

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

**Die Erstbeschreibung zweier bisher unbekannter
AntiHif1 α -Varianten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
David Fernando Raoul Callau Monje
aus
Waiblingen
2008

Dekan: Prof. Dr. I.B. Autenrieth

1.Berichterstatter: Professor Dr. A.Nieß

2.Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Weigert

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Körperliche Belastung, Hypoxie und deren Auswirkungen auf den Organismus	7
1.2 Zusammenhang zwischen Hif1 α -Transkription und körperlicher Belastung	9
1.3 Die Beeinflussung der Ausdauerleistungsfähigkeit über Polymorphismen des Hif1 α -Gens	10
1.4 Die Zelle und ihre Reaktion auf Hypoxie	11
1.5 Der Transkriptionsfaktor Hif1	13
1.5.1 Der Aufbau des Hif1-Proteinkomplex	13
1.5.2 Regulation der Hif1-Aktivität	15
1.5.3 Regulation von Hif1 α auf Transkriptionsebene	16
1.5.4 Posttranskriptionelle Prozessierung der Hif1 α mRNA	17
1.5.5 Varianten der Hif1 α mRNA	19
1.6 AntiHif1 α	20
1.6.1 Sequenz von aHif1 α	22
1.6.2 Funktionsweise von aHif1 α	23
1.6.3 Phylogenetische Konservierung von aHif1 α	24
1.7 Arbeitshypothesen	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Gewinnung von Probenmaterial	26
2.1.1 Erschöpfende Ausdauerbelastung (Nikolauslauf)	26
2.2 Zur Verfügung gestellte cDNA-Proben	26
2.2.1 THP1-Zellreihe	26
2.2.2 Myotubenzellkultur	27
2.2.3 Screening mehrerer Gewebe	28
2.3 Verarbeitung der Proben	29

2.3.1	Isolierung der PBMC-Fraktion aus den Nikolauslaufproben	29
2.3.2	RNA-Extraktion	30
2.3.3	Isolierung der Gesamt-RNA und DNase-Verdau	30
2.3.4	RNA-Aufreinigung	31
2.3.5	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA	32
2.3.6	Reverse Transkription	32
2.4	PCR	33
2.5	Quantitative Real Time RT-PCR	34
2.5.1	PCR-Setup	34
2.5.2	Schmelzkurvenanalyse	36
2.5.3	Auswertung der PCR-Ergebnisdaten	36
2.5.4	Housekeeping Gen	36
2.5.5	Berechnungen	38
2.6	Verwendete Primer	39
2.6.1	Primereffizienz	39
2.7	Gelelektrophorese	40
2.8	Bioinformatische Verfahren	41
2.8.1	UCSC Genome Browser	41
3	<i>Ergebnisse</i>	44
3.1	UCSC Genome Browser	44
3.2	Primerauswahl	47
3.3	Untersuchung von PBMC's	50
3.4	neue Primerauswahl	57
3.5	Lokalisationsanalyse	58
3.6	Myotuben	61
3.7	Nikolauslauf	65
3.8	Screening auf aHif1 α in verschiedenen Geweben	67
4	<i>Diskussion</i>	69
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	69
4.2	Der Promotorbereich von aHif1 α	70

4.2.1	Untersuchung des Promotors	71
4.2.2	Bedeutung des Promotors	71
4.3	Splicevarianten von aHif1 α	72
4.4	Differentielle Expression, Lokalisationsanalyse und mögliche funktionelle Bedeutung der beiden neuen aHif1 α Varianten	73
4.4.1	Funktion von aHif1 α Ex14	74
4.4.2	Funktion von aHif1 α Ex2	75
4.5	Untersuchung der erstmals von Thrash-Bingham beschriebenen aHif1 α Variante	76
4.6	Ausblicke	78
5	Zusammenfassung	80
6	Abkürzungsverzeichnis	82
7	Literaturverzeichnis	86

1. Einleitung

1.1 Körperliche Belastung, Hypoxie und deren Auswirkungen auf den Organismus

In Extremsituationen, aber auch im Alltag und Sport, ist der menschliche Körper diversen Belastungen ausgesetzt und reagiert auf diese. Wie diese Reaktionen aussehen, ist abhängig von Intensität und Dauer der Belastung, genetischer Ausstattung, Allgemeinzustand und Trainingszustand des jeweiligen Individuums. Eine fehlende Reaktion oder der Untergang des Organismus stellen dabei die Extremformen dar. Meist erfolgt eine Reaktion im Sinne einer Anpassung an die neuen Gegebenheiten. Die Hypoxie als Belastungssituation ist ein in der Sportmedizin häufig untersuchter Zustand. Hypoxie kann physiologischerweise unter normalen Umweltbedingungen im Rahmen verschiedener Belastungsformen in unterschiedlichen Körperkompartimenten auftreten. Im Fall einer Hypoxie, vermittelt das Gen Hif1 (*hypoxia inducible factor 1*) wichtige Anpassungsvorgänge. Hif1 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der im Rahmen einer Hypoxie schnell reguliert werden muss. Der genaue Aufbau des Hif1 Transkriptionskomplexes wird unter 1.5.1 erläutert. Zum besseren Verständnis der folgenden Ausführungen, wird hier vorweggenommen, dass es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt, der aus einer α - und β -Untereinheit besteht. Die Regulation erfolgt hauptsächlich über die Alpha-Untereinheit, die durch den Sauerstoffpartialdruck (pO_2) reguliert wird. Allgemein erfordern erniedrigte pO_2 Spiegel eine Anpassung der Zelle, die sie zum Beispiel durch Akzentuierung bestimmter Stoffwechselwege erreicht (Ameln et al. 2005). Des Weiteren kann man Adaptationsvorgänge beobachten, die das Blut und das Immunsystem betreffen. Da diese Veränderungen durch Blutentnahme relativ einfach zu untersuchen sind, konnten bereits sehr viele physiologische Anpassungsmechanismen beschrieben werden. So ist zum Beispiel nach Belastung ein deutlicher Anstieg von Zytokinen zu finden, die in den Regulationsweg von Hif1 eingebunden sind (Graven et al. 2003). Es erfolgt

jedoch keine systemische Immunreaktion auf den Anstieg dieser proinflammatorischen Mediatoren, da in gleichem Maße antiinflammatorische Stoffe ansteigen (Ostrowski et al. 1999). Ein weiterer Effekt ist die beobachtete Modulation der Zellanzahl des Immunsystems durch hypoxische Konditionen. Hierbei konnte ein durch Belastung verursachter Anstieg der mononukleären Zellen (PBMC's) im peripheren venösen Blut beobachtet werden (Connolly et al. 2004). In welchem Ausmaß sich diese Beeinflussungen des Immunsystems zu einem modulierenden Effekt addieren, konnte bisher noch nicht geklärt werden (Cuzzocrea et al. 2001).

Auf zellulärer Ebene ist die Bildung freier Sauerstoff- und Stickstoffradikale (ROS, RNS) in den Mitochondrien ein weiterer interessanter Aspekt, der mit Belastung, aber auch mit Hypoxie in Verbindung steht. Freie Radikale sind sehr reaktionsfreudige Moleküle, und sind damit in der Lage zelluläre Proteine, Lipide und vor allem DNA zu oxidieren. Niess et al. konnten zeigen, dass die ROS- und RNS-Spiegel in Leukozyten nach Belastung, von dem Trainingszustand des Individuums abhängig sind (Niess et al. 1999). Daraus kann man schlussfolgern, dass das Ausmaß des oxidativen Stresses, der durch ROS und RNS verursacht wird, zum einen von Ausmaß und Dauer der Belastung, zum anderen aber auch von der antioxidativen Kapazität des Individuums abhängig ist. Dass ROS wirklich die DNA schädigen können, konnte durch eine Untersuchung von Sportlern gezeigt werden. Diese Sportler erlitten nach erschöpfender Ausdauerbelastung eine Schädigung der leukozytären DNA durch ROS (Niess et al. 1998). Studien, die sich mit dem Thema der Reduktion des oxidativen Stresses durch Antioxidantiengabe befassten, zeigen, dass nach momentanem Wissensstand der Effekt der Antioxidantiengabe auf die Entstehung des oxidativen Stresses unter Ausdauerbelastung eher gering ist. Es konnte jedoch ein positiver Effekt einer Antioxidantiengabe bei reiner Hypoxie nachgewiesen werden (Bailey und Davies 2001).

1.2 Zusammenhang zwischen Hif1 α -Transkription und körperlicher Belastung

Dieser Zusammenhang war bereits Inhalt diverser Studien, wobei jedoch unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden, die unter anderem in der Verwendung unterschiedlicher Studienprotokolle begründet sein können.

Im Rahmen einer Arbeit von Lundby et al., die den Einfluss von Ausdauerbelastung auf die Expression von Hif1 α mRNA im Skelettmuskel untersuchte, konnte ein Unterschied zwischen trainierten und untrainierten Probanden festgestellt werden. Die Probanden mussten eine einmalige, akute, dreistündige Ausdauerbelastung absolvieren, die aus einer Beinextension bestand. Dabei wurde festgestellt, dass es bei trainierten Probanden zu keiner Zeit zu einer Änderung der Expressionswerte kam. Wohingegen bei den untrainierten Probanden 3 Stunden nach Belastung ein kurzzeitiger Anstieg der Hif1 α mRNA Expressionswerte zu beobachten war. Dieser Effekt war bereits nach 24 Stunden nicht mehr nachzuweisen und konnte durch Training eliminiert werden (Lundby et al. 2006). Einige Jahre zuvor, konnte eine ähnliche Studie, nach vergleichbarer Belastung keine Veränderungen nachweisen. Als Ursache für dieses differente Ergebnis wurde die Probenentnahme, die bereits 30 Minuten nach Ende der Belastung erfolgte, angeführt (Gustafsson et al. 1999). In weiteren Studien wurde die Dauer zwischen Ende der Belastung und Probenentnahme deutlich verlängert und die Probanden wurden einem Ausdauertraining unterzogen.

In einer Studie sollten sich die Probanden einem Ausdauertraining unter Hypoxie und Normoxie unterziehen und 24 Stunden nach der letzten Belastung erfolgte die Entnahme der Muskelbiopsien. Lediglich in der Hypoxie-Gruppe konnte ein Anstieg von Hif1 α mRNA gezeigt werden (Vogt et al. 2001).

In einer weiteren Studie erfolgte zuerst ein intensives Ausdauertraining über 3 Monate. Die Probenentnahme wurde 48 Stunden nach der letzten Belastung in Form von Muskelbiopsien durchgeführt. Ein Anstieg von Hif1 α mRNA konnte nicht gezeigt werden (Ookawara et al. 2002). Das im Vorfeld betriebene

Ausdauertraining und der lange Zeitraum zwischen Probenentnahme und letzter Belastung erklären diese Ergebnisse im Sinne der Arbeit von Lundby. Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Ergebnissen steht eine Arbeit, welche die Expressionswerte von Hif1 α mRNA nach erschöpfender Ausdauerbelastung untersucht hat. Die Probanden mussten eine Knieextensionsbelastung unter normaler oder reduzierter O₂-Zufuhr, begonnen bei 5 Watt bis zur Erschöpfung, durchführen. Dabei konnte zu keinem der Messzeitpunkte, die bei 0, 30, 120 und 360 Minuten lagen, eine Veränderung der Hif1 α mRNA registriert werden (Ameln et al. 2005). In einer anderen Studie wurden die Proben als Alternative zu den Muskelbiopsien aus venösem Blut gewonnen. Anschließend wurden die Expressionswerte von Hif1 α mRNA in PBMC-Zellen, die aus den Blutproben extrahiert wurden, gemessen, wobei die Probanden 30 Minuten lang über ihrer aeroben Schwelle belastet wurden. 60 Minuten nach Ende der Belastung konnte ein Anstieg der Hif1 α mRNA Werte gemessen werden. Der Effekt war jedoch nicht direkt nach der Belastung feststellbar (Connolly et al. 2004). Die Arbeit gibt in ihrer Zusammenfassung zudem an, dass der Anstieg 2,4-fach gewesen sei. Tatsächlich gemessen wurde ein fraglich signifikanter 1,26-facher Anstieg mittels Oligonucleotid Microarray. Dieser Wert wurde nicht durch eine real-time PCR-Messung bestätigt. Die kompletten fold-changes sind unter <http://jap.physiology.org/cgi/data/00316.2004/DC1/1> als „*Supplemental Material*“ einsehbar.

1.3 Die Beeinflussung der Ausdauerleistungsfähigkeit über Polymorphismen des Hif1 α -Gens

Zu diesem Thema gibt es eine Reihe von Studien, die diesen Zusammenhang untersucht haben. Die maximale Sauerstoffaufnahme VO_{2max} diente stets als Marker für die Ausdauerleistungsfähigkeit. Insgesamt wurden 9 Polymorphismen beschrieben, die allerdings mit deutlich unterschiedlicher Häufigkeit auftreten und auch nicht bei allen menschlichen Rassen in gleicher Kombination zu finden waren. Hier seien nur die drei häufigen genannt

(P582S(C/T), A-2500T, T+140C) (Prior et al. 2003). Bei Amerikanern afrikanischer Abstammung zeigte sich, dass der A-2500T Polymorphismus für die seltene Variante (AT/TT) im Gegensatz zu den homozygoten A-Allelträgern zu einer erniedrigten Ausdauerleistungsfähigkeit führt. Für Kaukasier war dieses Ergebnis jedoch nicht nachzuweisen. Im Rahmen der Untersuchung des P582S (C/T) Polymorphismus wurde festgestellt, dass die Individuen, die ein CT- oder ein TT-Allel tragen, nach ihrem 60. Lebensjahr ihre Ausdauerleistungsfähigkeit mittels Ausdauertraining nicht in dem Maße erhöhen können, wie Träger des CC-Allels. Als mögliche Erklärung kommt ein Aminosäuretausch im Hif1 α -Protein in Betracht (Prior et al. 2003).

1.4 Die Zelle und ihre Reaktion auf Hypoxie

Menschliche Zellen sind in der Lage sich an Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes, im Rahmen einer Hypoxie oder eines Höhenaufenthaltes anzupassen, ohne ihre Funktion zu verlieren, ebenso wenig verringert sich darunter ihre Lebenserwartung. Die rasche Reaktion einer Zelle auf Hypoxie zeigt deutlich, dass dies eine potentiell gefährliche Situation darstellt, der die meisten Zellen nur für kurze Zeit ausgesetzt sind. In einem Zustand der Hypoxie ist die Anpassung des Energiemetabolismus der Zelle essentiell. Hierfür geht sie in den „*Hibernation state*“, der sich durch einen deutlich verminderten Energiekonsum kennzeichnet. Dabei reduziert die Zelle ihre Stoffwechselaktivität, erhöht die Sauerstoffausschöpfung und passt ihre metabolische Enzymaktivität an. Diese Anpassungsmechanismen entwickeln sich in den ersten ein bis drei Stunden nach Einsetzen einer Hypoxie (Leach und Treacher 1998) (Bertges et al. 2000) (Boutilier und St Pierre 2000). Um sich dem Zustand der Hypoxie anzupassen, kommt es zusätzlich zu einer Aktivierung von Genen durch Transkriptionsfaktoren. Der wichtigste unter diesen Transkriptionsfaktoren ist das bereits mehrfach genannte Hif1. Hif1 steuert als Transkriptionsfaktor eine große Anzahl von Genen, die unter anderem im Rahmen einer Hypoxie reguliert werden müssen. Im Folgenden

werden einige Beispiele von Genen aufgeführt, die durch Hif1 gesteuert werden.

Einige der Hif1 Zielgene führen zu einer vermehrten Sauerstoffzufuhr ins Gewebe. Ein Beispiel hierfür ist Erythropoetin, das zu einer vermehrten Bildung von Erythrozyten und damit zu einem Anstieg des Hämatokrit führt. Gleichzeitig steigt Transferrin an und sorgt damit für eine ausreichende Zufuhr von Eisen für die Bildung von Hämoglobin. Eine Gefäßdilatation, und dadurch ein vermehrter Blutfluss, wird unter anderem durch Endothelin1 erreicht. VEGF ist durch Stimulierung der Angiogenese ebenfalls an einer Verbesserung der Perfusion beteiligt (Boutillier und St Pierre 2000) (Bertges et al. 2000) (Semenza 1999) (Bunn und Poyton 1996) (Morwenna und Ratcliffe 1997) (Ratcliffe et al. 1998). Nachdem die hier genannten Gene eine Verbesserung der Blutzufuhr bewerkstelligen, gibt es noch eine ganze Reihe von Genen, die ebenfalls durch Hif1 gesteuert werden und für die intrazelluläre Anpassung verantwortlich sind. So werden durch Hif1 Schlüsselenzyme der Glukoseverwertung gesteuert, wie zum Beispiel die Hexokinase-1 und 2, Phosphofruktokinase-L, Aldolase-C, Triosephosphatisomerase, Pyruvatkinase-M, Laktatdehydrogenase-A, Enolase-1 und der Glukosetransporter-1 (Iyer et al. 1998). Die Laktatdehydrogenase ihrerseits führt zu einer Synthese verschiedener Enzyme der anaeroben Glykolyse. Die Steuerung der Glukosetransporter ermöglicht der Zelle ihre Glukoseaufnahme um bis zu 600% zu erhöhen und ist damit ein wichtiger Faktor beim Zustandekommen des Pasteur Effekts, der einen Anstieg des Glucose-Verbrauchs unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie beschreibt. Begründet ist er durch einen vermehrten anaeroben Abbau der Glucose, wobei Laktat entsteht. Da dieser Weg weniger Energie in Form von ATP liefert, steigt der Glucose-Verbrauch anfangs an. Die Zelle kann diesen Weg solange gehen und sich dadurch eine gewisse ATP-Konzentration erhalten, bis die steigenden Laktat-Spiegel sie zwingen auch diesen Weg wieder zu verlassen.

Eine weitere Funktion von Hif1 wird momentan diskutiert, wonach der programmierte Zelltod durch Hypoxie verursacht und durch Hif1 vermittelt sein könnte. Man nimmt an, dass die Hif1 α -Untereinheit durch Bindung an p53 dieses stabilisiert. Dadurch wird der proteolytische Abbau von p53 gehemmt

und es kommt zur Akkumulation von p53 unter hypoxischen Bedingungen (An et al. 1998) (Graeber et al. 1994). p53 seinerseits aktiviert Apoptose induzierende Gene wie BAX oder p21 (Semenza 1999).

Bei der Apoptose, dem gesteuerten Zelltod, kommt es, im Gegensatz zur Nekrose, nicht zu einer Intoxikation der Umgebung durch Zellinhalte der verendeten Zelle.

Bisher wurde Hif1 im Rahmen der allgemeinen und speziellen Anpassungsreaktionen des Körpers an hypoxische Belastungen als entscheidendes Regulatorgan vorgestellt. Im Folgenden wird Hif1 näher betrachtet.

1.5 Der Transkriptionsfaktor Hif1

Wie oben bereits erwähnt, spielt der Hif1-Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei den Anpassungsvorgängen der Zelle an Hypoxie. Das Hif1 α Protein ist eines der ersten Genprodukte, das unter Hypoxie vermehrt exprimiert wird (Wang et al. 1995). Typischerweise erfolgt diese Antwort auf Hypoxie im Sinne einer Überexprimierung des Hif1 α Proteins und der darauf folgenden Transkription bestimmter Gene sehr rasch innerhalb weniger Stunden.

Der Hif1-Transkriptionsfaktor hat zwei Aufgaben. Erstens führt Hif1 im Fall einer Hypoxie zur Transkription von durch Hypoxie induzierbaren Genen. Zweitens stabilisiert die Hif1 α -Untereinheit das p53-Protein während Hypoxie.

1.5.1 Der Aufbau des Hif1-Proteinkomplex

Der Hif1-Proteinkomplex ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktorenkomplex, der sich aus zwei Proteinuntereinheiten zusammensetzt (Wang et al. 1995). Diese werden als α - und β -Untereinheit bezeichnet und im Folgenden mit pHif1 α und pHif1 β abgekürzt. Die α -Untereinheit hat eine Größe von 826 Aminosäuren und ein Gewicht von 120-130kD. Die β -Untereinheit, die auch

ARNT (=aryl receptor nuclear translocator) genannt wird, hat 774-789 AS und wiegt 91-94kD (Wang und Semenza 1995). Die α -Untereinheit stellt den durch Sauerstoff regulierten Anteil des Komplexes dar. Unter Normoxie unterliegt dieser Teil dem schnellen Proteinabbau (Huang et al. 1998).

Der Hif1-Komplex als Ganzes besitzt einige Domänen mit jeweils komplett unterschiedlichen Funktionen. Die NLS-Domäne (*Amino(N)/Carbony(C) nuclear localisation signal*) steuert bei Hypoxie die Translokation in den Nukleus. Die bHLH-Domäne (*basis helix-loop-helix*) dient der Bindung an DNA und zum anderen der Dimerisation mit der jeweils anderen Untereinheit. Eine Funktion die ebenfalls durch die PAS-Domäne ausgeübt wird. Die ODD-Domäne (*oxygen dependent degradation sequence*) der α -Untereinheit ist für die sauerstoffabhängige Proteininstabilisation zuständig. Die ebenfalls in der α -Untereinheit gelegene TAD-Domäne (*Amino(N)/Carbonyl(C)*) hat die Transaktivierung als Aufgabe. Die AS-Domäne (*alternative splicing sequence*) die aus 45bp besteht, führt zu zwei unterschiedlichen Varianten der β -Untereinheit (Semenza 1999) (Semenza 2000) (Bertges et al. 2000) (Morwenna und Ratcliffe 1997).

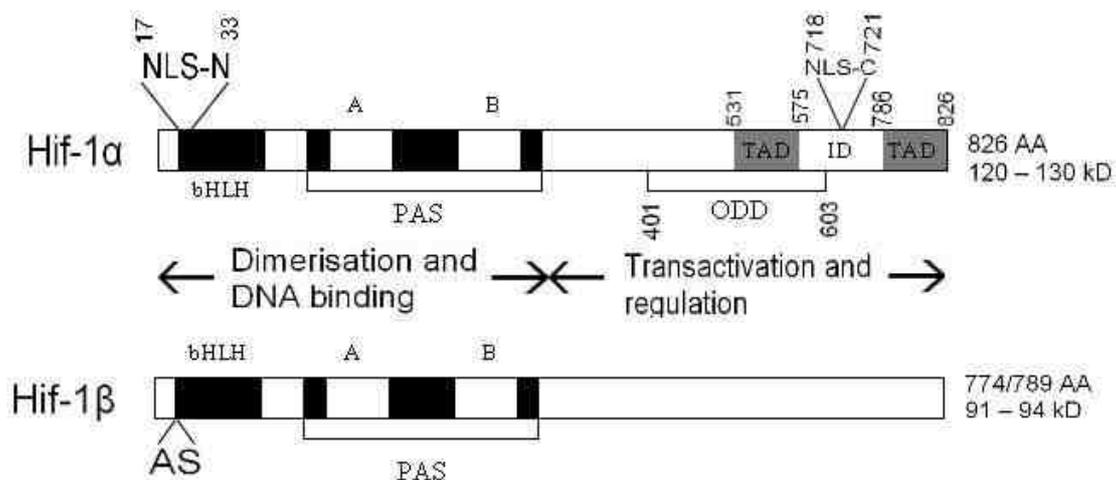


Abbildung 1: Modell der Hif1-Proteinkomplex-Untereinheiten

Im oberen Teil ist die α -Untereinheit dargestellt, im unteren Teil die β -Untereinheit. Beide Untereinheiten sind mit ihren jeweiligen funktionellen Abschnitten abgebildet. Wie zwischen den beiden Schemazeichnungen dargestellt, sind die linken Abschnitte für die Dimerisation und DNA-Bindung verantwortlich. Der rechte Anteil der Alpha-Untereinheit ist für die Transaktivierung und Regulation notwendig. Abbildung modifiziert nach Semenza 1999.

1.5.2 Regulation der Hif1-Aktivität

Wie oben bereits erwähnt, gibt es eine Reihe von Genen, die durch den Hif1-Proteinkomplex im Rahmen einer Hypoxie aktiviert werden. Im Fall einer Hypoxie wird der Abbau von pHif1 α unterdrückt. Die β -Untereinheit ist in einem stets ungefähr gleichen Maß exprimiert. Das heißt, dass die Regulation der Hif1-Aktivität lediglich durch die α -Untereinheit erfolgt. Die Halbwertszeit einer α -Untereinheit unter Normoxie beträgt lediglich 5 Minuten. Ursache hierfür ist ein ständiger Abbau, der durch eine Kaskade an Veränderungen an den α -Untereinheiten ausgelöst wird. Zuerst erfolgt eine Hydroxylierung eines Prolins durch eine O₂-gesteuerte Prolyl-Hydroxylase (Ivan et al. 2001), dann ubiquitiniert ein VHL (von-Hippel-Lindau Protein) die ODD-Domäne, was schließlich den Proteasomen signalisiert, dass diese Untereinheit zum Abbau vorgesehen ist. Dieser rasche und stetige Abbau führt dazu, dass pHif1 α unter Normoxie so gut wie nicht nachzuweisen ist. Unter Hypoxie wird der Abbau der Alpha-Untereinheit gehemmt. Eine wichtige Rolle könnten hierbei die von Mitochondrien gebildeten ROS spielen (Agani et al. 2000) (Schroedl et al. 2002). Diese Hemmung führt zu einer Akkumulation und letztlich zu einer Translokation in den Nukleus (Jiang et al. 1996) (Jiang et al. 1996) (Jewell et al. 2001).

