoxic stresses. Biochem Biophys Res Commun 240, 552-6.
- Lando, D., Pongratz, I., Poellinger, L. und Whitelaw, M.L. (2000): A Redox Mechanism Controls Differential DNA Binding Activities of Hypoxia-inducible Factor (HIF) 1alpha and the HIF-like Factor. J Biol Chem 275, 4618-4627.
- Latker, C.H. und Kuwabara, T. (1981): Regression of the tunica vasculosa lentis in the postnatal rat. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 21, 689-699
- Laudet, V., Niel, C., Duterque-Coquillaud, M., Leprince, D. und Stehelin, D. (1993): Evolution of the *ets* gene family. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190, 8-14
- Lee, M.-E., Temizer, D.H., Clifford, J.A. und Quertermous, T. (1991): Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. J Biol Chem 266, 16188-16192.
- Lewin, B. (1997): Genes VI, Oxford University Press
- Lierse, W. (1963): Über die Beeinflussung der Hirnangioarchitektur durch die Morphogenese. Acta Anat 53, 1-54
- Lopez-Barneo, J., Ortega-Sanez, P., Mokina, A., Franco-Obregon, A., Urena, J. und Castellano, A. (1997): Oxygen sensing by ion channels. Kidney Int. 51, 454-461
- Losordo, D.W., Vale, P.R., Symes, J.F., Dunnington, C.H., Esakof, D.D., Maysky, M., Ashara, A.B., Lathi, K. und Isner, J.M. (1998): Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. Circulation 98, 2800-2804

- Lyden, D., Young, A.Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B.L., Hynes, R.O., Zhuang, Y., Manova, K. und Benezra, R. (1999): Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts *Nature* 401, 670-677
- Madden, T.L., Tatusov, R.L. und Zhang, J. (1996): Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.* 266, 131-141
- Maemura, K., Hsieh, C.M., Jain, M.K., Fukumoto, S., Layne, M.D., Liu, Y., Kourembanas, S., Yet, S.F., Perrella, M.A. und Lee, M.E. (1999): Generation of a dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain. *J Biol Chem* 274, 31565-31570.
- Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N. und Yancopoulos, .D. (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60
- Majérus, M.-A., Bibollet-Ruche, F., Telliez, J.-B., Wasylyk, B. und Bailleul, B. (1992): Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter. *Nucleic Acids Res.* 20, 2699-2703
- Maltepe, E., Schmidt, J.V., Baunoch, D., Bradfield, C.A. und Simon, M.C. (1997): Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 386, 403-407
- Maroulakou, I.G., Papas, T.S. und Green, J.E. (1994): Differential expression of ets-1 and ets-2 proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene* 9, 1551-1565
- Marsden, P.A., Heng, H.H.Q., Scherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, A.V., Shi, X.-M., Tsui, .-C. und Schappert, K.T. (1993): Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268, 17478-17488.
- Mavrothalassitis, G.J., Watson, D.K. und Papas, T.S. (1990): Molecular and functional characterization of the promoter of the human *ETS-2* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1047-1051.
- Maxam, A. und Gilbert, W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 560-4.
- Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W. und Ratcliffe, P.J. (1997): Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8104-8109
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. und Ratcliffe, P.J. (1999): The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275
- Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H., Risau, W. und Ullrich, A. (1994): Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367, 576
- Millauer, B., Longhi, M.P., Plate, K.H., Shawver, L.K., Risau, W., Ullrich, A. und Strawn, L.M. (1996): Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*. *Cancer Res.* 56, 1615

- Morishita, K., Johnson, D. und Williams, L. (1995): A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem* 270, 27948-53.
- Mukhopadhyay D., Knebelmann, B., Cohen, H.T., Ananth, S. und Sukhatme, V.P. (1997): The von Hippel-Lindau suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5629-5639
- Mukhopadhyay D., Tsiokas L., Zhou, X.M., Foster, D., Brugge, J.S. und Sukhatme, V.P. (1995): Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 375, 577-584
- Mustonen, T. und Alitalo, K. (1995): Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 129, 895-8.
- Nakao, T., Ishizawa, A. und Ogawa, R. (1988): Observations of vascularization in the spinal cord of mouse embryos, with special reference to development of boundary membranes and perivascular spaces. *Anat Rec* 221, 663-677
- Noden, D.M. (1989): The formation of avian embryonic blood vessels. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 1097-1103
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H. und Folkman, J. (1994): Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328
- O'Rourke, J.F., Tian, Y.M., Ratcliffe, P.J. und Pugh, C.W. (1999): Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 274, 2060-71.
- Page, C., Rose, M., Yacoub, M. und Pigott, R. (1992): Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 141, 673-683
- Pan, J. und McEver, R.P. (1993): Characterization of the promoter for the human P-selectin gene. *J Biol Chem* 268, 22600-22608.
- Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lievre, F. und Buck, C.A. (1987): Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells *Development* 100, 339-349
- Pardanaud, L. und Dieterlen-Lievre, F. (1993): Expression of C-ETS1 in early chick embryo mesoderm: relationship to the hemangioblastic lineage. *Cell Adhesion & Communication* 1, 151-60.
- Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A. und Ferrara, N. (1994): Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 269, 25646-54.
- Patterson, C., Perrella, M.A., Hsieh, C.M., Yoshizumi, M., Lee, M.E. und Haber, E. (1995): Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 270, 23111-8.
- Patterson, C., Wu, Y., Lee, M.-E., DeVault, J.D., Runge, M.S. und Haber, E. (1997): Nuclear protein interactions with the human *KDR/flk-1* promoter *in vivo*. *J Biol Chem* 272, 8410-8416.

