

---

## **Missbrauch der physiologischen Antwort auf Sauerstoffmangel im Gewebe – Gefahr durch Gen-Doping mit dem Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 (HIF-1)?**

Joachim Fandrey

Fast 100 Jahre sind seit der Erstbeschreibung einer Substanz vergangen, die im Serum von Tieren nach einer starken Blutung gefunden wurde, und die in der Lage war, die Hämatopoese zu aktivieren (CARNOT/DEFLANDRE 1906). Diese ersten Untersuchungen, publiziert 1906 in den *Comptes rendus de l'Académie des Sciences Paris*, begründeten die Forschung über die Struktur, die Bildung und die Funktion des Hormons Erythropoietin (JELKMANN 1992). Zwar hat die Erfolgsgeschichte der Erforschung des Erythropoietins durch die Identifikation und Klonierung des Gens 1985 durch LIN et al. (1985) und die unmittelbar danach einsetzende gentechnische Herstellung und Zulassung des rekombinanten Hormons als Therapeutikum zunächst der renalen Anämie ihren Höhepunkt erreicht (SPIVAK 2001; GOODNOUGH 2001), jedoch liegt vieles zur Physiologie der Regulation immer noch im Dunkeln. Die Bildung von Erythropoietin steigt exponentiell, wenn die Sauerstoffkapazität des Blutes abnimmt (JELKMANN 1992; FANDREY/BUNN 1993). Jedoch gibt es keine Struktur, die die Sauerstoffkapazität oder gar die Erythrozytenzahl bestimmt, sondern die Oxygenierung der Gewebe, damit der Gewebs- $pO_2$ , ist der entscheidende Faktor in der Kontrolle der Expression des Erythropoietingens. Bei Absinken des Gewebs- $pO_2$  wird die Expression des Gens für Erythropoietin – beim Erwachsenen zum größten Teil in den Nieren und zum geringeren Teil in der Leber – gesteigert und das Protein vermehrt in Zirkulation abgegeben. Weil der  $pO_2$  die entscheidende Steuergröße ist, wird sowohl in vitro bei vermindertem  $pO_2$  im Inkubationsgas als auch beim Menschen bei Verminderung des inspiratorischen  $pO_2$ , etwa bei Höhenaufenthalt, die Erythropoietinbildung ebenfalls gesteigert (JELKMANN 1992).

Erythropoietin ist das Schlüsselhormon in der Vermehrung und Reifung erythrozytär determinierter Vorläuferzellen im Knochenmark. Unter der Wirkung von Erythropoietin steigen die Erythrozytenzahl und die Hämoglobinkonzentration des Blutes (SPIVAK 2001). In diesem Sinne sorgt Erythropoietin bei Anämie für eine Wiederherstellung der verminderten Sauerstoffkapazität bzw. erhöht kompensatorisch dieselbe bei einem Absinken des inspiratorischen  $pO_2$ . Diese physiologische Zunahme der Sauerstoffkapazität bei Höhenaufenthalt wird u.a. beim Höhentraining für Athleten genutzt. So war es zu vermuten, dass unmittelbar nach Aufklärung des Mechanismus und Verfügbarkeit des rekombinanten Hormons auch der Missbrauch in Form des Dopings von Bedeutung sein würde (SPIVAK 2001).

Neben diesem unmittelbar verbesserten Verständnis der Kontrolle der Erythrozytenbildung ist Erythropoietin aber das Paradigma für Hypoxie-induzierbare Gene geworden (BUNN et al. 1998). Die Aufklärung des Mechanismus, durch den unter Sauerstoffmangel im Gewebe, wo normalerweise die Gesamtsynthese an Proteinen um 60-75% abnimmt, die Bildung von Erythropoietin dagegen jedoch mehrere 100-fach gesteigert wird, hat über die letzten fast 15 Jahre die Forschung zur Hypoxie-induzierbaren Genexpression allgemein stimuliert (SEMENZA 1999). Zunächst war es notwendig, das komplexe System des Gesamtorganismus auf ein zelluläres Modell zu reduzieren. Dies gelang mit der Isolation von zwei Hepatomzelllinien (GOLDBERG et al. 1987), deren Antwortverhalten auf Hypoxie mit einer Steigerung des sezernierten Erythropoietins in idealer Weise der in vivo-Situation gleich kam (Abbildung 1).

