

Zusammenfassung

Die langfristige Anpassung einer Zelle an Veränderungen in der O₂-Versorgung erfolgt durch eine Modulation der Genexpression. Die transkriptionelle Kontrolle der Genexpression wird über die Funktion von verschiedenen Transkriptionsfaktoren ausgeübt. Unter Hypoxie spielt der Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 (HIF-1) eine entscheidende Rolle für die transkriptionelle Aktivierung der Expression von vielen Genen, wie z.B. Erythropoetin (EPO), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). HIF-1 besteht aus einer O₂-sensitiven Untereinheit HIF-1 α und einer konstitutiv exprimierten Untereinheit HIF-1 β , die auch als Arylhydrocarbon-Rezeptor-nukleäres-Translokator-Protein (ARNT) bekannt ist.

Die O₂-abhängige Regulation von HIF-1 α erfolgt überwiegend durch post-translationale Modifikation. Unter Normoxie werden Sauerstoff-abhängig zwei Prolin-Reste (P402/ P564) innerhalb der O₂-abhängigen Degradierungsdomäne (ODD) und ein Asparagin-Rest (N803) in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (C-TAD) hydroxyliert. Die Prolinhydroxylierung bedingt dann die Bindung des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorproteins (VHL), Ubiquitylierung und proteasomalen Abbau von HIF-1 α . Die Asparaginhydroxylierung verhindert die Rekrutierung des Coaktivators p300.

Neben der O₂-abhängigen Regulation von HIF-1 α können viele Wachstumsfaktoren und Hormone, einschließlich Insulin über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase B (PKB) Signalweg, die HIF-1 α -Spiegel O₂-unabhängig induzieren. Dabei ist die Steigerung der HIF-1 α -Proteinspiegel nicht direkt auf die Phosphorylierung durch PKB zurückzuführen, sondern wird wahrscheinlich durch weitere PKB Substrate, wie mammalian target of Rapamycin (mTOR) und Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) verursacht. Insbesondere die GSK-3 könnte eine Rolle bei der Regulation der HIF-1 α Proteinstabilität spielen, denn potentielle Consensus-Sequenzen für die GSK-3 scheinen in der O₂-abhängigen Degradierungsdomäne (ODD) von HIF-1 α zu existieren.

Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit die exakte Lokalisation dieser möglichen Phosphorylierungsstellen für die GSK-3 im Zusammenhang mit der HIF-1 α Stabilität zu untersuchen.

Aktivierung der PAI-1- und HIF-1 α -Expression durch Insulin und Lithiumchlorid

Insulin kann die PAI-1-Genexpression über den PI3K/ PKB Signalweg via HIF-1 α vermitteln. In Primärkulturen von Rattenhepatocyten und in HepG2 Hepatomazellen konnte Insulin unter Normoxie die GSK-3 durch Phosphorylierung hemmen und eine Induktion der PAI-1-mRNA und HIF-1 α -Proteinmenge bedingen. Hemmung der GSK-3 durch Behandlung mit LiCl imitierte den Insulineffekt und steigerte die PAI-1-mRNA- und die HIF-1 α -Proteinspiegel. Unter venösem pO₂ konnte dieser Effekt noch verstärkt werden. Dies deutete darauf hin, dass die GSK-3 über eine

Regulation der HIF-1 α -Spiegel an der Vermittlung der Insulin-induzierten PAI-1-Expression beteiligt sein könnte.

Regulation der HIF-1 α Proteinmenge durch GSK-3

In HepG2- und COS-7-Zellen wurden die HIF-1 α -Proteinspiegel nach Cotransfektion von verschiedenen HIF-1 α -, GSK-3 α - und GSK-3 β -Expressionsplasmiden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass unter Normoxie und Hypoxie die Expression von GSK-3 α und GSK-3 β zu einer Reduktion der HIF-1 α -Proteinmengen führte. Diese Abnahme der Proteinmenge war auf einen VHL-unabhängigen proteasomalen Abbauprozess zurückzuführen, da i) eine VHL-resistente HIF-1 α -Mutante auch durch GSK-3 destabilisiert wurde und ii) der Proteasomenhemmstoff MG132 die Reduktion der HIF-1 α -Spiegel dieser Mutante durch GSK-3 teilweise aufhob. Die Regulation der HIF-1 α -Proteine durch GSK-3 erfolgte ausschließlich im Bereich der ODD von HIF-1 α . Innerhalb dieses Bereichs befinden sich die putativen GSK-3 Phosphorylierungsstellen (S551, T555 und S589). Durch Mutationen von S551A, T555V und S589A, allein und in Kombination, wurden diese Phosphorylierungsstellen ausgeschaltet. Die nachfolgenden Experimente zeigten dann, dass die Punktmutationen den Effekt der Reduktion durch GSK-3 aufgehoben hatten. Dadurch kann angenommen werden, dass durch diese Mutationen innerhalb der N-terminalen Transaktivierungsdomäne der ODD die Regulierung durch die GSK-3 ausgeschaltet wurde.

