Aus der Abteilung Herz- und Kreislaufphysiologie (Prof. Dr. med. D. M. Katschinski)

im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Etablierung und Charakterisierung einer Tetracyclininduzierbaren PHD2-Knockdown-HeLa-Zelllinie

# **INAUGURAL – DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Sinja Kim-Anh Le-Huu aus Niefern-Öschelbronn

> > Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. D. M. Katschinski

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

A	bkür	zungsverzeichnis	Ш
1	Einl	eitung	1
	1.1	Hypoxie	1
	1.2 1. 1. 1. 1.	<ul> <li>Hypoxie-induzierbarer Faktor-1</li></ul>	1 1 2 3 4
	1.3	PHD-Sauerstoffsensoren	6
	1.	3.1 PHD-Isoformen	6
	l. 1	3.2 Weitere PHD-Substrate	7
	1.	3.4 Regulation der PHDs durch kleine Moleküle	9
	1.	3.5 PHD-Inhibitoren	9
	1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	11
2	Mat	erial und Methoden	12
	2.1	Zelllinie und Zellkultur	12
	2.2	Stabile Transfektion	12
	2.3	Transiente Transfektion und Luciferase-Assay	14
	2.4 2. 2.	Isolierung von Gesamt-RNA (Chomczynski und Sacchi 1987)4.1 RNA-Isolierung mit Trizol4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	15 16 16
	2.5	Reverse Transkription	17
	2.6	Polymerase-Kettenreaktion	17
	2.7	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	18
	2.8	Transkriptomanalyse	19
	2.9	Proteinextraktion und -messung	20
	2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	20
	2.11 2. 2. 2.	Zweidimensionale Gelelektrophorese 11.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF): erste Dimension 11.2 Äquilibrierung und SDS-PAGE: zweite Dimension 11.3 Auswertung der zweidimensionalen Gele	21 21 22 22
	2.12	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	23
	2.13	Fluoreszenzmikroskopie	23
	2.14	Scratch-Assay	24
	2.15	Statistik	24

3	Erge	bnis	Se	25
	3.1 3. 3.	Etab PHI 1.1 1.2	blierung einer stabil shRNA-transfizierten, Tetracyclin-induzierbaren D2- bzw. PHD3-Knockdown-Zelllinie Screening stabil transfizierter Zellklone mithilfe des Luciferase-Assays Überprüfung des PHD-Knockdowns auf Proteinebene	25 26 27
	3.2 3.1 3.1	Opt PHI 2.1 2.2	imierung der Bedingungen für die Tetracyclin-abhängige Induktion eines D2- bzw. PHD3-Knockdowns Titration der Tetracyclin-Konzentration Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer mit Tetracyclin zur Induktion eines PHD2- bzw. PHD3-Knockdowns	29 29 30
	3.3 3.1 3.	Cha 3.1 3.2	rakterisierung der PHD2- und PHD3-Knockdown-Zelllinie Expression der PHD1-, PHD2- und PHD3-RNA in den PHD-Knockdown- Zelllinien 2.1.1-16 und 3.3.1-12 HIF-1α-Proteinnachweis in PHD-Knockdown-Zellklonen	33 33 34
	3.4 3. 3. 3. 3. 3.	Ider Prot 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5	ntifizierung PHD2-abhängiger Veränderungen im Transkriptom und Transkriptomuntersuchung Zweidimensionale Gelelektrophorese der 2.1.1-16-Zellen Cofilin1 wird PHD2-abhängig phosphoryliert PHD2-abhängige Veränderung der Anordnung von F-Aktin In-vitro-Wundheilungsassay (Scratch Assay)	36 36 40 41 42 43
4	Disk	ussi	on	44
	4.1 4.2	Etał Ider Prot	olierung einer Tetracyclin-induzierbaren PHD-Knockdown-Zelllinie ntifizierung von PHD-abhängigen Transkriptom- und reomveränderungen	44 46
	4.3	PHI Akt	D2-abhängige Phosphorylierung von Cofilin1 und Veränderungen im infilament-Umbau	50
	4.4	Kon	sequenzen einer PHD2-Inhibition	53
5	Zusa	mm	enfassung	54
6	Liter	ratu	۲	56

# Abkürzungsverzeichnis

Abbildung
Aktin-denolymerisierende Faktoren
engl amino-terminal enhancer of split
engl activating transcription factor-4
engl hasic helix-loon-helix
Rinderserumalhumin (engl. boyine serum albumin)
Carboanhydrase IX
CREB hindendes Protein
komplementäre DNA
Caenorhabditis elegans
Chronophin
Kohlenstoffdiovid
Cofilin1
1 4-Diazabievelo(2 2 2)octan
1' 6'-Diamidino-2-nhenvlindol
Diethylpyrocarbonat
Ethyl-3 4-dihydroxybenzoat
engl Dulbecco's modified Fagle's medium
Dimethylovalylalycin
Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
Disentidyl-Pentidase 4
Dithiothreitol
Ethylendiamintetraacetat
engl egg laving abnormal 9
EGL neun homolog
Erythropoietin
und andere (lat et alii)
engl. fibroblast activation protein
Eisen (ferrum)
engl. factor inhibiting HIF
Glukosetransporter 1
Stunden (engl. hours)
HEPES-gepufferte Salzlösung (engl. HEPES buffered saline)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonat
Hypoxie-induzierbarer Faktor
engl. hypoxia response element
Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
Hitzeschockprotein 27
Isoelektrische Fokussierung
Immunglobulin G
kilo Dalton
engl. lysogeny broth
LIM-Kinase
L-mimosin
engl. mitogen-activated protein kinase
engl. Methyl CpG binding protein 1
Millimeter Quecksilbersäule
Boten-RNA (engl. messenger RNA)

NF-κB	engl. Nuclear Factor κB
N-OG	N-Oxalylglycin
$O_2$	Sauerstoff
OASL	engl. 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
OD	optische Dichte
ODDD	engl. oxygen-dependent degradation domain
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK1	p21-aktivierte Kinase 1
PAS	Per/ARNT/Sim
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PGM2L1	engl. phosphoglucomutase 2-like 1
pН	negativ dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration (lat.
1	pondus hydrogenii)
PHD	Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne-Proteine
PTPRE	engl. protein tyrosine phosphatase, receptor type, E
pVHL	Von-Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein
Q-PCR	quantitative PCR
RASSF2	engl. Ras association domain family 2
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROCK	engl. Rho associated, coiled-coil-forming protein kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
ŔŢ	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler (engl. standard error of the mean)
shRNA	engl. short hairpin RNA
siRNA	engl. short interfering RNA
SSH	Slingshot
TAD	Transaktivierungsdomäne
TE	Tris-EDTA
TESK	Testis-spezifische Proteinkinase
Tet	Tetracyclin
TLE	engl. transducin-like enhancer of split
T-REx	engl. Tetracycline-regulated Expression
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSPAN8	Tetraspanin8
U	Enzymeinheit (engl. unit)
V	Volt
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor

# 1 Einleitung

# 1.1 Hypoxie

Sauerstoff ist essenziell für die Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen des Körpers. Normalerweise liegt der arterielle Sauerstoffpartialdruck bei ca. 90 mmHg. Aber nicht jede Zelle des Körpers wird mit so viel Sauerstoff versorgt. Der Sauerstoff gelangt mittels Diffusion entlang eines Partialdruckgefälles vom Blut in die Zelle. Die Gewebekapillaren werden oft von mehreren Zellschichten umgeben, die ihrerseits auch Sauerstoff verbrauchen, so dass die Diffusionstrecke relativ lang ist. Im Gewebe herrscht daher nur noch ein Sauerstoffpartialdruck von weniger als 40 mmHg.

Der menschliche Körper besitzt ein ausgefeiltes System, um schon geringe Schwankungen der Sauerstoffversorgung zu detektieren und einem Sauerstoffmangel entgegenzuwirken bzw. sich ihm anzupassen.

Hypoxie (Absinken des Sauerstoffangebots unter den Sauerstoffbedarf) kann vielfältige Ursachen haben. Bei der hypoxämischen Hypoxie ist die arterielle O<sub>2</sub>-Sättigung vermindert. Grund dafür kann eine Lungenfunktionsstörung, aber auch ein Aufenthalt in großen Höhen sein. Der Abfall des Sauerstoffpartialdrucks wird von peripheren und zentralen Chemorezeptoren registriert und führt zu einem gesteigerten Atemantrieb (Prabhakar und Kline 2002).

Auch auf zellulärer Ebene findet eine Anpassung an den Sauerstoffmangel statt. Unter Hypoxie akkumuliert in den Zellen der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1) (Wang G L et al. 1995). HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem in Fibroblasten der Nierenrinde die Expression von Erythropoietin (EPO) steigert (Wang G L und Semenza 1993). EPO steuert die Proliferation und Differenzierung der Erythrozyten-Vorläuferzellen. Durch die gesteigerte Anzahl der Erythrozyten wird die Sauerstoffversorgung des gesamten Organismus verbessert.

# 1.2 Hypoxie-induzierbarer Faktor-1

# 1.2.1 Bedeutung und Aufgaben von HIF-1

HIF-1 wird in allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert. Neben EPO reguliert HIF-1 mehr als 70 weitere Gene und beeinflusst damit unter anderem die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, die Angiogenese, das Zellwachstum, die Zellmobilität und die pH-Regulation (Wenger et al. 2005). Er spielt damit nicht nur bei

systemischer Hypoxie, sondern auch bei lokaler Gewebehypoxie eine Rolle, wie sie zum Beispiel bei Ischämien oder gestörter Sauerstoffdiffusion auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass in Tumoren und Infarktgeweben eine deutlich gesteigerte HIF-1 Aktivität vorliegt (Lee S H et al. 2000; Semenza 2002).

HIF-1-Knockout-Mausmodelle haben gezeigt, dass HIF-1 in der embryonalen Entwicklung existenziell ist. Homozygote HIF-1-Knockout-Mäuse sind nicht überlebensfähig und zeigen kardiovaskuläre Fehlbildungen und Neuralrohrdefekte (Iyer et al. 1998).

# 1.2.2 Die Struktur von HIF-1

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor bestehend aus einer α- und einer β-Untereinheit. HIF-1β (91-94 kDa), auch *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) genannt, wird konstitutiv im Zellkern exprimiert. HIF-1α (ca. 120 kDa) ist hingegen eine stark regulierte Untereinheit. In der C-terminalen Hälfte ist eine *oxygen-dependent degradation domain* (ODDD) lokalisiert (Abb. 1). Durch Hydroxylierung von den Prolinen 402 und 564 der ODDD wird HIF-1α für den Abbau markiert (Ivan et al. 2001; Jaakkola et al. 2001). Zwei unabhängige Transaktivierungsdomänen N-TAD und C-TAD ermöglichen die Inaktivierung bzw. die Aktivierung von HIF-1α. HIF-1α und HIF-1β besitzen jeweils am N-Terminus eine *basic-helix-loop-helix*-PAS-Domäne (bHLH PAS). PAS steht für Per/ARNT/Sim, die ersten drei bekannten Mitglieder dieser Proteinfamilie. Die *basic-helix-loop-helix*-PAS-Domäne ist für die Dimerisierung von HIF-1α und HIF-1β sowie die Bindung an die DNA-Sequenz 5'-G/ACGTG-3' des *hypoxia response element* (HRE) verantwortlich (Wang G L et al. 1995).