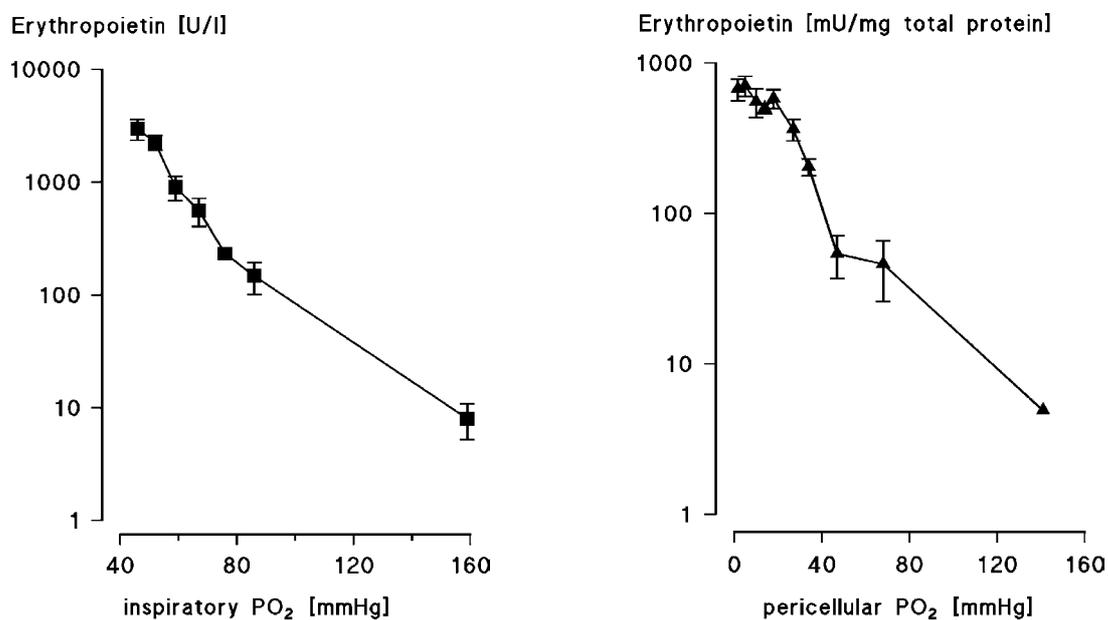


Abb. 1: Steigerung der Bildung von Erythropoietin in Ratten, die für sechs Stunden Atemgasen mit vermindertem pO<sub>2</sub> ausgesetzt waren und eine exponentielle Zunahme der Expression des Erythropoietingens in den Nieren (Daten nicht gezeigt) und nachfolgend des Proteins im Serum zeigten (linke Bildhälfte). Die humanen Hepatomzellen HepG2 zeigen ein sehr ähnliches Verhalten (rechter Bildabschnitt), wenn der pO<sub>2</sub> perizellulär abgesenkt wird. Auch hier geht der gesteigerten Sekretion von Erythropoietin in den Kulturüberstand eine exponentielle Zunahme der Expression des Gens voraus (Daten nicht gezeigt) (FANDREY/BUNN 1993).

Voraussetzung für derartige Untersuchungen war allerdings eine genaue Kenntnis der Sauerstoffversorgungsbedingungen in der Zellkultur, die initial zunächst vernachlässigt wurden. Messungen des perizellulären pO<sub>2</sub> erlaubten dann jedoch die exakte Kontrolle der Versuchsbedingungen und die Etablierung von zellulären Modellen zur Untersuchung der

