

K. Heinicke¹, T. Hofer, R. H. Wenger², M. Gassmann

Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel

The cellular response to hypoxia

Institute für Physiologie und Veterinärphysiologie, Universität Zürich, Schweiz

1 Division of Physiology, Department of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, California

2 Carl-Ludwig-Institut für Physiologie, Universität Leipzig

Zusammenfassung

Erythropoese wird induziert durch Anämie, reduzierten Sauerstoffpartialdruck (pO_2) z.B. in großer Höhe und während körperlicher Belastung sowie durch andere Faktoren. Das Glykoprotein Erythropoietin (Epo) ist ein Hormon, welches die Proliferation, die Differenzierung und die Reifung der erythroiden Zellen reguliert. Hypoxie erhöht die Epo-Konzentration im Plasma, was zu einer Erhöhung des Erythrozytenvolumens und dadurch zu einem verbesserten O_2 -Transport im Blut führt. Untersuchungen der Epo Genregulation ergaben, dass ein allgemeiner Mechanismus existiert, der die Induktion verschiedener Gene steuert, wenn der Organismus hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wird. Die Schlüsselfunktion in dieser O_2 -abhängigen Genexpression übernimmt der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1), ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer α und einer β (auch ARNT genannten) Untereinheit besteht. Die Aktivierung von HIF-1 ist abhängig von der Hypoxie-bedingten Stabilisierung der α Untereinheit (HIF-1 α), währenddem die Stabilisierung von ARNT nicht von der O_2 -Konzentration betroffen ist. Bis vor kurzem war nicht bekannt, wie Zellen die Abnahme der O_2 -Konzentration wahrnehmen, was zur Stabilisierung von HIF-1 α führt. Ein erster Einblick in den Mechanismus, wie die Zelle O_2 -Konzentrationen misst, erfolgte mit der Entdeckung einer Familie von O_2 -abhängigen Prolylhydroxylasen, welche die Stabilität von HIF-1 α beeinflussen. Diese Prolylhydroxylasen markieren HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen für den proteasomalen Abbau, indem sie ihn an zwei spezifischen Prolinresten modifizieren. Dieser Übersichtsartikel berichtet über die neusten Erkenntnisse auf diesem Gebiet.

Schlüsselwörter: Erythropoietin, Hypoxie-induzierbarer Faktor-1, Sauerstoffsensoren

Einleitung

Sauerstoff (O_2) ist essentiell für das Leben höherer Organismen. Als terminaler Elektronen-Akzeptor dient er in den Mitochondrien zur Energiegewinnung. So ist es nicht verwunderlich, dass im Laufe der Evolution unterschiedliche Mechanismen entwickelt wurden, um zelluläre und systemische O_2 -Konzentrationen zu messen und zu regulieren. Die körperliche Leistungsfähigkeit wird durch eine Vielzahl von anatomischen, physiologischen und genetischen Faktoren determiniert. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Blut- und

Summary

Erythropoiesis is induced by anemia, decreased ambient oxygen tension (hypoxia) e.g. at high altitude or upon exercise and by other stimuli. Erythropoietin (Epo) is a glycoprotein hormone that regulates proliferation, differentiation and maturation of erythroid cells. Hypoxia induces Epo plasma levels leading to increased red blood cell mass and hence enhanced oxygen-carrying capacity of the blood. Research on the regulation of the Epo gene revealed a general system of transcriptional regulation of a broad range of genes involved in adaptation to hypoxia. The key regulator for this oxygen-dependent gene expression is the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), a heterodimeric transcription factor consisting of an α and a β (ARNT) subunit. Activation of HIF-1 is critically dependent on hypoxia-induced stabilization of its α -subunit, while ARNT is not affected by the oxygen partial pressure. Until recently, the means by which cells sense alteration in oxygen tension and subsequently induce changes in HIF-1 α stabilization remained obscure. The first insight of an oxygen sensing pathway came with the discovery of a family of oxygen-dependent prolyl hydroxylases responsible for the modulation of HIF-1 α stability. These HIF-1 α -specific prolyl hydroxylases modify HIF-1 α at two specific proline residues under normoxic conditions, thereby priming HIF-1 α for proteolytic degradation. This short review discusses the latest developments in this field.

Key words: erythropoietin, hypoxia-inducible factor-1, oxygen sensing

Gefäßsystem hinsichtlich seiner O_2 -Transportfähigkeit, Pufferung und Thermoregulation.