Abb. 1: Die Domänenstruktur von HIF-1a.

Neben HIF-1 $\alpha$ , welches in allen Zellen exprimiert wird, gibt es zwei weitere  $\alpha$ -Untereinheiten: HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ . HIF-2 $\alpha$  ist hinsichtlich seiner Struktur und Funktion eng mit HIF-1 $\alpha$  verwandt, weist jedoch eine organspezifischere Expression auf (Ema et al. 1997; Wiesener et al. 1998). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  teilweise unterschiedliche Zielgene haben (Hu et al. 2003). Die Rolle von

HIF-3 $\alpha$  (Gu et al. 1998) ist dagegen bisher noch unklar. Es wird nur am Prolin 564 hydroxyliert (Schofield und Ratcliffe 2005).

#### 1.2.3 Zielgene von HIF-1

Vieles, was über HIF bekannt ist, wurde anhand der Forschung an EPO entdeckt. EPO ist ein Glykoprotein-Hormon, das vor allem von peritubulären Fibroblasten der Niere und zu einem kleinen Teil von Hepatozyten in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck synthetisiert wird (Tan et al. 1992). Aber auch in Zellen von Milz, Lunge und Gehirn wurde EPO-mRNA in geringen Mengen nachgewiesen (Fandrey und Bunn 1993; Marti et al. 1996). EPO stimuliert als Wachstumsfaktor die Proliferation und Differenzierung der Erythrozyten im Knochenmark. Therapeutisch wird es daher vor allem bei chronischer Anämie niereninsuffizienter Pateinten eingesetzt. Allerdings konnten auch gewebeprotektive Eigenschaften von EPO nachgewiesen werden. Studien an kardialem und neuronalem Gewebe haben die antiapoptotische, antiinflammatorische und antioxidative Wirkung von EPO gezeigt (Calvillo et al. 2003; Ehrenreich et al. 2004).

Am 3'-Ende des EPO-Gens befindet sich ein HRE. Unter hypoxischen Bedingungen (z. B. bei einem Höhenaufenthalt) bindet HIF-1 daran und induziert die Transkription des EPO-Gens.

Im Gegensatz zur systemischen Hypoxie, die eine Steigerung der EPO-Expression zur Folge hat, kann Hypoxie auch lokal auf ein Gewebe beschränkt auftreten, z. B. in Wunden, Tumoren oder bei Infarkten. Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), ein weiteres Zielgen von HIF-1, spielt hier eine wichtige Rolle für die Angiogenese (Forsythe et al. 1996). VEGF stimuliert die Angiogenese, indem es an VEGF-Rezeptoren der Endothelzellen bindet und deren Wachstum fördert (Ferrara und Davis-Smyth 1997). Durch die steigende Gefäßdichte nimmt die Diffusionsstrecke des Sauerstoffs ab, das Gewebe wird besser versorgt. VEGF steigert darüber hinaus die Gefäßpermeabilität und spielt damit eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen (Dvorak et al. 1995). In vielen Tumoren findet man eine verstärkte Expression von VEGF. Inhibitoren des VEGF-Signalwegs werden in Kombination mit Chemotherapeutika oder Strahlentherapie im Rahmen verschiedener Studien zur Tumortherapie eingesetzt (Klement et al. 2000; Lee C G et al. 2000).

Unter Sauerstoffmangel gewinnt die anaerobe Glykolyse gegenüber der aeroben Glykolyse zunehmend an Bedeutung (Pasteur-Effekt). Da bei der anaeroben Glykolyse jedoch sehr viel weniger ATP entsteht, muss entsprechend mehr Glukose umgesetzt werden, um den Energiehaushalt der Zelle aufrecht zu erhalten. Der Glukosetransporter GLUT1 ist in der

Zellmembran lokalisiert, über ihn gelangt die Glukose Insulin-unabhängig in die Zelle. HIF-1 reguliert die Expression von GLUT1 (Ebert et al. 1995), so dass sich die Zelle an den erhöhten Glukosebedarf unter hypoxischen Bedingungen anpassen kann. Neben GLUT1 werden einige Enzyme der Glykolyse von HIF-1 reguliert.

Bei der anaeroben Glykolyse entsteht Laktat, welches zusammen mit einem Proton an das Blut abgegeben wird. Der pH-Wert des Organismus kann dadurch gestört werden. Die membranständige Carboanhydrase CAIX katalysiert die Gleichgewichtsreaktion  $H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow H_2O + CO_2$  und reguliert damit den pH-Wert. Das entstehende  $CO_2$  kann mithilfe der Erythrozyten zur Lunge transportiert und dort abgeatmet werden (Wenger 2002). CAIX wird unter hypoxischen Bedingungen durch HIF-1 verstärkt exprimiert, wodurch der pH-Wert konstant gehalten werden kann (Wykoff et al. 2000).

Die hier näher erläuterten Zielgene EPO, VEGF, GLUT1 und CAIX sollen exemplarisch deutlich machen, wie viele verschiedene Bereiche durch HIF-1 reguliert werden. Insgesamt sind mehr als 70 Zielgene bekannt. Sie besitzen alle ein HRE und sind unter anderem für die Sauerstoffversorgung, den zellulären Metabolismus, das Zellwachstum und die Apoptose zuständig.

### 1.2.4 Regulation von HIF-1a

Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  konstitutiv exprimiert und synthetisiert. Gleichzeitig wird es jedoch wieder für den Abbau markiert, indem es von den Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne-Proteinen (PHD1-3) an den Prolinen 402 und 564 der ODDD hydroxyliert wird. Für diese Reaktion wird unter anderem molekularer Sauerstoff benötigt. Die hydroxylierte Form von HIF-1 $\alpha$  interagiert mit dem von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein (pVHL). pVHL ist ein Teil des E3-Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplexes, der HIF-1 $\alpha$  polyubiquitiniert. Dadurch wird HIF-1 $\alpha$  für den proteasomalen Abbau markiert und ist unter normoxischen Bedingungen kaum nachweisbar (Maxwell et al. 1999) (Abb. 2). Bei dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom liegt eine Mutation des VHL-Gens vor. Dadurch akkumuliert HIF-1 $\alpha$  auch unter normoxischen Bedingungen. Klinisch äußert sich das Syndrom durch das Auftreten spezieller Tumoren, wie z. B. dem klarzelligen Nierenzellkarzinom oder dem cerebellären Hämangioblastom. Diese Tumoren sind stark vaskularisiert und zeigen unter anderem eine erhöhte VEGF-Produktion (Friedrich 2001).

Ein weiterer Faktor, der die HIF-1α-Aktivität kontrolliert, ist der *factor inhibiting HIF-1* (FIH-1). FIH-1 katalysiert die Hydroxylierung des Asparagin 803 der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (C-TAD). Diese Hydroxylierung verhindert, dass der

transkriptionelle Coaktivator CBP/p300 (CREB-bindendes Protein) an HIF-1 $\alpha$  binden kann (Lando et al. 2002). Der CBP/p300-Cofaktor ist eine Histon-Acetyltransferase, die mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert. Durch seine Aktivität wird die Chromatinstruktur verändert und das betreffende Gen für die transkriptionelle Aktivität zugänglich gemacht (Wenger 2002). Wird die Bindung von CBP/p300 durch FIH-1 unterbunden, ist somit die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 $\alpha$  vermindert.

FIH-1 gehört wie PHD zu der Familie der Eisen- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und benötigt für die Reaktion molekularen Sauerstoff. Allerdings ist die Michaeliskonstante von FIH-1 für Sauerstoff geringer als bei den PHDs (Koivunen et al. 2004). Das bedeutet, dass bei verminderter Sauerstoffkonzentration zunächst die Aktivität der PHDs sinkt und dadurch HIF-1 $\alpha$  in der Zelle akkumuliert. Allerdings wird HIF-1 $\alpha$ weiterhin durch FIH-1 inaktiviert. Erst bei weiterer Abnahme der Sauerstoffkonzentration kommt auch die Aktivität von FIH-1 zum Erliegen.

Unter Hypoxie ist die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  nicht möglich. HIF-1 $\alpha$  gelangt über bisher unbekannte Mechanismen in den Zellkern, dimerisiert mit HIF-1 $\beta$ , coaktiviert CBP/p300 und bindet an das HRE. Durch die HIF-1-Aktivität wird dem Sauerstoff- und Nährstoffmangel entgegengewirkt, so dass in der Folge HIF wieder abnimmt (Abu-Farha et al. 2005).



Abb. 2: Schematische Darstellung der HIF-Regulation

# **1.3 PHD-Sauerstoffsensoren**

Die PHD-Enzyme gehören zur Superfamilie der Eisen- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Die drei Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3 sind auch bekannt als HIF-Prolylhydroxylasen HPH3, HPH2 und HPH1 oder als EGLN2, EGLN1 und EGLN3 (EGL neun homolog). Epstein et al. entdeckten 2001 die HIF-Prolylhydroxylase EGL-9 (*egg laying abnormal-9*) in Caenorhabditis elegans (C. elegans) und identifizierten drei EGL-9-homologe menschliche PHD-Gene (Epstein et al. 2001).

Die PHDs katalysieren eine komplexe Reaktion, bei der ein Prolin zu 4-Hydroxyprolin hydroxyliert wird. Gleichzeitig wird 2-Oxoglutarat zu Succinat decarboxyliert. Als Cofaktoren werden Sauerstoff, Eisen und Ascorbat benötigt.

Prolin + 2-Oxoglutarat 
$$\xrightarrow{\text{PHD}}$$
 4-Hydroxyprolin + Succinat + CO<sub>2</sub>  
 $\xrightarrow{\text{O}_2, \text{ Fe}^{2^+}}$  Ascorbat

Abb. 3: Reaktion, die von den PHDs katalysiert wird.

Der  $K_m$ -Wert der drei PHDs für Sauerstoff liegt leicht über der Sauerstoffkonzentration in der Luft. Dadurch haben auch geringe Schwankungen der Sauerstoffkonzentration Einfluss auf die Aktivität der PHDs (Hirsilä et al. 2003). Damit spielen die PHDs eine wichtige Rolle als Sauerstoffsensoren der Zelle und haben indirekt über die Regulation von HIF-1 großen Einfluss auf den Zellmetabolismus.

# 1.3.1 PHD-Isoformen

Die drei Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3 katalysieren alle die gleiche Reaktion, unterscheiden sich jedoch in ihrer relativen Aktivität, ihrer Expressionsstärke, ihrer zellulären Lokalisation und teilweise in ihrer Funktion.