Phosphorylierung der HIF-1 α -TADN durch GSK-3

Da die bisherigen Versuche gezeigt haben, dass die putativen Phosphorylierungsstellen S551, T555 und S589 durch GSK-3 phosphoryliert werden könnten, konnte erst durch einen GSK-3-Kinase-Assay gezeigt werden, dass nur bei Ausschaltung aller drei Phosphorylierungsstellen die aktive GSK-3 β HIF-1 α nicht mehr phosphorylieren kann.

Regulation der HIF-2 α Proteinmenge durch GSK-3

Um zu überprüfen, inwieweit die Regulation durch GSK-3 auch für HIF-2 α zutrifft, wurden die ebenfalls im HIF-2 α -Protein vorhandenen GSK-3-Phosphorylierungsstellen mutiert. Transfektionsexperimente mit einem HIF-2 α -TADN-Expressionsplasmid, sowie dessen Mutante mit GSK-3 α - und GSK-3 β -Genkonstrukten in HepG2-Zellen zeigten, dass die Modulation, die die GSK-3 auf HIF-1 α ausübt, auch auf HIF-2 α übertragbar ist.

Regulation der HIF-3 α Proteinmenge durch PKB

Im Gegensatz zu HIF-1 α und HIF-2 α besitzt HIF-3 α eine putative Targetsequenz für PKB. Two Hybrid-Analysen in Gegenwart eines PKB-Expressionsvektors zeigten, dass PKB HIF-3 α reprimiert, was durch Mutation der "PKB-Site" aufgehoben werden konnte.

Somit zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass GSK-3 sowohl die VHL-unabhängige proteasomale HIF-1 α - und HIF-2 α -, aber nicht die HIF-3 α -Degradation verursachen kann.

1. Einleitung

Die Grundlage des höheren Lebens wurde mit der Entstehung des Sauerstoffs vor etwa 2 Milliarden Jahren geschaffen. Er dient als Substrat bei verschiedenen enzymatischen Reaktionen sowie als terminaler Elektronenakzeptor in der mitochondrialen Atmungskette und trägt somit dazu bei, daß Energie im Rahmen der ATP-Synthese bereitgestellt werden kann. Bei einer mangelnden Versorgung des Körpers mit Sauerstoff kommt es zu schwerwiegenden Konsequenzen für den Körper, denn insbesondere Gehirn, Herz und Muskeln von Säugern sind auf eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff über das Blut angewiesen. Tritt eine Unterversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) auf, muß der Körper darauf mit sogenannten Anpassungsreaktionen reagieren. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen: die kurzfristigen, die innerhalb von Sekunden bis Minuten ablaufen und die langfristigen Reaktionen, die über Stunden und Tage verlaufen. Bei den kurzfristigen Reaktionen handelt es sich um kompensatorische Maßnahmen, die keinen Einfluss auf die Genexpression haben, wie z.B. das Einsetzen einer verstärkten Atmung und die Erweiterung der Lungengefäße. Energieverbrauchende Stoffwechselwege, wie Proteinsynthese oder Gluconeogenese werden auf zellulärer Ebene herunterreguliert und so durch Verlangsamung der ATP-verbrauchenden zellulären Prozesse der ATP-Umsatz verringert.