Eine verminderte O_2 -Versorgung, bedingt durch beispielsweise Höhenexposition, Anämie oder Blutverlust bei Unfall, aktiviert die Expression des blutbildenden Hormones Erythropoietin (Epo) (Abb.1). Über die Blutbahn gelangt Epo ins Knochenmark, wo es an die Epo-Rezeptoren der erythroiden Vorläuferzellen bindet (32). In der Folge führt die Bindung von Epo an seinen Rezeptor zu einer terminalen Reifung der erythroiden Vorläuferzellen und letztlich zur Erhöhung der Erythrozytenzahl. Der entscheidende Reiz für die

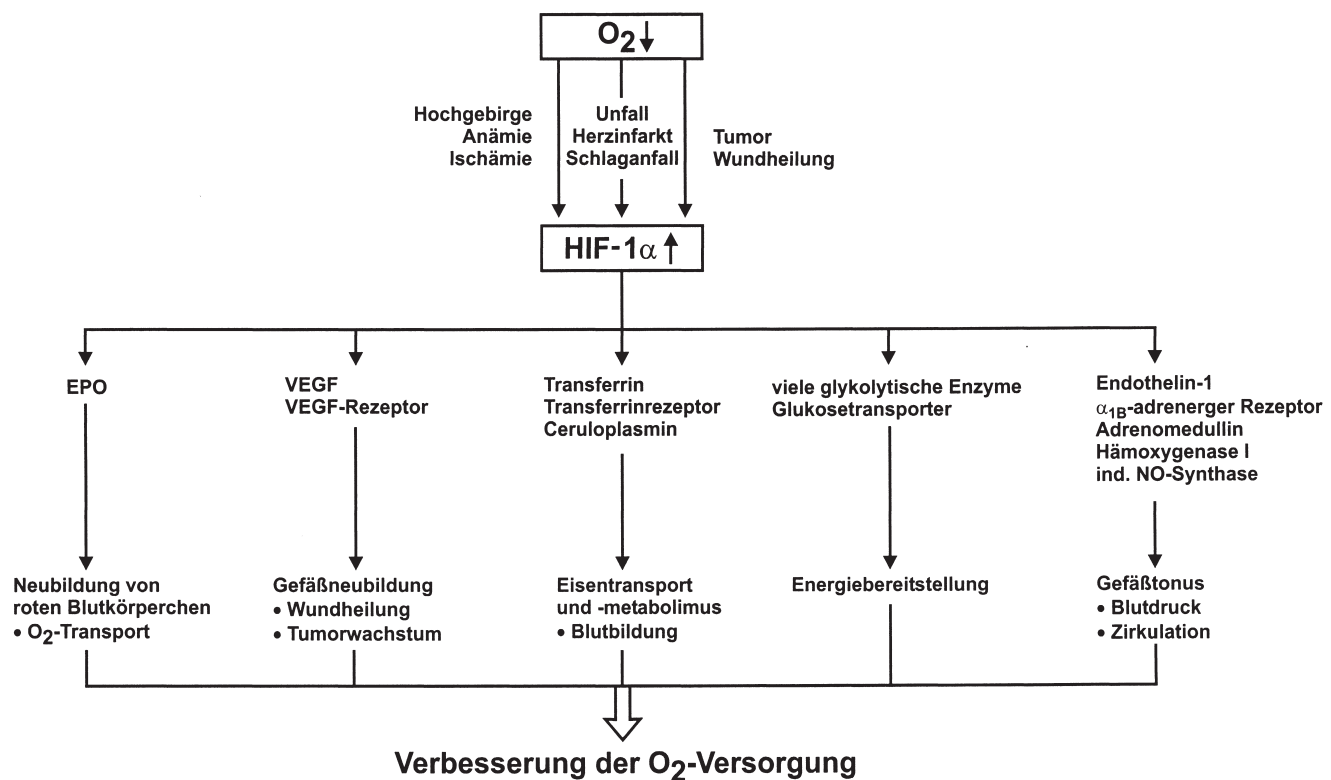


Abbildung 1: O₂-Mangel bewirkt eine erhöhte Expression von HIF-1 α (Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 α), einem Transkriptionsfaktor, der die Synthese von beispielsweise Erythropoietin (Epo), vaskulärem endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF), Transferrin, Transferrinrezeptor, glykolytischen Enzymen und Endothelin-1 kontrolliert. Eine ausführliche Auflistung der HIF-1 α -regulierten Gene findet sich in Ref. 24.

Synthese des Epo ist der Abfall des intrarenalen pO₂. Es ist eine bekannte Tatsache, dass durch körperliches Training eine Steigerung der Erythropoese und ein erhöhter Erythrozytenumsatz hervorgerufen werden (48, 60). So erreichen ausdauertrainierte Athleten höchste Werte für Erythrozytenvolumen und totale Hämoglobinmenge (22b). Interessanterweise kommt es unter starker körperlicher Belastung zwar zu einem Abfall der Nierendurchblutung (5), jedoch konnte keine Erhöhung der Epo-Plasmaspiegel unmittelbar nach akuter Belastung bei untrainierten und trainierten Personen sowie nach langandauernden Trainingsperioden festgestellt werden (2, 47, 59). Offensichtlich wird die kritische pO₂-Schwelle nicht unterschritten, die zur Erhöhung der Epo-Syntheserate führt. Diese Beobachtung zeigt, dass sich die O₂-Regulationsmechanismen komplexer gestalten als bisher angenommen. Möglicherweise führen andere Mechanismen, wie z.B. eine erhöhte Epo-Rezeptordichte oder -affinität, zu der trainingsinduzierten Stimulierung der erythropoietischen Aktivität, doch müssen diese Postulate erst geprüft werden.