- Peers, C. und Buckler, K.J. (1995): Transduction of chemostimuli by the type I carotid body cell. *J. Membr. Biol.* 144, 1-9
- Peng, J., Zhang, L., Drysdale, L. und Fong, G. (2000): The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 α plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8386-91.
- Pepper, M.S. (1997): Manipulating angiogenesis: from basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17, 605-619
- Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L. und Montesano, R. (1991): Vascular endothelial growth factor (vegf) induces plasminogen activators and plasminogen-activator inhibitor-1 in microvascular endothelial-cells. *Biochem Biophys Res* 181, 902-906
- Pepper, M.S. und Montesano, R. (1990): Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Diff. Dev.* 32, 319-328
- Plate, K., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A. und Risau, W. (1993): Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Research* 53, 5822-5827.
- Poole, T.J. und Coffin, J.D. (1988): Developmental angiogenesis: quail embryonic vasculature. *Scanning Microsc.* 2, 443-448
- Poole, T.J. und Coffin, J.D. (1989): Vasculogenesis and angiogenesis: Two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J. Exp. Zool.* 251, 224-231
- Pugh, B.F. und Tjian, R. (1991): Transcription from TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* 5, 1935-1945
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M. und Ratcliffe, P.J. (1997): Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272, 11205-14.
- Rak, J.W., St Croix, B.D. und Kerbel, R.S. (1995a): Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy *Anti-Cancer Drugs* 6, 3-18
- Rak, J., Filmus, J., Finkenzeller, G., Grugel, S., Marme, D. und Kerbel, R.S. (1995b): Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 14, 263-277
- Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwala, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L. und Bedi, A. (2000): Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 14, 34-44
- Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bonthron, D.T., Dewey, C.F. und Gimbrone, M.A. (1993): Platelet-derived growth factor-b chain promoter contains a *cis*-acting fluid shear stress responsive element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4591-4595
- Rettig, W.J., Garin Chesa, P., Healey, J.H., Jaffe, E.A. und Old, L.J. (1992): Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10832-10836
- Richard, D.E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D. und Pouyssegur, J. (1999): p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32631-32637

- Risau, W. (1991): Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. In „The Development of the Vascular System.“ (Feinberg, E.M., Sherer, G.K. und Auerbach, R., Eds.). *Issues Biomed.* 14, 58-68
- Risau, W. (1995): Differentiation of Endothelium *FASEB J.* 9, 926-933
- Risau, W. (1996): What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer Metastasis Rev.* 2, 149-151
- Risau, W. (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
- Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.G., Sasse, J., Eklom, P., Kemler, R. und Doetschman, T. (1988): Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102, 471-478
- Risau, W. und Flamme, I. (1995): Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11, 73-91.
- Ronicke, V., Risau, W. und Breier, G. (1996): Characterization of the endothelium-specific murine vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter. *Circ Res* 79, 277-85.
- Roy, A.L., Meisterernst, M., Pogmonec, P. und Roeder, R.G. (1991): Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* 354, 245-248
- Ryan, H.E., Lo, J. und Johnson, R.S. (1998): HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17, 3005-15.
- Sabin, F.R. (1920): Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood plasma and red blood-cells as seen in the living chick. *Anat Rec* 13, 199-204.
- Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburgbuchholz, K., Fujiwara, Y., Gendronmaguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W. und Qin, Y. (1995): Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376, 70-74.
- Sato, M., Tanaka, T., Maeno, T., Sando, Y., Suga, T., Maeno, Y., Sato, H., Nagai, R. und Kurabayashi, M. (2002): Inducible Expression of Endothelial PAS Domain Protein-1 by Hypoxia in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells. Role of src family kinases-dependent pathway. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 26, 127-134.
- Schlaeger, T., Bartunkova, S., Lawitts, J., Teichmann, G., Risau, W., Deutsch, U. und Sato, T. (1997): Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 3058-3063.
- Schlaeger, T., Qin, Y., Fujiwara, Y., Magram, J. und Sato, T. (1995): Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice. *Development* 121, 1089-98.
- Schnürch, H. und Risau, W. (1993): Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 119, 957-968.
- Scholtz, B., Kingsley-Kallesen, M. und Rizzino, A. (1996): Transcription of the transforming growth factor-beta2 gene is dependent on an E-box located between an essential cAMP response element/activating transcription factor motif and the TATA box of the gene. *J. Biol. Chem.* 271, 32375-32380.