Die Prozesse der Akkumulation und Translokation, werden zum einen durch sinkende VHL-Spiegel begründet (Ameln et al. 2005), zum anderen spielt die Stabilisierung der ODD-Domäne eine wichtige Rolle (Wenger 2000). Der genaue Vorgang bei dieser Stabilisierung ist leider noch unklar, eine mögliche Phosphorylierung steht allerdings im Raum. Das Ausmaß der Hypoxie korreliert in einem gewissen Rahmen exponentiell mit der Aktivität von Hif1 und der damit einhergehenden Transkription verschiedener Gene (Morwenna und Ratcliffe 1997). Voraussetzung für eine gesteigerte Gentranskription über Hif1-Aktivierung ist sowohl eine erhöhte Hif1-DNA-Bindungsaktivität als auch das Vorliegen erhöhter pHif1 α - und pHif1 β -Konzentrationen (Jiang et al. 1996). Zuerst erfolgt eine Hif1 α -Abbauhemmung mit folgender Akkumulierung. Dann wandert es in den Kern und fusioniert dort mit der β -Untereinheit. Das nun

vollständige Hif1-Protein bindet an spezifische Hif1-Bindungsstellen des Genoms, wobei eine Reihe von transkriptionellen Cofaktoren benötigt wird. Hier sei beispielhaft *Histone* acetyltransferase CBP/p300 und HSP90 (*heat shock protein*) genannt.

Die Hif1-Bindungsstellen werden HBS-Sequenzen (*Hif binding site*) genannt. Hier bindet Hif1 mit seiner bHLH-Domäne an zu aktivierenden Gen. Die HBS-Sequenz ihrerseits liegt wiederum in der HRE-Region (*hypoxia response element*) des entsprechenden Gens.

Eine solche HRE-Region wurde das erste Mal im Jahre 2000 von Wenger beschrieben. Die beschriebene HRE-Region hat eine Länge von 50bp, enthält die Basensequenz 5'-TACGTCGT-3' und befindet sich auf dem EPO-Gen. Zusätzlich zu der Hif1-Bindungsstelle sind noch mindestens vier weitere Bindungsstellen vorhanden (Wenger 2000). Der nun folgende Schritt ist die Transkription dieser Gene mit darauf folgender Translation.

1.5.3 Regulation von Hif1 α auf Transkriptionsebene

Das Hif1 α -Gen ist auf Chromosom 14q20-24 lokalisiert und enthält nach momentanem Wissensstand 15 Exons. Es wurden viele Studien durchgeführt, welche sowohl die Reaktion der Hif1 α mRNA als auch des Hif1 α -Proteins auf Ausdauerbelastung untersucht haben. Im Gegensatz zur mRNA, wird pHif1 α unmittelbar nach Belastungsbeginn auf posttranslationaler Ebene hochreguliert, indem sein Abbau gehemmt wird (Gustafsson et al. 2002) (Gustafsson et al. 1999) (Vogt et al. 2001). Es spielt jedoch eine Rolle, ob diese Belastung unter Hypoxie oder Normoxie stattfindet. Eine Belastung unter Normoxie führt zu höheren Hif1 α -Proteinspiegeln als unter Hypoxie (Wagner 2001).

Bei einer Untersuchung von Lungenepithelzellen unter längerer Hypoxie, wurde festgestellt, dass sich die Proteinlevel 4 Stunden nach Hypoxiebeginn auf dem höchsten Niveau befanden und nach 6 Stunden bereits wieder im Abfallen waren. Nach 12 Stunden war die Konzentration sogar schon wieder auf dem Ausgangsniveau angekommen. Die mRNA Niveaus zeigten in den ersten 6

Stunden nach Hypoxiebeginn keine Veränderungen im Gegensatz zur Normoxie. Erst nach 6 Stunden erfolgte ein rapider Abfall der Konzentrationswerte, der bis 12 Stunden nach Hypoxiebeginn anhielt (Uchida et al. 2004). Es wurde geschlussfolgert, dass die steigenden Hif1 α -Proteinkonzentrationen durch eine negative Rückkopplung für den Abfall der Hif1 α -mRNA-Konzentrationen verantwortlich sein könnten.

1.5.4 Posttranskriptionelle Prozessierung der Hif1 α mRNA

Nach Ablesung der DNA entsteht primär eine hnRNA (heteronukleäre RNA). Diese hnRNA wird über verschiedene Schritte in eine mRNA prozessiert. Zuerst erfolgt das Anhängen eines GTP an das 5'-Ende der hnRNA über eine 5'-5' Bindung mit Methylierung des Guanosins. Diese erste Modifikation wird Kappe genannt. Jetzt sorgt eine Poly-A-Polymerase für den Poly-A-Schwanz und damit für die zweite Modifikation. Dieser Poly-A-Schwanz besteht meist aus ungefähr 250 Adenosinmonophosphaten in einer Kette. Er wird an das 3'-Ende der hnRNA, direkt hinter das Transkriptionsstoppsignal 5'-AATAAA-3' gehängt. Das Transkriptionsstoppsignal wird auch Poly-A-Signal genannt und befindet sich auf dem kodierenden Strang. Zu Letzt wird die hnRNA gesplitt. Das bedeutet, dass die Introns (nicht-kodierende Genabschnitte) entfernt und die Exons (kodierende Genabschnitte) zusammengefügt werden. Jedes Gen besteht aus Exons, muss aber nicht zwingend Introns enthalten. Diese variieren in ihrer Länge und Anzahl zwischen den verschiedenen Genen. Zwischen Exon und Intron im Bereich des Introns befinden sich Splicesignale, die von Spleißosomen erkannt werden. Diese Spleißosomen bestehen aus snRNA Molekülen und Proteinen. Im Gegensatz zum „traditionellen“ Splicing, gibt es noch ein so genanntes alternatives Splicen. Hierbei kommt es neben einer Entfernung der Introns zusätzlich zu einer Entfernung bestimmter Exons. Hier kann als weitere Modifikationsstelle die teilweise Entfernung bestimmter Introns auftreten. Im Falle von Hif1 sind 2 Varianten beschrieben, die sich lediglich durch das Fehlen von Exon 14 unterscheiden (Kimura et al. 2006) (Hogenesch

et al. 1997). Ort all dieser Modifikationen ist der Zellkern. Diese Modifikationen regulieren den Abbau der mRNA, ihren Transport aus dem Nukleus und die Translation in Proteine durch Ribosomen. Die Konsequenz des alternativen Splicens ist eine erhöhte Proteinviefalt, die zusätzlich durch das Editieren der mRNA (das Vertauschen einzelner DNA-Basen) erhöht wird. In diesem Zusammenhang ist auch die differentielle Polyadenylierung zu erwähnen.

Das Ende der Transkription wird Termination genannt und ist definiert als der Punkt, ab dem die RNA-Polymerase keine weitere Synthese betreibt. Das Signal 5'-AATAAA-3' stellt solch ein Stoppsignal dar. Auch sehr ähnliche Signale können die Aufgabe als Stoppsignal übernehmen, das zweithäufigste ist hierbei 5'-AUUAAA-3'. Unmittelbar *downstream* dieses Signals, im Durchschnitt ca. 5-10 Nukleotide, wird ein Polyadeninschwanz (Poly-A-Tail) an die mRNA synthetisiert. Aus diesem Grund werden diese Signale auch Poly-A-Signale genannt (Tian et al. 2005). Von diesen Signalen müssen die Stoppsignale unterschieden werden, die im Rahmen der Translation einer mRNA durch Ribosomen im Zytoplasma den Abbruch einer Aminosäurekette und damit das Ende eines Proteins signalisieren. Im Fall von Hif1 α wird die differentielle Polyadenylierung durch verschieden starke Poly-A-Signale reguliert. Die von der Zelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten gebildeten Faktoren bewirken, dass das vorangehende, schwächere Poly-A-Signal berücksichtigt wird oder nicht. Dieser Prozess des Überlesens mancher Poly-A-Signale wird differentielle Polyadenylierung genannt und es wird vermutet, dass dieser Mechanismus zu einer erhöhten Anzahl von Varianten führt, vor allem jene mit unterschiedlich langem 3'Ende. Die differentielle Polyadenylierung dient jedoch nicht der Erhöhung der Proteinviefalt, sondern der differentiellen Regulierbarkeit der Proteinexpression (Simon et al. 2004). Eine Besonderheit des Hif1 α Genlokus ist, dass bereits die Expression einer so genannten antiHif1 α mRNA in *cis* nachgewiesen werden konnte (Thrash-Bingham und Tartof 1999). Bei solchen Transkripten handelt es sich um *cis natural antisense transcripts* (*cisNATs*). Diese werden vom komplementären DNA-Strang des jeweiligen *sense* Transkriptes abgelesen. Im Fall von Hif1 α konnte nachgewiesen werden, dass sich in Folge dieser gegenläufigen Transkription

die jeweiligen 3´Sequenzbereiche der gebildeten Transkripte überlappen. Die Transkripte sind somit in weiten Teilen komplementär zueinander. Diese Feststellung ist besonders wichtig, weil bekannt ist, dass die Ausbildung doppelsträngiger RNA ein Mechanismus ist, welcher auf vielfältige Weise Einfluss auf die Proteinexpression nehmen kann. Ein Beispiel für die Regulation der Genexpression durch RNA-RNA Interaktion ist die Steuerung der Genexpression durch RNA Interferenz. Die RNA Interferenz wurde im Jahre 1998 entdeckt. Vermittler dieser RNA Interferenz sind so genannte microRNA´s (miRNA´s). Diese miRNA´s sind in der Lage an die jeweils für sie passende mRNA zu binden. miRNA´s gehören ihrerseits zur Klasse der non-coding RNA´s (ncRNA´s), da sie für kein Protein kodieren. Die RNA Interferenz ist der am meisten beachtetste Mechanismus zur Regulation der Genexpression. Für die Entdeckung dieses Mechanismus wurde im Jahre 2006 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen (Fire et al. 1998). Kürzlich wurde die Bedeutung der Expression von unterschiedlichen ncRNA´s inklusive der miRNA´s herausgefunden (Katayama et al. 2005). Es wird angenommen, dass die sense-antisense Interaktion auch zur RNA-Interferenz führt, womit der antisense mRNA eine sehr hohe Bedeutung bei der Regulation der Proteinsynthese zukäme.

1.5.5 Varianten der Hif1 α mRNA

Gothie et al. konnten 4 verschiedene Varianten der konventionellen Hif1 α mRNA nachweisen. Diese sind durch alternatives Splicen entstanden. Sie enthalten fakultativ das Exon 14 und ein TAG-Basentriplett am Übergang zwischen Exon 1 und 2. Die Hif1 α mRNA Variante mit Exon 14 ist die am häufigsten exprimierte Variante. Damit könnte man sie auch als die eigentliche konventionelle Hif1 α mRNA bezeichnen (Gothie et al. 2000).

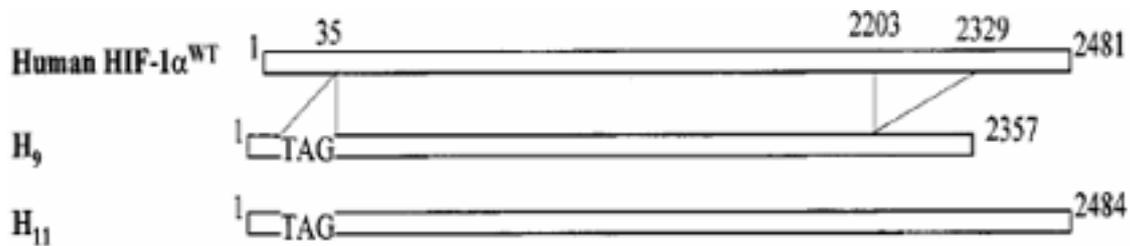


Abbildung 2: Die bekannten mRNA Splicevarianten des konventionellen Hif1 α

Die in der Abbildung angegebenen Zahlen stellen den Abstand vom Beginn der Hif1 α mRNA dar. In der obersten Zeile ist die konventionelle Hif1 α mRNA zu sehen, die das Exon 14 enthält. In der zweiten Zeile ist die Variante ohne Exon 14 zu sehen. In der dritten Zeile ist die Hif1 α mRNA zu sehen, die sowohl das Exon 14 als auch das Basentriplett TAG enthält. Abbildung nach Gothie et al. 2000.

In anderen Arbeiten werden noch weitere Hif1 α mRNA Varianten beschrieben (Chun et al. 2002) (Chun et al. 2001) (Depping et al. 2004) (Lee et al. 2004) (Lukashev et al. 2001). Auf diese soll hier jedoch nicht näher eingegangen werden, da sie bisher jeweils nur von einer Arbeitsgruppe gefunden werden konnten. In unserer Arbeit unterscheiden wir Hif1 α mRNA Varianten mit Exon 14 von denen ohne Exon 14.

1.6 AntiHif1 α

Wie oben bereits beschrieben, besteht eine negative Rückkopplung zwischen pHif1 α und Hif1 α mRNA. Diese Rückkopplung könnte durch die Induktion von aHif1 α (antiHif1 α) vermittelt sein. Oft wird im Falle von aHif1 α von einer mRNA gesprochen, obwohl es nach neuer Terminologie eine *non-coding* RNA (ncRNA) ist. aHif1 α ist eine RNA, deren Länge anfangs unterschätzt wurde (Thrash-Bingham und Tartof 1999) und die momentan mit einer Länge von ungefähr 1800bp angegeben wird (Rossignol et al. 2002). Zum ersten Mal wurde aHif1 α im nicht-papillären klarzelligen Nierenzellkarzinom nachgewiesen (Thrash-Bingham und Tartof 1999). Mittlerweile konnte es jedoch auch in zahlreichen anderen Geweben nachgewiesen werden (Rossignol et al. 2002).

Zudem konnte gezeigt werden, dass aHif1 α durch Hypoxie in Lymphozyten induziert werden kann, bei einer gleichzeitig festgestellten Verminderung der Hif1 α mRNA (Thrash-Bingham und Tartof 1999). Des Weiteren konnte mittels Kobalt-Chlorid, das Hypoxie mimetisch wirkt, ein Abfall von Hif1 α mRNA und ein Anstieg von aHif1 α in Nervengewebe ausgelöst werden (Rossignol et al. 2004). Dies weist auf eine regulatorische Rolle von aHif1 α in der Antwort der Zelle auf Hypoxie hin. In diesem Zusammenhang ist jedoch von Bedeutung, dass der Anstieg von aHif1 α , und damit auch der Abfall der Hif1 α mRNA, erst nach einer gewissen Zeit (4 Stunden) einsetzt, wenn pHif1 α bereits beginnt abzufallen (Wang et al. 1995). aHif1 α könnte folglich für die verminderte Expression von pHif1 α während andauernder Hypoxie verantwortlich sein (Thrash-Bingham und Tartof 1999). Dieser Regulationsmechanismus eines Transkriptes durch Expression seines entgegengesetzten Transkriptes wurde bereits für zahlreiche Gene beschrieben (Chang et al. 1991) (Farrell und Lukens 1995) (Hastings et al. 1997) (Kumar und Carmichael 1997) (Malik et al. 1995).

Als Nebeneffekt einer andauernden Hypoxie, und damit einer vermehrten aHif1 α Expression und eines Rückganges von pHif1 α , können Auswirkungen auf p53 auftreten. p53 wird wie oben bereits erwähnt durch pHif1 α stabilisiert. Im Fall eines Abfalls von pHif1 α , führt dies auch zu einer Verringerung von p53. Da p53 ein Tumorsuppressorgen ist, könnte ein Verlust der p53-Funktion zu einem unregelmäßigen Zellwachstum führen (Agarwal et al. 1998) (Levine 1997) (Levine et al. 1991).

Im Fall des Mamma-Ca´ wurde eine deutliche Signifikanz zwischen den aHif1 α Expressionswerten und der Prognose gefunden. Frauen, die hohe aHif1 α Expressionswerte aufwiesen, zeigen eine deutlich schlechtere Prognose (Cayre et al 2003).

Thrash-Bingham et al., die aHif1 α als erste nachweisen konnten, sahen aHif1 α als ein wichtiges regulatorisches Element an (Thrash-Bingham und Tartof 1999).

Im Jahre 2004 konnten Rossignol et. al zeigen, dass sich die Expression von aHif1 α und Hif1 α in unterschiedlichen Geweben auch unterschiedlich verhält.

Sie schlussfolgerten, dass aHif1 α und Hif1 α viel eher unter der Kontrolle von gewebsspezifischen Faktoren stehen könnten, als unter der Kontrolle von Hypoxie (Rossignol et al. 2004).

1.6.1 Sequenz von aHif1 α

Ursprünglich wurde aHif1 α zuerst von Thrash-Bingham et al. beschrieben (Thrash-Bingham und Tartof 1999). Im Jahre 2002 konnten Rossignol et al. die vorhandene aHif1 α -Sequenz erweitern und zudem die Lage des vermeintlichen Promotors angeben. Nach dieser Arbeit, die bis zum heutigen Tage Stand der Dinge ist, umfasst aHif1 α ca. 1800bp. Der 3' Abschnitt ist über eine Länge von 1027bp streng komplementär zur 3'UTR der Hif1 α mRNA. Damit ist dieser Teil in der Lage an die 3'UTR der Hif1 α mRNA zu binden (Rossignol et al. 2002). Es wird aus diesem Grund auch als natürliches antisense Transkript der Hif1 α mRNA angesehen. Der 5' Abschnitt weist keine Komplementarität zur Hif1 α mRNA auf. aHif1 α wird aus der Hif1 α Gensequenz abgeleitet, welche für die 3'UTR der Hif1 α mRNA kodiert. Der aHif1 α humane Genpromotor weist mutmaßliche HRE-Regionen auf und liegt ungefähr 2800bp downstream des Endes von Hif1 α (Rossignol et al. 2002).

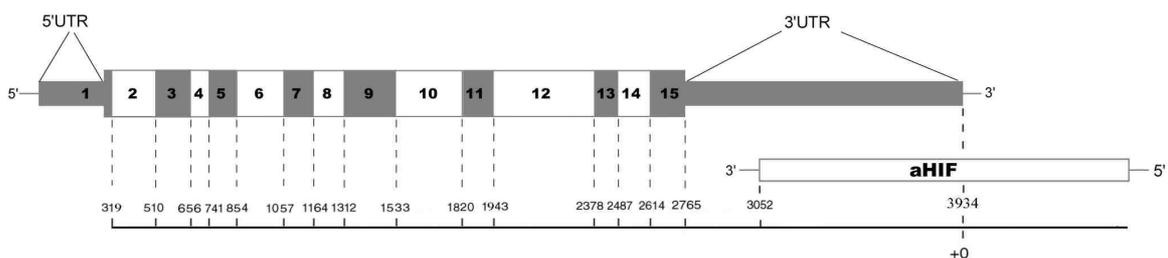


Abbildung 3: Darstellung der bisher gefundenen aHif1 α -Variante und der Hif1 α mRNA

Die breit dargestellten Abschnitte der Hif1 α mRNA stellen Protein kodierende Abschnitte dar. Die schmalen Abschnitte sind die nicht Protein kodierenden Anteile. Das Exon 14 ist ein fakultativ vorhandenes Exon. Der überlappende Bereich ist der oben erwähnt komplementäre Sequenzabschnitt. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf den genomischen Abstand bezüglich der Hif1 α mRNA. 0 findet sich am Beginn des Exon 1. Ab +0 beginnt der zusätzliche Bereich, der über das 3' Ende der Hif1 α mRNA hinausgeht.

1.6.2 Funktionsweise von aHif1 α

Da aHif1 α über einen weiten Bereich komplementär zum 3'UTR der Hif1 α mRNA ist, kann es sehr stabile Bindungen mit diesem Bereich eingehen. Auf der 3'UTR der Hif1 α mRNA finden sich zahlreiche AUUUA-reichen Elemente (*AU-rich elements* – ARE). Diese Elemente liegen im Bereich der Komplementarität zwischen aHif1 α und der Hif1 α mRNA. Diese ARE werden auch als Instabilitätselemente bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass diese ARE Proteine wie Tristetraprolin oder AU-rich RNA-Bindungsprotein binden. Zusätzlich werden diese Bindungsproteine ubiquitiniert und damit wird der Abbau über den proteasomalen Weg eingeleitet. Dieser Prozess der Proteinanlagerung und Ubiquitinierung steuert den AU-rich mRNA Durchsatz (Laroia et al. 1999) (Laroia et al. 2002). Im Fall der Hif1 α mRNA werden diese ARE von weiteren Elementen gleicher Funktion begleitet (UUAUUUAUU). Eine Voraussage der Sekundärstruktur mittels Computeranalyse erbrachte das Ergebnis, dass die ARE der Hif1 α mRNA im Bereich einer Haarnadelstruktur liegen. Damit sind sie gut gegen Proteinanlagerung geschützt (Mathews et al. 1999) (Zuker 1994). Durch Anlagerung der komplementären aHif1 α an die 3'UTR Region der Hif1 α mRNA, kommt es zu einer Konformationsänderung. Im Rahmen dieser Konformationsänderung gehen die Haarnadelstrukturen verloren und die ARE werden zugänglicher. Dies führt zu einer einfacheren Proteinbindung und damit auch zu einem schnelleren mRNA Abbau auf Translationsebene, falls eine Translokation des Hif1 α /aHif1 α Komplexes ins Zytoplasma erfolgt (Curatola et al. 1995). Eine ähnliche Stabilisationsweise wurde bereits für die VEGF mRNA gefunden. Hier sind ebenfalls ARE im 3'UTR Bereich der mRNA gefunden worden (Levy et al. 1997).

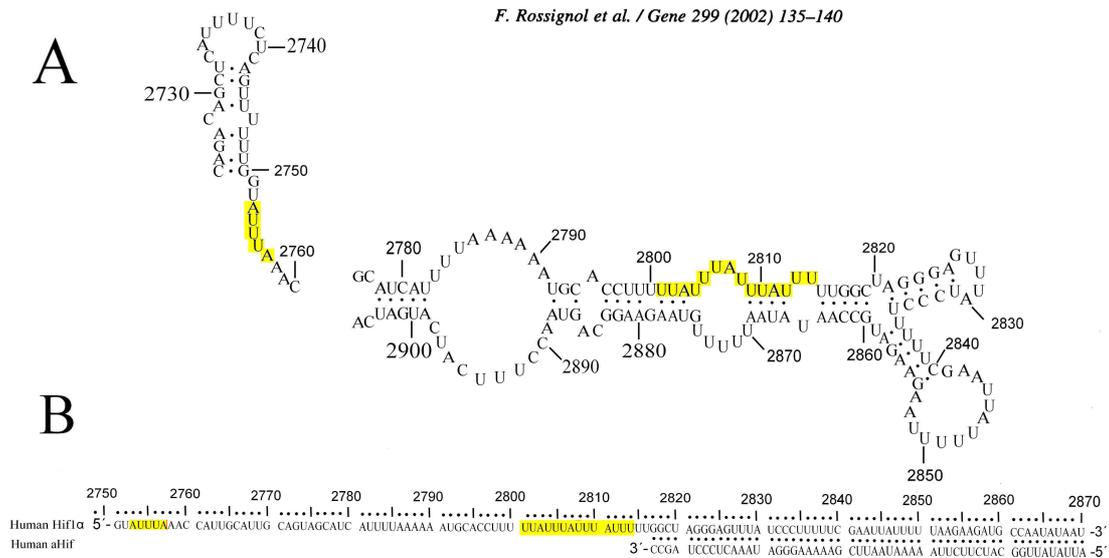


Abbildung 4: Funktionsweise von aHif1α

Diese Abbildung stellt den oben beschriebenen Sachverhalt dar. Die hinter den Strichen stehenden Zahlen definieren den Abstand der entsprechenden Base von dem Beginn der Hif1α mRNA. Punkte zwischen den Basen weisen darauf hin, dass sich der Computeranalyse folgend an entsprechenden Stellen eine Bindung zwischen zwei komplementären Basen ausbildet. Im Teilschaubild A ist ein zweidimensionales Modell eines Teiles der Hif1α mRNA zu sehen. Es wird dargestellt, wie durch Bildung von Haarnadelstrukturen die ARE geschützt werden. Die ARE sind zart grau unterlegt. Im Teilschaubild B ist dargestellt, wie durch Hybridisierung mit aHif1α die Haarnadelstrukturen verloren gehen. Abbildung modifiziert nach Rossignol et. al 2002.