Anders sieht es bei einem Aufenthalt in moderaten (1500-3000 m) bis extremen (<5500 m) Höhen aus, wo schon wenige Stunden nach Höhenexposition erhöhte Epo-Konzentrationen gemessen wurden (3, 20, 22a, 52). Dies kann bei einem Training in ausreichender Höhe von etwa 2500 m und einer Mindestaufenthaltsdauer von 3 Wochen zu einer Erhöhung der Erythrozytenmasse und der maximalen O₂-Aufnahme (VO₂max) führen (36). Interessant ist dabei, dass noch während des Höhengaufenthaltes die Epo-Konzentration wie-

der auf fast normoxische Werte abfällt (22a, 37). In einer umfassenden Höhentrainingsstudie wurde festgestellt, dass nur etwa die Hälfte der teilnehmenden Athleten auf den hypoxischen Reiz reagierte (7). Die Gruppe dieser sog. Responder zeigte einen höheren Anstieg der Epo-Konzentration bei Höhenexposition im Vergleich zu den Non-Responder. Während bei den Responder eine Steigerung des Erythrozytenvolumen und der VO₂max beobachtet wurde, fand man bei den Non-Responder keinerlei Veränderungen dieser Größen. Die Autoren führen diese unterschiedliche Reaktion auf individuelle genetische Polymorphismen des Epo- oder des Epo-Rezeptor-Gens zurück. Es wäre von Interesse, die erythropoietische Reaktion eines Non-Responders im Zusammenhang mit einer pathologisch bedingten Anämie zu kennen.

Bei einem regelmäßigen Ausdauertraining kommt es neben der Anpassung der Erythrozytenzahl auch zu Adaptationsreaktionen in der Skelettmuskulatur, die durch eine Zunahme der Kapillarisation, der Mitochondrienzahl und der Aktivität der oxidativen Enzyme gekennzeichnet sind (21, 25, 46). Ein reduzierter pO₂ und/oder metabolische Veränderungen in der Skelettmuskulatur während Belastung werden als mögliche primäre Stimuli der Angiogenese angesehen (21). Unter O₂-Mangel wird vermehrt vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) produziert, was zur Entstehung von neuen Blutgefäßen führt (Abb. 1) (15). Bestätigt wird dies durch einen akuten Anstieg der VEGF mRNA-Konzentration in Biopsien des M. vastus lateralis nach einer einmaligen Belastung von untrainierten Personen unter normoxi-

schen Bedingungen (42). Unerwarteterweise führte eine zusätzliche systemische Hypoxie (12% O₂) während der Belastung zu keinem weiteren Anstieg der VEGF mRNA-Kon-

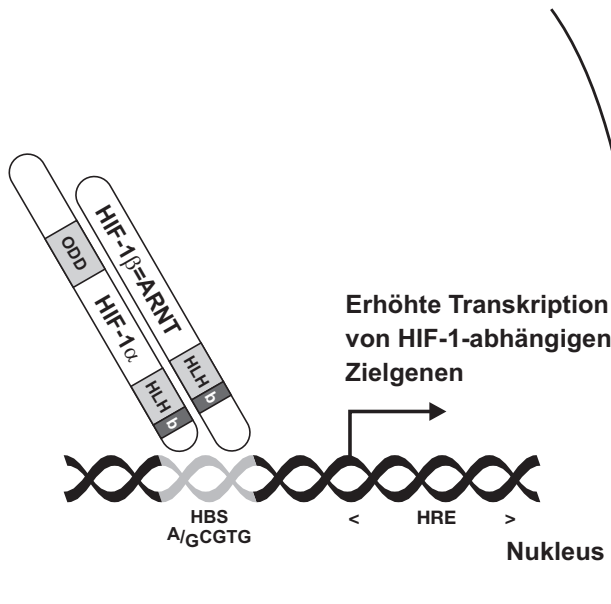


Abbildung 2: HIF-1 besteht aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β /ARNT. Die Heterodimerisierung führt zur DNA-Bindung an die HRE-Sequenz von Hypoxie-induzierten Zielgenen. HBE: HIF-1 binding site, ARNT: Arylhydrocarbon Rezeptor Nuclear Translokator, bHLH: basic-helix-loop-helix, ODD: O₂-abhängige Degradationsdomäne.

zentration. Andere Daten wurden bei trainierten Personen gefunden. *Hoppeler* und Mitarbeiter haben gezeigt, dass eine simulierte Hypoxie während wiederholten intensiven Trainings mit anschließender Ruhephase unter normoxischen Umgebungsbedingungen (training high - living low) zu einer VEGF-bedingten Erhöhung der Kapillarisation führt (26). Diese Arbeitsgruppe postuliert, dass ein wiederholtes und intensives Training in Hypoxie, bei sonst normoxischen Lebensbedingungen, zu einer Erhöhung der Muskelkapillarisation führt, die bei alleinigem normoxischen Training nicht erreicht wird.