- Schwachtgen, J., Janel, N., Berek, L., Duterque-Coquillaud, M., Ghysdael, J., Meyer, D. und Kerbiriou-Nabias, D. (1997): Ets transcription factors bind and transactivate the core promoter of the von Willebrand factor gene. *Oncogene* 15, 3091-3102
- Semenza, G.L. (2000a): HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14, 1983-1991
- Semenza, G.L. (2000b): HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 88, 1474-1480
- Semenza, G.L. (1996): Transcriptional regulation by Hypoxia-Inducible Factor 1: Molecular Mechanisms of Oxygen Homeostasis. *Trands in Cardiovascular Medicine* 6, 151-157
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.-M. und Wang, G.L. (1994): Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 757-763
- Semenza, G.L. und Wang, G.L. (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular & Cellular Biology* 12, 5447-54.
- Seth, A. und Papas, T.S. (1990): The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated. *Oncogene* 5, 1761-1767.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W., Fischer, K., Schuh, A., Schwartz, L., Bernstein, A. und Rossant, J. (1997): A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89, 981-90.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L. und Schuh, A.C. (1995): Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis In Flk-1-Deficient Mice. *Nature* 376, 62-66.
- Sharrocks, A., Brown, A., Ling, Y. und Yates, P. (1997): The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1371-87.
- Shen, B., Lee, D., Gerber, H., Keyt, B., Ferrara, N. und Zioncheck, T. (1998): Homologous Up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J. Biol. Chem* 273, 29979-29985.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H. und Sato, M. (1990): Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*flt*) closely related to the *fms* family. *Oncogene* 5, 519-524
- Shikama, N., Lyon, J. und Thangue, N.B.L. (1997): The p300/CBP family: Integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell. Biol.* 7, 230-236
- Siemeister, G., Schirner, M., Weindel, K., Reusch, P., Menrad, A., Marme, D. und Martiny-Baron, G. (1999): Two independent mechanisms essential for tumor angiogenesis: inhibition of human melanoma xenograft growth by interfering with either the vascular endothelial growth factor receptor pathway or the Tie-2 pathway. *Cancer Res.* 59, 3185-3191
- Sieweke, M.H., Tekotte, H., Jarosch, U. und Graf, T. (1998): Cooperative interaction of Ets-1 with USF-1 required for HIV-1 enhancer activity in T cells. *EMBO J.* 17, 1728-1739.
- Srinivas, V., Zhu, X., Salceda, S., Nakamura, R. und Caro, J. (1998): Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) is a non-heme iron protein. 273, 18019-18022

- Steward, P.A. und Wiley, M.J. (1981): Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: A study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev Biol* 84, 183-192.
- Suda, T., Takakura, N. und Oike, Y. (1999): Hematopoiesis and angiogenesis. *Int J Hematol* 71, 99-107
- Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N. und Fujii-Kuriyama, Y. (1998): Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1 α , HLF, and clock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 789-794
- Talks, K., Turley, H., Gatter, K., Maxwell, P., Pugh, C., Ratcliffe, P. und Harris, A. (2000): The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157, 411-21.
- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. und Poellinger, L. (2000): Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 19, 4298-309.
- Terman, B.I., Dougher Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D. und Bohlen, P. (1992): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 1579-86.
- Tian, H., Hammer, R.E., Matsumoto, A.M., Russell, D.W. und McKnight, S.L. (1998): The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 12, 3320-4.
- Tian, H., McKnight, S.L. und Russell, D.W. (1997): Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11, 72-82.
- Timmers, H.T.M. und Sharp, P.A. (1991): The mammalian TFIID protein is present in two functionally distinct complexes. *Genes Dev.* 5, 1946-1956
- Tomlinson, A., van Vlijmen, H., Loesch, A. und Burnstock, G. (1991): An immunohistochemical study of endothelial cell heterogeneity in the rat: observations in „en face“ Hautchen preparations. *Cell. Tissue Res.* 263, 173-181
- Topper, J.N. und Gimbrone Jr, M.A. (1999): Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Molecular Medicine Today* Jan 1999, 40-46.
- Turner, R.R., Beckstead, J.H., Warnke, R.A. und Wood, G.S. (1987): Endothelial cell phenotypic diversity. *Am. J. Clin. Pathol.* 87, 569-575
- Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M.A. und Stehelin, D. (1989): Complementary patterns of expression of c-ets-1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick. *Development* 107, 265-274.
- Villa-Garcia, M., Li, L., Riely, G., Bray, P.F. (1994): Isolation and characterization of a TATA-less promoter for the human β 3 integrin gene. *Blood* 83, 668-676
- Wakiya, K., Begue, A., Stehelin, D. und Shibuya, M. (1996): A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem* 271, 30823-30828.

Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. und Heldin, C.H. (1994): Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269, 26988-95.

Wang, G. und Semenza, G. (1993a): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4304-8.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. und Semenza, G.L. (1995a): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5510-5514

Wang, G.L. und Semenza, G.L. (1995): Purification and characterization of hypoxia inducible factor 1. *J Biol. Chem.* 270, 1230-1237.

Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. und Stehelin, D. (1990): The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346, 191-193.