1.6.3 Phylogenetische Konservierung von aHif1α

Wie für den 3'UTR Bereich von Hif1α konnte auch für aHif1α eine hohe phylogenetische Konservierung nachgewiesen werden. Zwischen Mensch, Ratte und Maus konnte eine ausgeprägte Übereinstimmung zwischen den 3'Enden nachgewiesen werden. Diese Übereinstimmung im Bereich der Komplementarität zur 3'UTR Region der Hif1α mRNA war zu erwarten, seit die hohe Konservierung der 3'UTR Region bei Säugetieren bekannt ist (Zou et al. 2001), da eine Mutation in diesem Bereich zu einer Verminderung der Bindungsstärke zwischen Hif1α mRNA und aHif1α führen würde

1.7 Arbeitshypothesen

Sehr viele Studien haben sich mit der Fragestellung befasst, ob Hif1 α auf Proteinebene reguliert wird. Momentan liegt lediglich eine Arbeit vor, die aussagt, dass der Regulationsmechanismus über die Stabilisierung des Proteins in vivo tatsächlich von Bedeutung ist (Ameln et al. 2005). Dem gegenüber steht eine Reihe von Arbeiten, die einer transkriptionellen Regulation von Hif1 α eine Bedeutung zumessen (Lundby et al. 2006) (Connolly et al. 2004).

aHif1 α könnte im Fall einer transkriptionellen Regulation von Hif1 α eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund erhoffen wir uns durch die nähere Untersuchung der differentiellen Expression von aHif1 α und Hif1 α einen ersten Beitrag zur Aufklärung der Relevanz von aHif1 α leisten zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung von Probenmaterial

2.1.1 Erschöpfende Ausdauerbelastung (Nikolauslauf)

Die ausgewählten Probanden waren alle Ausdauerathleten, die an einem Halbmarathon teilgenommen haben. Ihnen wurde 10 Minuten vor dem Start und direkt nach der Ankunft im Ziel jeweils 10ml venöses Blut entnommen. Insgesamt handelte es sich um 7 Probanden, die über eventuelle Risiken der Blutentnahme vorher aufgeklärt worden sind.

2.2 Zur Verfügung gestellte RNA-Proben

Die im Folgenden genannte Proben, wurden nicht von uns gewonnen, sondern wurden uns aus anderen Laboratorien zur Verfügung gestellt.

Die Proben waren stets RNA Proben.

2.2.1 THP1-Zellreihe

Die THP1-Zellreihe, THP1-Zellen sind Bestandteile einer akuten monozytären Leukämie, die uns von Frau PD Dr. Cora Weigert zur Verfügung gestellt wurde, verwendeten wir zur Differenzierung der zellulären Lokalisation unserer Amplikons. Insgesamt führten wir für jedes Amplikon 6 Messungen durch. Zuerst bestimmten wir die Expressionswerte des Amplikons in der Gesamt-RNA der Zellen („total“). Auf diesen Messwert wurden alle weiteren Messwerte bezogen, er diente uns also als Referenzwert. Für die Kompartimente Nukleus („nucl.“) und Zytoplasma („cytopl.“) ermittelten wir jeweils zwei Messwerte. Dies

war uns möglich, da die Aufreinigung für diese zwei Kompartimente zweimal durchgeführt wurde. Die zweite Messung ist im Ergebnisteil durch den Zusatz „2“ zu der Kompartimentangabe gekennzeichnet.

In einer weiteren Messung bestimmten wir die Expressionswerte durch Mischen gleicher RNA-Mengen des Nukleus und des Zytoplasmas („cytopl. + nucl.“). Beim Umschreiben der RNA in cDNA verwendeten wir für die Kompartimente Nukleus und Zytoplasma die gleichen Mengen an Gesamt-RNA. Da in der Realität die im Nukleus vorhandenen RNA-Mengen viel geringer sind als die im Zytoplasma, sind die Messergebnisse kritisch zu betrachten. Aus diesem Grund nahmen wir 7sk in unsere Untersuchung mit auf. 7sk ist eine *small nuclear RNA*, und kommt vorwiegend im Nukleus vor. Zudem untersuchten wir GAPDH, das vorwiegend im Zytoplasma zu finden ist. Dieses Wissen ermöglichte uns, die Messergebnisse unserer Amplikons mit 7sk und GAPDH zu vergleichen und eine Aussage über die Lokalisation machen zu können. Da die RNA Proben bereits aufgereinigt waren, wurden sie direkt der unter 2.3.6 beschriebenen Reversen Transkription zugeführt.

2.2.2 Myotubenzellkultur

Auch hier bekamen wir aus dem Labor von Frau PD Dr. Cora Weigert RNA Proben zur Verfügung gestellt. Zum Einsatz kamen Satellitenzellen, die durch eine Muskelbiopsie in den lateralen Anteil des „Musculus quadriceps femoris“ gewonnen wurden. Im ersten Teil des Versuches stimulierten wir die Proben mit Kobaltchlorid, das Hypoxie-mimetisch wirkt. Im zweiten Teil wurden Myoblasten durch eine Stimulation zur Differenzierung zu Myotuben angeregt. Da die RNA Proben bereits aufgereinigt waren, wurden sie direkt der unter 2.3.6 beschriebenen Reversen Transkription zugeführt.

2.2.3 Screening mehrerer Gewebe

Bei dem unter 3.8 beschriebenen Screening mehrere Gewebe kamen diverse Proben zum Einsatz. Diese Proben wurden uns mit Ausnahme der PBMC's von anderen Personen zur Verfügung gestellt (Tabelle 1).

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

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Fremdproben

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die im Rahmen des Screeningversuches eingesetzten RNA-Proben. In der linken Spalte ist das Gewebe angegeben aus dem die Proben entnommen wurden. In der rechten Spalte sind die Namen der Spender aufgelistet haben.

Auch bei diesen Proben handelte es sich um aufgereinigte RNA Proben, die wir direkt der Reversen Transkription zuführten.

2.3 Verarbeitung der Proben

2.3.1 Isolierung der PBMC-Fraktion aus den Nikolauslaufproben

Die PBMC-Fraktion des Blutes besteht aus Lymphozyten und Monozyten. Um diese Bestandteile umgehend zu isolieren, wurde Lymphoflot benutzt (Biotest AG, Dreieich). Im ersten Arbeitsschritt wurden je 20ml Blut mit 20ml PBS-Puffer verdünnt. In eine doppelt so hohe Anzahl an neuen Cups wurden je 20ml Lymphoflot gegeben und in je 2 Cups je 20ml der gleichen verdünnten Blutprobe. Das Lymphoflotgemisch hat eine niedrigere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten, jedoch eine höhere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. Dies erlaubt das Trennen der beiden Fraktionen durch Zentrifugation. In diesem Falle wurden die Proben 20 Minuten mit 2100rpm zentrifugiert und damit die beiden Fraktionen aufgetrennt. Da die Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten spezifisch leichter sind als das Lymphoflotgemisch, stellten sie die obere Fraktion dar und konnten bequem abpipettiert werden. Anschließend wurden sie jeweils mit PBS-Puffer in Cups pipettiert, so dass sich ein neues Volumen von 50ml ergab. Das Trennen der Lymphozyten und Monozyten erfolgte durch erneutes Zentrifugieren. Aus den jeweils 50ml wurden je 300µl entfernt, um anschließend mittels des Zellzählers CellDyn (Abbott, Ludwigshafen) deren Zellegehalt bestimmen zu können. Die verbleibenden 49,7ml wurden jeweils für 10 Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Das am Boden entstandene Zellpellet wurde durch Dekantieren vom Überstand befreit und anschließend getrocknet. In Abhängigkeit vom vorher gemessenen Zellgehalt wurden die getrockneten Pellets in PBS-Puffer gelöst, so dass sich eine Lösung mit der Konzentration von 107 Zellen pro ml Lösung ergeben hat. Aus dieser resultierenden Lösung wurde jeweils 1ml entnommen und mit 9ml PBS-Puffer aufgefüllt, so dass 10ml neue Lösung entstanden sind. Diese 10ml wurden für 10 Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abpipettiert und in 600µl RLT-Puffer gelöst.

2.3.2 RNA-Extraktion

Die Extraktion der zellulären RNA unseren Proben, erfolgte mit dem PAXgene™ Blood RNA Kit (PreAnalytix, Quiagen GmbH, Hilden).

Wir folgten den Empfehlungen des Herstellers und inkubierten die Proben zuerst zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden sie 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert und das verbliebene Pellet wurde mit 5ml RNase freiem Wasser versetzt. Anschließend benutzten wir einen Vortexer (REAXtop, Heidolph) um alles gut zu mischen. Im Anschluss folgte der nächste Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 4000g). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurde in 360µl BR1-Pufferlösung gelöst. Nach weiterer Zugabe von 300µl Puffer BR2 und 40µl Proteinase K wurde das Gemisch inkubiert, bei 55°C für 10 Minuten. Nach diesen 10 Minuten und einem weiteren Zentrifugationsschritt ergaben sich zwei Phasen. Die untere der beiden Phasen verwarfen wir durch Abpipettieren. Die verbleibende „obere“ Phase ergänzten wir mit 350 µl Ethanol. Da die Füllmenge der Säulen und Cups leider begrenzt war, mussten wir unser Probengemisch in zwei Sitzungen auf die PAXgene-Säule auftragen. Im ersten Durchgang trugen wir 700µl auf und setzten die Säule dann auf ein leeres Cup. Dieses zentrifugierten wir für 1 Minute bei 8000g und wiederholten den Vorgang mit dem Rest unseres Gemisches. Aus Reinigungsgründen wiederholten wir den Vorgang dreimal mit 700µl Pufferlösung Br3 und je zweimal mit 500µl Pufferlösung Br4. Um unsere jetzt vollständig gereinigte Probe aus der Säule lösen zu können, gaben wir 40µl BR5 Pufferlösung auf die Säule und zentrifugierten diese für 1 Minute bei 8000g. Diesen Vorgang wiederholten wir noch einmal. Anschließend inkubierten wir die Probe bei 65°C für 5 Minuten und froren sie letztlich ein.

2.3.3 Isolierung der Gesamt-RNA und DNase-Verdau

Für diese Aufgabe benutzten wir den RNeasy-Midi-Kit (Quiagen GmbH, Hilden) mit seinen Standardprotokollempfehlungen. Zuerst haben wir die Proben in 88µl

RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zu jedem Cup gaben wir 2µl DNase (RNase-free DNase-set Quiagen GmbH, Hilden) und 10µl DNase Puffer (1M Natriumacetat und 50mM Magnesiumsulfat mit Salzsäure auf pH5 titriert) hinzu. Um einen ausreichenden Verdau der DNA zu garantieren, ließen wir das Gemisch bei Raumtemperatur für 1 Stunde stehen. Im Anschluss deaktivierten wir das DNase-Enzym in den Cups mittels eines Hitzeblocks (Digital Dry Block Heater, PMC), durch Erwärmen der Proben für 10 Minuten auf 65°C.

2.3.4 RNA-Aufreinigung

Im Folgenden wurden die Proben so gut wie möglich von eventuellen Verunreinigungen befreit. Zuerst wurden die Proben mit je 400µl Phenol/Chloroform (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert (E BA 12R, Hettich). Von den daraus resultierenden zwei Phasen wurde die untere abpipettiert und verworfen. Die obere Phase wurde je mit 400µl Chloroform/Isoamylalkohol (Sigma-Aldrich GmbH, München) versetzt und erneut für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Erneut entstanden zwei Phasen, wovon wiederum die untere durch Abpipettieren verworfen wurde. Die oberen Phasen wurden nun jeweils mit 10µl Natriumacetat (Merck, Darmstadt) versetzt, um eine Ausfällung der Gesamt-RNA zu erreichen. Zusätzlich gaben wir noch 250µl EtOH (Merck, Darmstadt) hinzu und inkubierten die Proben 30 Minuten lang bei -70°C. Im nächsten Arbeitsschritt zentrifugierten wir die Proben bei 4°C und 14000rpm für 15 Minuten. Das entstandene Pellet am Boden des Cups enthielt nun die Gesamt-RNA. Der Überstand wurde dekantiert und die Probe zweimal mit 70% EtOH versetzt. Nach jedem Zugeben wurde die Probe inkubiert und zentrifugiert. Letztlich entstand ein RNA-haltiges Pellet, das unter Raumbedingungen getrocknet und jeweils in 20µl 10mM Tris-Puffer bei pH8 gelöst wurde.

2.3.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Proben erfolgte, um alle Proben auf eine RNA-Konzentration von 50ng/µl anpassen zu können. Dies war nötig, um vor dem nächsten Schritt, der cDNA-Gewinnung, eventuelle Konzentrationsunterschiede ausgleichen zu können. Für diesen Vorgang benutzten wir ein Photometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Mittels dieses Photometers waren wir nun in der Lage, durch Zugabe von Reinstwasser (Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg), alle RNA-Proben auf unsere gewünschte Zielkonzentration zu verdünnen.

2.3.6 Reverse Transkription

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte benötigten wir, um je 250ng Gesamt-RNA enzymatisch in cDNA (*complementary DNA*) umzuschreiben. Dazu verwendeten wir ein RT-Reagenz. Dieses RT-Reagenz bestand aus 50U RNase Inhibitor, 50U MuIV Reverse-Transkriptase-Enzym (M-MLV RT, Promega, Mannheim), je 1mM dNTP, 5mM MgCl² und 10mM Trispuffer pH 8,3. Im nächsten Schritt wurde je 5µl aufgereinigte RNA-Probe mit 1 µl 100mM Random Hexameren gemischt. Die Random Hexamer setzen sich aus einem Gemisch aus gleichen Anteilen von dATP, dGTP, dCTP, dTTP zusammen. Die Proben wurden anschließend 10 Minuten lang bei 70°C inkubiert und anschließend bei 4°C gekühlt. In diesem 4°C-Schritt pipettierten wir zu jedem Ansatz oben beschriebene RT-Reagenz hinzu. Zusätzlich zu den Proben erzeugten wir eine no-RT-control. Diese bestand zwar aus RNA-Probe, aber im Gegensatz zu den anderen Proben gaben wir Reinstwasser anstelle von RT-Reagenz hinzu. Diese zusätzliche Probe legten wir als Negativkontrolle an, um später Verunreinigung durch genomische DNA ausschließen zu können. Im Anschluss unterzogen wir alle Proben, auch die no-RT-control, fünf weiteren PCR-Schritten. Diese lauteten wie folgt: 50 Minuten bei 37°C, 5 Minuten bei

90°C, 30 Sekunden bei 4°C, 5 Minuten bei 90°C und zuletzt endlich bei 4°C. Die fertigen cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.4 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren, welches zur annähernd exponentiellen Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet werden kann. Sie fand erstmalige Verwendung im Jahre 1986 durch K.Mullis. Für eine erfolgreiche PCR werden bestimmte Zutaten benötigt. Zuerst braucht man natürlich einen zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Dieser kann entweder in nativer DNA oder cDNA enthalten sein. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt sollte zwischen 60 und 140 Basenpaaren lang sein, um optimale PCR-Ergebnisse zu erhalten. Zudem muss von dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt die Nukleotidsequenz am Anfang und Ende bekannt sein, um die Primerpaare spezifisch auswählen zu können. Primer sind kurze DNA-Einzelstrangstücke, die jeweils ungefähr 24 Basenpaare lang sind. Ein Primerpaar besteht immer aus einem Sense (Forward) und einem Antisense Primer (Reverse). Unsere Primer haben wir alle bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bestellt. Des Weiteren benötigt man eine hitzestabile DNA-Polymerase mit einem Puffer. Der Puffer wird benötigt, um das Reaktionsgemisch an einem für die DNA-Polymerase optimalen pH zu halten. Als letztes werden noch Desoxynukleotide als Substrat für die DNA-Polymerase benötigt. Diese werden im Voraus gemischt und sollten jeweils zu gleichen Teilen dATP, dGTP, dCTP und dTTP enthalten. Um unsere Arbeit etwas zeiteffizienter zu gestalten, haben wir in großen Mengen Mastermix im Voraus gemischt. Unter Mastermix verstehen wir sämtliche Zutaten für eine PCR ohne Primerpaar und ohne cDNA. Um die Primereffizienz zu erhöhen, haben wir anfangs mit verschiedenen Mastermix-Zusätzen experimentiert. Wir gaben in unterschiedlichen Mengen DMSO, Glycerol, Betain, $MgCl^2$ oder Reinstwasser hinzu.

Die PCR selber besteht meist aus 30 – 40 Zyklen. In jedem Zyklus kommt es stets zu den gleichen Arbeitsschritten. Zuerst wird die DNA bei ungefähr 94°C denaturiert. Das heißt, dass sich die eigentlich doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge aufteilt. Je nach Primerwahl folgt nun das Annealing der Primer bei Temperaturen zwischen 55 bis 65°C. Im Anschluss erfolgt der Polymeraseschritt bei 72°C. Dies ist die optimale Arbeitstemperatur für die DNA-Polymerase. Nach Abschluss der 30 – 40 Zyklen, werden die Proben auf 4°C abgekühlt und verbleiben in diesem Zustand. Zur Optimierung der Primereffizienz haben wir auch hier mit verschiedenen Primerprotokollen experimentiert.

2.5 Quantitative Real Time RT-PCR

Die Methode der Echtzeit-PCR ermöglicht, im Gegensatz zur PCR, eine DNA-Amplifikation mit gleichzeitiger quantitativer Bestimmung der Produktmenge. Bei diesem Verfahren wird dem PCR-Ansatz zusätzlich ein für den DNA-Nachweis geeigneter Fluoreszenzfarbstoff oder fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden zugegeben. In unserem Falle setzten wir den DNA-Fluoreszenzmarker Sybr-Green (Molecular Probes, Eugene, USA) ein. Dieser Marker hat die Eigenschaft sich in die Doppelstrangformen der vorhandenen DNA zu interkalieren. Dies führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzwerte. Über diesen Anstieg kann das quantitative RT-PCR-Gerät mittels einer optischen Messmethode den relativen Anstieg der DNA-Menge bestimmen.

2.5.1 PCR-Setup

Für die Durchführung unserer real time RT-PCR benutzten wir ein Gerät namens iCycler (Biorad, Hercules, CA, USA). Das Endvolumen betrug in unserem Falle stets 15µl pro Well. Pro real time RT-PCR-Lauf hatten wir 96 Wells (Thermo-Fast® 96, Semi-Skirted, natural, Cat# AB-0900, ABgene,

Epsom, U.K.) zur Verfügung, die wir in 32 Triplets aufteilten. Das bedeutet, dass wir von jedem PCR-Ansatz jeweils drei Wells pipettierten. Zum einen gab uns dies die Möglichkeit, die Qualität unserer Versuchsdurchführung zu beurteilen, zum anderen konnten wir aus den drei Ergebnissen für jede Probe einen Mittelwert berechnen. Die 15µl pro Well setzten wir im Verhältnis 1 zu 2 aus DNA und Submix (also 5µl:10µl) zusammen. Die 10µl Submix ihrerseits entstanden durch das Mischen von Primermix zu Mastermix im Verhältnis von 1 zu 3 (also 2,5µl zu 7,5µl). Die Primer waren im Primermix mit einer jeweiligen Endkonzentration von 0,3µM enthalten. Die 7,5µl Mastermix (QuantiTect™ SYBR®-Green PCR-Mastermix-Kit, Quiagen, Hilden, Germany) pro Well, enthielten bereits 0,015µl (10nM) FITC. Im Anschluss an das Pipettieren, versiegelten wir die Platte mit einer Folie (Clear Seal Strong, Cat# AB-0685, ABgene, Epsom, U.K.) mittels eines Combi-Thermo-Sealers (Model-No. 0384/240, ABgene, Epsom, U.K.) luftdicht. Die versiegelte Platte stellten wir in den vorgeheizten Cyclor und führten die real time RT-PCR unter Verwendung des Protokolls „PCR Protokoll“ durch (Abbildung 5).

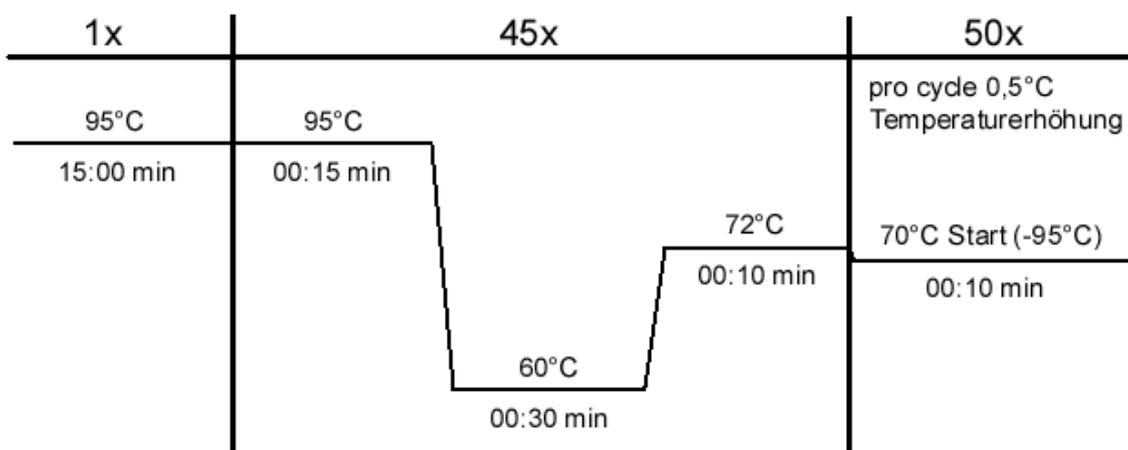


Abbildung 5: PCR-Protokoll

Die Grafik stellt das von uns verwendete PCR-Protokoll dar. In der obersten Zeile ist die Anzahl der jeweiligen Wiederholungen angegeben. Der linke Teil stellt einen einmaligen Zyklus bei 95°C für 15 Minuten dar. In der Mitte sind die Synthesezyklen angegeben. Der erste Schritt (95°C, 15 Sekunden) diente zur Lösung aller doppels trängiger DNA oder RNA Stränge. Das Annealing der Primer erfolgte im zweite Schritt (60°C, 30 Sekunden). Da die DNA-Polymerase ihr Synthesemaximum bei 72°C erreicht, wurde diese Temperatur für den letzten Schritt gewählt. Im rechten Teil der Abbildung ist die Bestimmung der Schmelzkurve zu sehen.

2.5.2 Schmelzkurvenanalyse

Ein kompletter real time RT-PCR-Zyklus besteht aus 30 – 40 Einzelzyklen. Am Ende eines jeden kompletten real time RT-PCR-Zyklus haben wir mit Hilfe des iCyclers eine Schmelzkurvenanalyse jedes unserer Produkte erstellt. Auf DNA bezogen gibt die Schmelztemperatur die Temperatur an, bei der sich die vorhandene DNA zu 50% in Einzelstränge getrennt hat. Dies erfolgt für jede DNA an einer charakteristischen Stelle, da der GC-Gehalt die Schmelztemperatur maßgeblich beeinflusst. Diese Schmelzkurvenanalysen gaben uns die Möglichkeit unsere Produkte zu identifizieren und eventuelle Verunreinigungen durch unspezifisch amplifizierte Produkte auszuschließen. Die Bestimmung der Schmelzkurve erreichten wir durch eine Erhöhung der Temperatur in Schritten von jeweils 0,5K alle 10 Sekunden, beginnend bei 70°C bis auf 95°C.

2.5.3 Auswertung der PCR-Ergebnisdaten

Zu Beginn unserer Ergebnisanalyse betrachteten wir die 3 Ergebnisse die wir pro Probe erhalten hatten, um starke Abweichungen bei Ergebnissen einzelner Wells zu registrieren und diese dann letztlich aus der Statistik auszuschließen. Des Weiteren kontrollierten wir die Schmelzkurven. Im Anschluss bildeten wir den Mittelwert eines jeden Triplets unter Achtung einer maximal tolerierten Abweichung der Einzelwerte. Letztlich trugen wir die Werte in das Softwareprogramm JMP IN 5.1 (SAS Institute Inc., NC, USA) ein.

2.5.4 Housekeeping Gen

Mit Hilfe des Primerpaares GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) amplifizierten wir einen Abschnitt eines Gens, welches wir als Housekeeping Gen benutzten. Ein Housekeeping Gen sollte die Eigenschaft

haben, sich in seinen Expressionswerten nicht zu verändern. Diese Konstanz sollte auch im Falle verschiedener Belastungen des Organismus nicht verloren gehen. Unter diesen Voraussetzungen kann das Housekeeping Gen dann als Referenzwert dienen. Es ermöglicht dann relative Aussagen über Amplikons anderer Gene und unterschiedlicher PCR-Läufe, durch Vergleich der Expression im gleichen Versuch (Simon et al. 2004). GAPDH eignet sich sehr gut als Housekeeping Gen, da sich in Vorversuchen gezeigt hat, in denen es mit einem Teil der ribosomalen Untereinheit 18s verglichen wurde, dass es unter verschiedenen Untersuchungsbedingungen sehr konstant exprimiert wurde (Zimmermann et al. 2003).

Es zeigte sich, dass GAPDH auch im Falle des Nikolauslaufes auch unter Belastung keine großen Schwankungen der Expressionswerte erfahren hat.

Gen	Forward	Reverse	Effizienz
GAPDH	5'-GCC TGG AGA AAC CTG CCA AG-3'	5'-TGG TCC TCA GTG TAG CCC AAG-3'	1,98

Tabelle 2: GAPDH-Primerpaar

Die Tabelle gibt das von uns verwendete Primerpaar für die Bestimmung von GAPDH an. In der zweiten und dritten Spalte von links sind die Sequenzen des jeweiligen Forward und Reverse Primers angegeben. In der rechten Spalte ist die Effizienz des Primerpaares angegeben.

Für unsere Versuchsreihe die wir zum Zwecke der subzellulären Lokalisierung unserer Amplikons durchführten, kam teilweise auch 7sk als Housekeeping Gen zum Einsatz. 7sk ist eine klassische nukleäre RNA und damit im Rahmen solcher Lokalisationsanalysen gut als Vergleichswert zu verwenden.