Wie aber passt sich die einzelne Zelle einem O₂-Mangel an? Als spezifische Antwort auf Hypoxie findet eine transkriptionelle Aufregulierung spezifischer Gene statt, welche notwendig sind, um die O₂-Homöostase aufrecht zu erhalten (50, 61). Die entsprechende Antwort des Körpers erfolgt auf zellulärer (z.B. Glykolyse), lokaler (z.B. Angiogenese, Gefäßtonus) und systemischer (z.B. Erythropoese) Ebene (Abb. 1). Dem Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 (HIF-1) fällt bei dem Zusammenspiel der O₂-abhängigen Faktoren die Rolle des Dirigenten zu. Mit der Identifizierung des zellulären O₂-Sensors gelang erst kürzlich ein wissenschaftlicher Durchbruch. In diesem Artikel soll ein Überblick der bisherigen Erkenntnisse auf dem Gebiet der molekularen O₂-Regulationsmechanismen sowie der O₂-abhängigen Genexpression gegeben werden.

HIF-1 α steuert die Aufrechterhaltung des O₂-Gleichgewichts

Die Identifizierung von HIF-1 als Hauptregulator der O₂-abhängigen Genexpression war ein erster großer Schritt in der Analyse des Mechanismus, welcher der Adaptation an hypoxische Bedingungen zu Grunde liegt. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten, HIF-1 α und HIF-1 β (Abb. 2), wobei die Klonierung von HIF-1 β zeigte, dass diese Untereinheit bereits bekannt war. HIF-1 β ist nämlich identisch mit dem Heterodimerisierungspartner des Dioxinrezeptors, dem sogenannten Arylhydrocarbon Rezeptor Nuclear Translokator (ARNT) (18, 58). Beide HIF-1 Untereinheiten gehören zur Unterfamilie der basic-helix-loop-helix (bHLH) Proteine, die eine bestimmte charakteristische Sequenz (PAS-Domäne genannt) besitzen (58). HIF-1 α und HIF-1 β werden ubiquitär im Gewebe vieler Spezies (Mensch, Wirbeltier, Wurm, Insekt u.a.) exprimiert (4, 13, 51). Die Aktivierung von HIF-1 hängt aber ausschließlich von der durch Hypoxie induzierten Stabilisierung der α -Untereinheit ab, wohingegen die HIF-1 β /ARNT-Untereinheit unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck (pO₂) konstitutiv exprimiert wird. Demzufolge kann im Gegensatz zu HIF-1 β /ARNT die HIF-1 α -Untereinheit in Zellkulturen nicht oberhalb einer kritischen O₂-Konzentrationsgrenze nachgewiesen werden. In HeLa-Zellen beträt diese ca. 5% O₂ (35 mmHg) (34). Nur unter dem Einfluss von Hypoxie oder Hypoxie-imitierenden Substanzen (z.B. Kobaltsalze oder Eisenchelatoren) steigt die HIF-1 α -Konzentration und führt somit zur Aktivierung der HIF-1 α -abhängigen Zielgene (Abb. 2).

Überrascht hat die Tatsache, dass das HIF-1 α Protein bei eintretendem O₂-Mangel sofort, d.h. innerhalb von Sekunden, den kultivierten Zellen zur Verfügung steht (33). Normalisiert sich die O₂-Zufuhr, verschwindet HIF-1 α innerhalb von wenigen Minuten wieder. Neueste immunohistochemische Untersuchungen von verschiedenen Organen bei Mäusen zeigten, dass in Gehirn, Niere, Leber, Herz und Skelettmuskel HIF-1 α Protein schon unter normoxischen Umgebungsbedingungen nachweisbar ist (53). Werden die Mäuse einer systemischen Hypoxie ausgesetzt (6% O₂ für 4 Stunden), so erhöht sich die HIF-1 α Konzentration unterschiedlich schnell in den verschiedenen Organen und erreicht ihr Maximum in Gehirn, Niere und Leber nach 1-4 Stunden. Die Höhe des pO₂, der zu einem Anstieg der HIF-1 α -Konzentration führt, sowie die Zeitspanne bis zu der maximalen HIF-1 α Expression ist also vom jeweiligen Gewebe abhängig. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass eine bestimmte HIF-1 α -Konzentration stets notwendig ist, um eine kontinuierliche Expression von Genen sicherzustellen, die für eine ausreichende Energiebereitstellung zur Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion unentbehrlich sind. Unterstützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen an HIF-1 α -defizienten embryonalen Stammzellen in Normoxie, bei denen die basale Expression der HIF-abhängigen Zielgene verringert war (30).

Wie wichtig ist HIF-1 α ? Untersuchungen an homozygot HIF-1 α -defizienten Mäuseföten (sog. knock-out Mäuse, siehe 17) zeigten, dass diese nicht lebensfähig sind und intrauterin sterben (30, 44). Diese Föten zeigen gravierende Herz- und Hirnmissbildungen sowie ein defektes Blutgefäßnetz. Offensichtlich ist HIF-1 α ein nicht redundanter, lebenswichtiger Faktor, der nicht durch HIF-2 α (12) oder HIF-3 α (19) ersetzt werden kann. Diese letzteren Faktoren haben ähnliche Funktionen wie HIF-1 α , werden im Gegensatz zu HIF-1 α aber nicht ubiquitär exprimiert.