molekularen Mechanismen (WOLFF, FANDREY und JELKMANN 1993; METZEN, WOLFF, FANDREY und JELKMANN 1995 ). In einer überzeugenden Serie von Untersuchungen an verschieden großen DNA-Abschnitten aus den regulatorischen Bereichen des Erythropoietingens gelang es Gregg Semenza (Johns Hopkins University, Baltimore) die regulatorischen DNA-Abschnitte, die für die Hypoxie-induzierbare Induktion des Erythropoietingens verantwortlich waren, einzugrenzen (SEMENZA et al. 1991; SEMENZA/WANG 1992). Daraufhin ließ sich ein 120-Basen-Paar langer Abschnitt hinter dem Erythropoietingen als Hypoxie-induzierbarer Enhancer identifizieren, der mit dem vor dem Erythropoietingen liegenden Promotor interagiert und so eine bis zu mehrere 100-fach gesteigerte Expression unter Sauerstoffmangelbedingungen erlaubt (BLANCHARD et al. 1992; WANG/SEMENZA 1993). Von großem Interesse – und bisher nicht endgültig geklärt – sind zusätzliche DNA-Abschnitte, die eine gewebespezifische Expression des Erythropoietingens erlauben (EBERT/BUNN 1999). Denn während der Fetalzeit wird beim Menschen Erythropoietin zu mehr als 80% in der Leber exprimiert, und erst nach der Geburt wird die Bildung in die Nieren verlagert (DAME et al. 1998). Obwohl die DNA-Abschnitte, die für die gewebespezifische Expression des Erythropoietingens bisher nicht restlos identifiziert werden konnten, gelang es mit Kenntnis der regulatorischen DNA-Abschnitte die daran bindenden Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die unter Hypoxie die gesteigerte Expression des Erythropoietingens bewirken. 1995 gelang SEMENZA und Mitarbeitern die Identifizierung des Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 (HIF-1), der an die DNA im Bereich des Enhancers des Erythropoietingens bindet und verantwortlich ist für die Hypoxie-induzierbare Expression (SEMENZA et al. 1991; WANG et al. 1995). Sehr schnell wurde gefunden, dass HIF-1 eine Vielzahl Hypoxie-induzierbarer Gene reguliert und dabei an eine auch über Speziesgrenzen hinweg gut konservierte Abfolge von Nukleotiden in der DNA der entsprechenden regulatorischen Einheiten dieser Gene bindet (MAXWELL/PUGH/RATCLIFFE 1993). Ein spannender Wettlauf entwickelte sich um die Identifizierung der Mechanismen, die zu einer vermehrten Verfügbarkeit des Transkriptionsfaktor-Komplexes HIF-1 unter Hypoxie führen. Zunächst wurde gefunden, dass die  $\alpha$ -Untereinheit von HIF-1 sauerstoffsensibel ist, während die  $\beta$ -Untereinheit konstitutiv im Kern vorhanden ist. Es stellte sich heraus, dass unter Sauerstoffmangel die Untereinheit HIF-1  $\alpha$  stabilisiert wird und nicht, wie unter hohem  $pO_2$  üblich, über das Proteasomen-System abgebaut wird (SALCEDA/CARO 1997; HUANG et al. 1998). Eine posttranslationale Modifizierung durch Hydroxylierung von Prolinresten in der  $\alpha$ -Untereinheit an den Positionen 402 und 564 durch Prolylhydroxylasen markiert das Protein für eine Erkennung durch das von Hippel-Lindau-Protein, das eine Ubiquitinierung der  $\alpha$ -Untereinheit initiiert und damit die Degradation durch die Proteasomen einleitet (LANDO et al. 2002; EPSTEIN et al. 2001). Unter Sauerstoffmangel sistiert die Aktivität der Prolylhydroxylasen und ermöglicht auf diesem Wege, dass HIF-1 $\alpha$  in der Zelle akkumuliert, in den Kern zu transloziert wird und mit HIF-1 $\beta$  als aktiver Komplex die Expression Hypoxie-induzierbarer Gene steigert. Neben dieser Regulation der Verfügbarkeit der  $\alpha$ -Untereinheit von HIF-1 führt ein weiterer Hypoxie-abhängiger Schritt zur Kontrolle der Funktion dieses wichtigen Transkriptionsfaktors. Am C-terminalen Ende des HIF-1 $\alpha$ -Pro-