Gen	Forward	Reverse	Effizienz
7sk	5'-TCC CCT GCT AGA ACC TCC AA-3'	5'-CAT GCA GCG CCT CAT TTG-3'	1,93

Tabelle 3: 7sk-Primerpaar

Hier ist unsere Primerpaar zum Nachweis von 7sk zu sehen. Erklärungen analog zu Tabelle 2.

2.5.5 Berechnungen

Zu Beginn unserer Auswertung definierten wir einen Treshhold-Wert. Der Treshhold-Wert lag bei ungefähr 10% der im Durchschnitt maximal erreichten Fluoreszenzintensität eines PCR-Laufes. In unserem Fall lag dieser Wert stets um 25. Als nächstes definierten wir den „Cycle Treshhold Value“ (CT-Wert). Dieser Wert ist die Anzahl der Zyklen, die nötig war, um in einem Well einen Fluoreszenzwert hervorzurufen, der mindestens dem Treshhold-Wert entspricht. Aus diesen CT-Werten errechneten wir den „Mean Normalized Expression“-Wert (MNE) (Formel 1). Dieser stellt die Expression des zu untersuchenden PCR-Produktes ins Verhältnis zu unserem Housekeeping Gen (Simon 2003).

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

Formel 1: Formel zur Berechnung des MNE Wertes

„E_{reference}“ gibt die Effizienz des Primers des Housekeeping Gens an. Durch „E_{target}“ stellten wir die Effizienz des Primers des jeweiligen Zielamplikons dar. „CT reference mean“ und „CT target mean“ geben die CT-Werte des Zielgens und des Housekeeping Gens an.

Die errechneten MNE-Werte wurden mittels eines Shapiro-Wilk-W-Tests überprüft. Bei dieser Überprüfung stellte sich allerdings heraus, dass die Ergebnisse nicht normalverteilt waren. Aus diesem Grund haben wir die Daten vor unserer Auswertung logarithmiert. Dies stellte sich als das am besten geeignete Verfahren zur Normalverteilung der Daten in den Gruppen mittels Box-Cox-Transformation heraus. Nach diesem Schritt untersuchten wir die Daten der verschiedenen Gruppen auf signifikante Einflüsse mittels einer Varianzanalyse bezüglich eines Merkmals. Um diese Untersuchung übersichtlicher zu gestalten und graphisch besser darstellen zu können, haben wir die Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle in die nicht logarithmierte Form zurück transformiert. Um Veränderungen in den Blutbildern zu erkennen, haben

wir die Zellkonzentrationen nach Behandlungsgruppen unterteilt. Anschließend errechneten wir Mittelwerte und Konfidenzintervalle, um bei Auftreten einer Signifikanz den errechneten P-Wert nach Bonferroni entsprechend der Anzahl der Gruppenvergleiche zu bereinigen. Bei der Halbmarathon-Ausdauerbelastung führten wir einen Vergleich der Daten vorher mit nachher durch. Das von uns verwendete Statistikprogramm Jump 5.1 (SAS-Institute) berechnet in diesen Fällen die entsprechenden adjustierten Varianzen und Signifikanzen. Durch die Einbeziehung des Faktors „Proband“ als Einflussvariable, konnten gepaarte Vergleiche bei Verlaufsanalysen zu denselben Probanden durchgeführt werden.

Die Mittelwerte und Konfidenzintervalle die im Rahmen der Zellkulturversuche und gewebsspezifischen Expressionswerte bestimmt wurden, beziehen sich auf 3 durchgeführte Messwiederholungen und nicht auf komplett unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

2.6 Verwendete Primer

Die Primerdesignprogramme Primer5 (Premier, Biosoft International) und Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) halfen uns bei der Auswahl der geeigneten Primer für unsere Versuche. Nach Auswahl der Primer überprüften wir diese auf Spezifität mittels der Gendatenbank GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/Blast.cgi) im zu untersuchenden humanen Genom.

2.6.1 Primereffizienz

Die optimale Primereffizienz ist 2,0. Das bedeutet, dass in jedem Zyklus einer PCR eine Verdoppelung der vorhandenen DNA stattfindet. Dieser Wert kann theoretisch nicht überschritten werden, in der Praxis kann es jedoch vorkommen, dass der Wert 2,0 erreicht oder sogar überschritten wird. Dies ist durch das Entstehen von Nebenprodukten zusätzlich zu dem spezifischen

Amplikon möglich. Solche Nebenprodukte können zum Beispiel Primerdimere sein. Vor Beginn unserer eigentlichen Untersuchung ermittelten wir über eine Verdünnungsreihe die Effizienz unserer Primer. Dies erreichten wir durch das Anlegen von 6 Verdünnungsstufen. Um eine möglichst hohe Primereffizienz zu erreichen, veränderten wir das Primerdesign, das PCR-Protokoll und die Mastermixzusammensetzung.

Die Effizienz (E) errechneten wir aus den CT-Values der einzelnen Verdünnungsstufen unter Zuhilfenahme der Software REST (R.Rasmussen 2001, M.W. Pfaffl et al. 2002). Hierzu trugen wir in einem Schaubild die CT-Werte der Gene gegen den Logarithmus der jeweiligen cDNA-Konzentration auf. Dies ergab für jedes Primerpaar eine Gerade mit einer Steigung f, mit der wir die Effizienz der Primer errechnen konnten (Formel 2).

$$E = 10^{-1/f}$$

Formel 2: Formel zur Berechnung der Effizienz eines Primerpaares

Die errechneten Werte flossen später bei der Berechnung unserer PCR-Ergebnisse ein.

2.7 Gelelektrophorese

Um die Identität eines amplifizierten Produktes nachzuweisen, haben wir dessen DNA-Fragmentlänge mittels einer Gelelektrophorese bestimmt. Hierfür benutzten wir 1,5- bis 2%iges Agarosegel als Laufmatrize und Ethidiumbromid als DNA-Marker. Die Konzentration des Agarosegels wählten wir in Abhängigkeit der zu erwartenden Größe des DNA-Abschnitts. In einer Mikrowelle erhitzen wir ein Gemisch aus 1,5 – 2 Gramm Agarose und 100ml 1xTAE-Puffer. Dieses Gemisch erhitzen wir bis zur vollständigen Homogenisierung und versetzten es anschließend mit 5µl Ethidiumbromid. Nachdem das Gemisch auf Handwärme abgekühlt war und sich immer noch in einem homogen-flüssigen Zustand befand, wurde es in eine Laufform

gegossen. Sofort nach dem Ausgießen wurden in die Laufkammer zwei Kammpfalter eingeführt, die jeweils 20 Taschen im sich abkühlenden Agarosegel erzeugten. Über einen Zeitraum von 45 Minuten kühlte das Gel vollständig ab und polymerisierte aus. Anschließend wurde es mit der Laufform in eine Laufkammer gelegt und vollständig und flächendeckend mit 1xTAE-Puffer bedeckt. Wie oben bereits erwähnt benutzten wir als Proben unsere PCR-Produkte. Diese mischten wir im Verhältnis 5 zu 1 mit 6x-Loading-Buffer (15µl DNA, 3µl 6x-Loading-Buffer). Von den resultierenden 18µl pipettierten wir jeweils 15µl in die Taschen des Gels. Danach ließen wir das Gel für 1 – 1,5 Stunden bei 89V laufen. Vorher gaben wir allerdings noch DNA-Leitern in eine oder mehrere der Taschen, um unsere DNA-Fragmente auch vermessen zu können. Hierbei kamen verschiedene DNA-Leitern zu Einsatz (123bp-, 250bp-, 1kbp-Ladder). Nach entfernen des Gels aus der Laufkammer detektierten wir die DNA-Banden mittels eines UV-Gerätes und eines PCs mit der Software Quantity-One. In manchen Fällen wurden einzelne Banden unter einer UV-Lampe ausgeschnitten und zur Sequenzierung verschickt.

2.8 Bioinformatische Verfahren

2.8.1 UCSC Genome Browser

Der UCSC Genome Browser ist ein im Internet frei verfügbares Tool. Wir setzten es vor allem zur Untersuchung der phylogenetischen Konservierung bestimmter Loci des Genoms ein. Hochkonservierte Sequenzen weisen häufig auf einen wichtigen funktionellen Aspekt hin, der im Rahmen der Evolution erhalten geblieben ist. Um diese phylogenetischen hoch konservierten Sequenzabschnitte zu finden, werden in der komparativen Genomik multiple Sequenzabgleiche durchgeführt.

In unserem Falle wurden zwei Arten von Sequenzabgleichen durchgeführt. Für die klassischen *alignments* kürzerer Sequenzabschnitte verwendeten wir das Programm GeneDoc (Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II.

1997 GeneDoc: *Analysis and Visualization of Genetic Variation*, EMBNEW.NEWS 4:14). Dieses Verfahren wird angewendet um kürzere Sequenzabschnitte von wenigen 100bp auf phylogenetische Konservierung auf Einzelbasisniveau zu untersuchen. Des Weiteren können einzelne Funktionselemente wie zum Beispiel das Polyadenylierungssignal HEX auf Konservierung untersucht werden. Als orientierendes Screening führten wir einen Vergleich aller mRNAs und *Expressed Sequence Tags*, die sich innerhalb eines ausgewählten Genlokus befanden, durch. Dieser Vergleich ermöglichte uns, erste Aussagen über die mögliche Vielfalt an proteinkodierenden und auch nicht proteinkodierenden mRNAs zu tätigen, die alle durch alternatives Splicing aus einem Genlokus entstanden waren. Gleichzeitig konnten wir erste Sequenzunterschiede feststellen. Zusätzlich kann, als Resultat aus der Nutzung alternativer Promotoren, eine Aussage über die mögliche Existenz weiterer sense oder antisense mRNA Varianten getroffen werden. Diese Abgleiche ermöglichte uns der UCSC Genomebrowser (<http://genome.ucsc.edu>). Mit diesem Browser sind Sequenzanalysen möglich. Ausgangspunkt ist ein eingegebener Zielbereich innerhalb des Genoms oder eine eingegebene Zielsequenz (Kent et al. 2002). Dies ist möglich durch eine zugrunde liegende Datenbank, welche die Genomdaten und Gensequenzen von insgesamt 20 Spezies, inklusive der humanen, umfasst (Karolchik et al. 2003). Für gezielte Sequenzabgleiche innerhalb des Browsers stand uns BLAT zur Verfügung (Kent 2002). Dieses Tool ermöglichte uns den Abgleich des jeweiligen Zielsequenzbereichs mit den in der Datenbank abgelegten mRNA Sequenzen und EST's. Dieser Abgleich war nicht auf die jeweilige Spezies beschränkt. Es konnten auch die homologen EST's und mRNAs von bis zu 17 anderen Spezies zugeordnet werden. Diese Vergleichsmöglichkeit führte zu einer höheren Aussagekraft bezüglich der Frage welche Bereiche des Genoms exprimiert sind. Für eine exaktere Sequenzanalytik verfügt der Genome Browser über integrierte Zugriffsmöglichkeiten. Zur funktionell orientierenden Sequenzanalytik steht eine Reihe von Shareware-Programmen zur Verfügung. Des Weiteren können Expressionsdatenbanken mit Hilfe einer großen Anzahl bioinformatischer Verfahren zur funktionell orientierenden Expressionsanalytik

untersucht werden. In unserer Arbeit nutzten wir diese Möglichkeiten zur Detektion von bei Vertebraten promotortypischen CpG Islands (Gardiner-Garden und Frommer 1987), von microRNA Bindungsstellen (Lewis et al. 2005), zur Detektion von Eigenkomplementaritäten von Sequenzen innerhalb eines Genlokus oder auch des gesamten Genoms (Kent et al. 2003) (Schwartz et al. 2003) und zur Untersuchung von *repeating elements* (Jurka 2000). Die Daten des *Affymetrix Transcriptome Project Phase 2* lassen für 10 humane Chromosomen eine Expressionsanalyse mit 5-Nukleotidauflösung zu (Cheng et al. 2005). Diese Daten wurden bei den Überlegungen berücksichtigt, ob bestimmte Bereiche außerhalb der Referenz RNA Sequenz eines Gens exprimiert sein könnten.

Zur Untersuchung möglicher Intron → Exon und Exon → Intron Übergänge verwendeten wir ebenfalls den UCSC Genome Browser.

3 Ergebnisse

3.1 UCSC Genome Browser

In unserem ersten Arbeitsschritt befassten wir uns mit der *in silico* Analyse des Hif1 α -Gens welches wir mit dem UCSC Genome Browser untersuchten. Zudem analysierten wir die bisher publizierte aHif1 α -Variante und eventuell wichtige Sequenzen im Bereich des Hif1 α Gens. Besonders richteten wir hier unser Augenmerk auf Poly-A-Stellen, CpG Islands, microRNA Bindungsstellen und die phylogenetische Konservierung der unterschiedlichen Abschnitte.

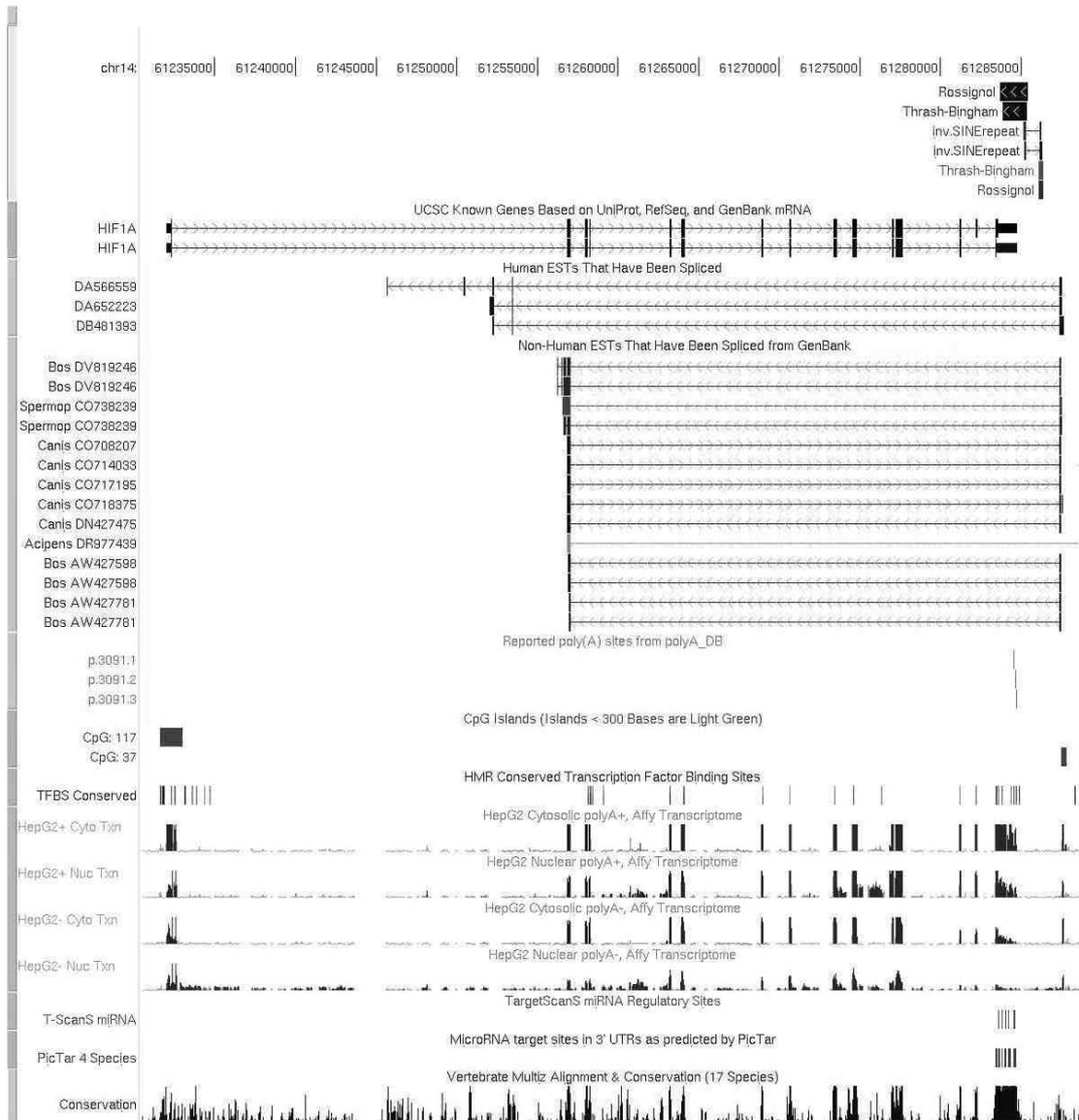


Abbildung 6: Analyse mittels des UCSC Genome Browser

Die Abbildung zeigt einen Abgleich von mRNA Sequenzen, die auf dem Chromosom 14 zu finden sind. In obigem Schaubild repräsentieren Linien Introns, Pfeile geben die Richtung von 5' nach 3' der entsprechenden Sequenz an, schmale Boxen repräsentieren nicht translatierte Regionen und dicke Boxen stehen für die kodierende Sequenz eines Transkriptes. Bisher gefundene Poly-A-Stellen werden unter *Reported poly(A) sites* durch dünne graue Striche symbolisiert. CpG Islands werden ihrer Größe entsprechend mit dicken grauen Boxen dargestellt. Konservierte Transkriptionsfaktorbindungsstellen sind durch senkrechte schwarze Striche angezeigt. In welchem Ausmaß ein bestimmtes Transkript in einem bestimmten Kompartiment der Zelle gefunden wird, und ob dieses Transkript polyadenyliert ist, wird durch die Höhe der grauen Striche angezeigt, die in den Zeilen mit der Beschriftung HepG2 zu finden sind. Je höher die Striche, desto höher die Konzentration in dem entsprechenden Kompartiment. microRNA Zielstellen werden im unteren Teil der Grafik durch graue Striche gekennzeichnet. Im „Konservierungsdiagramm“ steht die maximale Höhe für eine maximale Konservierung der entsprechenden Sequenz unter den 17 verschiedenen in der Datenbank vorhandenen Wirbeltierarten. In der Abbildung sind in den Zeilen 1 und 2 die von Thrash-Bingham und Rossignol publizierten aHif1 α -Varianten zu sehen. In den Zeilen 5 und 6 wird dargestellt, dass sich die von Thrash-Bingham und Rossignol gefundenen aHif1 α -Sequenzabschnitte in invertierter und komplementärer Form in einem Bereich wieder finden, der auf aHif1 α bezogen weiter upstream liegt. Diese Komplementarität ergibt sich aus dem Vorliegen der in den Zeilen 3 und 4 gezeigten inv.SINErepeats. SINE's (*short interspersed nuclear elements*) sind typischerweise 100-400bp lange, häufig wiederholte und relativ frei verteilte DNA-Sequenzen im Genom. In unserem Schaubild werden inv.SINErepeats angezeigt, dies sind SINE's, die sich wiederholen, aber zueinander invertiert sind. Darunter sind die bisher bekannten proteinkodierenden Splicevarianten von Hif1 α zu sehen. Gefolgt sind diese von den humanen und nicht-humanen gesplittenen EST's, welche von dem mit „CpG 37“ bezeichneten CpG Island ausgehen und somit einen Bezug zur fraglichen Promotorregion von aHif1 α besitzen. Nur diese wurden hier dargestellt. Als nächstes sind die Poly-A-Stellen dargestellt, die jeweils für ein Ende einer Hif1 α mRNA sprechen, da sie als Polyadenylierungssignale das Ende der Transkription bewirken können. In der nächsten Zeile ließen wir uns CpG Islands anzeigen, gefolgt von der Konservierung der Transkriptionsfaktorbindungsstellen. In den letzten drei Zeilen sind in den oberen zwei Zeilen zuerst microRNA Bindungsstellen zu sehen. An diese microRNA Bindungsstellen können microRNA's durch Bindung zu einer Instabilität der entsprechenden RNA führen. In der untersten Zeile ist die Konservierung des entsprechenden Abschnittes der RNA zwischen den einzelnen Spezies zu erkennen.

Im Fall der gesplitten humanen EST's zeigte sich, dass sie entgegengesetzt zu Hif1 α verlaufen, also antisense sind und auf der Höhe des Intron 1 von Hif1 α enden. Des Weiteren ist auffällig, dass sie alle an der gleichen Stelle beginnen und unmittelbar danach gesplittet werden. In der Abbildung ist zu erkennen, dass diese Spliceestelle phylogenetisch hoch konserviert ist. Die drei vorhandenen Poly-A-Stellen deuten darauf hin, dass an diesen Stellen jeweils das Ende einer Hif1 α -Variante liegen könnte. Ein CpG Island befindet sich upstream der oben angegebenen Spliceestelle und könnte ein Teil des bereits beschriebenen Promotors von aHif1 α sein. Zudem ist auch dieses CpG Island phylogenetisch hoch konserviert. Bei einer Betrachtung der von Thrash-Bingham und Rossignol publizierten Varianten fiel uns auf, dass diese im Bereich von inv.SINerepeats liegen. Zusammenfassend ist über die *in silico* Analyse zu sagen, dass es Hinweise auf ein *open reading frame* von aHif1 α gibt, in dessen Anschluss direkt eine zwischen den Spezies hoch konservierte Spliceestelle zu finden ist. Es spricht also einiges dafür, dass es mindestens eine weitere aHif1 α -Variante gibt, von deren Promotorregion das CpG Island einen Teil darstellt und die an oben beschriebener Spliceestelle gesplittet wird. Bezüglich ihres weiteren Verlaufes könnte diese aHif1 α -Variante in einen Abschnitt von Hif1 α ziehen.

3.2 Primerauswahl

Auf der Grundlage unserer bioinformatischen Analyse wählten wir unsere Primer. Um die Lage der Primer zu verdeutlichen, bezeichneten wir sie entsprechend ihrer Lokalisation auf den bisher bekannten Exons der Hif1 α mRNA. Zuerst wählten wir einen Forward Primer den wir downstream des CpG Island an die Stelle +2711 in den Promotorbereich von aHif1 α legten.

Position	Sequenz
+2711	5'-GGC AGC GTC TTG GAA AAA CT-3'

Tabelle 4: Angabe der Sequenz des Forward Primers

Um sicher sein zu können, mit diesem Primer erfolgreich zu sein, überprüften wir die Stelle +2711 hinsichtlich ihrer Expressionswerte (Abbildung 7).

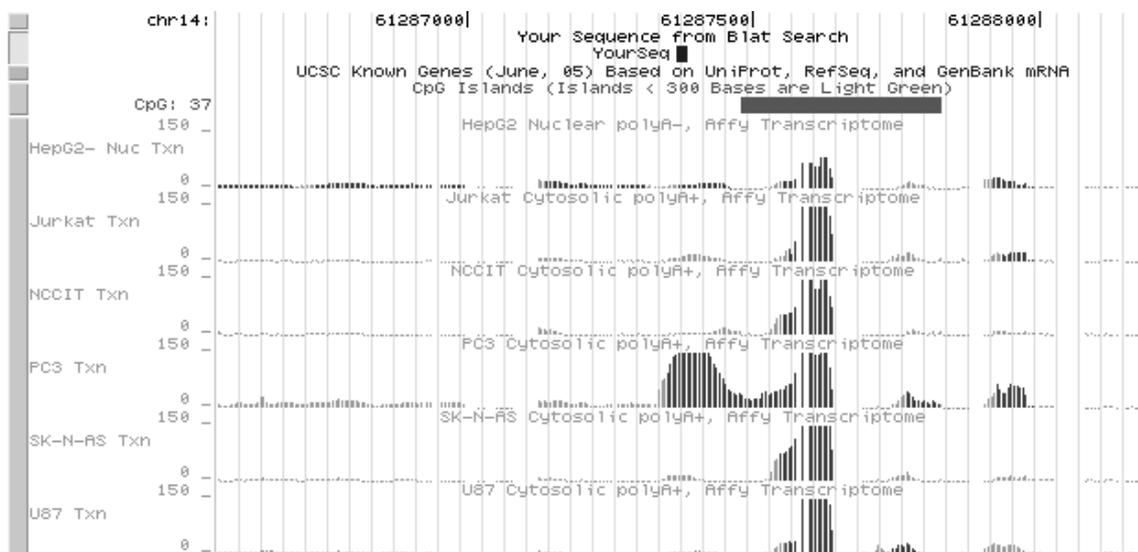


Abbildung 7: Expressionswertüberprüfung

Diese Abbildung zeigt das in Abbildung 6 dargestellte CpG Island „CpG: 37“. Im oberen Teil des Bildes ist unter *Your Sequence* unser Forward Primer zu sehen. Direkt in der darunter liegenden Zeile ist das CpG Island dargestellt. In den folgenden Zeilen stellen hohe graue Striche eine hohe Expression dar.

Die Zeile „HepG2- Nuc Txn“ zeigt relativ niedrige aber doch basal vorhandene Expressionswerte über den gesamten dargestellten Bereich downstream des CpG Islands.

In der Zeile mit der Beschriftung „PC3 Txn“ ist zu sehen, dass eine deutliche Expression für die Region downstream des CpG Islands vorhanden ist, in die wir unseren Forward Primer legten.

Diesen Forward Primer kombinierten wir mit in anderen Versuchen bereits getesteten Hif1 α Forward Primern. Im Fall von aHif1 α sind diese Hif1 α Forward Primer als aHif1 α Reverse Primer zu verwenden. Für die Reverse Primer wählten wir Lokalisationen in einigen der bisher bekannten Exons der Hif1 α mRNA. Zudem wählten wir einen Reverse Primer, der direkt downstream des +2711 Primers an der Position +2612 ansetzt. Dies ermöglichte uns, nur die Promotorregion zu vervielfältigen und nachzuweisen.