Bei den längerfristigen Anpassungsreaktionen des Organismus an Hypoxie handelt es sich um eine Veränderung der Genexpression. Die durch Hypoxie angeregte Synthese von roten Blutkörperchen (Erythropoese) im Knochenmark ist die am besten charakterisierte O_2 -abhängige Genexpression bei Säugern. Eine Schlüsselfunktion hat hierbei das Hormon Erythropoetin (EPO), das als Antwort auf Hypoxie in den fibroblastenähnlichen, Typ I interstitiellen Zellen der äußeren Medulla der Niere produziert wird. Über den Blutkreislauf gelangt das Hormon ins Knochenmark, wo es an Rezeptoren der erythroiden Vorläuferzellen bindet und somit ihre Proliferation und Differenzierung stimuliert. Die so verstärkte Erythrocytenproduktion trägt entscheidend zur Normalisierung des O_2 -Transports bei. Neben der EPO-Synthese und den klassischen Stoffwechselwegen Glycolyse und Gluconeogenese sind bei Säugern eine große Zahl weitere physiologischer Prozesse bekannt, bei denen Sauerstoff einen regulatorischen Einfluß hat. Dabei spielen eine Vielzahl von Transportern, Enzymen, Hormonen und Wachstumsfaktoren eine Rolle, deren Genexpression durch verringerten Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) und normalen Sauerstoffpartialdruck (Normoxie) moduliert wird (Tab. 1). Die Wirkung einer extrazellulären Signalsubstanz, wie eines Hormons, Wachstumsfaktors oder Neurotransmitters wird in der Regel über einen Rezeptor vermittelt, jedoch ist ein eigentlicher Sauerstoffsensoren bisher nicht identifiziert.

Tabelle 1: O₂-modulierte Prozesse und darin involvierte Gene bei Säugetieren.

Prozesse	Hypoxie-induzierte Genexpression	Normoxie-induzierte Genexpression
Hämatopoese	Erythropoietin (EPO) 1	
Angiogenese	Vascular endothelial growth factor (VEGF) 2	Placental growth factor (PLGF) 3
Fibrinolyse	Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4	Plasminogen activator (tPA) 5
Wundverschluß/Entzündung	Inducible nitric oxide synthase (iNOS) 6	Tumor necrosis factor- α (TNF α) 7
Wachstum/Differenzierung	p53 Tumor suppressor protein 8	
	bcl-2 Apoptosis preventing protein 9	
	Insulin like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) 10	
Kohlenhydrat-Stoffwechsel		
Glucosetransport	Glucosetransporter-1 (GLUT-1) 11	
Glykolyse/Gluconeogenese	Glucokinase (GK) 12-16	cytosolic Phosphoenolpyruvate carboxykinase-1 (PCK-1) 17
	Aldolase A (ALD-A)	
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	
	Phosphoglycerate kinase1 (PGK1)	
	Pyruvate kinase M (PK _M)	
	Lactate dehydrogenase A (LDH-A)	
NH ₃ -Aminosäuren-Stoffwechsel	L-Arginine transporter 18	Tyrosine aminotransferase (TAT) 19
Xenobiotika-Stoffwechsel		Cytochrome P450-1 A1 (CYP1A1) 20
Häm-Stoffwechsel	Heme oxygenase-1 (HO-1) 21	Hemopexin (Hx) 22
H ₂ O- und Elektrolythaushalt	Angiotensin converting enzyme (ACE) 23	Atrial natriuretic peptide receptor (ANPR) 24