Expression von HIF-1 abhängigen Zielgenen unter Hypoxie

Hypoxie bewirkt die intrazelluläre Stabilisierung von HIF-1 α , welches anschließend in den Zellkern transportiert wird. Diese nukleäre Translokation geschieht unabhängig von der HIF-1 β /ARNT-Untereinheit, welche konstitutiv im Zellkern vorkommt (9). Auch konnte man in stark HIF-1 α -überexprimierten aber normoxisch kultivierten Zelllinien feststellen, dass HIF-1 α in den Zellkern gelangt (23). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass kein weiteres Hypoxie-abhängiges Signal für den nukleären Transport von HIF-1 α benötigt wird. Ist HIF-1 α einmal im Zellkern angekommen, heterodimerisiert es dort mit HIF-1 β /ARNT und der daraus resultierende HIF-1-Komplex bindet an eine spezifische Basensequenz von O₂-regulierten Genen (Abb. 2). Diese Sequenz wird HIF-1 binding site (HBS) genannt und lautet: A/GCGTG (6, 62). Die HBS ist die Kernsequenz des sog. hypoxia response elements (HRE), welches die Feinregulierung der HIF-1-abhängigen Zielgene steuert. Seit wenigen Jahren ist nun bekannt, dass O₂-regulierte Gene eine oder mehrere Kopien dieser HREs besitzen. Obwohl HIF-1 α hauptsächlich durch den pO₂ reguliert wird, spielen für die HIF-1 α -Stabilität und die Transkriptionsaktivität an den Zielgenen noch eine Reihe von anderen Faktoren eine Rolle. So ist die Phosphorylierung von HIF-1 α essentiell für eine normale HIF-1-Funktion, was wiederum eine erhöhte Transkriptionsrate der HIF-1 Zielgene nach sich zieht (Abb. 3) (41). Außerdem kann durch verschiedene Phosphorylierungsinhibitoren die Aufregulierung der HIF-1-abhängigen Zielgene blockiert werden (8, 28, 63).

Momentan sind über 25 solcher Zielgene bekannt (24). Man geht jedoch davon aus, dass dies nur die Spitze des Eisberges ist. Die Bindung von HIF-1 an das HRE führt zur gezielten Überexpression von verschiedenen Faktoren, welche die Antwort des Organismus auf systemischer, lokaler und zellulärer Ebene regulieren. Die Abbildung 1 zeigt die koordinierten Funktionen vieler HIF-1-abhängiger Zielgene nach hypoxischer Exposition. Das reduzierte Sauerstoffangebot führt auf systemischer Ebene zur Erhöhung des Epo-Spiegels

und somit zur Erhöhung der Erythropoese. Diese wiederum benötigt zur Hämsynthese mehr Eisen, das dank erhöhter Synthese von Transferrin und dessen Rezeptor zur Verfügung gestellt wird. Bei akuter Hypoxie wird durch Erhöhung der Glykolyse und der Glukoseverfügbarkeit mehr Energie bereitgestellt. Gleichzeitig wird die Blutzirkulation angepasst, indem der Gefäßtonus durch gefäßwirksame HIF-1-abhängige Faktoren modifiziert wird (Abb. 1).

HIF-1 α wird in Normoxie abgebaut: Der O₂-Sensor

Wie bereits oben erwähnt, kann das HIF-1 α Protein oberhalb eines kritischen intrazellulären pO₂ kaum oder gar nicht nachgewiesen werden. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass HIF-1 α nicht auf Transkriptionsebene reguliert wird, sondern über Proteininstabilisierung unter hypoxischen Bedingungen (62). Dies bedeutet, dass das HIF-1 α Protein konstitutiv synthetisiert und unter normoxischen Bedingungen über die Ubiquitin/Proteasom-Degradationskaskade gleich wieder abgebaut wird (Abb. 3) (27, 35, 45).