Die folgende Tabelle stellt die von uns als Reverse Primer ausgewählten Primer zusammen, die wir mit +2711 kombinierten (Tabelle 5).

Position	Sequenz	Korrelat des Ziels
125	5'-GCC CGC TTC TCT CTA GTC TCA C-3'	Hif1 α Ex.1
405	5'-GCT CAT CAG TTG CCA CTT CCA-3'	Hif1 α Ex.2
2420	5'-TTG CAG AAT GCT CAG AGA AAG C-3'	Hif1 α Ex.13
2488	5'-AAC ATT ATT ACA GCA GCC AGA CG-3'	Hif1 α Ex.14
2618	5'-GCA TGT AGA CTG CTG GGG C-3'	Hif1 α Ex.15
2855	5'- AAC ATT ATT ACA GCA GCC AGA CG -3'	Hif1 α Ex.15 3'UTR
3199	5'-CTT TGC CAG CAG TAC GTG GTA G-3'	Hif1 α Ex.15 3'UTR
3595	5'-AAT GTT CTG CCT ACC CTG TTG G-3'	Hif1 α Ex.15 3'UTR
+2612	5'-ATG AAC GCC TTC TGG AGC TT-3'	Promotor aHif1 α

Tabelle 5: Reverse Primer

Die Tabelle zeigt die von uns als Reverse Primer zur Bestimmung neuer aHif1 α -Varianten verwendeten Primer. Die Spalte „Korrelat des Ziels“ gibt an, in welchem Bereich der Hif1 α Gensequenz der Reverse Primer lokalisiert ist.

Letztlich wählten wir noch Primerpaare, um die Hif1 α Varianten nachzuweisen. Diese dienten uns, um die Expressionswerte der gemessenen aHif1 α Varianten mit den Hif1 α Expressionswerten vergleichen zu können (Tabelle 6).

Gen	Position	Forward	Reverse
Hif1 α mit Exon 14	2488 → 2675	5'-AAC ATT ATT ACA GCA GCC AGA CG-3'	5'-ACT GGT CAG CTG TGG TAA TCC A-3'
Hif1 α ohne Exon 14	2473-2637 → 2675	5'-AGC AGT AGG AAT TAT TTA GCA TGT AGA C-3'	5'-ACT GGT CAG CTG TGG TAA TCC A-3'

Tabelle 6: Primerpaare für die Amplifikation der bisher bekannten Hif1 mRNA Varianten

In der Spalte „Gen“ ist das Zielamplikon angegeben. Die Spalte „Position“ gibt die Lage der Primer innerhalb der Hif1 α mRNA an. Die Spalten „Forward“ und „Reverse“ geben jeweils die Sequenz der verwendeten Primer an.

Zu Übersichtszwecken erstellten wir noch eine Abbildung in der ein Teil unserer Primer hinsichtlich ihrer Lage zum Hif1 α Genom dargestellt sind.

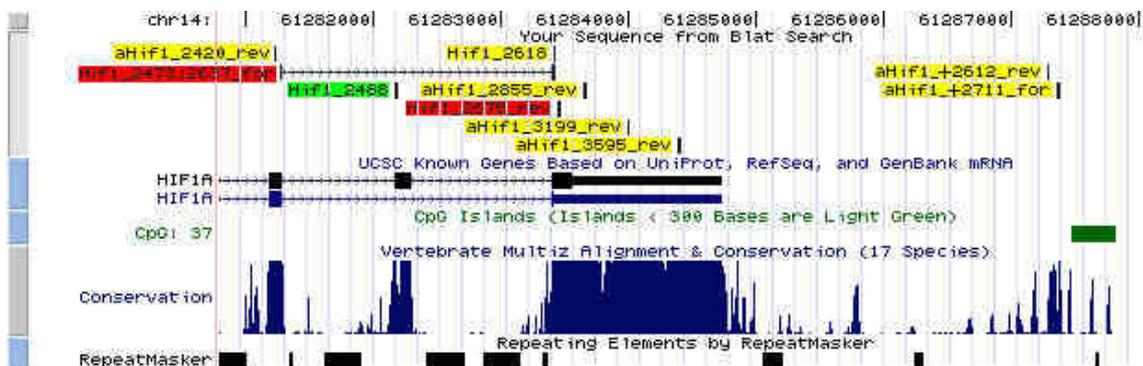


Abbildung 8: Übersicht über die Lokalisation der Primer

Diese Abbildung wurde mit Hilfe des Genome Browsers erstellt und verdeutlicht die Lage unserer Primer. Aus Übersichtsgründen wurden die Primer 125 und 405 nicht in das Schaubild übernommen. Sie liegen ca. 2000bp entfernt vom linken Rand der Abbildung. Die rot unterlegten Primer kamen zum Nachweis der bisherigen Hif1 α mRNA Varianten zum Einsatz. Die gelb unterlegten Primer benutzten wir, um unsere Proben auf eventuelle neue aHif1 α Varianten zu untersuchen. Der grün unterlegte Primer Hif1_2488 kamen im Rahmen von Hif1 α Nachweisen als Forward Primer und bei der Suche nach möglichen aHif1 α Varianten als Reverse Primer zum Einsatz.

Wie in der Abbildung 8 zu sehen ist, überspannt der Primer Hif1_2473;2637 einen relativ breiten Bereich. Dies ist möglich, da in der Abbildung 8 die Introns angezeigt werden und bei der Sequenzwahl des Primers darauf geachtet wurde, dass dieser ein Intron überspannt. Im Falle von Hif1_2473;2637 überspannt der Primer sogar zwei Introns und primt damit spezifisch nur die Hif1 α mRNA Varianten denen das Exon 14 fehlt. Im Gegensatz dazu setzt der Primer 2488 innerhalb der Exon 14 an und ist damit nur in der Lage, Hif1 α Varianten zu primen, die das Exon 14 exprimieren.

3.3 Untersuchung von PBMC's

Als Proben setzten wir Pools unserer Sportlerproben vom Nikolauslauf ein. Die Pools verwendeten wir, um relativ schnell eine Aussage über das mögliche Vorhandensein von aHif1 α -Varianten treffen zu können. Nach der Isolation der mRNA der PBMC's, wurde diese mittels einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA amplifizierten wir mit Hilfe einer PCR. Für die PCR setzten wir die Primerpaare ein, die, wie oben beschrieben, +2711 als Forward-Primer enthielten. Die Produkte trugen wir auf ein Agarosegel auf. Tabelle 7 gibt die Primerpaar an, mit denen wir ein positives Ergebnis erzielen konnten.

Forwardprimer	Reverse Primer	Kennzeichnung in der Abbildung 9
+2711	405	C
+2711	2488	D
+2711	3595	E
+2711	+2612	F

Tabelle 7: Die erfolgreichen Primerpaare die wir für unsere initiale PCR verwendeten

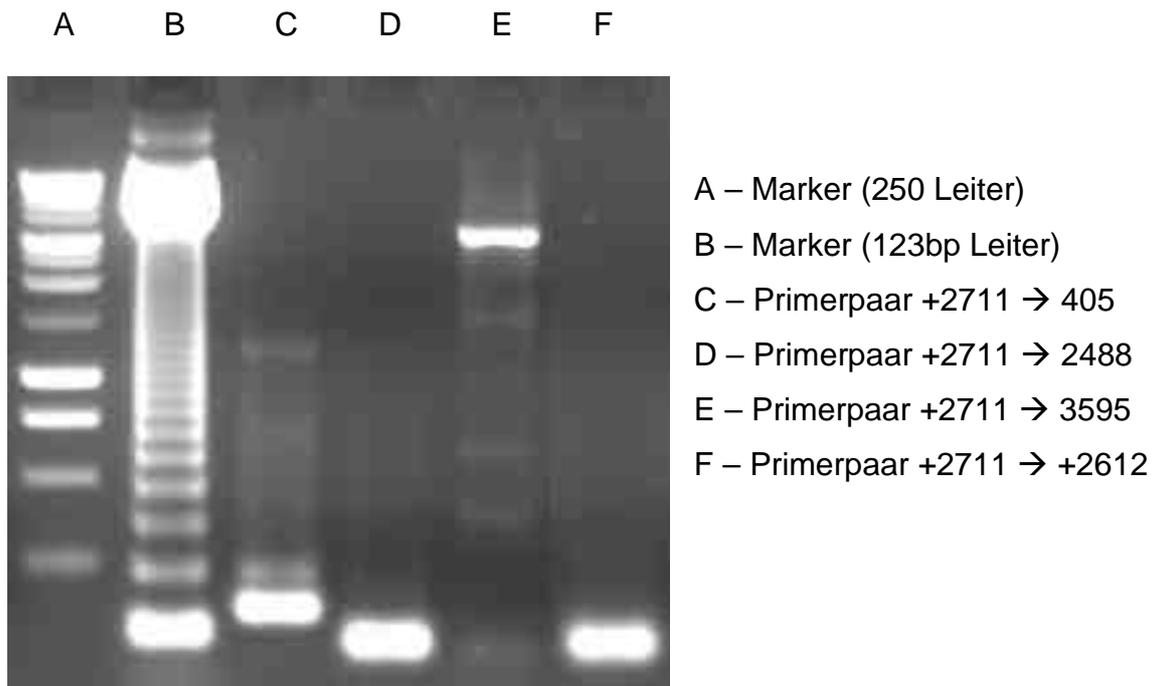


Abbildung 9: Gelelektrophorese

Diese Abbildung zeigt Teile der Ergebnisse unsere Gelelektrophorese. Proben die ohne Ergebnis geblieben sind, wurden nicht dargestellt. Die über der Abbildung stehenden Buchstaben beziehen sich auf die rechts neben der Abbildung angegebene Legende und identifizieren das verwendete Primerpaar bzw. die verwendete DNA-Leiter.

Abbildung 9 ist ein Ausschnitt aus der von uns durchgeführten Gelelektrophorese. Die Spalten A und B stellen unsere DNA-Leitern dar, die wir zum Bestimmen der Länge der einzelnen Banden benötigt haben. In Spalte A verwendeten wir eine 250bp, in Spalte B eine 123bp DNA-Leiter.

Für die Probe F war eine deutliche Bande der Länge von ca.100bp zu sehen. Dieses Primerpaar haben wir direkt in den Promotorbereich von aHif1 α gelegt und damit in die Startsequenz unserer möglichen aHif1 α -Variante. Die Probe E wies eine sehr große Bande auf, die ca. die Länge von 3200bp hat. Die Primerwahl ließ vermuten, dass es sich hierbei um die bisherige aHif1 α Variante handelt. Dieses Ergebnis konnten wir jedoch nicht bestätigen, da die Sequenzierung keine genauen Ergebnisse erbrachte.

C zeigte eine deutliche Bande die ungefähr die Länge von 140bp hat. Da der Reverse Primer im Exon 2 liegt, nannten wir diese Variante aHif1 α Ex2. Auch für die Probe D fanden wir eine deutliche Bande, die ungefähr die Länge von 80bp hat. Diese Variante nannten wir aHif1 α Ex14, da der Reverse Primer in Exon 14

liegt. Die beiden Proben C und D schnitten wir aus und schickten sie zur Sequenzierung. Das Sequenzierungsergebnis ist in den Abbildungen 10 und 12 zu sehen.

```
GGCAGCGTCTTGGAAAACTATCCACTACAGGCCTATTTATACCCTTGTA  
AATAACTCACCAGCATCCAGAAGTTTCCTCACACGCAAATAGCTGATGGTA  
AGCCTCATCACAGAGGCCTTATCAAGAGCGAcTCACATT
```

Abbildung 10: Sequenzierungsergebnis von aHif1 α Ex2

Die klein geschriebenen Buchstaben in der Abbildung 10 waren nicht durch eine automatische Erkennung, sondern nur durch eine visuelle Überprüfung des Elektroferogrammes zu bestimmen (Abbildung 11).

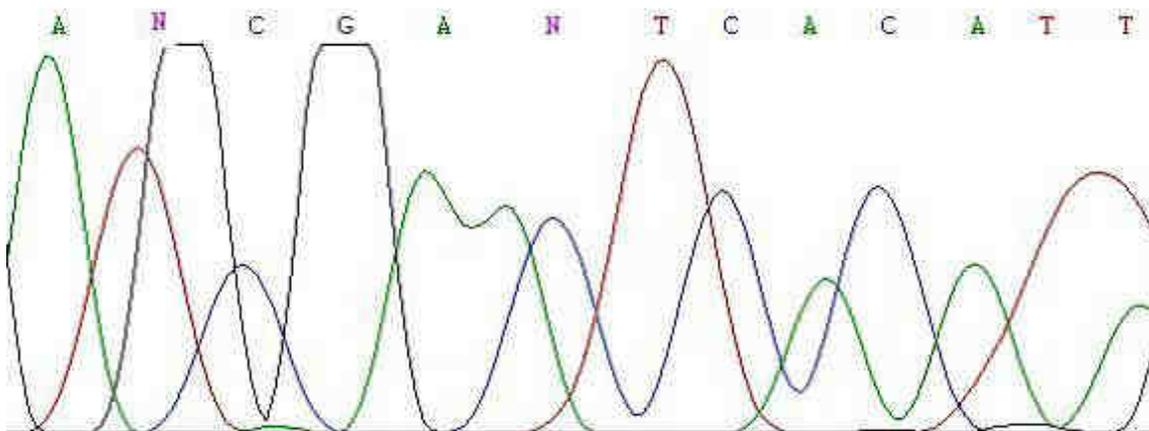


Abbildung 11: Elektroferogramm

Hier ist ein Ausschnitt aus dem Elektroferogramm unserer Sequenzierung von aHif1 α Ex2 zu sehen. Im oberen Teil der Grafik ist die bestimmte Basensequenz zu sehen. Jeder Base ist eine Farbe zugeordnet (Schwarz – G, Grün – A, Rot – T, Blau – C). Dadurch ist es möglich anhand des höchsten Signals die entsprechende Base zu bestimmen. Das „N“ bedeutet, dass die entsprechende Base an dieser Stelle nicht eindeutig zu definieren war. An der Stelle des ersten N, sind zwei hohe Ausschläge zu sehen. Im Falle des zweiten N sind zwei mittel hohe Ausschläge dargestellt. Wir entschieden uns die nicht eindeutig definierten Basen durch Überprüfung dieses Elektroferogrammes manuell zu wählen. Das erste N ersetzten wir durch ein G, das zweite durch ein C.

```
TGGCAGCGTCTTGGAAAACTATCCACTACAGATTTGCATCCTTTTACACG
TTTCCAAGAAAGGAGTGAGCTGCAG
```

Abbildung 12: Sequenzierungsergebnis von aHif1 α Ex14

Diese beiden Sequenzen überprüften wir mit dem UCSC Genome Browser. Es stellte sich heraus, dass Teile beider Sequenzen zu 100% identisch mit Abschnitten der DNA im Bereich des Hif1 α -Genoms waren. Im Folgenden sind in den Abbildungen 13 und 14 unsere Anfragen an den Genome Browser dargestellt.

BLAT Search Results

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
browser details	YourSeq	138	1	141	141	100.0%	14	-	61256962	61287386	30425
browser details	YourSeq	23	45	82	141	76.0%	11	+	134043840	134043872	33
browser details	YourSeq	20	20	40	141	100.0%	18	-	23723234	23723256	23

Abbildung 13: BLAT Search Result für aHif1 α Ex2

„SCORE“ gibt die Anzahl der Übereinstimmungen zwischen dem Suchergebnis und der DNA an. In der Spalte „QSIZE“ ist die Länge unserer Suchanfrage in Basenpaaren angegeben. „Identity“ stellt die prozentuale Übereinstimmung zwischen unserer Sequenz und der DNA dar. „CHRO“ gibt das Chromosom an, auf welchem die Übereinstimmung gefunden wurde. „Strand“ steht für die Richtung der gefundenen Sequenz. In unserem Fall bedeutet Strand -, dass es sich um eine Sequenz auf dem nicht kodierenden Strang handelt. „SPAN“ gibt an, wie viele Basenpaare die von uns eingegebene Sequenz überspannt.

BLAT Search Results

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
browser details	YourSeq	61	2	63	76	100.0%	14	-	61282207	61287386	5180
browser details	YourSeq	24	40	69	76	96.2%	5	-	34806910	34806946	37

Abbildung 14: BLAT Search Result für aHif1 α Ex14

Die Erklärungen sind analog zu Abbildung 13.

Es ist deutlich zu sehen, dass es Abschnitte beider Varianten gibt, die zu 100% auf dem Chromosom 14 zu finden sind. Gleichzeitig stellt das Chromosom 14 auch den einzigen Genlokus dar, im dem beide Sequenzen zu einem großen

Teil gefunden werden. Des Weiteren ergab diese Anfrage, dass es sich bei beiden Sequenzen um Teilsequenzen des nicht kodierenden Stranges des Chromosoms 14 handelt. Zudem fanden wir durch diese Anfrage heraus, dass es sich bei den beiden Sequenzen um gespligte Varianten handelt, da sie einen sehr großen Bereich der DNA überspannen. Um einen genaueren Überblick über die Ergebnisse zu erhalten, implementierten wir die gefundenen Sequenzen in eine neue Anfrage an den UCSC Genome Browser.

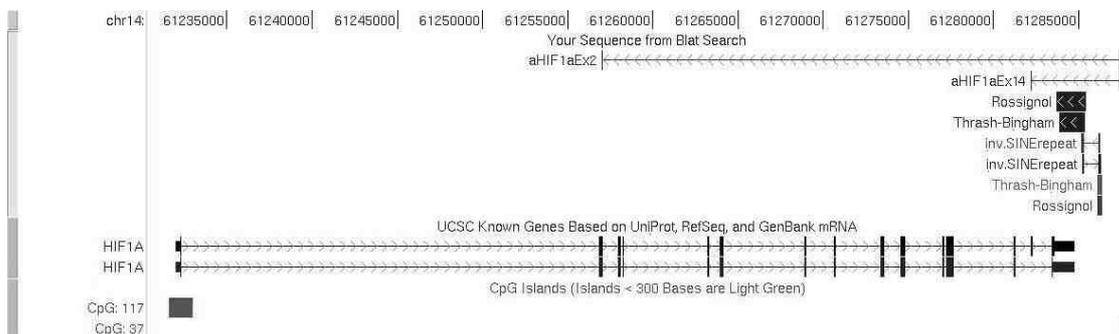


Abbildung 15: Analyse der gefundenen Sequenzen

Das Schaubild entstand durch eine Suchanfrage an den UCSC Genome Browser. In den oberen zwei Zeilen befinden sich die beiden von uns gefundenen Sequenzen, die wir mit aHif1aEx2 und aHif1aEx14 bezeichneten. Die Erklärungen zu dieser Grafik sind analog zur Abbildung 6.

Da die PCR ein sehr unspezifisches Verfahren ist, und nicht zwischen sense und antisense Varianten unterscheidet, untersuchten wir die von uns gefundenen Sequenzen bezüglich ihrer Orientierung. Dabei half uns die Betrachtung der Exon → Intron und Intron → Exon Übergänge. Die an den Übergängen gefundenen Sequenzen erlauben eine eindeutige Aussage bezüglich der Orientierung der Sequenzen. Die Untersuchung dieser Übergänge führten wir mittels des UCSC Genome Browsers durch.

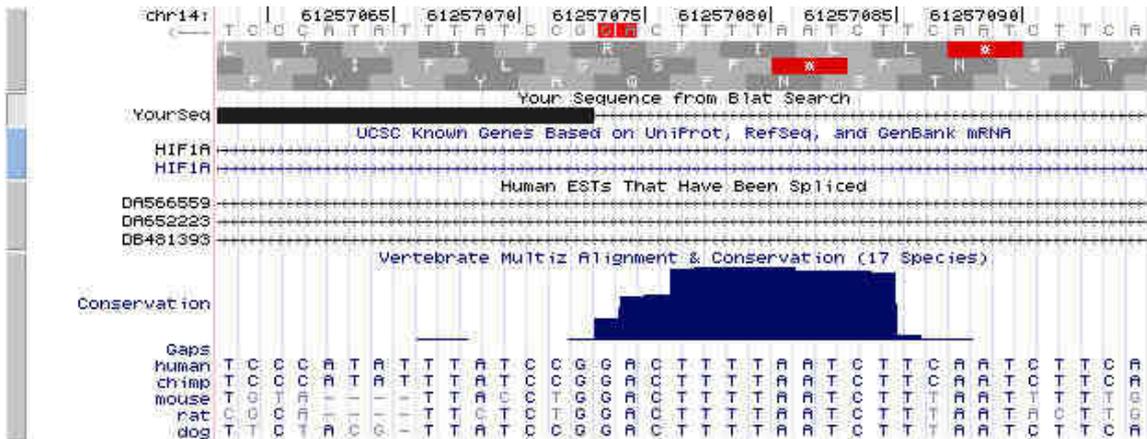


Abbildung 16: Überganganalyse

Zu sehen ist in der Zeile *Your Sequence* der Intron→Exon Übergang von aHif1αEx2. In der obersten Zeile ist die Basensequenz angegeben. Die für uns interessante Stelle des Intron→Exon Übergangs ist rot unterlegt. Im unteren Teil ist die Konservierung dargestellt.

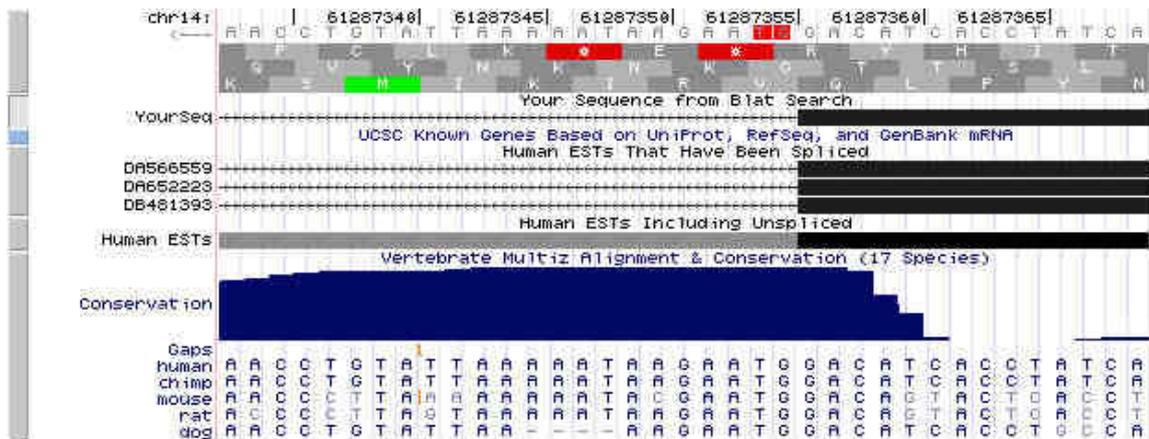


Abbildung 17: Überganganalyse

Zu sehen ist in der Zeile *Your Sequence* der Exon→Intron Übergang von aHif1αEx2 und aHif1αEx14. In der obersten Zeile ist die Basensequenz angegeben. Die für uns interessante Stelle des Exon→Intron Übergangs ist rot unterlegt. Im unteren Teil ist die Konservierung dargestellt.

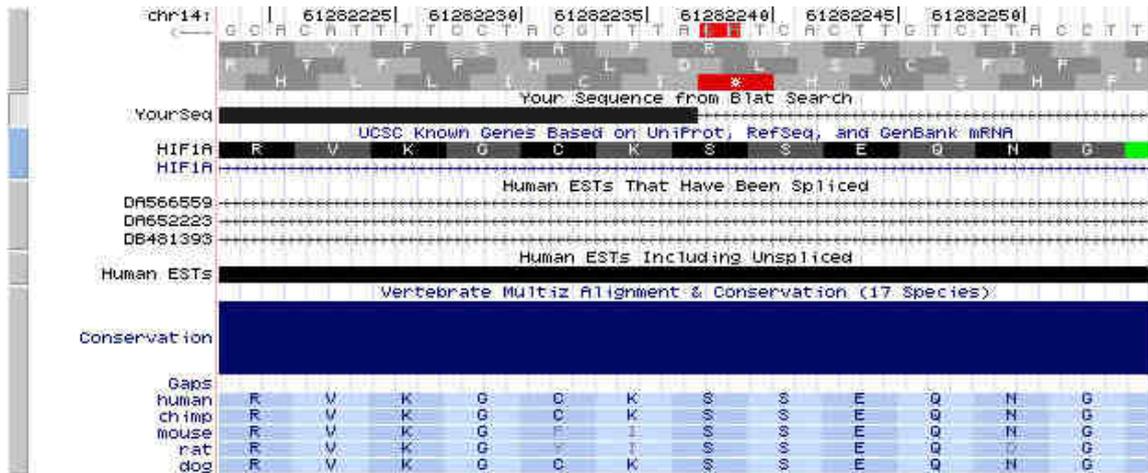


Abbildung 18: Überganganalyse

Zu sehen ist in der Zeile *Your Sequence* der Intron→Exon Übergang von aHif1αEx14. Sonstige Erklärungen sind analog zu denen der Abbildung 16.