- 1 Goldberg, M.A., Dunning, S.P., Bunn, H.F. (1988) *Science* **242**, 1412-1415
- 2 Goldberg, M.A. and Schneider, T.J. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 4355-4359
- 3 Gleadle, J.M., Ebert, B.L., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J. (1995) *Am.J.Physiol.* **268**, C1362-C1368
- 4 Kietzmann, T., Roth, U., Jungermann, K. (1999) *Blood* **94**, 4177-4185
- 5 Pinsky, D.J., Liao, H., Lawson, C.A., Yan, S.F., Chen, J., Carmeliet, P., Loskutoff, D.J., Stern, D.M. (1998) *J.Clin.Invest.* **102**, 919-928
- 6 Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L.S., Cox, G.W., Varesio, L. (1995) *J.Exp.Med.* **182**, 1683-1693
- 7 VanOtteren, G.M., Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Danforth, J.M., Strieter, R.M. (1995) *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **13**, 399-409
- 8 Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Fornace-AJ, Giaccia, A.J. (1994) *Mol.Cell Biol* **14**, 6264-6277
- 9 Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1995) *Nature* **374**, 811-813
- 10 Tazuke, S.I., Mazure, N.M., Sugawara, J., Carland, G., Faessen, G.H., Suen, L.F., Irwin, J.C., Powell, D.R., Giaccia, A.J., Giudice, L.C. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 10188-10193
- 11 Gleadle, J.M., Ebert, B.L., Ratcliffe, P.J. (1995) *Eur.J.Biochem.* **234**, 92-99
- 12 Kietzmann, T., Roth, U., Freimann, S., Jungermann, K. (1997) *Biochem.J.* **321**, 17-20
- 13 Kietzmann, T., Freimann, S., Bratke, J., Jungermann, K. (1996) *FEBS Lett.* **388**, 228-232
- 14 Graven, K., Troxler, R.F., Kornfeld, H., Panchenko, M.V., Farber, H.W. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 24446-24453
- 15 Firth, J.D., Ebert, B.L., Ratcliffe, P.J. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 21021-21027
- 16 Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P., Giallongo, A. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 32529-32537
- 17 Hellkamp, J., Christ, B., Bastian, H., Jungermann, K. (1991) *Eur.J.Biochem.* **198**, 635-639
- 18 Louis, C.A., Reichner, J.S., Henry-WL, J., Mastrofrancesco, B., Gotoh, T., Mori, M., Albina, J.E. (1998) *Am.J.Physiol.* **274**, R775-R782
- 19 Nauck, M., Woffle, D., Katz, N., Jungermann, K. (1981) *Eur.J.Biochem.* **119**, 657-661
- 20 Hazinski, T.A., Noisin, E., Hamon, I., DeMatteo, A. (1995) *J Clin.Invest.* **96**, 2083-2089
- 21 Lee, P.J., Jiang, B.H., Chin, B.Y., Iyer, N.V., Alam, J., Semenza, G.L., Choi, A.M. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 5375-5381
- 22 Kietzmann, T., Immenschuh, S., Katz, N., Jungermann, K., Muller, E.U. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 397-403
- 23 King, S.J., Booyse, F.M., Lin, P.H., Traylor, M., Narkates, A.J., Oparil, S. (1989) *Am.J Physiol.* **256**, C1231-C1238
- 24 Mathew, R., Omar, H.A., Fayngersh, R., Shen, W., Wang, J., Gewitz, M.H., Hintze, T.H., Wolin, M.S. (1996) *Br.J.Pharmacol.* **118**, 1886-1890

Insbesondere Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Erythropoetin (EPO)-Genexpression (Bunn und Poyton, 1996; Goldberg et al., 1988; Wang und Semenza, 1993) und zur Normoxie-modulierten Glucagon-abhängigen PCK1-Genaktivierung (Kietzmann et al., 1997; Kietzmann et al., 1996; Kietzmann et al., 1997) sowie zur Hypoxie-modulierten Insulin-abhängigen GK-Genaktivierung (Kietzmann und Jungermann, 1997; Bratke et al., 1999; Kietzmann et al., 1998; Kietzmann et al., 1997) weisen darauf hin, daß ein H_2O_2 -bildendes Häm-Protein als Sauerstoff-Sensor beteiligt sein könnte.

Spektroskopische Untersuchungen und deren Befunde führten zu der Hypothese, daß ein b-Typ-Cytochrom am O_2 -Sensing beteiligt sein könnte (Acker et al., 1989, 1992, 1994), in dessen Signaltransduktionsprozess O_2 in H_2O_2 umgewandelt wird (Fandrey et al., 1994; Görlach et al., 1994) (Abb. 1). Das daraus entstandene H_2O_2 kann dann durch eine am endoplasmatischen Retikulum lokalisierte perinukleäre Fenton-Reaktion in Hydroxylradikale ($\text{OH}\bullet$) und in Hydroxylanionen (OH^-) umgewandelt werden (Kietzmann et al., 1998; Liu et al., 2004). Durch die Fenton-Reaktion wird es den Zellen ermöglicht, ihre Genexpression adäquat an den Sauerstoffpartialdruck anzupassen. Diese Anpassung erfolgt durch die hohe Reaktivität des Hydroxylradikals mit RNA-bindenden Faktoren, wie der ein Fe-S-Cluster enthaltenden Aconita-