teins an der Position 803 wird die Aminosäure Asparagin ebenfalls in Abhängigkeit von  $pO_2$  hydroxyliert (LANDO et al. 2002). Auch dieses Enzym ist  $pO_2$ -abhängig und hydroxyliert nur bei ausreichend verfügbarem Sauerstoff die Aminosäure Asparagin an dieser Position. Hydroxyliertes Asparagin ist jedoch nicht in der Lage, weitere Koaktivatoren der Genexpression zu binden und damit für den Transkriptionskomplex zu rekrutieren. Während derzeit die molekularen Feinheiten der  $pO_2$ -abhängigen Aktivierung und Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  untersucht werden, ist die Bedeutung von HIF-1 $\alpha$  für das Verständnis der normalen Hypoxie-Adaptation, aber auch der Tumorbilogie, von eminenter Wichtigkeit geworden (SEMENZA 2000). Darüber hinaus spielt HIF-1 eine Rolle im Training des menschlichen Skelettmuskels. In einer Arbeitsgruppe vom Karolinska Institut in Stockholm wurde berichtet, dass gesunde männliche Versuchspersonen nach einer 45-minütigen Übung, in der die Kniestrecker aktiviert wurden, in Biopsaten aus dem Muskelgewebe vermehrt HIF-1 $\alpha$ -Protein aufwiesen. Dieses HIF-1 $\alpha$  war im Kern der isolierten Zellen zu finden, war biologisch aktiv und erhöhte die mRNA des Gefäßwachstumsfaktors VEGF (= Vascular Endothelial Growth Factor), eines klassischen Ziel-Gens unter der Kontrolle von HIF-1. Daraus lässt sich schließen, dass bereits beim physiologischen Training der Transkriptionsfaktor-Komplex HIF-1 im Muskel des gesunden Sportlers aktiviert wird. Dieser „normalen Aktivierung“ steht der pathologische Sauerstoffmangel bei ischämischer Gefäßerkrankung gegenüber. Auch hier wird vermehrt HIF-1 exprimiert, jedoch scheint sich die Vermutung zu bestätigen, dass die HIF-1-abhängigen Gene nicht in ausreichendem Maße aktiviert werden, um beispielsweise durch Neoangiogenese im ischämischen Gewebe eine Minderversorgung zu verhindern. Aus diesem Grund hat man einen gentherapeutischen Ansatz unternommen, indem ein konstitutiv aktives HIF-1 $\alpha$ -Protein, das durch Fusion mit einem viralen Aktivator (VP16) entstanden ist, als nackte DNA in das Gewebe eingebracht wird und dort vermehrt zur Expression eines HIF-1 $\alpha$ /VP16-Hybrids führt (VINCENT et al. 2000). Diese von VINCENT et al. (2000) durchgeführten Experimente zeigten, dass der vermehrte und konstitutiv nachweisbare HIF-1 $\alpha$ /VP16-Gehalt zu einer Zunahme der VEGF-Expression in Glioblastomzellen und zu einer vermehrten Erythropoietinexpression in Hepatomzellen führte. Wurde dieses Genkonstrukt in vivo im Kaninchen eingesetzt, so zeigte sich eine Zunahme der Gefäßdichte, die vergleichbar war mit der gentherapeutischen Behandlung mit einem Plasmid mit humanem VEGF. Sehr eindrucksvoll konnten die Untersucher in der mittels Kontrastmittel verstärkten Darstellung der Gefäße in einem experimentell ischämischen Hinterlauf des Kaninchens zeigen, dass sowohl die Therapie mit VEGF DNA als auch mit dem HIF-1 $\alpha$ /VP16-Hybrid zu einer signifikanten Erhöhung der Revaskularisation in vivo führte (Abbildung 2). Mit diesen Experimenten ließ sich zeigen, dass zumindest im Tierexperiment im künstlich erzeugten ischämischen Hinterlauf durch das Einbringen von nackter HIF-1 $\alpha$ /VP16-Hybrid DNA eine vermehrte Vaskularisierung erreicht werden kann. Dieser Ansatz, primär zur therapeutischen Verwendung bei ischämischer Mangelversorgung bei Patienten mit Gefäßerkrankungen gedacht, muss sicherlich in nächster Zukunft berücksichtigt werden, wenn es um den Missbrauch von gentherapeutischen Ansätzen im Sinne eines Gen-Dopings gehen wird.

Die Detektion solcher Methoden wird sehr schwierig sein, da im Prinzip nur eine Aufarbeitung des Gewebes von in diesem Gebiet höchst kompetenten Wissenschaftlern möglicherweise den Nachweis eines derartigen Gen-Konstrukts erlaubt. Zudem wird sich die Suche als sehr komplex erweisen, wenn nicht exakt bekannt ist, um welche DNA-Abschnitte es sich handelt. Selbst bei deren Kenntnis wird der Nachweis von Gen-Doping ausschließlich invasiv möglich sein und die Mitarbeit hoch spezialisierter Labors erfordern. Der Nachweis wird zeitlich und finanziell extrem aufwändig und nur in Gewebeproben, nicht aber in Blutproben möglich sein. Allerdings ist der Nachweis nicht unmöglich, da die Expression eines HIF-1/Hybrides immer grundsätzlich von der physiologischen Antwort der Gewebe auf Sauerstoffmangel abweichen wird. Gerade das Vorhandensein verschiedener natürlich vorkommender Spleißvarianten von HIF-1 $\alpha$ , was manche experimentelle Untersuchungen erschwert, könnte in diesem Falle sehr hilfreich sein. Denn nur das Gesamtbild der Expression verschiedener Isoformen ist charakteristisch für eine durch Hypoxie induzierte physiologische Antwort, während selektive Überexpression einzelner HIF-1 $\alpha$ -Formen eher den Missbrauch im Sinne eines Gen-Dopings nahe legt.