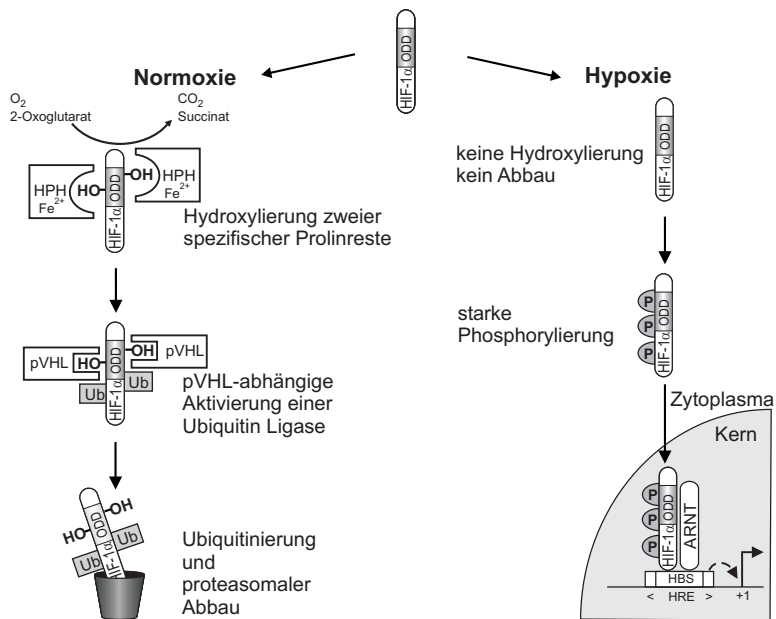


Abbildung 3: Die Stabilisierung von HIF-1 α in Hypoxie und der Abbau von HIF-1 α in Normoxie. Der proteosomale Abbau von OH-markiertem HIF-1 α ist als Abfalleimer symbolisiert. Für Einzelheiten siehe Text. ODD: O₂-abhängige Degradationsdomäne, HPH: HIF α -Prolylhydroxylase, pVHL: von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein, Ub: Ubiquitin Ligase.

Lange Zeit war nicht bekannt, wie die Zellen die O₂-Konzentration ihrer Umgebung messen können. Eine von mehreren Theorien war, dass die Konzentration von reaktiven O₂-Spezies (ROS) wie beispielsweise Superoxid oder Peroxid als Signalübermittler in der O₂-Messung dienten. ROS entsteht nämlich in den Mitochondrien als Nebenprodukte der Atmungskette. Die publizierten Daten sind aber kontrovers. Während *Fandrey* und Mitarbeiter eine Abnahme von ROS bei abnehmender O₂-Konzentration feststellten (14), veröffentlichten *Schumacker und Mitarbeiter*, dass die Produkti-

on von ROS unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert wird (11, 57). Seit letztem Jahr ist der Mechanismus der die Stabilisierung von HIF-1 α reguliert, bekannt. Die Schlüsselenzyme, die den O₂-abhängigen Abbau von HIF-1 α kontrollieren, sind spezifische Prolylhydroxylasen, die Fe²⁺ als Co-Faktor sowie O₂ und 2-Oxoglutarat als Co-Substrate benötigen (29, 31). Diese Prolylhydroxylasen hydroxylieren zwei bestimmte Prolinreste, die in der sog. O₂-abhängigen Degradationsdomäne (ODD) vorkommen (Abb. 3) (38). Unter normoxischen Bedingungen ermöglicht diese Hydroxylierung die spezifische Interaktion des von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Proteins (pVHL) mit HIF-1 α . Das pVHL beinhaltet eine Ubiquitin Ligase, welche die Ubiquitinierung von HIF-1 α vollzieht. In der Folge werden die ubiquinierten HIF-1 α Moleküle durch Proteasomen abgebaut (Abb. 3) (10, 39, 40, 55). Analoge Resultate wie in den Zellkulturen wurden beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* gefunden (13). Mit anderen Worten: In Normoxie wird HIF-1 α zwar ständig synthetisiert, aber gleich wieder durch Anhängen von OH-Gruppen markiert. Einmal markiert, durchläuft HIF-1 α einen vorgegebenen intrazellulären Abbauprozess bis zur vollständigen Zerstörung. Bei O₂-Mangel hingegen fehlt der Prolylhydroxylase das O₂, was dazu führt, dass keine OH-Gruppen angehängt werden können. Als Folge davon wird HIF-1 α nicht abgebaut, wandert in den Kern und aktiviert nach Heterodimerisierung mit HIF-1 β /ARNT die entsprechenden Zielgene. Somit können die spezifischen HIF-1 α -Prolylhydroxylasen als wichtige Teile der O₂-Wahrnehmung, wenn nicht als die eigentlichen O₂-Sensoren betrachtet werden.

Medizinische Bedeutung

Kann HIF-1 α direkt zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden? Bereits untersucht wurden gentherapeutische Anwendungsmöglichkeiten, die auf dem Transfer von HIF-1 Zielgenen wie VEGF oder Epo basieren (43, 49, 56). Der Gentransfer von VEGF, dem wichtigsten angiogenetischen Wachstumsfaktor, wurde erfolgreich bei der Behandlung von ischämischen Erkrankungen wie periphere arterielle Verschlusskrankheit, diabetische Neuropathie und koronare Herzkrankheit eingesetzt (43, 49). Da HIF-1 die Transkriptionsrate von VEGF und anderen angiogenetischen Wachstumsfaktoren unter hypoxischen Umgebungsbedingungen bestimmt und koordiniert (50, 61), sollte HIF-1 einen noch wirksameren Ansatzpunkt für die Gentherapie bieten (24). Der HIF-1-Gentransfer würde auf einem übergeordneten, komplexeren Niveau ansetzen und könnte somit physiologischer auf die lokale Angiogenese wirken.

Therapeutische Ansätze ergeben sich ebenfalls für die Wundheilung, beispielsweise bei großflächigen Verbrennungen, wo Blutgefäße in unmittelbarer Umgebung der Wundränder beschädigt sind. Hier könnte durch Zugabe von HIF-1 oder VEGF der Heilungsprozess beschleunigt werden.