Wasylyk, C., Bradford, A.P., Gutierrez-Hartmann, A. und Wasylyk, B. (1997): Conserved mechanisms of Ras regulation of evolutionary related transcription factors, Ets1 and Pointed P2. *Oncogene* 14, 899-913

Watabe, T., Yoshida, K., Shindoh, M., Kaya, M., Fujikawa, K., Sato, H., Seiki, M., Ishii, S. und Fujinaga, K. (1998): The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int. J. Cancer* 77, 128-137.

Wenger, R.H. und Gassmann, M. (1997): Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Chem.* 378, 609-616.

Wenger, R.H., Rolfs, A., Kvietikova, I., Spielmann, P., Zimmermann, D.R. und Gassmann, M. (1997): The mouse gene for hypoxia-inducible factor-1 α . Genomic organization, expression, and characterization of an alternative first exon and 5' flanking sequence. *Eur. J. Biochem.* 246, 155-165

Wenger, R.H., Rolfs, A., Marti, H.H., Guenet, J.L. und Gassmann, M. (1996): Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mrna expression of mouse hypoxia inducible factor 1 α . *Biochemical & Biophysical Research Communications* 223, 54-59.

Werner, M.H., Clore, G.M., Fisher, C.L., Fisher, R.J., Trinh, L., Shiloach, J. und Gronenborn, A.M. (1995): The solution structure of the human ETS1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation. *Cell* 83, 761-771

Wernert, N., Raes, M.B., Lassalle, P., Dehouck, M.P., Gosselin, B., Vandebunder, B. und Stehelin, D. (1992): c-Ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathol* 140, 119-27.

Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M.B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandebunder, B. und Stehelin, D. (1994): Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.* 54, 5683-5688

Wiener, C.M., Booth, G. und Semenza, G.L. (1996): In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 225, 485-488.

Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. und Maxwell, P.H. (1998): Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 92, 2260-8.

Wilson, D.B., Dorfman, D.M. und Orkin, S.H. (1990): A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4854-4862.

Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Prüß, M., Reuter, I. und Schacherer, F. (2000): TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* 28, 316-319

Wisdom, R. (1999): AP-1: One Switch for Many Signals. *Exp. Cell Res.* 253, 180-185

Woods, D.B., Ghysdael, J. und Owen, M.J. (1992): Identification of nucleotide preferences in DNA sequences recognised specifically by c-Ets-1 protein. *Nucleic Acids Res.* 20, 699-704

Xu, H., Tong, I.L., de Fougères, A.R. und Springer, T.A. (1992): Isolation, characterization, and expression of mouse ICAM-2 complementary and genomic DNA. *J. Immunol.* 149, 2650-2655.

Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J. und Holash, J. (2000): Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.

Yang, C., Shapiro, L.H., Rivera, M., Kumar, A. und Brindle, P.K. (1998): A role for CREB binding protein and p300 transcriptional coactivators in Ets-1 transactivation functions. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2218-2229.

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

Zawel, L. und Reinberg, D. (1995): Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 533-561

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

Zhang, R., Min, W., und Sessa, W.C. (1995): Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem* 270, 15320-15326.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide und Plasmide

Oligonukleotid	Basensequenz (5' → 3')	Anwendung
HRF eld1	CATTGTCGCCGTGGCCCTCCG	Klonierung
HRF eld2	GGAAGTTTGCAGAGGGCTGGC	Sequenzierung
HRF eld3	GCAAGTTGGAAAAAATCCGG	Sequenzierung
HRF eld4	AGATGACCATACAGTCTCAGG	Primer-Extension
HRF eld5	TCACTTTTCTGGGATCTGAC	Sequenzierung
HRF eld6	TCCGTTTAGCCCCGAACAGG	Sequenzierung
HRF eld7	GCTGCGGACTCCGGAGCTGT	Sequenzierung
HRF eld8	GGGAGTGGGACATCGGGCTG	Sequenzierung
HRF eld9	ACACTGCCGAGGATTGTACG	Sequenzierung
HRF eld10	CGCTGAGATGACCATACAGT	Sequenzierung
HRF eld11	CGGGGGCAAGCGAGTGCGGC	Sequenzierung
HRF eld12	TGTTAGGTTTAAGTGTATGC	Sequenzierung
HRF eld13	GCAGGAAAATCTCCAGAAGG	Sequenzierung
HRF eld14	GCCTTGAGGTTATGAAATTCG	Sequenzierung
HRF eld15	CGATGCCTTTAACCCGCAGG	Sequenzierung
HRF eld16	CGCAGGACTGAGTAATGGCG	Sequenzierung
HRF eld17	GATCTGCTACCCAAGTTCGG	Sequenzierung
HRF elu1	GCCAGCCCTCTGCAAACCTCC	Sequenzierung
HRF elu2	CCGGATTTTTTTCCAACCTGC	Sequenzierung
HRF elu3	ACAGCTCCGGAGTCCGCAGC	Klonierung
HRF elu4	CCTGTTTCGGGGCTAAACGGA	Sequenzierung
HRF elu5	CGCGGTACCAGGCGGCCGTACAATCCTCG	Sequenzierung
HRF elu6	CGCGGTACCCAGCGGCCGCACTCGCTTGC	Sequenzierung
HRF elu7	GACGGGGTCAGGGCAGAAGC	Sequenzierung
HRF elu8	CGCGGTACCGAGCCAAGCGGATGGTTTAG	Sequenzierung
HRF elu9	CGCGGTACCGGGGGTTGGCTGGGCGCTCG	Sequenzierung
HRF elu10	CGCGGTACCGGATCTCCGACCCAGCGCT	Sequenzierung
HRF elu11	AGGAGGCCGGACATTCGAGA	Sequenzierung
HRF elu12	TTAAAGTGGGCTGACAGCCG	Sequenzierung
HRF elu13	CAGCCCGATGTCCCACTCCC	Sequenzierung
HRF elu14	ACGGTGATACTGGGGTATTG	Sequenzierung
HRF elu15	GGTGTCTGGATGTAGAAATG	Sequenzierung
HRF elu16	CCTGGGAATCTTTGAGGCGC	Sequenzierung
HRF elu17	GGCTCTGCTCTATGCAAGTC	Sequenzierung