Bei der Untersuchung der Übergänge stellten wir fest, dass der Exon → Intron Übergang von aHif1αEx2 und aHif1αEx14 identisch ist. Die rot markierten Stellen in den Abbildungen 16-18 stellen die Exon → Intron bzw. Intron → Exon Übergänge dar. Es sind in allen Schaubildern die typischen Übergänge zu finden. Im Falle des Exon → Intron Überganges beginnt das Intron mit der Sequenz GT, bei dem Intron → Exon Übergang endet das Intron auf AG. Diese Übergänge sind hoch konserviert. Dies bestätigt unsere Vermutung, dass es sich um antisense Varianten handelt und nicht um sense Sequenzen. Im Fall von sense Sequenzen wären die Übergänge invertiert und komplementär zu den von uns gefundenen Übergängen. Es wird auch ersichtlich, dass die bislang in der Datenbank vorhandenen ESTs den gleichen *Splice Donor* aber jeweils andere *Splice Akzeptoren* aufwiesen. Bei unseren Varianten handelt es sich somit um neue, noch nicht bekannte ESTs (Abbildungen 16-18).

3.4 neue Primerauswahl

Vor Beginn unserer real time RT-PCR Experimente suchten wir zuerst zwei neue Primer. Diese neue Auswahl von Forward Primern hielten wir für nötig, da wir durch zwei neue Primer gezielter unsere bisherigen Varianten primen können (Tabelle 8)

Amplikon	Primername	Sequenz
aHif1 α Ex2	+2690;405	5'-CCA CTA CAG GCC TAT TTA TAC CCT-3'
aHif1 α Ex14	+2690;2488	5'-CCA CTA CAG ATT TGC ATC CTT TTA-3'

Tabelle 8: Neue Primer

Hier sind die zwei neuen Forward Primer aufgelistet, die wir erstellten, um unsere bisherigen aHif1 α Varianten spezifischer primen zu können. Der Primername setzt sich aus der Startposition des Primer und der Zielstelle innerhalb der Hif1 α Sequenz zusammen für die er verwendet wird. In der rechten Spalte ist die Sequenz des Primers angegeben.

Diese neuen Primer wählten wir so, dass sie an der Stelle +2690 ansetzen, über die Splicestelle hinweg ziehen und im jeweiligen Exon unserer aHif1 α -Varianten enden. Dies führte zu der von uns gewünschten Spezifität der Primer. Unsere bisherigen Reverse Primer behielten wir bei.

Anschließend bestimmten wir noch die Effizienzen der neuen Primerpaare.

Amplikon	Primerpaar	Effizienz (E)
aHif1 α Ex2	+2690;405 → 405	1,85
aHif1 α Ex14	+2690;2488 → 2488	1,95

Tabelle 9: Primereffizienzen

In der linken Spalte ist das Amplikon zu finden; die mittlere Spalte gibt den Namen des Primerpaares an, die Effizienz des Primerpaares an befindet sich in der rechten Spalte

Auch hier erstellten wir eine Übersicht, die die gesplitten aHif1 α Varianten und die verwendeten Primerpaare beinhaltet (Abbildung 19).

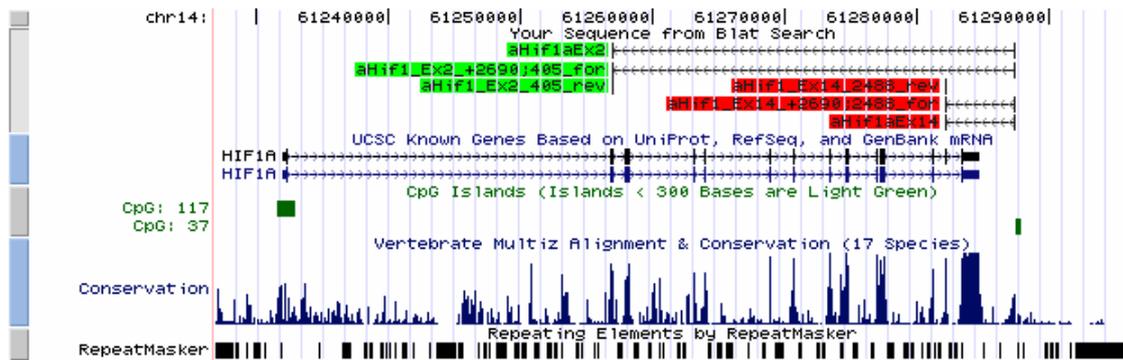


Abbildung 19: Darstellung der Primerpaare

Diese Abbildung zeigt die komplette Hif1 α mRNA und die von uns neu gewählten Primerpaare. Grün markiert sind die von uns gefundene aHif1 α Ex2 und das passende Primerpaar. Rot unterlegt sind die von uns gefundene aHif1 α Ex14 und das Primerpaar zu ihrem Nachweis. Beide Forward Primer wurden von uns so gewählt, dass sie über die Splicestelle hinweg, zum jeweiligen Zielexon ziehen. In obigem Schaubild ist leider kein Unterschied zwischen den aHif1 α Varianten und den Forward Primern zu sehen. Das liegt daran, dass die für die Suche eingegebenen Sequenzen der aHif1 α Varianten und der Forward Primer im Vergleich zu dem auf dem Schaubild dargestellten Ausschnitt der DNA sehr klein sind. Die aHif1 α Varianten wurden jedoch trotzdem in das Schaubild eingebunden, um die Lage der Primer zu verdeutlichen.

3.5 Lokalisationsanalyse

Wir führten Versuche durch, um die vorwiegende Lokalisation innerhalb der Zelle der von uns gefundenen aHif1 α Varianten zu bestimmen. Für die bisher bekannte, von Thrash-Bingham beschriebene aHif1 α Variante wählten wir ein Primerpaar, das innerhalb der bekannten Sequenz liegt (Tabelle 10).

Gen	Position	Sequenz
aHif1 α	+292 → +409	5'-TAT GAA TGG GAT GAG TGA AGC AG-3' → 5'-TGA AGT CTA AAT TTA TTA ATC TGT TAA TGG-3'

Tabelle 10: Primerpaar zum Nachweis der bekannten aHif1 α Variante

Der Forward Primer liegt bei +292, der Reverse Primer bei +409. In der rechten Spalte sind die Basensequenzen der beiden Primer angegeben.

Da wir in der Versuchsanordnung gleiche Mengen nukleärer und zytoplasmatischer RNA verwendeten, war ein Bezugspunkt nötig. Aus diesem Grund wählten wir ein Primerpaar um 7sk nachzuweisen. 7sk ist ein *small nuclear* RNA und damit eine klassische nukleäre RNA. Von 7sk ist bekannt, dass sie überwiegend im Nukleus vorkommt. Bei Amplikons die ähnliche Verteilungsmuster wie 7sk aufweisen, kann also davon ausgegangen werden, dass sie vor allem nukleäre Varianten sind. GAPDH diene uns als Beispiel einer zytoplasmatischen Variante. Die Tabelle 11 gibt die untersuchten Amplikons an. In der Abbildung 20 sind unsere Ergebnisse dargestellt.

Gen	Position (Forward → Reverse)	Effizienz
aHif1αEx2	+2690;405 → 405	1,85
aHif1αEx14	+2690;2488 → 2488	1,95
Hif1α ohne Exon 14	2473-2637 → 2675	1,84
Hif1α mit Exon 14	2488 → 2675	2,00
GAPDH	---	1,98
aHif1α	+292 → +409	2,00
7sk	207 → 311	1,93

Tabelle 11: Übersicht über die Primerpaare und deren Effizienzen

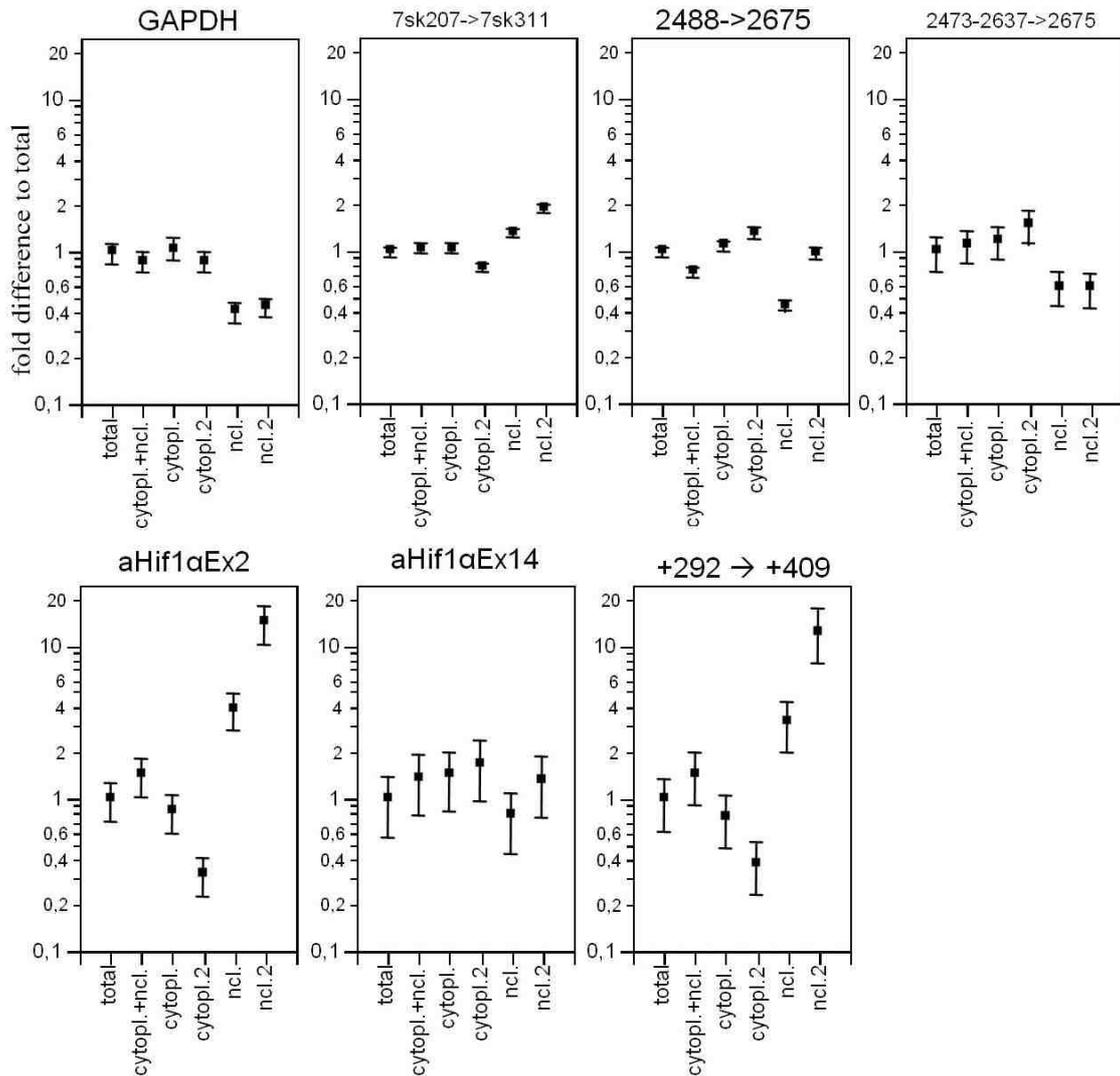


Abbildung 20: Lokalisationsanalyse

Die Teilschaubilder zeigen die unterschiedlichen von uns gemessenen Konzentrationen in den jeweiligen Zellkompartimenten. Über jedem Schaubild ist das Amplikon bzw. das Primerpaar angegeben. Auf der y-Achse sind die Konzentrationsveränderungen als *fold difference to total* angegeben. Eingezeichnet sind die Mittelwerte und für drei Messwiederholungen die 99%-Konfidenzintervalle. Auf der x-Achse ist das jeweilige Kompartiment angegeben. „cytopl.“ ist die Abkürzung für Zytoplasma, „ncl.“ für Nukleus. Die hinter manchen Kompartimenten angegeben „2“, gibt die zweite Messung der Werte an. Dies geschah lediglich für die Kompartimente „ncl.“ und „cytopl.“. Die Extraktion „total“ kam durch eine Messung der gesamten RNA einer Zelle zustande. „cytopl.+ncl.“ ist durch messen einer Mischung gleicher Mengen nukleärer und zytoplasmatischer RNA entstanden.

Die 7sk zeigt als Vertreter der *small nuclear RNA* in beiden nukleären Messungen höhere Werte als in den zytoplasmatischen Messungen. Sowohl

aHif1 α Ex2 als auch das konventionelle aHif1 α zeigen ähnliche Verteilungsmuster wie 7sk. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass beide Varianten vor allem nukleär vorkommen. Ein ähnliches Verteilungsmuster wie GAPDH zeigt Hif1 α ohne Exon 14, was auf ein vor allem zytoplasmatisches Vorliegen von Hif1 α ohne Exon 14 deutet. Im Fall von Hif1 α mit Exon 14 weist der erste nukleäre Messwert auch auf eine zytoplasmatische Variante hin. Der zweite nukleäre Messwert konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen. aHif1 α Ex14 zeigt am ehesten das Verteilungsmuster von GAPDH. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass aHif1 α Ex14 eine zytoplasmatische Variante ist.

3.6 Myotuben

Wir nutzten Myotuben, um die differentielle Expression von aHif1 α Ex14 und aHif1 α Ex2 im Vergleich zu den Hif1 α Varianten unter Hypoxie zu untersuchen. Als Positivkontrolle unserer Versuche haben wir das Amplikon EGR1sv gemessen. EGR1sv ist ein *immediate early gene* von dem bekannt ist, dass es bei Hypoxie mit sofortigen Anstiegen der Expressionswerte reagiert. Die Expressionswerte in den verschiedenen Myotubenversuchen bestimmten wir stets mit einer real time RT-PCR. Hierzu verwendeten wir die in Tabelle 12 angegebenen Primerpaare. GAPDH diente uns als Housekeeping Gen.

Gen	Primerpaar (Forward \rightarrow Reverse)	Effizienz
EGR1sv	----	1,98
Hif1 α ohne Exon 14	2488 \rightarrow 2675	1,84
Hif1 α mit Exon 14	2473-2637 \rightarrow 2675	2,00
aHif1 α Ex2	+2690;405 \rightarrow 405	1,85
aHif1 α Ex14	+2690;2488 \rightarrow 2488	1,95
GAPDH	---	1,98

Tabelle 12: Verwendete Primerpaare und deren Effizienzen

Zuerst untersuchten wir Myotuben, die mit Kobaltchlorid versetzt wurden, hinsichtlich der Expression von EGR1sv, den Hif1 α mRNA Varianten, aHif1 α Ex2 und aHif1 α Ex14 (Abbildung 21).

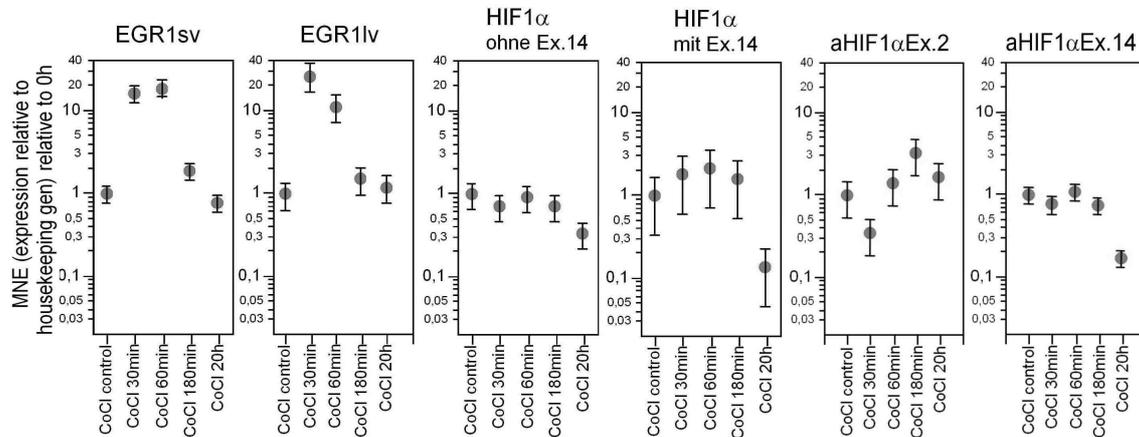


Abbildung 21: Myotubenversuche mit Kobaltchloridstimulation

Expressionswerte der mit Kobaltchlorid (CoCl₂) behandelte Myotuben. Auf der y-Achse sind die Expressionswerte als Vielfaches des 0-Stunden Wertes aufgetragen. Die Mittelwerte und für drei Messwiederholungen die 99%-Konfidenzintervalle sind jeweils eingezeichnet. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Messzeitpunkte zu sehen. Wir wählten insgesamt 5 Messzeitpunkte zu den Zeiten 0, 30min, 60min, 180min und 20h.

Im Fall von EGR1sv konnten wir die typische Reaktion eines *immediate early genes* nachweisen. Es konnte ein sofortiger Anstieg auf das ca. 20-fache des 0-Stunden Wertes zu den Messzeitpunkten 30min und 60min gemessen werden. Dieser rasche Anstieg der Expressionswerte ging zu den folgenden Zeitpunkten zurück und erreicht beim 20-Stunden Zeitpunkt ungefähr das Ausgangsniveau. Die Expressionswerte von Hif1 α ohne Exon 14 zeigten bis auf den 20-Stunden Messwert keine signifikanten Änderungen. Lediglich der 20-Stunden Messwert war signifikante erniedrigt und lag bei dem ca. 0,3-fachen des Ausgangswertes. Auch bei Hif1 α mit Exon 14 konnten wir lediglich beim 20-Stunden Messwert eine signifikante Veränderung feststellen. Der Expressionswert fiel auf das 0,15-fache des Ausgangswertes. aHif1 α Ex2 zeigte mehrere signifikante Veränderungen. Schon der zweite Messwert bei 30min war durch einen signifikanten Abfall auf das 0,35-fache des Ausgangswertes gekennzeichnet. Der 60min Messwert lag wieder im Bereich des

Ausgangswertes, wohingegen der 180min Messwert bezüglich des Ausgangswertes signifikant auf das ca. 3-fache erhöht war. Für aHif1 α Ex14 waren zwei interessante Ergebnisse feststellbar. Zum einen war der 20-Stunden Wert deutlich erniedrigt auf das ca. 0,2-fache, zum anderen fiel uns eine deutliche Ähnlichkeit der Expressionswertschwankungen zu Hif1 α ohne Exon 14 auf.

Im nächsten Versuch wurden Myoblasten zu Myotuben *in vitro* differenziert. Wieder wurden die Expressionswerte von EGR1sv, den Hif1 α mRNA Varianten, aHif1 α Ex2 und aHif1 α Ex14 zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Abbildung 22).

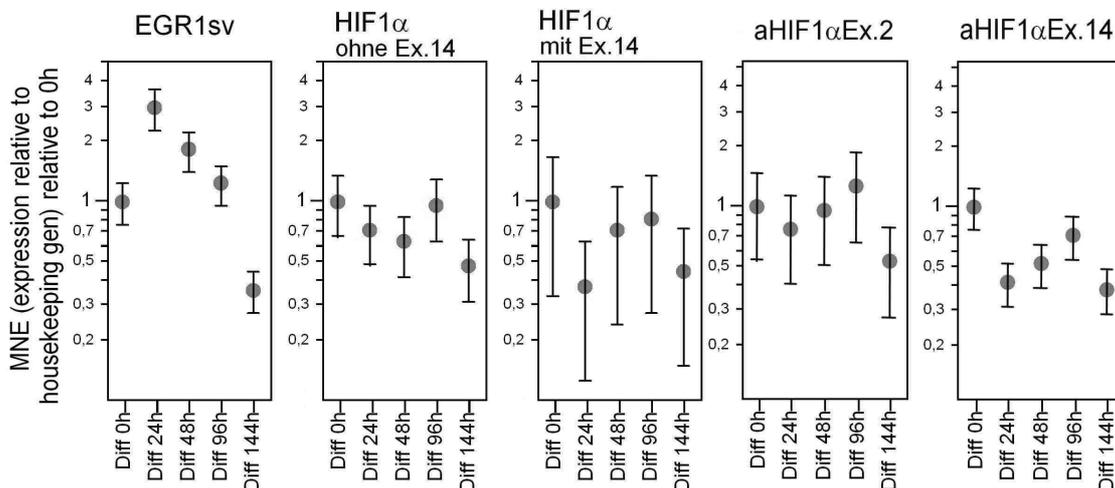


Abbildung 22: Myotubendifferenzierung

Auf der y-Achse sind Expressionswert als Vielfaches des 0-Stunden Wertes aufgetragen. Die Mittelwerte und für drei Messwiederholungen die 99%-Konfidenzintervalle sind jeweils eingezeichnet. Auf der x-Achse sind die von uns gewählten Messzeitpunkte zu sehen (0h, 24h, 48h, 96h, 144h).

EGR1sv hat auch hier im Sinne eines *immediate early genes* sehr rasch und deutlich reagiert, so dass bei 30min ein Anstieg auf das ca. 3-fache festzustellen war. Der 144-Stunden Wert war deutlich erniedrigt und lag bei dem 0,35-fachen des Ausgangswertes. Für die Amplikons der Hif1 α Varianten und aHif1 α Ex2 konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Hingegen fiel aHif1 α Ex14 rasch auf das 0,4-fache des Ausgangswertes ab. Die

restlichen Messwerte waren bis auf den 96-Stunden Wert in diesem signifikant erniedrigten Bereich zu finden.

Um eine Aussage treffen zu können, ob womöglich eine Korrelation zwischen aHif1 α und Hif1 α besteht, erstellten wir Korrelationsdiagramme zwischen den Expressionswerten unserer aHif1 α Varianten und den Hif1 α mRNA Varianten. Im Fall von aHif1 α Ex14 konnten wir eindeutige Korrelationen zu den beiden Hif1 α mRNA Varianten feststellen (Abbildung 23).

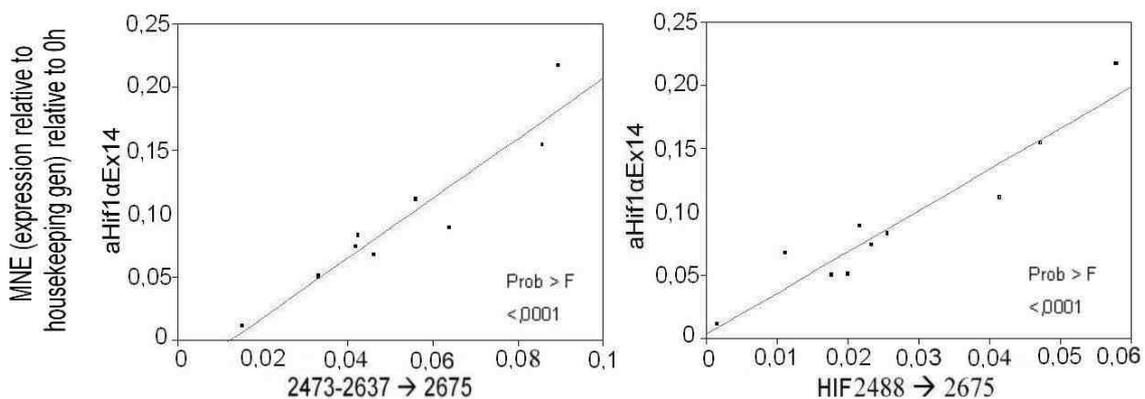


Abbildung 23: Korrelationen

In beiden Teilabbildungen sind Vergleiche der Expressionswert von aHif1 α Ex14 mit denen der Hif1 α mRNA Varianten zu sehen. Hierbei wurden alle Messwerte des CoCl₂- und des Differenzierungsversuchs berücksichtigt. Auf der y-Achse ist jeweils aHif1 α Ex14 aufgetragen. Auf den x-Achsen ist im linken Teil Hif1 α ohne Exon 14 und im rechten Teil Hif1 α mit Exon 14 zu finden. Für die linke Teilabbildung lag das Bestimmtheitsmaß (Rsquare) bei 0,949. Die Freiheitsgrade betragen 1 und das F-Ratio 73,1810. Im Fall der rechten Teilabbildung lag das Bestimmtheitsmaß bei 0,953, die Freiheitsgrade waren 1 und das F-Ratio 78,63.

3.7 Nikolauslauf

Für die Untersuchung unserer Nikolauslauf-Proben verwendeten wir eine real time RT-PCR. Zusätzlich wurde im Rahmen dieses Versuches HSP27 als Positivkontrolle gemessen, da für dieses Amplikon ein Ansteigen nach Ausdauerbelastung bekannt ist. Eine Übersicht über die von uns bestimmten Amplikons stellt Tabelle 13 dar. Abbildung 24 zeigt unsere Messergebnisse.

Gen	Primerpaar (Forward → Reverse)	Effizienz
HSP 27	5'-GCA GTC CAA CGA GAT CAC CA-3' → 5'-GCT TTA CTT GGC GGC AGT CT-3'	1,90
Hif1α ohne Exon 14	2488 → 2675	1,84
Hif1α mit Exon 14	2473-2637 → 2675	2,00
aHif1αEx2	+2690;405 → 405	1,85
aHif1αEx14	+2690;2488 → 2488	1,95
GAPDH	---	1,98

Tabelle 13: Nikolauslauf

Die Tabelle gibt die von uns untersuchten Amplikons und die jeweils verwendeten Primer an. In der rechten Spalte sind die Effizienzen der jeweiligen Primerpaare zu sehen. GAPDH diente uns als Housekeeping Gen.