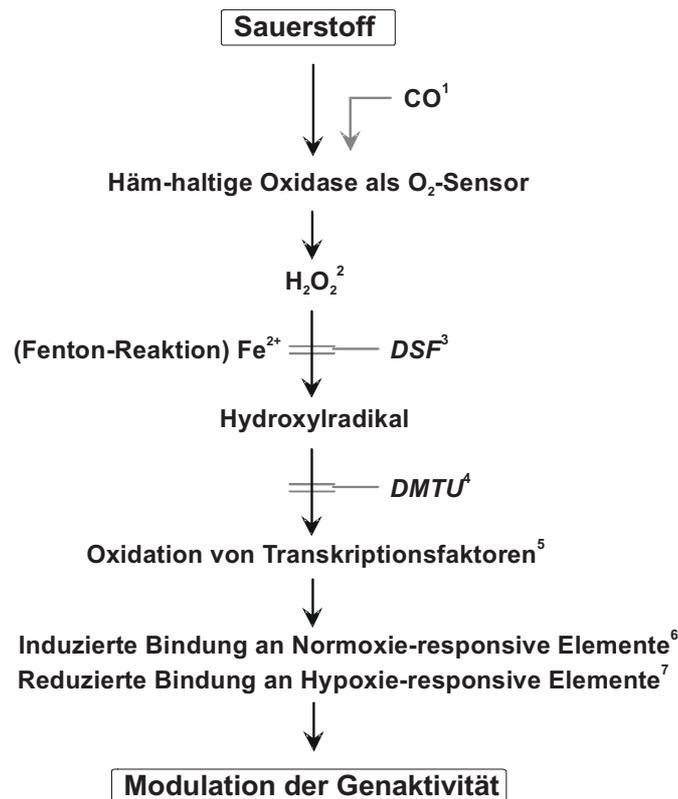


Abb. 1: Modulation der Genaktivität durch Sauerstoff-Sensing (Hypothese) (Jungermann und Kietzmann, 2000). (1) CO, Kohlenmonoxid (Sauerstoffsimulator) (Goldberg et al., 1988; Kietzmann et al., 1993); (2) Zugabe von H_2O_2 (Kietzmann et al., 1997, 1996; Fandrey et al., 1994); (3) DSF, Desferrioxamin (Eisenchelator) (Fandrey et al., 1994; Ehleben et al., 1997; Kietzmann et al., 1998); (4) DMTU, Dimethylthioharnstoff (Radikalfänger) (Fandrey et al., 1994; Ehleben et al., 1997; Kietzmann et al., 1998); (5) s. Huang et al., 1996; (6) s. Bratke et al., 1999; (7) s. Huang et al., 1996; Firth et al., 1994; und Semenza et al., 1996.

se (Rouault und Klausner, 1997) oder redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren. Zu diesen gehören neben dem leucin-zipper Protein Aktivator-Protein 1 (AP-1) (Abate et al., 1990), die zur Gruppe der basic helix-loop-helix (bHLH)-Familie gehörenden Proteine Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF-1) (Wang et al., 1995) und der Upstream Stimulatory Factor (USF) (Pognonec et al., 1992), die an Cysteinen modifiziert werden, bevor sie in den Kern einwandern und die Genexpression über die modifizierte Bindung an Normoxie-responsive Elemente (NRE) oder Hypoxie-responsive Elemente (HRE) modulieren (Abb. 1).

1.1 Der Hypoxie-induzierbare Faktor

Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1) ist ein heterodimerer Proteinkomplex, der aus einer HIF-1 α Untereinheit (Wang und Semenza, 1995) und aus einer HIF-1 β Untereinheit besteht, die auch als Arylhydrocarbon-Rezeptor-nukleärem-Translokator (ARNT) bekannt ist (Hoffmann et al., 1991).

Der humane HIF-1 α ist ein Protein von 826 AS. Der aminoternale Bereich von HIF-1 α beinhaltet eine basic helix-loop-helix (bHLH)-Domäne und eine PAS (Per-AHR-ARNT-Sim)-Domäne, die in dem Drosophila Protein Periodic (Per), dem Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR), dem ARNT und dem Single minded (Sim) Protein vorkommt und deshalb PAS-Domäne genannt wird. Die DNA-Bindung wird durch die basischen Aminosäuren der bHLH-Domäne ermöglicht, wohingegen die bHLH-PAS-Domäne für die Protein-Dimerisierung verantwortlich ist (Reisz-Porszasz et al., 1994; Wang et al., 1995; Jiang et al., 1996a) (Abb. 2).