Hinsichtlich der relativen Aktivität der PHDs liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Huang J. et al. wiesen in einer In-vitro-Studie für PHD2 die höchste Aktivität nach (PHD2 > PHD3 > PHD1) (Huang J et al. 2002), während Tuckermann et al. eine gleich starke Aktivität für PHD2 und PHD3 zeigten (PHD2 = PHD3 > PHD1) (Tuckerman et al. 2004). PHDs werden in allen Geweben exprimiert, allerdings unterschiedlich stark (Cioffi et al. 2003; Lieb et al. 2002). PHD2 wird in den meisten Geweben exprimiert, PHD1 und PHD3 zeigen dagegen eine organspezifischere Expression. Im Herzmuskelgewebe wird PHD3 am stärksten exprimiert, während PHD1 im Hoden die stärkste Expression aufweist (Lieb et al. 2002). Auch bezüglich der Lokalisation innerhalb der Zelle unterscheiden sich die PHD-Isoformen. PHD1 (43,6 kDa) ist vor allem im Zellkern lokalisiert, PHD2 (46,0 kDa) überwiegend im Zytoplasma und PHD3 (27,3 kDa) sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (Metzen et al. 2003a). HIF-1 $\alpha$  kann also im Zytoplasma und im Zellkern abgebaut werden (Berra et al. 2001).

Die Hauptfunktion der PHDs, die Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$ , wurde bereits erwähnt. Das HIF-1 $\alpha$ -Prolin 564 kann von allen drei PHD-Isoformen hydroxyliert werden, während nur PHD1 und PHD2 das HIF-1 $\alpha$ -Prolin 402 hydroxylieren (Epstein et al. 2001).

Es ist bisher unklar, ob die PHDs neben der Hydroxylierung von HIF-1α noch weitere Aufgaben erfüllen. Zum Beispiel zeigten C. elegans, denen das EGL-9-Gen fehlte, einen abnormal Eier legenden Phänotyp (Trent et al. 1983).

PHD2-Knockout-Mäuse sind nicht überlebensfähig, während PHD1- und PHD3-Knockout-Mäuse keine embryonalen Defekte zeigen. Dies weist darauf hin, dass PHD2 während der Embryogenese die wichtigste Rolle zukommt. PHD2-Knockout-Mäuse sterben zwischen Tag 12,5 und Tag 14,5 der embryonalen Entwicklung und weisen morphologische Veränderungen des Herzens und der Plazenta auf. Die Herzwände sind dünner, die Trabeculae unterentwickelt, das Ventrikellumen vergrößert und das Ventrikelseptum nicht verschlossen. Interessanterweise treten diese Veränderungen erst ab Tag 11,5 der embryonalen Entwicklung auf. Die Plazenta der PHD2-Knockout-Mäuse zeichnet sich durch ein weniger verzweigtes Labyrinth, Proliferation des Spongiotrophoblasten und abnormal verteilte Trophoblastriesenzellen aus. Dieser Defekt tritt ab Tag 10,5 auf. In der Plazenta der PHD2-Knockout-Mäuse wurde eine deutlich gesteigerte Expression von HIF-1a und HIF-2a nachgewiesen. Erstaunlicherweise war die HIF-1a-Expression im Myokard der PHD2-Knockout-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp dagegen nicht erhöht (Takeda et al. 2006).

### 1.3.2 Weitere PHD-Substrate

Bisher ist HIF-α das einzige bekannte Substrat, welches von den PHDs hydroxyliert wird. Auf der Suche nach neuen Substraten wurde der *activating transcription factor-4* (ATF-4) als spezifisches Substrat von PHD3 identifiziert (Koditz et al. 2007). ATF-4 ist ein Mitglied der ATF/CREB-Familie der *basic-leucine-zipper*-Transkriptionsfaktoren (Hai und Hartman 2001). Er wird durch Anoxie, Endoplasmatischer-Reticulum-Stress und Aminosäuremangel induziert (Blais et al. 2004). ATF-4 besitzt eine ODDD mit 5 Prolinen und wird in Abhängigkeit von PHD3 degradiert. Allerdings ist der Abbau nicht pVHL-abhängig (Koditz et al. 2007). Im Gegensatz zu HIF-1 $\alpha$  wird ATF-4 nur von PHD3 reguliert. PHD1 und PHD2 haben dagegen keinen Einfluss auf ATF-4. Außerdem wird ATF-4 nur transient durch Hypoxie induziert. Die Induktion von PHD3 hat auch unter hypoxischen Bedingungen einen Abbau von ATF-4 zur Folge, da PHD3 auch noch unter 0,2 % O<sub>2</sub> aktiv ist (Stiehl et al. 2006). Dieses Beispiel zeigt, dass Substrate, die durch eine einzelne PHD reguliert werden, einer anderen Regulationskinetik unterliegen als HIF-1 $\alpha$ . Die drei PHD-Isoformen ermöglichen daher unterschiedliche Hypoxieantworten.

# 1.3.3 Regulation der PHDs durch Protein-Protein-Interaktion

Die PHDs als Schlüsselregulatoren von HIF-1 $\alpha$  werden selbst sowohl in ihrer Expression als auch in ihrer Aktivität reguliert.

PHD2 und PHD3 werden unter Hypoxie verstärkt exprimiert (Epstein et al. 2001). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sie Zielgene von HIF-1 $\alpha$  sind (del Peso et al. 2003). Es besteht also ein Feedback-Mechanismus, der eine verstärkte HIF-Degradation bei Reoxygenierung der Zelle ermöglicht. PHD3 wird sowohl von HIF-1 $\alpha$  als auch von HIF-2 $\alpha$  reguliert, während PHD2 nur von HIF-1 $\alpha$  induziert wird (Aprelikova et al. 2004). PHD1 wird nicht durch Hypoxie induziert (Epstein et al. 2001).

Ähnlich wie HIF-1 $\alpha$  werden auch PHD1 und PHD3 durch das Proteasom abgebaut. Die E3-Ubiquitin-Ligasen Siah1 und Siah2 markieren sie unter Hypoxie für den Abbau. Siah1/2 werden zwar durch Hypoxie induziert, allerdings unabhängig von HIF. Auf PHD2 haben sie keinen Einfluss (Nakayama et al. 2004).

Darüber hinaus sind einige mit den PHDs interagierende Proteine bekannt, deren Rolle teilweise jedoch noch unklar ist. Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (PPIase) FKBP38 hat Einfluss auf die Proteinstabilität von PHD2. Diese Regulation ist unabhängig von der PPIase-Funktion von FKBP38 und wird nicht von der Sauerstoffkonzentration beeinflusst (Barth et al. 2007).

Das TRiC-Chaperonin interagiert mit PHD3, nicht jedoch mit PHD1 und PHD2. Es hat Einfluss auf die Proteinfaltung (Masson et al. 2004). OS-9 fördert die Hydroxylierung von HIF-1α und interagiert mit PHD2 und PHD3, nicht jedoch mit PHD1 (Baek et al. 2005).

Diese Beispiele zeigen, dass die drei PHDs auf unterschiedliche Art und Weise reguliert werden. Dies lässt vermuten, dass die PHDs sich auch in ihrer Funktion unterscheiden und in unterschiedliche Signalwege involviert sind.

# 1.3.4 Regulation der PHDs durch kleine Moleküle

Die komplexe Reaktion der PHDs wird durch verschiedene kleine Moleküle beeinflusst. Da Eisen für die Reaktion essenziell ist, inhibieren Eisenchelatoren wie z. B. Desferrioxamin die PHDs (Nytko et al. 2007). Auch Metalle wie Cobalt und Nickel führen zu einer verringerten Aktivität der PHDs. Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob sie mit Eisen konkurrieren, Ascorbat in den Zellen vermindern oder ob ein komplexerer Mechanismus zugrunde liegt (Hirsilä et al. 2005; Salnikow et al. 2004).

Ascorbat wird vermutlich benötigt, um Fe(III) zu Fe(II) zu reduzieren und damit in seiner aktiven Form zur Verfügung zu stellen. In Abwesenheit von Ascorbat zeigen die PHDs keine Aktivität (Knowles et al. 2003). Interessanterweise hemmen auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die Aktivität der PHDs. Es konnte gezeigt werden, dass ROS unter anderem die Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) fördern. Diesem Effekt konnte durch Ascorbat entgegengewirkt werden (Gerald et al. 2004). Unter normoxischen Bedingungen hemmt Stickstoffmonoxid die PHDs, vermutlich indem es mit Sauerstoff um das aktive Zentrum der PHDs konkurriert (Metzen et al. 2003b).

Verschiedene Zwischenprodukte des Citratzyklus wie Succinat, Fumarat, Oxalacetat und Pyruvat sind kompetetive Hemmstoffe der PHDs, da sie mit 2-Oxoglutarat konkurrieren. Interessanterweise sind angeborene Defekte der Succinat-Dehydrogenase und der Fumarat-Hydratase mit der Entstehung von Tumoren assoziiert (Dalgard et al. 2004; Isaacs et al. 2005; Selak et al. 2005). Durch die Enzymdefekte akkumulieren Succinat bzw. Fumarat, so dass die PHDs gehemmt werden. Dieses Beispiel macht die Interaktion zwischen Zellmetabolismus und Sauerstoffhomöostase deutlich.

# 1.3.5 PHD-Inhibitoren

PHD-Inhibitoren stellen möglicherweise einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt für Anämien oder Ischämien dar. Von besonderem Interesse ist dabei die Therapie der chronischen Anämie bei Niereninsuffizienz. PHD-Inhibitoren könnten die Behandlung mit rekombinantem EPO ersetzen. Verschiedene Substanzen, vor allem 2-Oxoglutarat-Antagonisten, werden derzeit *in vitro* und *in vivo* getestet.

N-Oxalylglycin (N-OG) und sein lipophiles Derivat Dimethyloxalylglycin (DMOG) sind in Konzentrationen von 0,2-1 mM potente PHD-Inhibitoren *in vitro* (Jaakkola et al. 2001; Masson et al. 2001). Für die PHD-Inhibitoren L-mimosin (L-Mim), Ethyl-3,4-Dihydroxybenzoat (3,4-DHB) und *6-chlor-3-hydroxychinolin-2-carbonic acid–Ncarboxymethylamid* (S956711) konnte eine Stabilisierung von HIF-α und eine Induktion von HIF-Zielgenen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Warnecke et al. 2003). Als Nebenwirkungen zeigten sich in der Zellkultur eine verminderte Proliferationsrate der Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der PHD-Inhibitoren sowie eine gesteigerte LDH-Aktivität als Zeichen einer zellulären Schädigung. Bei Ratten konnte 6 Stunden nach einmaliger Gabe von L-Mim und S956711 HIF-1 $\alpha$  in den Zellkernen der tubulären Nierenzellen positiv angefärbt werden (Warnecke et al. 2003). In anderen Organen war HIF-1 $\alpha$  nicht nachweisbar. Außerdem konnte im Rattenmodel gezeigt werden, dass die Angiogenese deutlich induziert wird (Warnecke et al. 2003). PHD-Inhibitoren könnten daher eine protektive Rolle im Rahmen von Ischämien spielen. Denkbar wäre auch eine Präkonditionierung durch PHD-Inhibitoren, beispielsweise vor Herzoperationen oder Transplantationen (Warnecke et al. 2003).