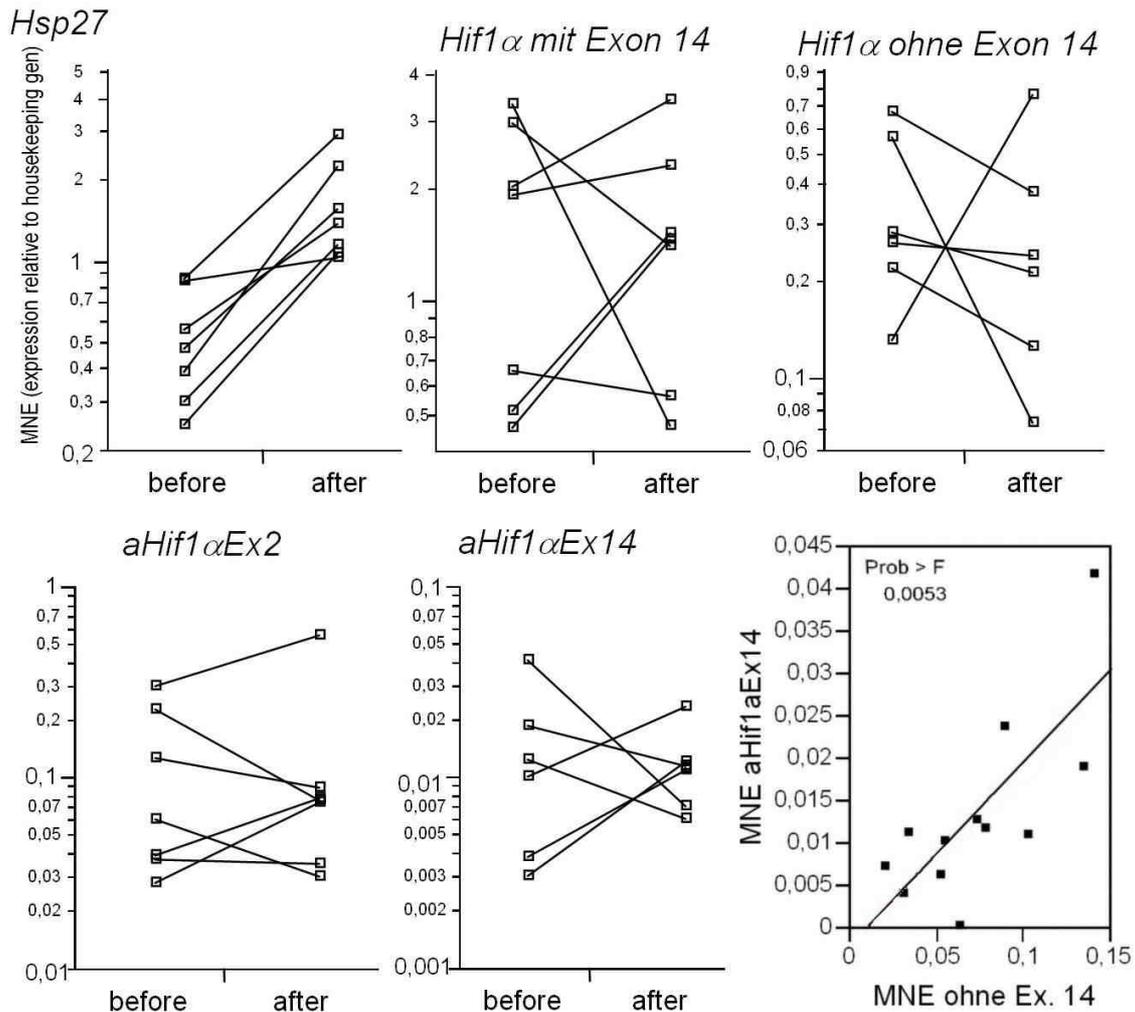


Abbildung 24: Nikolauslauf

Die ersten 5 Teilschaubilder zeigen die Ergebnisse unserer Untersuchung der Nikolauslaufproben. Über jedem Teilschaubild ist das zugehörige Amplikon angegeben. Auf der y-Achse der Schaubilder ist der Expressionswert des Amplikons im Verhältnis zu GAPDH zu sehen. Die x-Achse ist mit den beiden Entnahmezeitpunkten die direkt vor („before“) und nach dem Marathon („after“) lagen beschriftet. Die Verbindungen zwischen den einzelnen Messwerten stellen die Zugehörigkeit der zwei Messwerte zu einem Probanden dar. Dadurch war es uns möglich die Veränderungen jedes einzelnen Probanden zu beurteilen. Das letzte Schaubild rechts unten stellt eine Korrelation zwischen den mittleren Expressionswerten von aHif1 α Ex14 auf der y-Achse und Hif1 α ohne Exon 14 auf der x-Achse dar. Das Bestimmtheitsmaß betrug bei dieser Korrelation 0,557.

Wie zu erwarten, zeigt sich bei HSP27 bei allen Probanden ein Anstieg der Expressionswerte. Bei einem Probanden war lediglich ein geringer Anstieg feststellbar, wohingegen bei den restlichen Probanden ein deutlicher Anstieg zu

registrieren war. Die Expressionswerte für die beiden Hif1 α Varianten waren sehr uneinheitlich. So konnte für keine der beiden Varianten eine signifikante Veränderung festgestellt werden. Auch bei aHif1 α Ex2 und aHif1 α Ex14 konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es bei aHif1 α Ex14 zu einer deutlichen Reduktion der Varianz kommt. Eine Korrelation konnte lediglich zwischen aHif1 α Ex14 und Hif1 α ohne Exon 14 gezeigt werden ($p = 0.005$). Das Bestimmtheitsmaß betrug hierbei 0,557.

3.8 Screening auf aHif1 α in verschiedenen Geweben

Der letzte Teil unserer Experimente sollte eine Untersuchung verschiedener Gewebe bezüglich der Expression der von uns gefundenen aHif1 α Varianten im Vergleich zu GAPDH sein. Hierzu untersuchten wir mit einer real time RT-PCR verschiedene Gewebeproben (Abbildung 25).

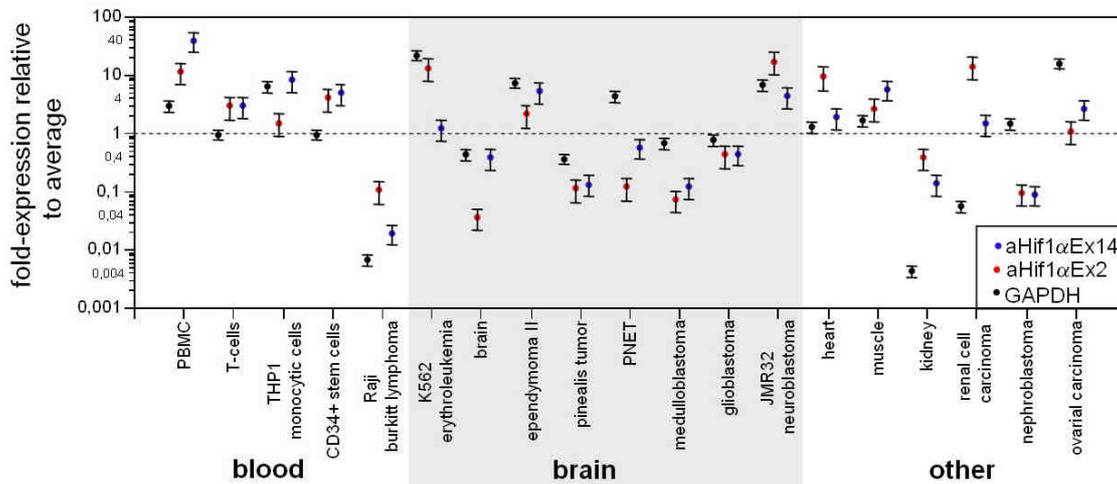


Abbildung 25: Gewebescreening

Das Schaubild zeigt die Untersuchung der verschiedenen Gewebeproben. Auf der y-Achse sind die Expressionswert der verschiedenen Amplikons dargestellt. Diese Expressionswerte wurden auf die mittlere errechnete Expression des jeweiligen Amplikons bezogen, es sind also keine absoluten Werte. Ein Vergleich der Expressionswerte zwischen den Amplikons ist folglich mit dieser Abbildung nicht möglich. Auf der x-Achse sind die Gewebeproben nach Herkunft aufgereiht. Ganz links sind zuerst die verschiedenen Blutproben angegeben, in der Mitte folgen die verschiedenen Gehirnproben und ganz rechts folgen die Gewebeproben, die den zwei

ersten Gruppen nicht zu zuordnen waren. Die Expressionswerte wurden als Mittelwerte mit zugehörigem 95% Konfidenzintervall für drei Messwiederholungen angegeben. GAPDH wird durch die schwarzen, aHif1 α Ex14 durch die blauen und aHif1 α Ex2 durch die roten Kreise dargestellt.

Das zentrale Ergebnis dieses Screenings verschiedener Gewebe ist, dass die gespligten aHif1 α Varianten in allen von uns untersuchten Geweben nachgewiesen werden konnten. aHif1 α Ex14 ist in den Blutproben eher über, hingegen in den Gehirnproben eher unter dem Durchschnitt exprimiert. Für aHif1 α Ex2 gelten ähnliche Aussagen, wobei aHif1 α Ex2 in den Gehirnproben nicht so deutlich unter seinem Durchschnitt exprimiert ist. Im Fall von GAPDH ist zu sehen, dass es, wie unter 1.5.4 beschrieben, in den unterschiedlichen Geweben sehr unterschiedlich exprimiert wird.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch unsere Versuche konnten wir mittels Sequenzierung und näherer Betrachtung der Intron → Exon und Exon → Intron Übergänge die Existenz zweier bisher unbekannter, gesplicter aHif1 α Varianten nachweisen.

In einer Untersuchung verschiedener Gewebe konnten wir feststellen, dass die aHif1 α Varianten in allen von uns untersuchten Geweben gefunden werden können. Durch Untersuchung der differentiellen Expression und vorwiegenden Lokalisation der beiden gesplicten aHif1 α Varianten ist es uns zudem möglich hinsichtlich ihrer Funktionen erste Vermutungen aufzustellen.

Aufgrund der sehr hohen Expressionswerte der gesplicten aHif1 α Varianten sowie ihrer differentiellen Expression ist von einer wichtigen physiologischen Bedeutung innerhalb der Zelle auszugehen. Zukünftige Untersuchungen werden allerdings noch die vollständigen Sequenzen der beiden neuen gesplicten aHif1 α Varianten ermitteln müssen.

In der Folge können dann Experimente zur Abklärung der Interaktion dieser Varianten mit den sense Varianten von Hif1 α durchgeführt sowie ihre exakte Funktion ermittelt werden.

Bezüglich der von Thrash-Bingham publizierten aHif1 α Variante (Thrash-Bingham und Tartof 1999) waren wir nicht in der Lage genauere Aussagen bezüglich der Größe zu machen. Wir konnten jedoch zeigen, dass auch diese aHif1 α Variante, wie aHif1 α Ex2, vor allem in Nukleus vorhanden ist.

Den für aHif1 α beschriebenen Promotor (Rossignol et al. 2002) konnten wir durch eine *in silico* Analyse bestätigen.

4.2 Der Promotorbereich von aHif1 α

In der ersten Arbeit die aHif1 α beschreibt, wurden von Seiten der Autoren keine Aussagen zum Promotor von aHif1 α gemacht (Thrash-Bingham und Tartof 1999). Erst Rossignol et al. beschreiben in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2002 einen Promotor für aHif1 α (Rossignol et al. 2002). Bei einer Überprüfung dieses Promotors stellten wir fest, dass er im Bereich des von uns beschriebenen CpG Islands lokalisiert ist.

CpG Islands sind definiert als DNA-Abschnitte von 0,5kbp bis 2kbp Länge, die einen erhöhten GC-Gehalt von über 60% aufweisen, dabei liegt der GC-Gehalt des Gesamtgenoms bei 40%. Von CpG Island weiß man, dass sie im Genom relativ selten zu finden sind und in aller Regel mit Genen assoziiert sind. Des Weiteren sind CpG Islands nur bei Genen zu finden, die konstitutiv exprimiert werden und sowohl vom paternalen als auch vom maternalen Chromosom abgelesen werden. Häufig handelt es sich bei solchen Genen sogar um Housekeeping Gene. Housekeeping Gene sind proteinkodierende Gene, die in jedem Zelltyp und in jedem Zellstadium bei relativ gleich bleibenden Expressionswerten exprimiert werden. Es sind typischerweise Gene, die mit dem Grundstoffwechsel von Zellen zusammenhängen. Normalerweise sind CpG Islands in der Nahe der Transkriptionsstartstelle zu finden und ihr Vorhandensein deutet auf hohe Expressionswerte des zugehörigen Gens hin (Gardiner-Garden und Frommer 1987).

Neben der Tatsache, dass der mögliche Promotorbereich über ein CpG Islands verfügt, fanden wir bei unserer *in silico* Analyse einen weiteren Anhaltspunkt der diesen Promotor bestätigt. Eine ganze Reihe humane gesplicte EST's, die für diesen Bereich beschrieben sind, beginnen direkt downstream bzw. schon innerhalb des CpG Islands (Abbildung 6). Ihr Transkriptionsstartpunkt liegt also offensichtlich im Bereich des möglichen Promotors.

Es ist als Schlussfolgerung aus oben genannten Informationen davon auszugehen, dass der Promotor für aHif1 α mit dem CpG Island übereinstimmt und ca. an der Stelle +2700 zu finden ist.

4.2.1 Untersuchung des Promotors

Bei einer Untersuchung des Promotors mittels des *Affymetrix Transcriptome Project Phase 2* stellten wir fest, dass es im Bereich des Promotors deutliche Expressionswerte gemessen werden können (Abbildung 7). Im *Affymetrix Transcriptome Project Phase 2* wurden mit Hilfe von Genchips bestimmte Chromosomen, die aus insgesamt 8 Zellreihen isoliert wurden, in einem Abstand von 5bp hinsichtlich ihrer Expressionswerte untersucht (Cheng et al. 2005). Im Fall des Promotors war eine deutliche Expression im Bereich des CpG Islands messbar. Zudem fanden wir im Bereich direkt downstream des CpG Islands, wie durch Abbildung 7 gezeigt, deutliche Expressionswerte. Dieser exprimierte Bereich entspricht exakt der Lokalisation unseres +2711 Forward Primers und damit dem 5' Anteil unserer aHif1 α Varianten. Wir vermuten, dass diese Stelle zumindest in der Nähe des Transkriptionsstartpunkts von aHif1 α ist. Ob dies jedoch für alle, auch eventuell noch unbekannte, aHif1 α Varianten gilt ist unklar.

4.2.2 Bedeutung des Promotors

Über die Art und Weise der Entstehung von antisense Varianten gibt es verschiedene Theorien. So beschrieben Bartsch et al. in einer Arbeit aus dem Jahr 2004 die Synthese von antisense RNA anhand der sense RNA als Vorlage. Die Synthese der antisense RNA soll von einer RNA abhängigen RNA Polymerase im Zytoplasma durchgeführt werden. Diese RNA Polymerase konnte jedoch bisher nicht gefunden werden (Bartsch et al. 2004). In ihrer Arbeit widersprachen sie damit der bisherigen Meinung, dass antisense Varianten, wie ihre sense Partner, vom Genom abgelesen werden.

Im Fall von aHif1 α geht man davon aus, dass es sich um eine *cisNAT* handelt, also um eine antisense Variante die auf dem Gegenstrang am selben genomischen Locus wie der sense Partner liegt. Im Gegensatz dazu existieren auch *transNAT*'s. Dies sind antisense Varianten die nicht vom gleichen

genomischen Locus wie die sense Variante abgelesen werden und auch nicht zwingend vom nicht kodierenden Strang abgelesen werden müssen.

In Anbetracht der Tatsache, dass durch Rossignol et al. für aHif1 α bereits ein Promotor beschrieben wurde (Rossignol et al. 2002) und wir diesen Promotor bestätigen konnten, ist zumindest für die gesplittenen aHif1 α eine Entstehung durch Ablesen des nicht kodierenden Stranges sehr wahrscheinlich. Hingegen ist eine Synthese im Zytoplasma durch oben beschriebenen Mechanismus eher unwahrscheinlich. Obwohl mittlerweile gezeigt werden konnte, dass antisense RNA's in erheblichem Ausmaß transkribiert werden (Rosok und Sioud 2004) (Yelin et al. 2003), ist es jedoch nicht auszuschließen, dass die Synthese von antisense RNA im Zytoplasma anhand einer sense RNA als Vorlage ein weiterer wichtiger Entstehungsweg von antisense RNA sein könnte.

4.3 Splicevarianten von aHif1 α

Nach unserer *in silico* Analyse der möglichen Promotorregion von aHif1 α mittels des *Affymetrix Transcriptome Project Phase 2*, lag die Vermutung nahe, dass es zumindest eine gesplittede aHif1 α Variante gibt. Diese Vermutung konnten wir durch die Untersuchung von PBMC's unserer Nikolauslaufproben nachweisen. Wir konnten durch Sequenzierung und *in silico* Analyse sogar zeigen, dass es mindestens zwei gesplittede aHif1 α Varianten gibt. Das Vorhandensein von unterschiedlichen Splicevarianten stellt einen besonderen Sachverhalt dar, da nach unseren Informationen dies der erste Nachweis für Splicevarianten einer antisense RNA ist. Über den genauen Beginn der beiden aHif1 α Varianten können wir leider keine Aussage machen, es ist jedoch davon auszugehen, dass downstream des Promotors oder innerhalb des Promotors auch der Transkriptionsstartpunkt der beiden Varianten liegt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestätigt, dass die humanen gesplitteden EST's die im Promotorbereich beginnen, ca. 150 – 200bp weiter upstream beginnen. Mit Sicherheit können wir hingegen sagen, dass die gesplitteden aHif1 α Varianten wie erwartet an der hoch konservierten Splicestelle gesplitted werden und auf

Höhe des Exon 2 bzw. des Exon 14 von Hif1 α weitergeführt werden. Die in Datenbanken bereits beschriebenen humanen gespligten EST's werden ebenfalls an dieser Splicestelle gespligt. Sie werden jedoch erst auf Höhe des Intron 1 von Hif1 α fortgesetzt. Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass es weitere gespligte aHif1 α Varianten geben könnte. Leider ist es uns auch nicht möglich weitere Aussagen über den exakten Verlauf > 100 Basen nach der Splicestelle zu machen. Es ist denkbar, dass die beiden gespligten Varianten in ihrem jeweiligen Exon enden, es ist jedoch auch möglich, dass weitere Spliceschritte erfolgen.

4.4 Differentielle Expression, Lokalisationsanalyse und mögliche funktionelle Bedeutung der beiden neuen aHif1 α Varianten

Unsere Untersuchungen hinsichtlich der Expression der gespligten aHif1 α Varianten, auch in Zusammenhang mit den bisher bekannten Hif1 α mRNA Varianten, erbrachten einige interessante Ergebnisse. Wie in Abbildung 25 dargestellt, konnten wir in einer Untersuchung verschiedener Gewebe in allen Geweben deutliche Expressionswerte messen. Dieser Fakt in Verbindung mit der Tatsache, dass der aHif1 α Promotor über ein CpG Islands verfügt, deutet auf eine wichtige funktionelle Bedeutung des aHif1 α Genlokus innerhalb der Zelle hin. Hinsichtlich der differentiellen Expression der unterschiedlichen aHif1 α und Hif1 α mRNA Varianten, konnten wir mittels der Myotubenversuche feststellen, dass weder Hif1 α noch aHif1 α unter körperlicher Belastung oder Hypoxie im Sinne eines *immediate early genes* reguliert werden. Zum Vergleich diente uns hierbei das bekannte *immediate early gene* EGR1-sv. Wir konnten jedoch sowohl für aHif1 α Ex2 als auch für aHif1 α Ex14 signifikante Veränderungen der Expressionswerte feststellen (Abbildung 21 und 22). Damit unterliegen beide gespligte aHif1 α Varianten einer differentiellen Expression. Mittels unserer Lokalisationsanalyse konnten wir zudem die vorwiegende Lokalisation der beiden gespligten aHif1 α Varianten feststellen. Hierbei stellte

sich heraus, dass es sich bei aHif1 α Ex14 um eine zytoplasmatische und bei aHif1 α Ex2 um eine nukleäre Variante handelt.

Dies legt eine physiologische Bedeutung von aHif1 α in der Anpassung an Hypoxie nahe. Insbesondere muss erwogen werden, dass aHif1 α durch Interaktion mit allen oder auch bestimmten Varianten der proteinkodierenden Hif1 α mRNA interagiert.

4.4.1 Funktion von aHif1 α Ex14

aHif1 α Ex14 weist als Besonderheit auf, dass diese Variante in das fakultativ vorhandenen Exon 14 zieht. Damit ergeben sich hinsichtlich der Funktion einige interessante Möglichkeiten. aHif1 α Ex14 könnte durch Bindung an die Hif1 α Referenz mRNA das Splicen verändern. Sowohl unsere Myotubenversuche als auch die Untersuchung unserer Nikolauslaufproben erbrachte eine positive Korrelation zwischen aHif1 α Ex14 und Hif1 α ohne Exon 14. Dies lässt hinsichtlich der Funktion von aHif1 α Ex14 die Vermutung zu, dass hohe Werte von aHif1 α Ex14 zu hohen Werten von Hif1 α ohne Exon 14 führen könnten. Es besteht die Möglichkeit, dass aHif1 α Ex14 durch seine Anwesenheit und eine Hybridisierung mit der Hif1 α Referenz mRNA zu einer vermehrten Entfernung des Exon 14 führt. Dies würde die positive Korrelation zwischen aHif1 α Ex14 und Hif1 α ohne Exon 14 erklären. In solch einem Fall, wäre jedoch auch eine negative Korrelation zwischen aHif1 α Ex14 und Hif1 α mit Exon 14 zu erwarten. Diesen Sachverhalt konnten wir durch unsere Ergebnisse jedoch nicht bestätigen.

Hinsichtlich der Funktion ist auch eine Wirkung von aHif1 α Ex14 im Sinne einer microRNA denkbar. microRNA's binden über microRNA Bindungsstellen an die zu ihnen komplementäre Ziel-RNA. Im Fall von aHif1 α Ex14 wären dies die Hif1 α RNA-Moleküle mit Exon 14. Diese Bindung von microRNA an die entsprechende Ziel-RNA nennt man RNA Interferenz. Die RNA Interferenz führt zu einem gesteigerten Abbau der jeweiligen Ziel RNA und ist ein bedeutender Bestandteil der posttranskriptionellen Regulation. Im Fall einer Funktion von

aHif1 α Ex14 im Sinne einer microRNA, ist am ehesten eine negative Korrelation zwischen aHif1 α Ex14 und Hif1 α mit Exon 14 zu erwarten. Unsere Untersuchung erbrachte jedoch eine starke, positive Korrelation zwischen den beiden Amplikons (Abbildung 23). Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu der Annahme, dass aHif1 α Ex14 eine Funktion als microRNA haben könnte, da in einer aus dem Jahr 2004 stammenden Arbeit eine positive Korrelation zwischen sense und antisense Transkripten beschrieben wurde. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Genchips die Expressionswerte von antisense Transkripten und ihren sense Partnern untersucht. Hierbei zeigte sich, dass es sense – antisense Paare gibt, bei denen die antisense Variante eine Funktion im Sinn einer microRNA ausübt, und bei denen gleichzeitig eine positive Korrelation nachgewiesen werden konnte (Quere et al. 2004).

4.4.2 Funktion von aHif1 α Ex2

Die für aHif1 α Ex14 beschriebene RNA Interferenz ist für aHif1 α Ex2 ebenfalls denkbar. Da bisher keine Varianten der Hif1 α mRNA ohne Exon 2 bekannt sind, würde aHif1 α Ex2 eine allgemeine regulative Rolle zukommen. aHif1 α Ex2 könnte im Sinn einer microRNA durch Bindung an die Hif1 α mRNA zu einem Abbau derselbigen führen. Da von einigen Arbeitsgruppen bereits diverse Hif1 α mRNA Varianten beschrieben worden sind (Chun et al. 2002) (Chun et al. 2001) (Depping et al. 2004) (Lee et al. 2004) (Lukashev et al. 2001), ist ebenfalls denkbar, dass es eine Hif1 α mRNA Variante gibt, die das Exon 2 nicht exprimiert und bisher noch nicht beschrieben werden konnte. In solch einem Fall würden die gleichen Überlegungen wie für aHif1 α Ex14 gelten.