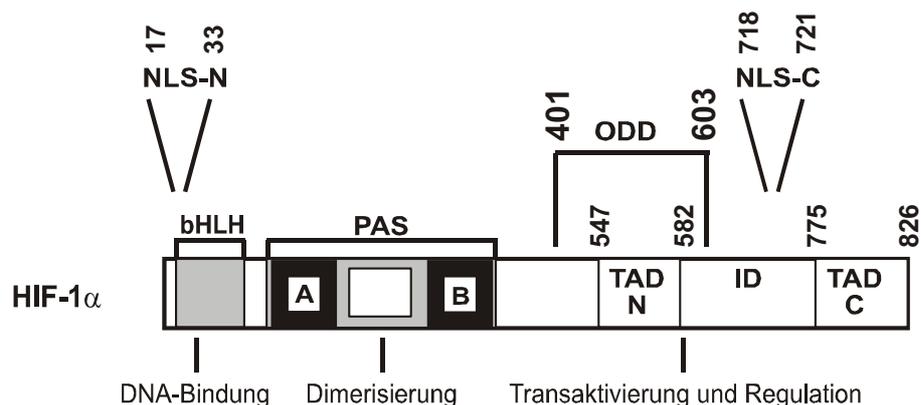


Abb. 2: Struktur einer α -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors am Beispiel von HIF-1 α . Angegeben sind die funktionellen Domänen mit den dazugehörigen Aminosäure-Bereichen (wenn bekannt) bHLH: basic Helix-Loop-Helix, ID: Inhibitorische Domäne, NLS: Nukleäre Lokalisationssequenz; ODD: O₂-abhängige Degradierungsdomäne, PAS: PAS (Per/ARNT/Sim)-Domäne mit den beiden internen homologen Bereichen A und B; TAD: Transaktivierungsdomäne.

Neben der HIF-1 α Untereinheit sind noch zwei weitere α -Untereinheiten bekannt, die mit der β -Untereinheit (ARNT) zu einem aktiven Transkriptionsfaktor dimerisieren können. Es handelt sich um HIF-2 α , auch bekannt als EPAS1 (endothelial PAS-domain-protein 1) (Tian et al., 1997), MOP2 (Member of PAS Superfamily 2) (Rivard et al., 2000), HLF (HIF like factor) (Ema et al., 1997) oder HRF (HIF related factor) (Flamme et al., 1997) und um HIF-3 α , auch bezeichnet als MOP7 (Hogenesch et al., 1997; Gu et al., 1998). Unter Hypoxie gelangt die α -Untereinheit in den Kern, heterodimerisiert dort mit der β -Untereinheit und entfaltet durch Bindung an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) (Beck et al., 1991) seine transkriptionsaktivierende Wirkung (Kallio et al., 1998).

1.2 Aktivierung und Stabilisierung von HIF-1 α unter Hypoxie

Die Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 α wird durch verschiedene post-translationale Modifikationen, wie Hydroxylierungen reguliert.

Unter Normoxie wird das HIF-1 α -Protein einer schnellen proteasomalen Degradation unterzogen, wohingegen Hypoxie diese Degradation blockiert (Huang et al., 1996; Kallio et al., 1997). Voraussetzung für den proteasomalen Abbau ist die Ubiquitylierung von HIF-1 α nach Bindung des von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL), einer Komponente eines E3 Ubiquitin Ligase Komplexes (Hon et al., 2002; Min et al., 2002). Die Bindung von pVHL erfolgt jedoch erst, wenn zwei Prolin Reste (P402/ P564), die sich in der O₂-abhängigen Degradierungsdomäne (ODD) des HIF-1 α Proteins befinden, durch spezifische Prolinhydroxylasen (PHD1-4) hydroxyliert sind. Durch die post-translationale Hydroxylierung eines weiteren Asparagin-Restes (N803) der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (C-TAD) durch den Factor-inhibiting HIF (FIH) wird die Rekrutierung des Coaktivators CBP/p300 verhindert, was sich in einem Verlust des Transaktivierungspotentials von HIF-1 α verdeutlicht.