Ein Nebeneffekt der 2-Oxoglutarat-Analoga ist, dass sie auch andere Mitglieder der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen hemmen, z. B. die Kollagen modifizierenden Prolyl-4-Hydroxylasen. Dies könnte bei länger dauernder Therapie zum Umbau des Bindegewebes verschiedener Organe führen.

Außerdem ist zu bedenken, dass bei einer Stabilisierung von HIF durch PHD-Inhibitoren auf mehr als 70 HIF-Zielgene Einfluss genommen wird. Dadurch ist zum einen die Spezifität vermindert, so dass ein breites Spektrum an Nebenwirkungen bedacht werden muss. Ein Beispiel dafür ist die Chuvash Polycythaemia, bei der eine homozygote Mutation des VHL-Gens vorliegt. Dies führt zu einer moderaten Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ unter Normoxie und ist mit vertebralen Hämangiomen, Varizen, niedrigem Blutdruck, peripheren Thrombosen und einer geringeren Lebenserwartung aufgrund von cerebrovaskulären Ereignissen assoziiert (Gordeuk et al. 2004). Zum anderen werden durch die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  mehrere ähnliche Mechanismen gleichzeitig reguliert, was wiederum die Effizienz erhöht. Beispielsweise wird nicht nur EPO induziert, sondern auch gleichzeitig der Eisenhaushalt reguliert (Macdougall und Eckardt 2006).

Allerdings haben die PHDs nicht nur Einfluss auf HIF-1 $\alpha$ . Neben ATF-4 wurden in einer Studie Gene identifiziert, die sowohl durch Hypoxie als auch durch PHD-Inhibitoren induziert werden, jedoch unabhängig von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  sind (Elvidge et al. 2006). Dies macht deutlich, dass ein besseres Verständnis der Funktion der PHDs nötig ist, um den Einfluss der PHD-Inhibitoren abschätzen zu können.

PHD-Inhibitoren der Firma FibroGen (Helsinki, Finnland) werden bereits in Phase-II-Studien getestet. Durch die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  wird die EPO-Produktion induziert und die Erythropoiese stimuliert. Ein Vorteil gegenüber der Verwendung von rekombinantem EPO liegt darin, dass die endogene EPO-Produktion gesteigert wird. Gegen das rekombinante EPO können sich neutralisierende Antikörper bilden, die mit endogenem EPO kreuzreagieren und zur Erythrozytenanämie führen (Casadevall et al. 2002). Diese Nebenwirkung könnte mit PHD-Inhibitoren umgangen werden. Darüber hinaus wird der PHD-Inhibitor oral appliziert und ist dadurch für den Patienten angenehmer anzuwenden als EPO-Spritzen.

# 1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die PHDs regulieren den Transkriptionsfaktor HIF-1, indem sie die Untereinheit HIF-1 $\alpha$  abhängig von der Sauerstoffkonzentration hydroxylieren und damit für den Abbau markieren. HIF-1 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor, der die Expression von mehr als 70 Zielgenen reguliert, die unter anderem für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zelle wichtig sind. Die Regulation von HIF-1 $\alpha$  durch die PHDs ist Gegenstand intensiver Forschung. Weniger ist dagegen über HIF-unabhängige Effekte der PHDs bekannt. In der Literatur mehren sich Hinweise, dass PHDs neben der Regulation von HIF-1 $\alpha$  auch weitere zelluläre Funktionen beeinflussen

Ziel dieser Arbeit war es, anhand einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-Knockdown-Zelllinie bisher unbekannte PHD-Substrate zu identifizieren. Dafür sollten zunächst eine Tetracyclin-induzierbare PHD2-Knockdown-Zelllinie etabliert und die Bedingungen für einen möglichst effizienten Knockdown optimiert werden. Weiterhin sollte die Zelllinie hinsichtlich der Expression von PHD1-3 sowie von HIF-Zielgenen charakterisiert werden. Um schließlich neue, HIF-unabhängige PHD-Substrate zu identifizieren, war es geplant, die Zelllinie mittels Microarray und 2D-Gelelektorphorese auf Transkriptom- und Proteomveränderungen zu untersuchen. Die gefundenen Veränderungen sollten in weiterführenden Experimenten bestätigt und der daraus resultierende Phänotyp der PHD2-Knockdown-Zellen untersucht werden.

Ein umfassendes Verständnis der PHDs ist von klinischer Bedeutung, da PHD-Inhibitoren unter anderem zur Therapie der chronischen Anämie bei niereninsuffizienten Patienten eingesetzt werden könnten. Sie sollen über eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  die endogene EPO-Produktion fördern und damit Anämien entgegenwirken. In Phase-II-Studien wird der Einsatz von PHD-Inhibitoren bereits getestet. Die Identifikation PHD-abhängiger Signalwege dient zum einen dem besseren Verständnis zellulärer Funktionen unter Normoxie und Hypoxie. Zum anderen ermöglichen die Erkenntnisse, die Wirkungen und Nebenwirkungen von PHD-Inhibitoren besser verstehen, abschätzen und behandeln zu können.

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Zelllinie und Zellkultur

Die humanen Cervix-Adenokarzinomzellen T-REx HeLa wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Zellen exprimieren unter Selektion mit Blasticidin (5  $\mu$ g/ml; Invitrogen) stabil den Tetracyclin-Repressor des Plasmids pcDNA<sup>TM</sup>6/TR. Dies ermöglicht eine Tetracyclin-induzierbare Expression von shRNA, deren Promotor einen Tetracyclin-Operator 2 enthält. In Abwesenheit von Tetracyclin bildet der Tetracyclin-Repressor Homodimere, die mit hoher Affinität an den Tetracyclin-Operator 2 binden und damit die Expression der nachfolgenden shRNA verhindern. Bei Zugabe von Tetracyclin bindet dieses an die Homodimere des Tetracyclin-Repressors und bewirkt eine Konformationsänderung. Der Tetracyclin-Repressor kann nicht mehr an den Tetracyclin-Operator 2 binden und die shRNA wird exprimiert.

Die Kultivierung der T-REx-HeLa-Zellen erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; PAN, Aidenbach, Deutschland), welches 4,5 g/l Glucose, Glutamine und Pyruvat enthält. Zusätzlich wurden 10 % tetracyclinfreies fetales Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (Invitrogen) zugegeben. Im Zellinkubator (Binder, Tuttlingen, Deutschland) herrschten 37 °C, 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>. Für Experimente unter Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) wurden die Zellen in einer Hypoxie-Werkbank (INVIVO<sub>2</sub> 400: Ruskinn, Bridgend, UK) kultiviert. Alle folgenden Experimente wurden mit T-REx-HeLa-Zellen bzw. stabil transfizierten shPHD T-REx-HeLa-Zellen (s. u.) durchgeführt.

# 2.2 Stabile Transfektion

Die T-REx-HeLa-Zellen wurden mit folgenden Plasmiden transfiziert:

```
pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO shPHD2.1
```

```
pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO shPHD2.2
```

pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO shPHD2.3

pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO shPHD3.1

pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO shPHD3.2

pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO shPHD3.3

Der Eingangsvektor pENTRTM/H1/TO (Invitrogen) enthält die H1/TO-RNAi-Kassette, welche den Tetracyclin-Operator 2 enthält und somit eine Tetracyclin-induzierbare

Expression der shRNA ermöglicht. Weitere Eigenschaften sind eine Zeocin- sowie Kanamycinresistenz, ein SV40-Promotor, zwei Rekombinationsflanken *attL1* und *attL2* sowie ein pUC-Replikationsursprung. In diesen Eingangsvektor wurden doppelsträngige Oligonukleotidsequenzen ligiert, welche für shRNA gegen jeweils 3 unterschiedliche Sequenzbereiche von PHD2 bzw. PHD3 kodieren.



Abb. 4: Schematische Darstellung des Eingangsvektors pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO (modifiziert nach: Produktbeschreibung der Firma Invitrogen am Beispiel der Sequenz PHD2.1)

shPHD2.1f	5'CACCGGACTGGAAGAAGCACAAGCTTTCAAGAGAAGCTTGTGCTTCTTCCAGTCC 3'
shPHD2.1r	5'AAAAGGACTGGAAGAAGCACAAGCTTCTCTTGAAAGCTTGTGCTTCTTCCAGTCC 3'
shPHD2.2f	5'CACCGCATGAACAAGCACGGCATCTTTCAAGAGAAGATGCCGTGCTTGTTCATGC 3'
shPHD2.2r	5'AAAAGCATGAACAAGCACGGCATCTTCTCTTGAAAGATGCCGTGCTTGTTCATGC 3'
shPHD2.3f	5'CACCGCGATAAGATCACCTGGATCGTTCAAGAGACGATCCAGGTGATCTTATCGC 3'
shPHD2.3r	5'AAAAGCGATAAGATCACCTGGATCGTCTCTTGAACGATCCAGGTGATCTTATCGC 3'

Tabelle 1: verwendete Oligonukleotidsequenzen, die f	hRNA gegen PHD2 bzw. PHD3 kodieren.
--	-------------------------------------

shPHD3.1f	5'CACCACGTCAAGGAGAGGTCTAAGGTTCAAGAGACCTTAGACCTCTCCTTGACG 3'
shPHD3.1r	5'AAAACGTCAAGGAGAGGTCTAAGGTCTCTTGAACCTTAGACCTCTCCTTGACGT 3'
shPHD3.2f	5'CACCGGGAAATGGAACAGGTTATGTTTCAAGAGAACATAACCTGTTCCATTTCCC 3'
shPHD3.2r	5'AAAAGGGAAATGGAACAGGTTATGTTCTCTTGAAACATAACCTGTTCCATTTCCC 3'
shPHD3.3f	5'CACCGCATCACCTGCATCTACTATCTTCAAGAGAGATAGTAGATGCAGGTGATGC 3'
shPHD3.3r	5'AAAAGCATCACCTGCATCTACTATCTCTCTTGAAGATAGTAGATGCAGGTGATGC 3'

Bei der Liposomen-vermittelten Transfektion bilden kationische Liposomen Komplexe mit der zu transfizierenden negativ geladenen DNA. Diese Komplexe werden mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen und die DNA zum Teil in das Genom der Zelle integriert. Um die Zellpopulation auf diejenigen Zellen zu selektionieren, bei denen die DNA tatsächlich integriert wurde, kodiert das transfizierte Plasmid für eine Zeocinresistenz. Die Zellpopulation kann somit nach der Transfektion mit 375 µg/ml Zeocin selektioniert werden.