## Literatur

- BLANCHARD, K.L.; ACQUAVIVA, A.M.; GALSON, D.L.; BUNN, H.F.: Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol. Cell Biol.* 12 (1992), 5373-5385
- BUNN, H.F.; GU, J.; HUANG, L.E.; PARK, J.W.; ZHU, H.: Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J. Exp. Biol.* 201 (1998), 1197-1201
- CARNOT, P.; DEFLANDRE, C.: Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang. *C. R. Acad. Sci. Paris* 143 (1906), 384-386
- DAME, C., FAHNENSTICH, H., FREITAG, P., HOFMANN, D., ABDUL-NOUR, T., BARTMANN, P., FANDREY, J.: Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 92 (1998), 3218-3225
- EBERT, B.L.; BUNN, H.F.: Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 94 (1999), 1864-1877
- EPSTEIN, A.C.; GLEADLE, J.M.; MCNEILL, L.A.; HEWITSON, K.S.; O'ROURKE, J.; MOLE, D.R.; MUKHERJI, M.; METZEN, E.; WILSON, M.I.; DHANDA, A.; TIAN, Y.M.; MASSON, N.; HAMILTON, D.L.; JAAKKOLA, P.; BARSTEAD, R.; HODGKIN, J.; MAXWELL, P.H.; PUGH, C.W.; SCHOFIELD, C.J.; RATCLIFFE, P.J.: C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107 (2001), 43-54
- FANDREY, J.; BUNN, H.F.: In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 81 (1993), 617-623

- GOLDBERG, M.A.; GLASS, G.A.; CUNNINGHAM, J.M.; BUNN, H.F.: The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 7972-7976
- GOODNOUGH, L.T.: Erythropoietin therapy versus red cell transfusion. *Curr. Opin. Hematol.* 8 (2001), 405-410
- HUANG, L.E.; GU, J.; SCHAU, M.; BUNN, H.F.: Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), 7987-7992
- JELKMANN, W.: Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* 72 (1992), 449-489
- LANDO, D.; PEET, D.J.; WHELAN, D.A.; GORMAN, J.J.; WHITELAW, M.L.: Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295 (2002), 858- 861
- LIN, F.K.; SUGGS, S.; LIN, C.H.; BROWNE, J.K.; SMALLING, R.; EGRIE, J.C.; CHEN, K.K.; FOX, G.M.; MARTIN, F.; STABINSKY, Z.: Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985), 7580-7584
- MAXWELL, P.H.; PUGH, C.W.; RATCLIFFE, P.J.: Inducible Operation of the Erythropoietin 3' Enhancer in Multiple Cell Lines: Evidence for a Widespread Oxygen-Sensing Mechanism. *PNAS* 90 (1993), 2423-2427
- 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.; RATCLIFFE, P.J.: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis [see comments]. *Nature* 399 (1999), 271-275
- METZEN, E.; WOLFF, M.; FANDREY, J.; JELKMANN, W.: Pericellular pO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> consumption in monolayer cell cultures. *Respir. Physiol* 100 (1995), 101-106
- SALCEDA, S.; CARO, J.: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 22642-22647
- SEMENZA, G.L.: Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15 (1999), 551-578
- SEMENZA, G.L.: HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol* 88 (2000), 1474-1480
- SEMENZA, G.L.; KOURY, S.T.; NEJFELT, M.K.; GEARHART, J.D.; ANTONARAKIS, S.E.: Cell-Type-Specific and Hypoxia-Inducible Expression of the Human Erythropoietin Gene in Transgenic Mice. *PNAS* 88 (1991), 8725-8729
- SEMENZA, G.L.; NEJFELT, M.K.; CHI, S.M.; ANTONARAKIS, S.E.: Hypoxia-Inducible Nuclear Factors Bind to an Enhancer Element Located 3' to the Human Erythropoietin Gene. *PNAS* 88 (1991), 5680-5684

- SEMENZA, G.L.; WANG, G.L.: 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. *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992), 5447-5454
- SPIVAK, J.L.: Erythropoietin use and abuse: When physiology and pharmacology collide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 502 (2001), 207-224
- VINCENT, K.A.; SHYU, K.G.; LUO, Y.; MAGNER, M.; TIO, R.A.; JIANG, C.; GOLDBERG, M.A.; AKITA, G.Y.; GREGORY, R.J.; ISNER, J.M.: Angiogenesis Is Induced in a Rabbit Model of Hindlimb Ischemia by Naked DNA Encoding an HIF-1 $\alpha$ /VP16 Hybrid Transcription Factor. *Circulation* 102 (2000), 2255-2261
- WANG, G.L.; SEMENZA, G.L.: Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 21513-21518
- WANG, G.L.; JIANG, B.H.; RUE, E.A.; SEMENZA, G.L.: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 5510-5514
- WOLFF, M.; FANDREY, J.; JELKMANN, W.: Microelectrode measurements of pericellular pO<sub>2</sub> in erythropoietin-producing human hepatoma cell cultures. *Am. J. Physiol* 265 (1993), C1266-C1270