Im Gegensatz zu den protektiven Effekten, die HIF-1 bei der Behandlung von ischämischen Erkrankungen zeigt, kann HIF-1 auch eine pathologische Wirkung ausüben, in dem es das Wachstum von Tumoren fördert (1). Ein solider Tumor

durchläuft während seines Wachstums einen O₂-Mangelzustand, der vor allem im Zentrum des Tumors offensichtlich wird. Um diesen O₂-Mangel auszugleichen, wird VEGF von den Tumorzellen hergestellt, was zu einer Vaskularisierung führt und somit die Versorgung des Tumorgewebes mit O₂ und Nährstoffen gewährleistet (16). Ein intratumoraler Gentransfer eines sog. antisense HIF-1 α -Plasmids (54) ist eine von verschiedenen untersuchten Strategien, um hypoxische Tumoren zu behandeln. Diese Technologie basiert darauf, dass ein komplementärer RNA-Strang (antisense RNA) gentechnologisch in der Zelle hergestellt wird, der den ursprünglichen, natürlich vorkommenden RNA-Strang (sense RNA) erkennt, bindet und ihn somit inaktiviert. Die Expression von HIF-1 α -antisense RNA im Tumorgewebe führt zu einer Senkung der VEGF Konzentration und darausfolgend der Kapillardichte. Durch diese Methode konnten erste Erfolge mit der dauerhaften Rückbildung von kleineren Tumoren erzielt werden.

Die Gentherapie bietet völlig neue Behandlungsstrategien von noch unbekanntem Ausmaß. Momentan befinden wir uns erst am Beginn der Forschungen, jedoch muss schon jetzt auf einen möglichen Missbrauch der Gentechnologie zur Leistungssteigerung im Sport hingewiesen werden. Diesem Missbrauch muss durch eine entsprechende Gesetzgebung sowie mit der Durchführung von ethischen und pädagogischen Programmen auf der Grundlage der neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse frühzeitig vorgebeugt werden.

Danksagung

Die Autoren danken dem Schweizerischen Nationalfonds (31-68202.02) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (HE3471/1-1) für die Unterstützung.

Literatur

1. *Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL*: Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor HIF-1 α , HIF-2 α , and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res* 61 (2001) 7349-7355.
2. *Bodary PF, Pate RR, Wu QF, McMillan GS*: Effects of acute exercise on plasma erythropoietin levels in trained runners. *Med Sci Sports Exerc* 31 (1999) 543-546.
3. *Böning D, Maassen N, Jochum F, Steinacker J, Halder A, Thomas A, Schmidt W, Naé G, Kubanek B*: After-effects of a high altitude expedition on blood. *Int J Sports Med* 18 (1997) 179-185.
4. *Bruick RK, McKnight SL*: A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294 (2001) 1337-1340.
5. *Buskies W*: Über das Verhalten des Blutvolumen in Lunge, Herz, Leber, Niere und Gehirn während dosierter Arbeit bei Luft- und Sauerstoffatmung. Hartung-Gorre Verlag, Konstanz 1987.
6. *Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH*: Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 443 (2001) 240-249.
7. *Chapman RF, Stray-Gundersen J, Levine BD*: Individual variation in response to altitude training. *J Appl Physiol* 85 (1998) 1448-1456.
8. *Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ*: Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res* 61 (2001) 2429-2433.
9. *Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH*: Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-