Für die Generierung stabil transfizierter Zellklone wurden  $3 \times 10^5$  Zellen in der Vertiefung einer 6-Lochplatte ausplattiert und am nächsten Tag in antibiotikafreiem Medium mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transfiziert. Pro Plasmid wurden drei verschiedene Transfektionsansätze gewählt: Es wurden 4 µg (Ansatz 1) bzw. 3 µg (Ansatz 2) der zirkulären Plasmid-DNA bzw. 5 µg des mit EcoRV linearisierten Plasmids (Ansatz 3) mit serumfreiem Medium (OptiMEM, Invitrogen) auf 250 µl ergänzt und gut gemischt. 6 µl Lipofectamine 2000 wurden mit 246 µl OptiMEM gemischt und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur mit der verdünnten DNA gemischt. Nach weiteren 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 500 µl der Mischung in die Vertiefung einer 6-Lochplatte gegeben und für 4-6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel mit antbiotikahaltigem Medium. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf eine 96-Lochplatte verteilt und nach weiteren 24 h durch Zugabe von 375 µg/ml Zeocin auf die Integration der shRNA-Konstrukte selektioniert.

# 2.3 Transiente Transfektion und Luciferase-Assay

Mittels der Calcium-Phosphat-Transfektionsmethode wurden das HIF-Firefly-Reportergen pH3SVL, welches freundlicherweise von Prof. R. H. Wenger (Universität Zürich, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurde, und das Renilla-Luciferase-Reportergen pRLSV40

(Promega, Mannheim, Deutschland) kotransfiziert. Das Reportergen pH3SVL besitzt neben dem für die Firefly-Luciferase kodierenden Abschnitt insgesamt 3 HREs. Bindet HIF-1a an diese, wird das Luciferase-Gen verstärkt abgelesen. Die Firefly-Luciferase-Aktivität ist somit proportional zur HIF-1α-Proteinmenge bzw. -Aktivität. Um Messschwankungen aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienz auszuschließen, wurde das Plasmid pRLSV40 cotransfiziert, welches für die Renilla-Luciferase kodiert und von dem konstitutiv exprimierten SV40 Promotor kontrolliert wird. Für die Calcium-Phosphat-Transfektion wurden  $2 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausplattiert. 0,5 µg pH3SVL, 0,02 µg pRLSV40 und 0,5 µg pcDNA3.1 wurden mit 0,1 x TE (1 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA pH 8,0) auf ein Volumen von 22 µl ergänzt und mit 25 µl 2 x HBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 12 mM Dextrose, 50 mM HEPES) gut gemischt. 3 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> wurden tropfenweise zugegeben und die Mischung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich Präzipitate aus Calciumphosphat und DNA bilden konnten. Anschließend wurde die Mischung langsam in die Vertiefungen einer 24-Lochplatte pipettiert. Die Induktion des PHD-Knockdowns mit 1-10 µg/ml Tetracyclin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) erfolgte 3-6 h nach der Transfektion. 12-48 h nach der Tetracyclin-Induktion wurden die Zellen lysiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte mithilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega gemäß den Herstellerangaben. Zunächst wurden die Substrate für die Reaktion der Firefly-Luciferase zu dem Lysat gegeben. Das dabei entstehende Licht wurde mit dem Luminometer Centro LB 960 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. In einem zweiten Schritt wurde die erste Reaktion abgestoppt, das Substrat für die Reaktion der Renilla-Luciferase zugegeben und erneut die Lumineszenz gemessen. Die gemessenen Firefly-Luciferase-Counts wurden immer als Quotient zu den Renilla-Luciferase-Counts angegeben.

# 2.4 Isolierung von Gesamt-RNA (Chomczynski und Sacchi 1987)

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen und pro Vertiefung einer 6-Lochplatte mit 750  $\mu$ l Lösung D (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5 % Sarcosyl) lysiert. Zu dem Lysat wurden 75  $\mu$ l 2 M Natriumacetat pH 4,0, 750  $\mu$ l Phenol und 150  $\mu$ l Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und mehrfach gevortext. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 20 min zentrifugiert (16100 g, 4 °C). Aus der

wässrigen Phase wurde die RNA mit 1 ml Isopropanol für 1 h bei -20 °C gefällt und der Ansatz erneut für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,3 ml Lösung D gelöst und die RNA mit 0,3 ml Isopropanol 1 h bei -20 °C gefällt. Nach 20-minütiger Zentrifugierung wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 10 µl DEPC-Wasser (0,2 % Diethylpyrocarbonat, autoklaviert) aufgenommen. Die RNA wurde bei 56 °C für 15 min in Lösung gebracht. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.1 RNA-Isolierung mit Trizol

Für die Transkriptomanalyse wurde die RNA mit Trizol (Invitrogen) isoliert. Dafür wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in der Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 1 ml Trizol lysiert und in ein Eppendorfcup überführt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lysat 10 min zentrifugiert (4 °C, 16100 g). Zu dem Überstand wurden 200 µl Chloroform gegeben, für 30 s gevortext und für weitere 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 0,5 ml Isopropanol gemischt und die RNA bei -20 °C für 90 min gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugierung (4 °C, 16100 g) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Anschließend wurde die RNA-Lösung mit DNase I (Fermentas) verdaut. Dazu wurden zu der RNA-Lösung 5  $\mu$ l 1 M Tris/HCl pH 7,5, 1  $\mu$ l 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 U DNase I und 20 U RNase Inhibitor gegeben. Die Mischung wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100  $\mu$ l ergänzt und bei 37 °C für 20 min inkubiert. 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 (v/v/v)) wurde zugegeben und für 2 min bei Raumtemperatur (16100 g) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 gemischt und die RNA bei -20 °C für 45 min gefällt. Nach 15-minütiger Zentrifugierung (4 °C, 16100 g) wurde das Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 25  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 2.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt. In einer Quarzküvette wurde die RNA 1:80 mit Wasser verdünnt und die optische Dichte (OD) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei entspricht eine  $OD_{260}$  von eins einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Das Verhältnis von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  gibt dabei eine Aussage über die Proteinkontamination der Probe. Für reine RNA liegt der Quotient  $(OD_{260}/OD_{280})$  zwischen 1,8 und 2,0.

Für die Transkriptomanalyse wurden die Konzentration und die Reinheit der RNA sowie die Integrität der 18S und 28S ribosomalen Banden mittels Kapillarelektrophorese (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) überprüft.

# 2.5 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Dazu wurden 2  $\mu$ g RNA eingesetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 10  $\mu$ l verdünnt. Nach Zugabe von 0,5  $\mu$ g oligo(dT)<sub>18</sub> Primer erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 70 °C. Anschließend wurden 4  $\mu$ l 5 x Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 1  $\mu$ l Ribonuclease-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l) und 2  $\mu$ l des 10 mM Nucleotid-Mix hinzugegeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe der Reversen Transkriptase (20 U/ $\mu$ l) erfolgte die Inkubation bei 37 °C für eine Stunde. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben anschließend für 10 min auf 70 °C erhitzt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

# 2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ausgehend von einer geringen Menge DNA eine bestimmte Sequenz amplifiziert.

Dazu wurde 1 µl cDNA aus einem Totalvolumen von 20 µl eingesetzt und mit 12,5 µl MasterMix (Fermentas), 0,2 µM spezifischem *Forward-Primer*, 0,2 µM spezifischem *Reverse-Primer* und 10,5 µl Wasser gemischt. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert. Anschließend folgten 28-35 Zyklen mit je 30 s Denaturierung der DNA bei 95 °C, 30 s Hybridisierung bei einer von den Primern abhängigen Temperatur und 30 s Elongation bei 72 °C. Nach einer abschließenden Elongation bei 72 °C für 10 min wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. Die Reaktion lief automatisiert in einem Primus 96 Thermocycler der Firma Peqlab (Erlangen, Deutschland) ab.

Das PCR-Produkt wurde in einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (0,1  $\mu$ g/ml) gefärbt. Ethidiumbromid lagert sich in DNA ein und verändert dadurch sein Anregungsspektrum. Bei Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von  $\lambda = 302$  nm unter einem UV-Transluminator (InGenius, Syngene,

Camebridge, UK) wird die Fluoreszenz stark erhöht und dadurch die angelagerte DNA sichtbar gemacht. Zur Kontrolle der Größe des PCR-Produkts diente ein 100 bp DNA Marker (O'RangeRuler<sup>™</sup>, Fermentas).

# 2.7 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Bei der quantitativen PCR (Q-PCR) wird die Menge an amplifizierter DNA mittels eines fluoreszierenden Farbstoffs direkt gemessen. Der Farbstoff SYBR Green interkaliert während der Reaktion in doppelsträngige DNA und ändert dadurch sein Fluoreszenz-verhalten. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt proportional zum entstandenen PCR-Produkt zu und ermöglicht somit eine Quantifizierung des PCR-Produkts. Zum Schluss der Reaktion wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der das PCR-Produkt langsam auf 95 °C erhitzt wird. Bei einer für das amplifizierte Fragment typischen Temperatur wird der Doppelstrang wieder aufgetrennt, der Farbstoff wird frei und die Fluoreszenz nimmt ab.

Für die Reaktion wurden zu 1 µl cDNA (Totalvolumen 20 µl) 12 µl 2 x SYBR Advantage qPCR premix (Clontech; Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), 0,2 µM eines spezifischen *Forward-Primers*, 0,2 µM eines spezifischen *Reverse-Primers*, 0,2 µl *ROX Reference Dye* LMP 50 x (Clontech) und 10 µl H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Nach 2 min Denaturierung der DNA bei 95 °C folgten 40 Zyklen mit je 20 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Hybridisierung (Temperatur s. u.) und 30 s Elongation bei 72 °C. Abschließend erfolgte nach einer Denaturierung bei 95 °C für 30 s die Schmelzkurvenanalyse. Die Reaktion lief automatisiert in einem Thermocycler (MX 3005 P, Stratagene, La Jolla, USA) ab. Die relative Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgte durch Vergleich mit einer Standardreihe mit definierter DNA-Konzentration. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurde für jede Probe parallel die cDNA des ribosomalen Proteins L28 amplifiziert und jede Kopienzahl anderer untersuchter cDNA-Fragmente in Relation zu L28 berechnet.

Gen	Oligonukleotidsequenz	Hybridisierungs- temperatur
hL28 forward	5'-GCAATTCCTTCCGCTACAAC-3'	58 °C
hL28 reverse	5'-TGTTCTTGCGGATCATGTGT-3'	58 °C
hPHD1 forward	5'-AGCCCCTAAGTCAGGCTCTC-3'	64 °C
hPHD1 reverse	5'-AGTGGTAGAGGTGGCTGTGG-3'	64 °C
hPHD2 forward	5'-TTGCTGACATTGAACCCAAA-3'	56 °C
hPHD2 reverse	5'-TTACCGACCGAATCTGAAGG-3'	56 °C
hPHD3 forward	5'-AGATCGTAGGAACCCACACG-3'	60 °C
hPHD3 reverse	5'-CAGATTTCAGAGCACGGTCA-3'	60 °C
hVEGF forward	5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3'	60 °C
hVEGF reverse	5'-TGGTGATGTTGGACTCCTCA-3'	60 °C
hCAIX forward	5'-GGGTGTCATCTGGACTGTGTT-3'	64 °C
hCAIX reverse	5'-CTTCTGTGCTGCCTTCTCATC-3'	64 °C

Tabelle 2: Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotidprimer

# 2.8 Transkriptomanalyse

Die Transkriptomanalyse wurde von dem Transkriptomanalyselabor (TAL) der Universität Göttingen unter der Leitung von Dr. Gabriela Salinas-Riester durchgeführt.