4.5 Untersuchung der erstmals von Thrash-Bingham beschriebenen aHif1 α Variante

Hinsichtlich der konventionellen aHif1 α ergab sich bei unseren Versuchen ein Problem. Wir wählten ein Primerpaar so aus, dass der Forward Primer in der Promotorregion von aHif1 α und der Reverse Primer in der von Thrash-Bingham beschriebenen aHif1 α Sequenz lag (Thrash-Bingham und Tartof 1999). Diese Verknüpfung der Promotorregion mit der konventionelle aHif1 α ist uns jedoch nie geglückt. Nach der genaueren Betrachtung der Arbeit von Rossignol et al. aus dem Jahr 2002 (Rossignol et al. 2002), vermuteten wir, dass auch in dieser Arbeit die Konnexion der Promotorregion mit der aHif1 α Variante nicht geglückt ist. Bei einer genaueren Betrachtung unserer Ergebnisse der in *silico* Analyse stellten wir fest, dass sich zwischen der Promotorregion und der konventionelle aHif1 α inv.SINE repeats befinden. inv.SINE repeats sind *Repeat elements*, die komplementär zueinander sind und eine Loop Struktur ausbilden können. Da Loop Strukturen zu einem Strangwechsel der Reversen Transkriptase führen können, ist die Reverse Transkriptase nicht in der Lage Loop Strukturen fehlerfrei zu lesen (Bartsch et al. 2004). Zudem konnte in einer zeitgleich in unserer Arbeitsgruppe erstellten Dissertation die Existenz einer im 3'UTR Bereich längeren Hif1 α Variante (Hif1 α -lv) nachgewiesen werden (Böhringer 2007). Die Existenz einer solchen Hif1 α -lv führt dazu, dass die konventionelle aHif1 α und Hif1 α -lv hybridisieren und eine doppelsträngige RNA ausbilden. Da die Expressionsmessungen für Hif1 α -lv relativ hohe Werte ergeben hat (Böhringer 2007), ist davon auszugehen, dass die Bildung doppelsträngiger RNA im Zusammenhang mit der konventionelle aHif1 α ein häufiger Mechanismus ist. Dies führt ebenfalls zu einer Störung der Reversen Transkriptase, die nicht in der Lage ist doppelsträngige RNA fehlerfrei zu vervielfältigen. Auch hier ist wieder mit Strangwechseln zu rechnen. Im Zusammenhang mit doppelsträngiger RNA ist die Existenz von Hybrid-RNA beschrieben worden (Bartsch et al. 2004). Sollten sowohl sense als auch antisense RNA parallel zueinander in der Zelle vorkommen, so können sie einen RNA Duplex ausbilden. Der Versuch einen solchen Duplex mittels einer

Reversen Transkriptase in cDNA umzuschreiben, kann zu Strangwechseln der Reversen Transkriptase führen. Dies äußert sich durch die Entstehung einer RNA die jeweils aus Teilen der sense und der antisense RNA besteht. Diese neue gebildete RNA nennt man Hybrid-RNA (Bartsch et al. 2004).

Die zwei aufgeführten Mechanismen könnten die Ursache sein, dass bisher keine aHif1 α Variante nachgewiesen werden konnte, die im Promotorbereich beginnt und eine direkte Verbindung zur konventionellen aHif1 α -Teilsequenz besitzt. In unseren Versuchen kann mit diesen Störmechanismen die nicht geglückte Sequenzierung der Bande E aus Abbildung 9 erklärt werden.

Da sowohl PCR als auch die Reverse Transkriptase keine spezifischen Verfahren hinsichtlich sense und antisense Varianten sind, untersuchten wir die konventionelle aHif1 α dahingehend, ob sie eventuell eine sense Variante sein könnte, die durch eine Störung der Reversen Transkriptase durch oben beschriebene Mechanismen entstanden sein könnte. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, da wir für die von Thrash-Bingham gefundene Sequenz ein A-to-I Editing nachweisen konnten. RNA-Editing generell beschreibt die posttranskriptionelle Veränderung einzelner Nukleotide von RNA's und dient dem Organismen zur Erhöhung der Diversität des Transkriptoms. A-to-I Editing im Speziellen beschreibt ein Verfahren bei dem enzymatisch Adenosin in Inosin umgewandelt wird. Dieses Inosin wird von der Zelle als ein Guanodin erkannt (Hoopengardner 2006). Eine Untersuchung der Sequenz von Thrash-Bingham mittels des UCSC Genome Browsers erbrachte eine Übereinstimmung der Sequenz von 99,5% mit dem Genom. Die nicht übereinstimmenden Anteile waren Stellen, an denen in der Thrash-Bingham Sequenz ein Guanodin anstelle eines Adenosins vorhanden war. Es ist anzunehmen, dass diese Unterschiede durch A-to-I Editing zustande gekommen sind. Wäre die konventionelle aHif1 α eine sense Variante die nur fälschlicherweise entstanden ist, dann wären diese Basenvertauschungen komplementär. Ein Tyrosin wäre also durch ein Cytosin ersetzt. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die konventionelle aHif1 α eine echte antisense Variante ist, die durch A-to-I Editing enzymatisch verändert worden ist. Obwohl wegen der oben beschriebenen Gründen es bisher nicht möglich war eine Verbindung

zwischen der bisher beschriebenen Teilsequenz von aHif1 α und der aHif1 α Promotorregion herzustellen, ist es sehr wahrscheinlich, dass die konventionelle aHif1 α im Bereich des beschriebenen aHif1 α Promotors beginnt.

4.6 Ausblicke

Wir konnten durch unsere Arbeit wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Existenz weiterer aHif1 α Varianten erbringen. Es sind jedoch in weiteren Studien die vollständigen Sequenzen der beiden gesplittenen aHif1 α zu klären.

Jedoch wurde durch unsere Ergebnisse das Thema der Regulation von Hif1 α komplexer und es ist zu vermuten, dass auch in Zukunft weitere sense und antisense Varianten gefunden werden, die als Teile eines interaktiven Regulationsnetzwerkes dienen könnten. Schon jetzt lässt die Studienlage vermuten (Lukashev et al. 2001) (Lee et al. 2004) (Chun et al. 2001) (Chun et al. 2002) (Depping et al. 2004), dass im Fall der sense Varianten noch eine große Anzahl an bisher unbekanntem Formen existieren. Auch im Fall der antisense Varianten muss noch mit einer steigenden Anzahl gerechnet werden. Dies wirft für zukünftige Studien das Problem auf, dass eine Untersuchung aller sense und antisense Varianten mit einem enormen Arbeitsaufwand verbunden ist, der jedoch notwendig ist, um hinsichtlich der Regulation von Hif1 α definitive Aussagen machen zu können.

Bei der Untersuchung der durch Thrash-Bingham beschriebenen aHif1 α Variante stießen wir, wie oben beschrieben, auf ein methodisches Problem. Dieses Problem, das unter anderem durch die Existenz oben beschriebener Strukturen, wie Loops und doppelsträngiger RNA, begründet ist, werden auch zukünftige Arbeitsgruppen zu lösen haben. Diese Strukturen führen zu Problemen in fast allen Arbeitsschritten. Schon das Umschreiben von RNA zu cDNA und später dann die weitere Prozessierung im Rahmen einer PCR, sind unvorhersehbar gestört. So wird zum Beispiel angenommen, dass die von uns eingesetzten Polymerasen im Fall einer Doppelsträngigkeit entweder die Synthese abbrechen, zu einem Wechsel des Stranges führen oder auch zu

einem Überspringen des entsprechenden Bereichs führen. Da all diese Möglichkeiten unvorhersehbar sind, ist eine exakte Deutung der erhaltenen Ergebnisse nicht möglich. Diese Probleme machen die Weiterentwicklung der Methoden oder aber die Etablierung einer vollständig neuen Methode unerlässlich.

5 Zusammenfassung

Die Reaktion der Zelle und des Organismus auf Hypoxie und Belastung war der physiologische Hintergrund dieser Arbeit, wobei wir mit dem Transkriptionsfaktor Hif1 einen innerhalb der Zelle zentralen Teil dieser Anpassungsreaktion untersuchten. Der Transkriptionsfaktor Hif1 ist ein Protein, das aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist. Die β -Untereinheit ist stets auf einem basalen Niveau exprimiert, wohingegen die α -Untereinheit einer Sauerstoff-abhängigen Regulation unterliegt. Für Hif1 α gilt als erwiesen, dass es einer posttranskriptionellen Regulation unterliegt. Aus diesem Grund ist besonders interessant, dass für die mRNA der α -Untereinheit (Hif1 α mRNA) sowohl die Existenz verschiedener Varianten als auch einer antisense Variante (aHif1 α) bekannt ist. antisense Variante bedeutet, dass es eine RNA gibt, die zumindest in einem gewissen Abschnitt komplementär zur Hif1 α mRNA ist und die in der Lage ist, durch Hybridisierung mit der Hif1 α mRNA selbige in irgendeiner Weise zu beeinflussen.

Mit dieser Arbeit erhoffen wir, durch untersuchen der differentiellen Expression von aHif1 α und Hif1 α einen ersten Beitrag zur Aufklärung der Relevanz von aHif1 α leisten zu können.

Hierzu wurde vorab die Hif1 α mRNA und die bisher bekannte aHif1 α Variante mittels einer *in silico* Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass es wahrscheinlich ist, dass mindestens eine gesplice, bisher unbekannte aHif1 α Variante existiert.

Mittels einer PCR, Gelelektrophorese und anschließender Sequenzierung konnten aus PBMC Proben von Ausdauersportlern, zwei bisher unbekannte gesplice aHif1 α Varianten isoliert werden. Eine erneute *in silico* Analyse des Ergebnisses erbrachte die Bestätigung, dass es sich um antisense Varianten handelt, die wir mit aHif1 α Ex14 und aHif1 α Ex2 benannten. Das besondere an aHif1 α Ex14 ist, dass es komplementär zu einem Bereich der Hif1 α mRNA ist, der durch alternatives Splicing fakultativ exprimiert wird.

Um erste Anhalte über die mögliche Funktion der gesplitten aHif1 α Varianten zu bekommen, wurden die gesplitten aHif1 α Varianten und die bekannten Hif1 α mRNA Varianten mittels real time RT-PCR hinsichtlich differentieller Expression unter Hypoxie und Belastung und hinsichtlich ihrer vorwiegenden Lokalisation untersucht. Es zeigte sich, dass beide Varianten unterschiedliche Lokalisationen aufweisen. aHif1 α Ex14 ist eher zytoplasmatisch zu finden, wohingegen aHif1 α Ex2 vorwiegend nukleär lokalisiert ist. Durch einen Vergleich mit EGR1, einem *immediate early gene*, konnte gezeigt werden, dass keine der aHif1 α oder Hif1 α Varianten im Sinne eines *immediate early genes* unter körperlicher Belastung oder Hypoxie reguliert wird. Allerdings fand sich sowohl in der Ausdifferenzierung von Myoblasten zu Myotuben als auch in der Behandlung von Myotuben mit Kobaltchlorid eine differentielle Regulierung beider antisense Varianten. Wobei lediglich aHif1 α Ex14 in ihrem differentiellen Regulationsverhalten signifikant mit den beiden Hif1 α Varianten korreliert war. In einer abschließenden Versuchsanordnung wurden verschiedene Gewebe auf ihre Expression der gesplitten aHif1 α Varianten gescreent. Dabei war das zentrale Ergebnis, dass die gesplitten aHif1 α Varianten in allen untersuchten Geweben exprimiert werden

Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um exakte Aussagen über die genaue Größen und die Interaktionen der aHif1 α Varianten mit den Hif1 α Varianten machen zu können, und um daraus letztlich die Funktion der aHif1 α Varianten ableiten zu können.

6 Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
7sk	<i>abundant small nuclear RNA</i>
A	Adenosin
AA	<i>amino acid</i>
aHif1 α	antiHif1 α
ARE	<i>AU-rich elements</i>
ARNT	<i>aryl receptor nuclear translocator</i>
AS	Aminosäure
AS-Domäne	<i>alternative splicing sequence Domäne</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	proapoptotisches Gen
bHLH	<i>basis helix-loop-helix</i>
BLAT	<i>BLAST Like Alignment Tool</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CD34+ Stammzellen	CD34 positive Stammzellen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cisNAT	<i>cis natural antisense transcript</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CT-Wert	<i>Cycle Treshold Value</i>
cytopl.	Zytoplasma
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
DMSO	Di-Methyl-Sulf-Oxyd
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
E	Effizienz

EGR1-sv	<i>early growth response gene – short variant</i>
EPO	Erythropoetin
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
G	Guanosin
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glycerin Aldehyd 3 Phosphat Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS	<i>Hif binding site</i>
HEX	Hexamer
Hif1	<i>hypoxia inducible factor 1</i>
Hif1 α	Alpha-Untereinheit von Hif1
Hif1 α -lv	lange Variante der Alpha-Untereinheit von Hif1
hnRNA	heteronukleäre RNA
HRE	<i>hypoxia response element</i>
HSP90	<i>heat shock protein</i>
K	Kelvin
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilo-Dalton
M	molar
MgCl ²	Magnesium Chlorid
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	milli-molar
MNE	<i>mean normalized expression</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
ng	Nanogramm
NLS	<i>Amino(N)/Carbony(C) nuclear localisation signal</i>
nM	Nanomolar

nucl.	Nukleus
O ₂	Sauerstoff
ODD	<i>oxygen dependent degradation sequence</i>
p	kurzer Arm eines Chromosoms
p53	Tumor-Suppressor-Protein 53
PAS-Domäne	<i>Period circadian protein, Ah-receptor nuclear translocator protein, single minded protein</i> Domäne
PBMC	mononukleäre Zelle
PBS-Puffer	<i>Phosphate buffered saline buffer</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	Privatdozent
pHif1α	Protein der Hif1α Untereinheit
pHif1β	Protein der Hif1β Untereinheit
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
q	langer Arm eines Chromosoms
RLT-Puffer	Qiagen <i>RNeasy lysis buffer</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	freie Stickstoffradikale
ROS	freie Sauerstoffradikale
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-	Reverse Transkriptase-
SINE	<i>short interspersed nuclear elements</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
T	Thymin
TAD	<i>Trans-Activation-Domain</i>
TAE-Puffer	Tris Acetat EDTA Puffer
THP1	humane monozytäre Zelllinie THP1
Tris-Puffer	(hydroxymethyl) aminomethan Puffer
U	Units
UCSC	University of California Santa Cruz
UTR	<i>untranslated region</i>
μl	Mikroliter

μM	Mikromolar
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von-Hippel-Lindau Protein
$\text{VO}_{2\text{max}}$	maximale Sauerstoffaufnahme

7 Literaturverzeichnis

Agani FH, Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol Chem* 2000; 275(46):35863-35867.

Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. *J Biol Chem* 1998; 273(1):1-4.

Ameln H, Gustafsson T, Sundberg CJ, Okamoto K, Jansson E, Poellinger L et al. Physiological activation of hypoxia inducible factor-1 in human skeletal muscle. *FASEB J* 2005; 19(8):1009-1011.

An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 1998; 392(6674):405-408.

Böhringer A. Persönliche Mitteilung. 2007

Bailey DM, Davies B. Acute mountain sickness; prophylactic benefits of antioxidant vitamin supplementation at high altitude. *High Alt Med Biol* 2001; 2(1):21-29.

Bartsch H, Voigtsberger S, Baumann G, Morano I, Luther HP. Detection of a novel sense-antisense RNA-hybrid structure by RACE experiments on endogenous troponin I antisense RNA. *RNA* 2004; 10(8):1215-1224.

Bertges DJ, Fink MP, Delude RL. Hypoxic signal transduction in critical illness. *Crit Care Med* 2000; 28(4 Suppl):N78-N86.

Boutilier RG, St Pierre J. Surviving hypoxia without really dying. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2000; 126(4):481-490.

Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 1996; 76(3):839-885.

Cayre A, Rossignol F, Clottes E, Penault-Llorca F. aHIF but not HIF-1alpha transcript is a poor prognostic marker in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003; 5(6):R223-R230.

Chang Y, Spicer DB, Sonenshein GE. Effects of IL-3 on promoter usage, attenuation and antisense transcription of the c-myc oncogene in the IL-3-dependent Ba/F3 early pre-B cell line. *Oncogene* 1991; 6(11):1979-1982.

Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S et al. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 2005; 308(5725):1149-1154.

Chun YS, Choi E, Kim TY, Kim MS, Park JW. A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1alpha gene. *Biochem J* 2002; 362(Pt 1):71-79.

Chun YS, Choi E, Yeo EJ, Lee JH, Kim MS, Park JW. A new HIF-1 alpha variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 22):4051-4061.

Connolly PH, Caiozzo VJ, Zaldivar F, Nemet D, Larson J, Hung SP et al. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 2004; 97(4):1461-1469.

Curatola AM, Nadal MS, Schneider RJ. Rapid degradation of AU-rich element (ARE) mRNAs is activated by ribosome transit and blocked by secondary structure at any position 5' to the ARE. *Mol Cell Biol* 1995; 15(11):6331-6340.

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001; 53(1):135-159.

Depping R, Hagele S, Wagner KF, Wiesner RJ, Camenisch G, Wenger RH et al. A dominant-negative isoform of hypoxia-inducible factor-1 alpha specifically expressed in human testis. *Biol Reprod* 2004; 71(1):331-339.

Farrell CM, Lukens LN. Naturally occurring antisense transcripts are present in chick embryo chondrocytes simultaneously with the down-regulation of the alpha 1 (I) collagen gene. *J Biol Chem* 1995; 270(7):3400-3408.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669):806-811.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; 196(2):261-282.

Gothie E, Richard DE, Berra E, Pages G, Pouyssegur J. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2000; 275(10):6922-6927.

Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Jr., Giaccia AJ. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 1994; 14(9):6264-6277.

Graven KK, Bellur D, Klahn BD, Lowrey SL, Amberger E. HIF-2alpha regulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1626(1-3):10-18.

Gustafsson T, Knutsson A, Puntschart A, Kaijser L, Nordqvist AC, Sundberg CJ et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human

skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. *Pflugers Arch* 2002; 444(6):752-759.

Gustafsson T, Puntschart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; 276(2 Pt 2):H679-H685.

Hastings ML, Milcarek C, Martincic K, Peterson ML, Munroe SH. Expression of the thyroid hormone receptor gene, *erbA*alpha, in B lymphocytes: alternative mRNA processing is independent of differentiation but correlates with antisense RNA levels. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(21):4296-4300.

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 1997; 272(13):8581-8593.

Hoopengardner B. Adenosine-to-inosine RNA editing: perspectives and predictions. *Mini Rev Med Chem* 2006; 6(11):1213-1216.

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(14):7987-7992.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001; 292(5516):464-468.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998; 12(2):149-162.

Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001; 15(7):1312-1314.

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; 271(30):17771-17778.

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* 1996; 271(4 Pt 1):C1172-C1180.

Jurka J. Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet* 2000; 16(9):418-420.

Karolchik D, Baertsch R, Diekhans M, Furey TS, Hinrichs A, Lu YT et al. The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(1):51-54.

Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M et al. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 2005; 309(5740):1564-1566.

Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 2002; 12(4):656-664.

Kent WJ, Baertsch R, Hinrichs A, Miller W, Haussler D. Evolution's cauldron: duplication, deletion, and rearrangement in the mouse and human genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20):11484-11489.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002; 12(6):996-1006.

Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R et al. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res* 2006; 16(1):55-65.

Kumar M, Carmichael GG. Nuclear antisense RNA induces extensive adenosine modifications and nuclear retention of target transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(8):3542-3547.

Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 1999; 284(5413):499-502.

Laroia G, Sarkar B, Schneider RJ. Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(4):1842-1846.

Leach RM, Treacher DF. Oxygen transport-2. Tissue hypoxia. *BMJ* 1998; 317(7169):1370-1373.

Lee KH, Park JW, Chun YS. Non-hypoxic transcriptional activation of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in concert with a novel hypoxia-inducible factor-1alpha isoform. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(18):5499-5511.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88(3):323-331.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351(6326):453-456.

Levy AP, Levy NS, Iliopoulos O, Jiang C, Kaplin WG, Jr., Goldberg MA. Regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and its modulation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Kidney Int* 1997; 51(2):575-578.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120(1):15-20.

Lukashev D, Caldwell C, Ohta A, Chen P, Sitkovsky M. Differential regulation of two alternatively spliced isoforms of hypoxia-inducible factor-1 alpha in activated T lymphocytes. *J Biol Chem* 2001; 276(52):48754-48763.

Lundby C, Gassmann M, Pilegaard H. Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1alpha and HIF-2alpha mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur J Appl Physiol* 2006; 96(4):363-369.

Malik KT, Wallace JI, Ivins SM, Brown KW. Identification of an antisense WT1 promoter in intron 1: implications for WT1 gene regulation. *Oncogene* 1995; 11(8):1589-1595.

Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999; 288(5):911-940.

Morwenna S, Ratcliffe WP. Mammalian oxygen sensing and hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(12):1419-1432.

Niess AM, Baumann M, Roecker K, Horstmann T, Mayer F, Dickhuth HH. Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *J Sports Med Phys Fitness* 1998; 38(2):111-115.

Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E. Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exerc Immunol Rev* 1999; 5:22-56.

Ookawara T, Suzuk K, Haga S, Ha S, Chung KS, Toshinai K et al. Transcription regulation of gene expression in human skeletal muscle in response to endurance training. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2002; 111(1-4):41-54.

Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 1999; 515 (Pt 1):287-291.

Prior SJ, Hagberg JM, Phares DA, Brown MD, Fairfull L, Ferrell RE et al. Sequence variation in hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1A): association with maximal oxygen consumption. *Physiol Genomics* 2003; 15(1):20-26.

Quere R, Manchon L, Lejeune M, Clement O, Pierrat F, Bonafoux B et al. Mining SAGE data allows large-scale, sensitive screening of antisense transcript expression. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(20):e163.

Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* 1998; 201(Pt 8):1153-1162.

- Rosok O, Sioud M. Systematic identification of sense-antisense transcripts in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22(1):104-108.
- Rossignol F, de Laplanche E, Mounier R, Bonnefont J, Cayre A, Godinot C et al. Natural antisense transcripts of HIF-1alpha are conserved in rodents. *Gene* 2004; 339:121-130.
- Rossignol F, Vache C, Clottes E. Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1alpha are detected in different normal and tumour human tissues. *Gene* 2002; 299(1-2):135-140.
- Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, Chandel NS. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283(5):L922-L931.
- Schwartz S, Kent WJ, Smit A, Zhang Z, Baertsch R, Hardison RC et al. Human-mouse alignments with BLASTZ. *Genome Res* 2003; 13(1):103-107.
- Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:551-578.
- Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest* 2000; 106(7):809-812.
- Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 2003; 19(11):1439-1440.
- Simon P, Schott K, Williams RW, Schaeffel F. Posttranscriptional regulation of the immediate-early gene EGR1 by light in the mouse retina. *Eur J Neurosci* 2004; 20(12):3371-3377.
- Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(1):201-212.
- Thrash-Bingham CA, Tartof KD. aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(2):143-151.
- Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem* 2004; 279(15):14871-14878.
- Vogt M, Puntschart A, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* 2001; 91(1):173-182.
- Wagner PD. Skeletal muscle angiogenesis. A possible role for hypoxia. *Adv Exp Med Biol* 2001; 502:21-38.

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 U S A* 1995; 92(12):5510-5514.

Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270(3):1230-1237.

Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000; 203(Pt 8):1253-1263.

Yelin R, Dahary D, Sorek R, Levanon EY, Goldstein O, Shoshan A et al. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat Biotechnol* 2003; 21(4):379-386.

Zimmermann AK, Simon P, Seeburger J, Hoffmann J, Ziemer G, Aebert H et al. Cytokine gene expression in monocytes of patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery evaluated by real-time PCR. *J Cell Mol Med* 2003; 7(2):146-156.

Zou AP, Yang ZZ, Li PL, Cowley AW, Jr. Oxygen-dependent expression of hypoxia-inducible factor-1 α in renal medullary cells of rats. *Physiol Genomics* 2001; 6(3):159-168.

Zuker M. Prediction of RNA secondary structure by energy minimization. *Methods Mol Biol* 1994; 25:267-294.

Danksagungen

Vielen Dank an die zahlreichen Personen aus den verschiedenen Laboratorien die uns freizügig Proben zur Verfügung gestellt haben.

Ein Dankeschön an das physiologische Institut, das Labor der Thorax-Herz-Gefäß-Chirurgie und an die Transfusionsmedizin, die durch die Erlaubnis ihre Geräte und Räume zu benutzen, die von uns durchgeführten Versuche erst ermöglichten.

Vielen Dank an Frau PD Dr. Cora Weigert, die uns freundlicherweise Proben für unsere Myotubenzellversuche zur Verfügung gestellt hat.

Ein herzliches Dankeschön an das Laborteam der Sportmedizin (Lenka, Thomas, Tabea und Anette) für die zahlreichen netten Stunden im Labor.

Alex und Peri, ohne euch beide hätte das nie funktioniert.

Alex, vielen Dank für die vielen Stunden im Labor die dadurch erträglicher waren und die zahlreichen Hilfestellungen.

Peri, vielen Dank für die tolle Betreuung und Geduld, die du teilweise mit mir haben musstest. Vielen Dank für deine ständige Ansprechbarkeit und ständige Hilfsbereitschaft bei Problemen.

Noch mal danke an euch beide, es war wirklich klasse und hat viel Spaß gemacht.

Zu Letzt noch ein herzliches Dankeschön an meine beiden Korrekturleserinnen, meine Mama und meine zukünftige Frau Mellie.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	David Fernando Raoul Callau Monje
geboren am	09. Dezember 1979
in	Waiblingen
Familienstand	ledig

Schulbildung

August 1986 – Juli 1990	Grundschule Berglen-Steinach
August 1990 – Juli 1999	Lessing-Gymnasium Winnenden

Zivildienst

September 1999 – August 2000	Individuelle Schwerstbehinderten- Betreuung DRK Waiblingen
------------------------------	---

Hochschulbildung

WS 00/01 – WS 01/02	Studium der Elektrotechnik an der Universität Karlsruhe
SS 02 – WS 03/04	Vorklinisches Studium an der Universität Tübingen
SS 04 – WS 06/07	Klinisches Studium an der Universität Tübingen
SS 07 – WS 07/08	Praktisches Jahr
6. Mai 2008	Abschluss des Studiums