Zusätzlich kann die Acetylierung von HIF-1 α durch die Acetyltransferase ARD-1 am Lysin 532 die Interaktion mit pVHL verstärken und so zur proteasomalen Degradation beitragen (Jeong et al 2002). Weitere post-translationale Modifikationen sind durch MAP-Kinasen beschrieben worden, wobei die genaue Lokalisation der phosphorylierten Aminosäuren im HIF-1 α Molekül nicht determiniert wurde (Richard et al. 1999).

1.3 Aktivierung und Kontrolle der HIF-1 α -Aktivität durch Insulin

Die HIF-1 α -Proteinspiegel werden nicht nur durch veränderten O₂-Partialdruck reguliert, sondern auch O₂-unabhängig durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie PDGF, Gerinnungsfaktoren wie Thrombin und Hormone wie Insulin. Interessanterweise scheint bei der

HIF-1 α Regulation durch alle diese O₂-unabhängigen Stimuli der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)- und Proteinkinase B (PKB)-Signalweg eine entscheidende Rolle zu spielen.

So wird diese Signalkaskade nach Insulin-Bindung an seinen Rezeptor und durch Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der intrazellulären Rezeptor β -Ketten und der Tyrosinphosphorylierung von Insulin-Rezeptor-Substraten (IRS) initiiert (Myers and White, 1996; O'Brian und Granner, 1996). Anschließend wird durch Phosphorylierung von Insulin-Rezeptor-Substraten (IRS) und Bindung der Phosphotyrosin-Reste der IRS an der regulatorischen Untereinheit p85 der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) diese Kinase aktiviert (Kazlauskas, 1994; Pawson, 1995). Durch diesen Prozess wird die PI3K-katalytische Untereinheit p110 zur Plasmamembran geführt, wo dann das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) zu PI(3,4,5)P₃ sowie PI(4)P zu PI(3,4)P₂ durch p110 phosphoryliert wird (Reif et al., 1996). Mit hoher Affinität binden dann PI(3,4,5)P₃ bzw. PI(3,4)P₂ an die Pleckstrin (PH)-Domäne der PKB und binden somit die Kinase an die Plasmamembran. Dort wird die PKB am Threonin (Thr) 308 und am Serin (Ser) 473 phosphoryliert (Alessi und Cohen, 1998; Bellacosa et al., 1998) und somit aktiviert. Die Phosphorylierung am Thr308 wird durch eine Kinase vermittelt, bei der es sich um eine ubiquitär exprimierte Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) handelt (Alessi et al., 1997; Stephens et al., 1998). Bei Ser473 ist die Phosphorylierung unabhängig von PDK1. Sie scheint durch eine Kinase vermittelt zu werden, die im Gegensatz zu PDK1 von dem Kinase-Inhibitor Staurosporin unbeeinflusst bleibt (Hill et al., 2001).

Über Phosphorylierungen von weiteren Substraten wie der Glycogen-Synthase-Kinase-3, dem mammalian target of Rapamycin (mTOR) und Transkriptionsfaktoren wie Forkhead-Transkriptionsfaktoren und Elongationsfaktoren wird der PKB-Effekt auf die Gen-Expression übertragen. PKB beeinflusst so die NF- κ B-abhängige Gentranskription durch Aktivierung der NF- κ B-Inhibitor (I κ B)-Kinase (IKK) und Degradierung von I κ B (Kane et al., 1999). Ob und wie PKB nun genau die Aktivität von HIF-1 α regulieren kann, ist bisher nicht genau bekannt. Eine Möglichkeit ergibt sich durch die Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3).

1.4 Regulation der GSK-3 durch Insulin und den Wnt-Signalweg

Die Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) wurde als erstes als ein Regulator des Glycogen Stoffwechsels entdeckt, da die GSK-3 das Schlüsselenzym der Glycogen Biosynthese ist, welches die Glycogen-Synthase durch Phosphorylierung inaktiviert (Embi et al., 1980). Die GSK-3 ist eine Serin/ Threonin Kinase, die in ihren Zielproteinen die Sequenz S/TXXXS/T erkennt (Fiol et al., 1990). Es existieren zwei Isoformen GSK-3 α und GSK-3 β , welche ubiquitär in Säugetierzellen exprimiert werden (Woodgett, 1990, 1991).