Die Genexpressionsanalyse wurde für jeweils 3 biologische Replikate pro Bedingung mittels des *Human 4x44K Design Array* (Agilent Technologies) in Kombination mit dem *Low RNA Input linear Amplification Kit Plus, One Color* (Agilent Technologies) und dem *RNA Spike-In Kit for One Color* (Agilent Technologies) durchgeführt. Es wurden jeweils 1 µg RNA eingesetzt und die cDNA-Synthese und In-vitro-Transkription gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte für 17 h bei 65 °C und 10 rpm im Hybridisierungsofen (Agilent). Der Array wurde gemäß dem Agilent-Technologies-SSPE-Protokoll (v2.1) gewaschen. Die dritte Waschlösung wurde durch Acetonitril ersetzt und unmittelbar danach mit dem Agilent G2505B Scanner gescannt. Die Datenextraktion erfolgte mit *Feature Extraction 9.1 Software* von Agilent. Alle Berechnungen wurden mit der Statistiksoftware "R" (http://cran.r-project.org/) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit VSN (Huber et al. 2002). Zur Bestimmung differentiell exprimierter Gene wurden lineare Modelle angewendet (Smyth 2005). Die Korrektur der p-Werte erfolgte mittels der Benjamini-Hochberg-Methode (Benjamini und Hochberg 1995).

# 2.9 Proteinextraktion und -messung

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und pro Vertiefung einer 6-Lochplatte mit 100  $\mu$ l Lysepuffer (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0,1 % Triton, Protease-Inhibitor Cocktail von Roche (Mannheim, Deutschland)) lysiert. Das Lysat wurde 20 min (16100 g, 4 °C) zentrifugiert, das Pellet verworfen und die Probe bei -20 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methodenbeschreibung von Bradford (Bradford 1976) mittels des Protein Assay Reagenz (Bio-Rad). Bei dieser Reaktion bindet *Coomassie brilliant blue G-250* an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm ohne Protein auf 595 nm mit Protein verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist daher ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Als Standard wurden 0-6  $\mu$ g Rinderserum Albumin (BSA) verwendet. Von den Proteinextrakten wurden 1-3  $\mu$ l eingesetzt. Die Messung erfolgte bei 595 nm mit dem *Microplate Reader Model 680* (Bio-Rad).

# 2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

In SDS-Polyacrylamid-Gelen können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das negativ geladene SDS bindet an Proteine (1,4 g SDS/g Protein in 1 % SDS-Lösung) und überdeckt damit deren Eigenladung. Die Proteine werden dadurch im elektrischen Feld unabhängig von ihrer Ladung nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und sind dadurch für die Detektion mit Antikörpern zugänglich.

20-100 μg Protein wurden mit 5 x Laemmlipuffer (190 mM SDS, 55 mM EDTA, 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 % β-Mercaptoethanol, 25 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau) bei 95 °C für 5 min erhitzt und in einem 7,5-15 %igen SDS-Polyacrylamidgel in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker diente ein 170-10 kD Protein-Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas). Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch in einer halbtrockenen Blotkammer (Peqlab) in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % Methanol) bei 2 mA pro cm<sup>2</sup> Gel für 1 h auf eine Nitrocellulosemembran (GE Healthcare, München, Deutschland) übertragen. Zur Kontrolle der Übertragungseffizienz wurde die Membran mit Ponceau S (Sigma) gefärbt. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden mit 5 % Magermilchpulver bzw. 5 % BSA in PBS für 1 h abgesättigt. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Folgende primäre

Antikörper wurden verwendet: anti-PHD2 polyklonales Kaninchen-IgG (1:1000, Novus, Littleton, USA), anti-PHD3 polyklonales Kaninchen-IgG (1:1000, Novus), anti-HIF-1a (1:1000, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), anti-p-Cofilin1 Maus-IgG polyklonales Kaninchen-IgG (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA), anti-Cofilin polyklonales Kaninchen-IgG (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) und anti-β-Aktin monoklonales Maus-IgG (1:1000, Sigma). Anschließend wurde die Membran 3 x 15 min mit PBS gewaschen und für 1 h mit einem sekundären Antikörper inkubiert, welcher mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiert ist: Anti-Kaninchen polyklonales Ziegen-IgG (1:30000, Santa Cruz) und Anti-Maus polyklonales Ziegen-IgG (1:1000, Santa Cruz). Nach erneutem 3 x 15-minütigem Waschen mit PBS wurde der Blot entwickelt, indem er mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 1 ‰ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1,25 mM Luminol und 0,225 mM Cumarsäure für 1 min inkubiert wurde. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz aus, die mittels einer Kamera (LAS-3000, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) detektiert wurde.

# 2.11 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ermöglicht es, Proteine sowohl nach ihrem isoelektrischen Punkt (erste Dimension) als auch nach ihrem Molekulargewicht (zweite Dimension) aufzutrennen. Dadurch ist die Auflösung der Trennung sehr viel höher als bei eindimensionalen Polyacrylamidgelen.

Für die Zellyse wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und für 5 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 0,5 ml PBS resuspendiert und erneut für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl IEF-Puffer (8 M Harnstoff, 1 % CHAPS, Bromphenolblau, Protease-Inhibitor, 2,5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2,5 mM NaF) gelöst und auf Eis durch Ultraschall (Sonopuls HD 2070, Bandelin, Berlin, Deutschland) lysiert. Nach erneuter Zentrifugierung (10 min bei 4 °C und 12000 g) wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels des Protein-Assays nach Bradford (Bio-Rad) wie bereits beschrieben bestimmt.

#### 2.11.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF): erste Dimension

150 μg Protein wurden mit IEF-Rehydrierungspuffer (8 M Urea, 1 % CHAPS, Bromphenolblau, 40 mM DTT und 0,5 % IPG-Puffer (GE Healthcare)) auf ein Volumen von 125 µl ergänzt. Ein 7 cm IEF-Streifen mit immobilisiertem, nicht-linearem pH-Gradienten (pH 3-10, GE Healthcare) wurde über Nacht mit der Probe rehydriert. Für die isoelektrische Fokussierung wurde eine Horizontalelektrophoresekammer (Multiphor II, GE Healthcare) auf 20 °C gekühlt und der IEF-Streifen nach folgendem Protokoll fokussiert: 1 min 200 V, lineare Steigerung auf 3500 V innerhalb von 90 min, Fokussierung für 1 h bei 3500 V.

# 2.11.2 Äquilibrierung und SDS-PAGE: zweite Dimension

Nach der Fokussierung müssen die Proteine im IEF-Streifen äquilibriert (Äquilibrierungspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,8, 6 M Urea, 30 % Glycerol, 2 % SDS) werden, damit sie in der zweiten Dimension optimal aufgetrennt werden. Durch die Bindung an SDS wird ihre Eigenladung überdeckt, so dass sie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. DTT denaturiert und reduziert die Proteine. Für die Äquilibrierung wurden die Streifen zunächst in 2,5 ml Äquilibrierungspuffer 1 (Zusatz von 1 % DTT) und anschließend in 2,5 ml Äquilibrierungspuffer 2 (Zusatz von 2,5 % Iodacetamid) für je 15 min geschüttelt.

Um überschüssigen Äquilibrierungspuffer zu entfernen, wurden die Streifen in SDS-Laufpuffer gespült und danach auf ein 12 % Polyacrylamidgel aufgebracht und mit 0,5 % Agarose fixiert. Die mit Bromphenolblau angefärbte Agarose hat gleichzeitig die Funktion eines Sammelgels und ermöglicht den Transfer der Proteine in das Polyacrylamidgel. Das Bromphenolblau dient als Laufmarker. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer. Anschließend wurden die Gele 3 x 15 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und über Nacht mit Coomassie-Färbelösung (0,02 % CBB-G250, 5 % Aluminiumsulfat-18-Hydrat, 10 % Ethanol) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 10 % Ethanol und 2 % ortho-Phosphorsäure.

# 2.11.3 Auswertung der zweidimensionalen Gele

Die Gele wurden eingescannt und differentiell exprimierte Proteinspots analysiert. Diese Spots wurden manuell aus den Gelen ausgestochen und mit Trypsin nach der Methodenbeschreibung von Shevchenko et al. verdaut (Shevchenko et al. 1996). Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mit einem LCQ DecaXP Massenspektrometer (Thermo Electron Corp, San Jose, Kalifornien). Die Aufarbeitung der Proben und anschließende massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Oliver Valerius (Abteilung molekulare Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) durchgeführt.

#### 2.12 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Anzucht transformierter Bakterien wurden 25 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und als Schüttelkultur über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben. Dabei erfolgt zunächst eine alkalische Lyse der Bakterien mit anschließender Reinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule. Die Plasmidkonzentration wurde photometrisch bestimmt (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad).

### 2.13 Fluoreszenzmikroskopie

Phalloidin gehört zu einer Gruppe von Toxinen des weißen Knollenblätterpilzes (Amanita phalloides) und bindet an F-Aktin. Gekoppelt an einen Fluoreszensfarbstoff, ermöglicht es die Darstellung von F-Aktin.

Für die Färbung wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 3,7 % Paraformaldehyd in DMEM für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Damit die Zellmembranen für den Farbstoff durchlässig wird, wurden die Zellen für 3-5 min mit 0,1 % Triton X-100 in PBS inkubiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden für 20-30 min mit 1 % BSA in PBS blockiert. Die Färbung erfolgte mit 5 U/ml Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zur Darstellung der Zellkerne wurde die DNA mit 1 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) für 3-5 min angefärbt und 5-mal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden an der Luft getrocknet und zur Konservierung der Farbstoffe mit DABCO-Lösung (250 mg DABCO gelöst in 10 ml PBS, 90 ml Glycerin, pH 8,6) auf Objektträgern eingebettet. Mikroskopiert wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

# 2.14 Scratch-Assay

Mittels des Scratch-Assays können die Wachstumsgeschwindigkeit und die Wachstumsrichtung von Zellen verglichen werden. Dafür wurde bei ca. 90 % konfluenten Zellen mit einer gelben Pipettenspitze ein Defekt (Scratch) in den Zellrasen gesetzt und dieser zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Setzen des Scratches fotografiert. Anhand einer standardisierten Computer-basierten Auswertung (S.CORE, S.CO LifeScience GmbH, München) wurde der prozentuale Anteil zellfreier Fläche bestimmt.