HRF e1u18	CGCCATTACTCAGTCCTGCG	Sequenzierung
HRF e1u19	CCGAACTTGGGTAGCAGATC	Sequenzierung
HRF e1u20	GAAGTCAAGGTCAGTTTGGC	Sequenzierung
HRF e1u21	AGAGAGCGCACCTCCAAGGC	Sequenzierung
HRF i1d1	GGACGCGTCCTTCCTCAGCTCTGAGCTGC	Sequenzierung
HRF i1d2	TTCCATGCTAGTTTGGGGCGC	Sequenzierung
HRF i1d3	AGTCGGTCGCCAGCTTTGAC	Sequenzierung
HRF i1d4	CTATGTAGCTCATTCTCCC	Sequenzierung
HRF i1d5	TTCCATCTTGTCCTTCTGC	Sequenzierung
HRF i1d6	ACCTTTGGTTGTCACTGTGG	Sequenzierung
HRF i1d7	GTTGTCCTCAGTGGAAACAG	Sequenzierung
HRF i1d8	TGGTGAGATGGCTGGGCAGG	Sequenzierung
HRF i1d9	ATGAACAGATGCCCCATTTTC	Sequenzierung
HRF i1d10	CAGACCCACTGGTTAGTATC	Sequenzierung
HRF i1d11	CAGAACTTACTCAGTAACTTGG	Sequenzierung
HRF i1d12	GAGTAGTAGGGTTTGTGGG	Sequenzierung
HRF i1d13	GGTCTTTTGTGTTGTTGTTG	Sequenzierung
HRF i1d14	TCTAGTAGCTGTGGAATGTC	Sequenzierung
HRF i1d15	GAAATCCTCAGTGGCAAGAG	Sequenzierung
HRF i1d16	GATGGTGAGCTGACTAATC	Sequenzierung
HRF i1u1	GGGGTACCCGGAGGGCCACGGCGACAATA	Sequenzierung
HRF i1u2	AAACTCCAGCGAATCGCACC	Sequenzierung
HRF i1u3	CTGCGCTGGCGGATCTCTAG	Sequenzierung
HRF i1u4	TCCGAGATGAGACCTGACAG	Sequenzierung
HRF i1u5	ATGGGTGACTGTCGCATTTG	Sequenzierung
HRF i1u6	CAGTGTAGGTTTCAGTGTAGG	Sequenzierung
HRF i1u7	TGTCCAAAAAACAGGGCAAG	Sequenzierung
HRF i1u8	TGATACCACCCACTAGTGG	Sequenzierung
HRF i1u9	AGGAGTGCTTCTGGTATTTG	Sequenzierung
HRF i1u10	GTGCCAGGGCAAAGATGGGC	Sequenzierung
HRF i1u11	ATAAACCCAAGGTCCATCAG	Sequenzierung
HRF i1u12	GTGCTGATAAGAATCAGAAAG	Sequenzierung
HRF i1u13	AGCATGTGAACAGCAGAGCC	Sequenzierung
LacZ u1	GTCGCTACCATTACCAGTTG	Sequenzierung
LacZ u2	CGGAATTCCAGCTGAGCGCC	Sequenzierung
LacZ d1	AGGTTACGTTGGTGTAGATG	Sequenzierung
LacZ d2	TGGGAACAAACGGCGGATTG	Sequenzierung
LacZ/pA u	CGCGGATCCGGGAAGTCGCAAAGTTGTGAG	Sequenzierung
SV40 poly A 1	CATTCTAGTTGTGGTTTGTCC	Sequenzierung
SV40 poly A 2	TACAAATAAAGCAATAGCATCAC	Sequenzierung