- 1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *J Cell Sci* 112 (1999) 1203-1212.
10. *Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH*: Hypoxia-inducible factor 1 α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275 (2000) 25733-25741.
 11. *Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT*: Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273 (1998) 11619-11624.
 12. *Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y*: A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 4273-4278.
 13. *Epstein AC, Gleadow JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzner E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ*: C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107 (2001) 43-54.
 14. *Fandrey J, Frede S, Jelkmann W*: Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem J* 303 (1994) 507-510.
 15. *Ferrara N*: Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Trop Microbiol Immunol* 237 (1999) 1-30.
 16. *Garayoa M, Martinez A, Lee S, Pio R, An WG, Neckers L, Trepel J, Montuenga L, Ryan H, Johnson R, Gassmann M, Cuttitta F*: Hypoxia-inducible factor (HIF-1) upregulates adrenomedullin expression in human tumor cells lines during oxygen deprivation. A possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Mol Endocrin* 14 (2000) 848-862.
 17. *Gassmann M, Hennet T, Bauer C*: Transgene Mäuse in der Grundlagenforschung. *Schweiz Arch Tierheilk* 140 (1998) 198-204.
 18. *Gassmann M, Kvietikova I, Rolfs A, Wenger RH*: Oxygen- and dioxin-regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int* 51 (1997) 567-574.
 19. *Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA*: Molecular characterization and chromosomal localization of third a-class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 α . *Gene Expr* 7 (1998) 205-213.
 20. *Gunga HC, Röcker L, Behn C, Hildebrandt W, Koralewski E, Rich I, Schobersberger W, Kirsch K*: Shift working in the Chilean Andes (> 3,600 m) and its influence on erythropoietin and low-pressure system. *J Appl Physiol* 81 (1996) 846-852.
 21. *Gustafsson T, Kraus WE*: Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front Biosci* 6 (2001) D75-D89.
 - 22a. *Heinicke K, Prommer N, Cajagal J, Viola T, Behn C, Schmidt W*: Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in men. *Eur J Appl Physiol*, in press (2002).
 - 22b. *Heinicke K, Wolfarth B, Winchenbach P, Biermann B, Schmid A, Huber G, Friedmann B, Schmidt W*: Blood volume and hemoglobin mass in elite athletes of different disciplines. *Int J Sports Med* 22 (2001) 504-512.
 23. *Hofer T, Desbaillets I, Hopfl G, Gassmann M, Wenger RH*: Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 α activation cascade: implications for HIF-1 α gene therapy. *FASEB J* 15 (2001) 2715-2717.
 24. *Hofer T, Wenger RH, Gassmann M*: Oxygen sensing, HIF-1 α stabilization and potential therapeutic strategies. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 443 (2002) 503-507.
 25. *Hoppeler H*: Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sport Med* 7 (1986) 187-204.
 26. *Hoppeler H, Vogt M*: Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol* 204 (2001) 3133-3139.
 27. *Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF*: Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 7987-7992.
 28. *Hur E, Chang KY, Lee E, Lee SK, Park H*: Mitogen-activated protein kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Pharmacol* 59 (2001) 1216-1224.
 29. *Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiano J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr*: HIF a targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292 (2001) 464-468.
 30. *Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL*: Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 12 (1998) 149-162.
 31. *Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim AV, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ*: Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292 (2001) 468-472.
 32. *Jelkmann W*: Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72 (1992) 449-489.
 33. *Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M*: Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15 (2001) 1312-1314.
 34. *Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH*: Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 271 (1996) C1172-C1180.
 35. *Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L*: Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274 (1999) 6519-6525.
 36. *Levine BD, Stray-Gundersen J*: "Living high-training low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *J Appl Physiol* 83 (1997) 102-112.
 37. *Mairbäurl H, Schobersberger W, Oelz O, Bärtsch P, Eckardt KU, Bauer C*: Unchanged in vivo P50 at high altitude despite decreased erythrocyte age and elevated 2,3-DPG. *J Appl Physiol* 68 (1990) 1186-1194.
 38. *Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ*: Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20 (2001) 5197-5206.
 39. *Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ*: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399 (1999) 271-275.
 40. *Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG*: Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 423-427.
 41. *Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J*: 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 (1999) 32631-32637.
 42. *Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, Henry R, Noyszewski EA, Wagner PD*: Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. *Am J Physiol* 277 (1999) H2247-H2252.
 43. *Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG*: Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenoviral vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 100 (1999) 468-474.
 44. *Ryan HE, Lo J, Johnson RS*: HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17 (1998) 3005-3015.
 45. *Salceda S, Caro J*: Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272 (1997) 22642-22647.
 46. *Saltin B, Gollnick PD*: Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance, in: Peachy LD, Adrian RH and Geiger SR (eds.): *Handbook of Physiology*. Williams and Wilkinson, Baltimore, 1983, Chapter 19, 555-631.
 47. *Schmidt W, Eckardt KU, Hilgendorf A, Strauch S, Bauer C*: Effects of maximal and submaximal exercise under normoxic and hypoxic conditions on serum erythropoietin level. *Int J Sports Med* 12 (1991) 457-461.
 48. *Schmidt W, Maassen N, Trost F, Böning D*: Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur J Appl Physiol* 57 (1988) 490-498.
 49. *Schratzberger P, Schratzberger G, Silver M, Curry C, Kearney M, Magner M, Alroy J, Adelman LS, Weinberg DH, Ropper AH, Isner JM*: Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med* 6 (2000) 405-413.

50. *Semenza GL*: HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 13 (2001) 167-171.
51. *Soitamo AJ, Rabergh CM, Gassmann M, Sistonen L, Nikinmaa M*: Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *J Biol Chem* 276 (2001) 19699-19705.
52. *Stray-Gundersen J, Chapman RF, Levine BD*: "Living high-training low" altitude training improves sea level performance in male and female elite runners. *J Appl Physiol* 91 (2001) 1113-1120.
53. *Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil D, Bauer C, Gassmann M, Candinas D*: HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 15 (2001) 2445-2453.
54. *Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW*: Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 α enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther* 8 (2001) 638-645.
55. *Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L*: Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 19 (2000) 4298-4309.
56. *Tripathy SK, Svensson EC, Black HB, Goldwasser E, Margalith M, Hobart PM, Leiden JM*: Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 10876-10880.
57. *Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT*: Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273 (1998)18092-18098
58. *Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL*: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995) 5510-5514.
59. *Weight LM, Alexander D, Elliot T, Jacobs P*: Erythropoietic adaptations to endurance training. *Eur J Appl Physiol* 64 (1992) 444-448.
60. *Weight LM, Byrne MJ, Jacobs P*: Haemolytic effects of exercise. *Clin Sci* 81 (1991) 147-152.
61. *Wenger RH*: Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 203 (2000) 1253-1263.
62. *Wenger RH, Gassmann M*: Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378 (1997) 609-616.
63. *Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL*: Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60 (2000) 1541-1545.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. M. Gassmann

Institut für Veterinärphysiologie, Universität Zürich

Winterthurerstrasse 260

CH-8057 Zürich, Schweiz

Fax: +41-1-635 8932

E-mail: maxg@access.unizh.ch