# 2.15 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mithilfe des gepaarten zweiseitigen t-Tests. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Etablierung einer stabil shRNA-transfizierten, Tetracyclin-induzierbaren PHD2- bzw. PHD3-Knockdown-Zelllinie

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung einer stabil shRNA-transfizierten, Tetracyclin-induzierbaren PHD2- und PHD3-Knockdown-Zelllinie. In Abbildung 5 ist der schematische Ablauf der Transfektions- und Selektionsstrategie dargestellt. Als Ausgangszelllinie dienten T-REx-HeLa-Zellen. Sie exprimieren unter Selektion mit 5 µg/ml Blasticidin stabil den Tetracyclin-Repressor des Plasmids pcDNA6<sup>TM</sup>/TR und ermöglichen dadurch eine Tetracyclin-induzierbare Expression von shRNA. T-REx-HeLa-Zellen wurden durch Lipofektion mit jeweils drei verschiedenen PHD2- bzw. PHD3-shRNA-Plasmiden transfiziert, die zuvor in transienten Transfektionen einen erfolgreichen PHD2- bzw. PHD3-Knockdown zur Folge hatten. Die transfizierten Zellen (aus insgesamt 18 unabhängigen Transfektionsansätzen) wurden durch limiting dilution und anschließendes Ausplattieren in 96-Lochplatten subkloniert (insgesamt n = 672 Vertiefungen von 96-Lochplatten für die Transfektion von PHD2- bzw. PHD3shRNA). Durch Behandlung mit 375 µg/ml Zeocin wurden die Zellklone mit erfolgreicher genomischer Integration des shRNA-Plasmids selektioniert. Ingesamt konnten 58 Zeocinresistente PHD2-shRNA-transfizierte Zellklone und 40 Zeocin-resistente PHD3-shRNAtransfizierte Zellklone gewonnen werden. Um diejenigen Zellklone zu identifizieren, welche die shRNA funktionell exprimieren, wurden die Zeocin-resistenten Zellklone hinsichtlich einer PHD-abhängigen HIF-Aktivität mittels eines HIF-spezifischen Reportergenplasmids überprüft. Dadurch konnte die Anzahl der Zellklone weiter eingeschränkt werden. Mithilfe von Western-Blot-Untersuchungen wurden Zellklone identifiziert, deren PHD2- bzw. PHD3-Expression nach Zugabe von Tetracyclin, und damit nach Induktion der shRNA, abnimmt.

Im Folgenden werden die Zellklone mit einem Namen bestehend aus vier Zahlen benannt. Die ersten beiden Zahlen stehen jeweils für das transfizierte Plasmid (2.1, 2.2 oder 2.3 für die PHD2-shRNA-Plasmide bzw. 3.1, 3.2 oder 3.3 für die PHD3-shRNA-Plasmide), die dritte Zahl steht für den Transfektionsansatz, und die letzte Zahl bezeichnet die Nummer des Subklons.



Abb. 5: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Etablierung des PHD2- bzw. PHD3-Knockdown-Klons. Die Zahlen in der Abbildung geben die Anzahl der Zellklone an, die zu dem entsprechenden Zeitpunkt der Transfektions- bzw. Selektionsstrategie vorhanden waren bzw. bei den angegebenen Testverfahren positiv getestet wurden.

# 3.1.1 Screening stabil transfizierter Zellklone mithilfe des Luciferase-Assays

Nach Transfektion von Zellen mit einer transienten siRNA gegen PHD2 und PHD3 kommt es sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen zu einer Stabilisierung von HIF-1α sowie einer gesteigerten HIF-Zielgenexpression (Koditz et al. 2007; Stiehl et al. 2006). Durch die Behandlung mit Zeocin konnten die Zellklone hinsichtlich einer erfolgreichen genomischen Integration der shRNA selektioniert werden. Um zu überprüfen, ob die PHD2- bzw. PHD3-shRNA nach Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin auch funktionell stabil exprimiert wird, wurde die HIF-Aktivität als Marker für einen erfolgreichen PHD2- bzw. PHD3-Knockdown mithilfe des Reportergen-Luciferase-Assays bestimmt. Dazu wurden die Zellklone transient mit dem Firefly-Luciferase-HIF-Reportergenplasmid pH3SVL sowie dem konstitutiv aktiven Renilla-Luciferase-Reportergenplasmid pRLSV40 transfiziert. Die transfizierten Zellklone wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin für 48 Stunden bei 20 %  $O_2$  bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 %  $O_2$  kultiviert. Nach Lyse der Zellen wurde die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität bestimmt. Für Zellen, die bei 1 %  $O_2$  kultiviert wurden, konnte stets eine stärkere HIF-Aktivität nachgewiesen werden als für Zellen, die bei 20 %  $O_2$  kultiviert wurden. Zusätzlich zeigten 33 Zellklone nach Zugabe von Tetracyclin für 48 Stunden, und damit der Induktion der PHDshRNA, sowohl unter 1 %  $O_2$  als auch unter 20 %  $O_2$  eine stärkere HIF-Aktivität als ohne Tetracyclin-Zugabe (Abb. 6).



Abb. 6: Ergebnisse des Luciferase-Assays. T-REx-HeLa-Zellen und verschiedene Zellklone (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2- bzw. PHD3-shRNA) wurden mit (+Tet) bzw. ohne (-Tet) Zugabe von 1  $\mu$ g/ml Tetracyclin für 48 Stunden bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die HIF-Aktivität mittels Luciferase-Assays bestimmt. Die rot markierten Zellklone wurden weiter untersucht.

#### 3.1.2 Überprüfung des PHD-Knockdowns auf Proteinebene

Von den 33 im Luciferase-Assay positiven Zellklonen wurden drei PHD2-Knockdown-Zellklone, vier PHD3-Knockdown-Zellklone und die Ausgangszelllinie T-REx HeLa hinsichtlich der Proteinexpression von PHD2 bzw. PHD3 untersucht. T-REx-HeLa-Zellen bzw. die Zellklone wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1  $\mu$ g/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden sie lysiert und die Expression von PHD2 und β-Aktin in Western Blots untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass PHD2 und PHD3 in den T-REx-HeLa-Zellen sowie in den Zellklonen unter Hypoxie stärker exprimiert werden als unter Normoxie (Abb. 7 und 8). Bei dem PHD2-Knockdown-Zellklon 2.1.1-16 konnte als einzigem PHD2-shRNA-Zellklon sowohl unter 20 % O<sub>2</sub> als auch unter 1 % O<sub>2</sub> eine verminderte PHD2-Expression nach Induktion der PHD2-shRNA mit Tetracyclin für 48 Stunden beobachtet werden. Die T-REx-HeLa-Zellen zeigten eine von der Tetracyclin-Zugabe unbeeinflusste PHD2-Expression (Abb. 7). Dadurch konnte ein von der PHD2-shRNA unabhängiger, unspezifischer Tetracyclin-Effekt ausgeschlossen werden.



Abb. 7: Western-Blot-Untersuchungen verschiedener Zellklone hinsichtlich ihrer PHD2-Knockdown-Effizienz. T-REx-HeLa-Zellen bzw. verschiedene Zellklone (stabil transfiziert mit einer Tetracyclininduzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1  $\mu$ g/ml Tetracyclin für 48 Stunden bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Expression von PHD2 und  $\beta$ -Aktin in Western Blots untersucht.

PHD3 wird in allen getesteten Zellklonen unter normoxischen Bedingungen nur schwach exprimiert. Durch eine hypoxische Inkubation kommt es zu einer HIF-abhängigen Expression von PHD3 (Pescador et al. 2005). Dementsprechend gelang der Nachweis von PHD3 nur unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 8). Die PHD3-Knockdown Zellklone 3.3.3-3, 3.3.3-6 (für beide Klone Daten nicht gezeigt) und 3.3.1-12 zeigten unter 1 % O<sub>2</sub> nach Induktion der PHD3-shRNA mit Tetracyclin eine geringere PHD3-Expression als ohne Zugabe von Tetracyclin. Der PHD3-Knockdown-Zellklon 3.2.1-12 zeigte keine veränderte PHD3-Expression in Abhängigkeit von der Tetracyclin-Induktion (Abb. 8).



Abb. 8: Western-Blot-Untersuchungen verschiedener Zellklone hinsichtlich ihrer PHD3-Knockdown-Effizienz.T-REx-HeLa-Zellen bzw. verschiedene Zellklone (stabil transfiziert mit einer Tetracyclininduzierbaren PHD3-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin für 48 Stunden bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Expression von PHD3 und  $\beta$ -Aktin in Western Blots untersucht.

Basierend auf der oben beschriebenen Selektionsstrategie, wurden die Zellklone 2.1.1-16 und 3.3.1-12 in den nachfolgenden Untersuchungen verwendet, um die Bedingungen für einen Tetracyclin-induzierten effektiven PHD2- bzw. PHD3-Knockdown zu optimieren.

# 3.2 Optimierung der Bedingungen für die Tetracyclin-abhängige Induktion eines PHD2- bzw. PHD3-Knockdowns

# 3.2.1 Titration der Tetracyclin-Konzentration

Gemäß den Herstellerangaben der T-REx-HeLa-Zellen (Invitrogen) soll die Induktion der shRNA mit 1 µg/ml Tetracyclin erfolgen. In einer Studie von Kappel et al. konnte unter Verwendung derselben Zelllinie gezeigt werden, dass sich der Effekt der shRNA-Induktion mit zunehmender Doxycyclin-Konzentration (1, 5 und 10 µg/ml) verstärkt (Kappel et al. 2006). Um den Einfluss der Tetracyclin-Konzentration auf die Stärke des induzierten Knockdowns zu überprüfen, wurden 2.1.1-16-Zellen ohne bzw. mit 1, 5 und 10 µg/ml Tetracyclin für 96 Stunden behandelt. In den anschließend durchgeführten Western-Blot-Untersuchungen zeigte sich kein Unterschied in der Stärke des PHD2-Knockdowns in Abhängigkeit von der Tetracyclin-Konzentration (Abb. 9). Bereits bei der niedrigsten Konzentration von 1 µg/ml Tetracyclin konnte ein effektiver PHD2-Knockdown beobachtet werden. Zur Kontrolle wurden T-REx-HeLa-Zellen mit einer Konzentration von 10 µg/ml Tetracyclin behandelt, um einen unspezifischen Tetracyclin-Effekt auszuschließen. Dabei konnte keine Beeinflussung der PHD2-Expression durch die Behandlung mit Tetracyclin in den T-REx-HeLa-Zellen beobachtet werden.



Abb. 9: Western-Blot-Untersuchungen hinsichtlich der PHD2-Knockdown-Effizienz bei verschiedenen Tetracyclinkonzentration. T-REx-HeLa-Zellen und 2.1.1-16-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden ohne bzw. mit Zugabe von 1, 5 und 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 96 Stunden nach Zugabe des Tetracyclins wurden die Zellen lysiert und die Expression von PHD2 und  $\beta$ -Aktin in Western Blots untersucht.