HRF Mlu u	GCGACGCGTCTGCCCCCTTAGTTTTCCATGG	Sequenzierung
HRF Bgl d	GCGAGATCTCGGAGCACCTGGGTTCTTAACC	Sequenzierung
HRF Mlu rev	GGGACGCGTTGTGCGCCGTGGCCCTCCGAG	Sequenzierung
HRF Kpn for	GGGGTACCGGGCTGAGACACGCGGGTGAGG	Sequenzierung
Bd1	ATATATATATAAAGTTGTGGGAGAACTGGG	Footprint-PCR
Bd2	ATATATATATGAACTGCGACTTGTTTTTGAGG	Footprint-PCR
Bd3	ATATATATAT TAAAAACTC GGACGGCCCG	Footprint-PCR
Bd4	ATATATATAT ACACTGCCGA GGATTGTACG	Footprint-PCR
Bu1	ATATATATATGCGGCCGCCCTAGGGAAGAGGAGACTTC	Footprint-PCR
Bu2	ATATATATATGCGGCCGCGTCCTGGGGATCATTACCGC	Footprint-PCR
Bu3	ATATATATATGCGGCCGCTGCGCTTCCATTTGGAGTCC	Footprint-PCR
Bu4	ATATATATATGCGGCCGCCGAGCTTCAGAGAAAGGGG	Footprint-PCR
BS1	CAGTGATTTGGGAACACGCTATCAACACAT	EMSA
BS1 ns	CAGTGATTTGGGAATCTCTGATCAACACAT	EMSA
BS1 rk	ATGTGTTGATAGCGTGTTCCCAAATCACTG	EMSA
BS1 rk ns	ATGTGTTGATCAGAGATTCCCAAATCACTG	EMSA
BS2	TGGGCGCTCGCTGCACGCCCTAGCTGCGCT	EMSA
BS2 ns	TGGGCGCTCGCTGTCTCTGCTAGCTGCGCT	EMSA
BS2 rk	AGCGCAGCTAGGGCGTGCAGCGAGCGCCCA	EMSA
BS2 rk ns	AGCGCAGCTAGCAGAGACAGCGAGCGCCCA	EMSA
BS3	GGCAGGCAGCCAGCGTGCGGGGCGGGGCTT	EMSA
BS3 ns	GGCAGGCAGCCCAGAGACGGGGCGGGGCTT	EMSA
BS3 rk	AAGCCCCGCCCCGCACGCTGGCTGCCTGCC	EMSA
BS3 rk ns	AAGCCCCGCCCCGTCTCTGGGCTGCCTGCC	EMSA
mut1 d	GGCTGTCAGCCCACTGCAAAAACCTCGGACGGC	Mutagenese
mut1 u	GCCGTCCGAGTTTTTGACAGTGGGCTGACAGCC	Mutagenese
mut2 d	CCGGCCGCTCTCGAATGCAATGCCTCCTCGGCTGTCAGC	Mutagenese
mut2 u	GCTGACAGCCGAGGAGGCATTGCATTTCGAGAGCGGCCGG	Mutagenese
mut3 d	GCGGAGCGCTGCGGACCAATGAGCTGTACACCGGCCG	Mutagenese
mut3 u	CGGCCGGTGTACAGCTCATTGGTCCGCAGCGCTCCGC	Mutagenese
mut4 d	GAGAAGCCCCGCCCCGTCTCTTGCTGCCTGCCCCG	Mutagenese
mut4 u	CGGGGCAGGCAGCCAAGAGACGGGGCGGGGCTTCTC	Mutagenese
mut5 d	GCGCCCGCCTGCCCTCAATCCTCCTTCCGCAGAAC	Mutagenese
mut5 u	GTTCTGCGGAAGGAGGATTGAGGGCAGGCGGGCGC	Mutagenese
mut6 d	CGCGAGCGCAGCTAGGAGAGACAGCGAGCGCCAGCC	Mutagenese
mut6 u	GGCTGGGCGCTCGCTGTCTCTCCTAGCTGCGCTCGCG	Mutagenese
mut7 d	CCAACCCCCCCCCCGCTCAATGGTACTGCTATAGTCC	Mutagenese
mut7 u	GGA CTATAGCAGTACCATTGAGCGGGGGGGGGGTTGG	Mutagenese
mut8 d	GATGTTGGGATGTGTTGATAGGAGATTCCCAAATCACTGG ATGTGCC	Mutagenese

mut8 u	GGGCACATCCAGTGATTTGGGAATCTCCTATCAACACATC CCAACATC	Mutagenese
mut9 d	CCCAAATCACTGGATGTGCCCTCAATGGGTTCGAAGGATA CAGCC	Mutagenese
mut9 u	GGCTGTATCCTTCGAACCCATTGAGGGCACATCCAGTGAT TTGGG	Mutagenese
HRF d1	ATCGAGGAAGAAGGGGCCGTG	PCR (Sonde)
HRF u1	GAGATCGAGAAGAACGACGTG	PCR (Sonde)
Del*	CCCAAGCTTACCCGGAGCACCTGGGTTCC	Deletions-PCR
Del 1	CGCGGTACCGCAGTTGGCTGTATCCTTCG	Deletions-PCR
Del 2	CGCGGTACCGGCACATCCAGTGATTTGGG	Deletions-PCR
Del 3	CGCGGTACCCATCCCAACATCACACTCAG	Deletions-PCR
Del 4	CGCGGTACCCGCAGTTCTGCGGAAGGAGG	Deletions-PCR
Del 5	CGCGGTACCCGAAGAGCGCAGCTTCAGAG	Deletions-PCR
Del 6	CGCGGTACCTGGGAAGTCGGGGCAGGCAG	Deletions-PCR
Del 7	CGCGGTACCCCAGCCCGATGTCCCACTC	Deletions-PCR

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pB KSII (+)	Klonierungsvektor	Stratagene
pB SKII (+)	Klonierungsvektor	Stratagene
pZErO™ -2	Klonierungsvektor	Invitrogen
pcDNA3	eukariotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pcDNA3.1/Myc-His/lacZ	Expressionsvektor mit LacZ-Reportergen	Invitrogen
pGL2 Basic	Expressionsvektor mit Luziferase-Reportergen	Promega
pGL3 Basic	Expressionsvektor mit Luziferase-Reportergen	Promega
pRL Tk	HSV Tk-Promotor in Luziferasevektor	Promega
pGL Tie-1	muriner Tie-Promotor in pGL3 basic	Dr. K. Iljin
pGL VEGF	humaner VEGF-Promotor in pGL2 basic	Dr. G Breier
flk 69	flk-Promotor bp -642/+299 in pGL-2	Dr. V. Rönicke
λm 70415-3	Murine HIF-2α cDNA in pB KSII (+)	Dr. I. Flamme
HIF2 FLAG pcDNA3	Murine Hif-2α cDNA in pcDNA3, FLAG-Tag	Dr. I. Flamme
HIF-2 10.1Xba in pZErO	4,66 kb muriner HIF-2α-Promotor/Exon1/Intron1 in pZErO-2	diese Arbeit
HIF-2 10.1Xba in pGL2	4,4 kb HIF-2α-Promotor/Exon1/Intron1 in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 Nco 31	1,68 kb HIF-2α-Promotor in pB KSII (+)	diese Arbeit
HIF-2 Xba I	3,37 kb HIF-2α-Promotor in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 Apa I	2,38 kb HIF-2α-Promotor in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 Nco I	1,68 kb HIF-2α-Promotor in pGL2 Basic	diese Arbeit

HIF-2 Nco I in pGL3	1,68 kb HIF-2 α -Promotor in pGL3 Basic	diese Arbeit
HIF-2 Sac I	1,37 kb HIF-2 α -Promotor in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 Sac II	614 bp HIF-2 α -Promotor in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 e1u3	560 bp HIF-2 α -Promotor in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 Apa in pcDNA	2,38 kb HIF-2 α -Promotor in pcDNA3.1/Myc-His/lacZ	diese Arbeit
HIF-2 AB8 Intron/Xba I	1,27 kb HIF-2 α -Intron1 in HIF-2 α Xba I (3' \rightarrow 5')	diese Arbeit
HIF-2 B)5 Intron/Xba I	1,27 kb HIF-2 α -Intron1 in HIF-2 α Xba I (5' \rightarrow 3')	diese Arbeit
HIF-2 Intron1-Fragment A	10 kb HIF-2 α -Promotor/Exon1/Intron1 in pB SKII (+)	K. Brusselmans
HIF-2 Intron1-Fragment B	8 kb HIF-2 α -Intron1/Exon2/Intron2 in pB SKII (+)	K. Brusselmans
pGLacZ-Flk-1 promoter / enhancer	939 bp Flk-1-Promotor und 2,3 kb Flk-1-Enhancer in pGL-2 mit LacZ-Reportergen	Dr. V. Rönicke
HIF-2 Xba I/lacZ	3,4 kb LacZ-Kassette aus pGLacZ-Flk-1 promoter / enhancer in HIF-2 Xba I	diese Arbeit
HIF-2 lacZ prom/int 5	1,27 kb HIF-2 α -Intron1 aus HIF-2 10.1Xba in pZErO in HIF-2 α Xba I/lacZ	diese Arbeit
HIF-2 Intron5,5/Xba I/lacZ	5,5 kb HIF-2 α -Intron1 aus HIF-2 Intron1-Fragment A in HIF-2 α Xba I/lacZ	diese Arbeit
HIF-2 del 1	1530 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 del 2	1500 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 del 3	1460 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 e1u8	1123 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 e1u9	1073 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 e1u10	1032 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 del 4	850 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 del 5	810 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 del 6	730 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 del 7	660 bp Hif-2 α -Promotorfragment in pGL2 Basic	diese Arbeit
HIF-2 mut 1	HIF-2 Xba I mit mutierter TATA-Box	diese Arbeit
HIF-2 mut 2	HIF-2 Xba I mit mutierter Ets-1-Bindungsstelle 1	diese Arbeit
HIF-2 mut 3	HIF-2 Xba I mit mutierter Ets-1-Bindungsstelle 2	diese Arbeit
HIF-2 mut 4	HIF-2 Xba I mit mutierter HIF-2-Bindungsstelle 1	diese Arbeit
HIF-2 mut 5	HIF-2 Xba I mit mutierter Ets-1-Bindungsstelle 3	diese Arbeit
HIF-2 mut 6	HIF-2 Xba I mit mutierter HIF-2-Bindungsstelle 2	diese Arbeit
HIF-2 mut 7	HIF-2 Xba I mit mutierter Ets-1-Bindungsstelle 4	diese Arbeit
HIF-2 mut 8	HIF-2 Xba I mit mutierter HIF-2-Bindungsstelle 3	diese Arbeit
HIF-2 mut 9	HIF-2 Xba I mit mutierter Ets-1-Bindungsstelle 5	diese Arbeit

7.2 Abkürzungen

Ω	Ohm
A	Adenosin
Abb.	Abbildung(en)
abs.	absolut
Abs.	Abschnitt
Ac	Acetat
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurereste
bHLH-Motiv	<i>basic Helix-Loop-Helix</i> -Motiv
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca	circa
CBP	CREB bindendes Protein
cDNA	copy-DNA
cfu	<i>colony forming units</i> (Kolonienbildende Phagenklone)
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i> (alkalische Phosphatase)
cpm	<i>counts per minute</i> (Impulse pro Minute)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F	Farad
FKS	fötale Kälberserum
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HAF	HIF-1 <i>ancillary factor</i>
HAS	HIF-1 <i>ancillary sequence</i>
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-Piperazinyl(1)]
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i> (Hypoxieinduzierbarer Faktor)
HRE	<i>hypoxia response element</i>
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertoni
m	Meter
min	Minute
MOPS	M-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernmagnetische Resonanz)
OD	optische Dichte
p	Plasmid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pfu	<i>plaque forming unit</i> (Plauebildender Phagenklon)
Pos.	Position

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
sog.	sogenannt
SSC	<i>sodium salt citrat</i> (Natriumchlorid-Natriumcitrat)
SSRE	<i>shear stress responsible element</i> (Scherstreßinduzierbares Element)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
U	<i>units</i> (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen/Volumen
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VT	Volumenteil
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5'-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller
Clauss
Dressler
Elsässer
Elschenbroich
Fischer
Frenking
Fuhs
Ganßauge
Habermehl
Hartmann
Kadenbach
Kaffarnik
Kern
Kirchner
Koolman
Lang
Löffler
von Löw
Mannherz
Melsheimer
Möröy
Müller
Niessing
Petzoldt
Risau
Röhm
Schachtschabel
Schäfer
Schulz
Seifart
Seitz
Voigt
Wiegandt

Mein akademischer Lehrer in Köln war Herr:

Flamme

7.4 Danksagung

Herrn Prof. Werner Risau (†) danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für seine menschliche Ausstrahlung, die für die angenehme Atmosphäre in seiner Abteilung maßgeblich mit verantwortlich war.

Herrn Prof. Matthias Clauss sei ganz herzlich gedankt für die Übernahme der offiziellen Betreuungspflicht für meine Arbeit am Max-Planck-Institut in Bad Nauheim.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Zellbiologie am MPI ein herzliches Dankeschön für einen Einstieg ins Doktorandenleben, wie er angenehmer wohl kaum hätte sein können.

Besonders gedankt sei an dieser Stelle Regina Heidenreich und allen ausführenden Kräften für die gute Transgen-Arbeit.

Herrn Dr. Ingo Flamme möchte ich für die vielen praktischen Anleitungen, die inspirierenden Gespräche und die konstruktive Kritik beim Schreiben meiner Doktorarbeit ganz herzlich danken.

Meinen Kollegen Stephanie Ernesti, Gerd Elvert und Manuel Rauter danke ich für ein schönes, abwechslungsreiches Laborklima sowie für all die kleinen und großen Hilfen.

Gerd, dessen Weg sich mit dem meinigen während unseres beruflichen Werdeganges desöfteren kreuzte, möchte ich darüberhinaus für viel gemeinsamen Spaß bei Kakao, Badminton und Gesang danken.

Katrin Wallbrecht, Steffi Goffert und Gerd Elvert sei ihr Engagement als Haupt-KorrekturleserInnen ganz herzlich gedankt.

Nicht unerwähnt bleiben sollte auch die gute Zusammenarbeit in Sachen Radioaktivität mit der AG Odenthal, die fabelhafte Sequenzierarbeit im Servicelabor der Biochemie sowie die guten Beziehungen zum Sekretariat des ZMMK an der Universität Köln.

Meiner Frau Katrin schließlich möchte ich in Liebe dafür danken, daß sie mich immer wieder angetrieben hat weiterzumachen, mich bei der langwierigen Schreiberei von zahlreichen Haushalts- und Familienpflichten entbunden hat und auch die ein oder andere direkt aus der Promotion resultierende, gemütsbedingte Schlechtwetterlage über sich ergehen ließ.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus meinen Eltern, ohne die mein Studium und diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

7.5 Teilpublikationen

Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G. und Flamme, I. (2003): Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1).

J Biol Chem. 2003 Feb 28;278(9):7520-30.

Elvert, G., Lanz, S., Kappel, A. und Flamme, I. (1999): mRNA cloning and expression studies of the quail homologue of HIF-2 alpha.

Mech. Dev. 87, 193-197.

Flamme, I., Elvert, G., Kappel, A., Lanz, S., Krieg, M., Plate, K. und Breier, G. (1999): The role of HIF-2 alpha during vascular development.

Cardiology 94, 5.