# 3.2.2 Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer mit Tetracyclin zur Induktion eines PHD2- bzw. PHD3-Knockdowns

Um zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt nach der Tetracyclin-Induktion der PHD-Knockdown am stärksten ist, wurden verschiedene Inkubationszeiten der Tetracyclin-Behandlung getestet. Dazu wurde die PHD-Expression 12, 24, 48 und 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin untersucht. Die PHD2- bzw. PHD3-Expression wurde auf RNA-Ebene und Proteinebene mittels quantitativer PCR bzw. Western Blot bestimmt. Bereits 12 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin konnte unter normoxischen und unter hypoxischen Bedingungen bei den 2.1.1-16-Zellen eine deutliche Abnahme der PHD2-RNA im Vergleich zu den ohne Tetracyclin kultivierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10A). 48 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe war eine maximale Abnahme der PHD2-RNA zu beobachten, während nach einer Tetracyclin-Inkubation für 96 Stunden der Effekt der shRNA bereits abgeschwächt war. Auf Proteinebene konnte im Western Blot sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen erst 48 Stunden nach Tetracyclin-Induktion ein deutlicher PHD2-Knockdown nachgewiesen werden, der sich 96 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe weiter verstärkte (Abb. 10B). Dieser zeitversetzte Effekt von Tetracyclin auf die PHD2-RNA- bzw. Proteinexpression erklärt sich durch die Proteinhalbwertszeit von PHD2 von ca. 20 Stunden (Barth et al. 2007).



Abb. 10: PHD2-Expression auf RNA- und Proteinebene in 2.1.1-16-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tetracyclin-Induktion des PHD2-Knockdowns. (A) 2.1.1-16-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 12-24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 12, 24, 48 bzw. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin wurden die Zellen lysiert. Die Expression von PHD2-RNA wurde mittels quantitativer PCR bestimmt und wird im Verhältnis zur L28-RNA angegeben. Die Expression bei 20 % O<sub>2</sub> ohne Tetracyclin wurde auf 100 % normiert. Die Zahlen über den Balken geben die Knockdown-Effizienz gegenüber nicht induzierten Zellen unter Normoxie bzw. Hypoxie in Prozent an. (B) 2.1.1-16-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 10 µg/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 12-24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 12, 24, 48 bzw. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 10 µg/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 12-24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 12, 24, 48 bzw. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin wurde die Zellen lysiert. Die Expression von PHD2 und β-Aktin wurde in Western Blots untersucht.

Analog wurden die 3.3.1-12-Zellen bezüglich der PHD3-RNA-Expression 12, 24, 48 bzw. 96 Stunden nach Tetracyclin-Induktion untersucht. Dabei zeigte sich unter hypoxischen Bedingungen nach 48 Stunden ein maximaler PHD3-Knockdown. Vergleichbar mit der Zeitreihe des PHD2-Knockdowns war auch der PHD3-Knockdown auf RNA-Ebene 96 Stunden nach Tetracyclin-Induktion bereits abgeschwächt (Abb. 11A). In den Western-Blot-Untersuchungen konnte 48 und 96 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe eine deutliche Abnahme der PHD3-Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 11B).



Abb. 11: PHD3-Expression auf RNA- und Proteinebene in 3.1.1-12-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tetracyclin-Induktion des PHD2-Knockdowns. (A) 3.3.1-12-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD3-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 12, 24, 48 bzw. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin lysiert. Die Expression der PHD3-RNA wurde mittels quantitativer PCR bestimmt und wird im Verhältnis zur L28-RNA angegeben. Die Expression bei 20 % O<sub>2</sub> ohne Tetracyclin wurde auf 100 % normiert. Die Zahlen über den Balken geben die Knockdown-Effizienz gegenüber nicht induzierten Zellen unter Normoxie bzw. Hypoxie in Prozent an. (B) 3.3.1-12-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD3-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 10 µg/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 12-24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 12, 24, 48 bzw. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin wurde der letzten 12-24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 12, 24, 48 bzw. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin wurde die Zellen lysiert. Die Expression von PHD3 und β-Aktin wurde in Western Blots untersucht.

Für die Transkriptomuntersuchungen wurden die Zellen soweit nicht anders angegeben mit 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin für 96 Stunden behandelt, um einen effektiven PHD-Knockdown sicherzustellen. Der Zeitpunkt von 96 Stunden wurde gewählt, da dann der größte Effekt hinsichtlich der Proteinexpression nachgewiesen werden konnte und die Proteinexpression am ehesten den "Arbeitszustand" der Zelle widerspiegelt.

# 3.3 Charakterisierung der PHD2- und PHD3-Knockdown-Zelllinie

# 3.3.1 Expression der PHD1-, PHD2- und PHD3-RNA in den PHD-Knockdown-Zelllinien 2.1.1-16 und 3.3.1-12

Zur weiteren Charakterisierung der etablierten Zelllinien wurden 2.1.1-16-Zellen, 3.3.1-12-Zellen und T-REx-HeLa-Zellen hinsichtlich ihrer RNA-Expression von PHD1, PHD2 und PHD3 untersucht. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob der Knockdown einer PHD die jeweils anderen beiden PHDs beeinflusst.

Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien mit bzw. ohne 1 µg/ml Tetracyclin für 96 Stunden bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. Aus den unter diesen Bedingungen gewonnenen Zellextrakten wurde die RNA isoliert und mittels quantitativer PCR die Expression von PHD1-RNA, PHD2-RNA, PHD3-RNA sowie der konstitutiv exprimierten ribosomalen RNA L28 bestimmt. Die Expression der PHD1-, PHD2- und PHD3-RNAs war ohne Tetracyclin-Induktion bei allen Zelllinien vergleichbar (Abb. 12). Für PHD2 und PHD3 konnte unter hypoxischen Bedingungen eine stärkere RNA-Expression als unter normoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Die PHD1-RNA-Spiegel wurden dagegen nicht von der Sauerstoffkonzentration beeinflusst.

In 2.1.1-16-Zellen konnte ein reproduzierbarer PHD2-Knockdown nach Tetracyclin-Zugabe sowohl unter Normoxie (37 % im Vergleich zu 100 % ohne Tet, p < 0,05) als auch unter Hypoxie (17 % im Vergleich zu 100 % ohne Tet, p < 0,05) induziert werden (Abb. 12A). Abhängig von dem PHD2-Knockdown konnte bei 2.1.1-16-Zellen auch für die PHD3-RNA-Expression unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Reduktion nachgewiesen werden (63 % im Vergleich zu 100 % ohne Tet, p < 0,05). Unter Normoxie war die nur geringe PHD3-Expression dagegen unbeeinflusst von dem PHD2-Knockdown. Bei den 3.3.1-12-Zellen führte eine Induktion mit Tetracyclin sowohl bei 20 % O<sub>2</sub> (69 % im Vergleich zu 100 % ohne Tet, p < 0,05) als auch bei 1 % O<sub>2</sub> (74 % im Vergleich zu 100 % ohne Tet, p < 0,05) zu einem signifikanten Knockdown der PHD3-RNA-Expression (Abb. 12B). Die PHD1- und PHD2-Expression in 3.3.1-12-Zellen wurde durch den PHD3-Knockdown nicht beeinflusst.



Abb. 12: RNA-Expression von PHD1-3. (A) T-REx-HeLa-Zellen bzw. 2.1.1-16-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin wurden die Zellen lysiert und die Expression von PHD2-, PHD3- und PHD1-RNA mittels quantitativer PCR untersucht und im Verhältnis zur L28-RNA angegeben. (B) T-REx-HeLa-Zellen bzw. 3.3.1-12-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD3-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin wurden die Zellen lysiert und die Expression von PHD3-, PHD3- und PHD1-RNA mittels quantitativer PCR untersucht und im Verhältnis zur L28-RNA angegeben.

#### 3.3.2 HIF-1a-Proteinnachweis in PHD-Knockdown-Zellklonen

In Zellen, die mit siRNAs gegen PHD2 bzw. PHD3 transient transfiziert wurden, wurde verstärkte HIF-1a-Expression und eine gesteigerte HIF-Zielgenexpression eine nachgewiesen (Koditz et al. 2007; Stiehl et al. 2006). Um die HIF-1a-Expression in 2.1.1-16-Zellen zu untersuchen, wurden diese ohne bzw. mit Zugabe von 10 µg/ml Tetracyclin für 96 Stunden bei 20 % O2 bzw. die letzten 24 Stunden bei 1 % O2 kultiviert. Western-Blot-Untersuchungen Mithilfe von wurde anschließend der HIF-1α-Proteinnachweis durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der PHD2-Knockdown in 2.1.1-16-Zellen nicht mit einer verstärkten HIF-1α-Expression einhergeht (Abb. 13). Dies steht im Gegensatz zu den Befunden bei Zellen mit transientem PHD-Knockdown, könnte jedoch mit einer geringeren Knockdown-Effizienz in den stabil transfizierten Zellen zusammenhängen. Als Screeningmethode zur Identifizierung stabil transfizierter Zellklone konnte die HIF-Aktivität dennoch als Marker für einen erfolgreichen PHD-Knockdown



eingesetzt werden, da der Reportergen-Luciferase-Assay im Gegensatz zu Western-Blot-Untersuchungen höchstwahrscheinlich eine sehr viel sensitivere Methode darstellt.

Abb. 13: HIF-1 $\alpha$ -Proteinnachweis. 2.1.1-16-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 10 µg/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 12, 24, 48 bzw. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin wurden die Zellen lysiert. Die Expression von PHD2, HIF-1 $\alpha$  und  $\beta$ -Aktin wurde in Western Blots untersucht.

Konsistent mit diesem Befund ist auch, dass sich die Expression des HIF-1 Zielgens *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in Abhängigkeit des PHD2- bzw. PHD3-Knockdowns in 2.1.1-16-Zellen bzw. 3.3.1-12-Zellen nicht signifikant ändert (Abb. 14). Dafür wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben kultiviert. In allen Zelllinien konnte eine hypoxische Induktion von VEGF (ca. 2,5-fach bei 1 % O<sub>2</sub> im Vergleich zu 20 % O<sub>2</sub> für 2.1.1-16-Zellen) nachgewiesen werden. In T-REx-HeLa-Zellen zeigte sich die VEGF-Genexpression sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie unbeeinflusst von der Tetracyclin-Behandlung, so dass ein unspezifischer Tetracyclin-Effekt ausgeschlossen werden konnte.



Abb. 14: Expression des HIF-Zielgens VEGF. T-REx-HeLa-Zellen bzw. 2.1.1-16-Zellen und 3.3.1-12-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2- bzw. PHD3-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1  $\mu$ g/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 96 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe wurden die Zellen lysiert und die Expression der VEGF-RNA mittels quantitativer PCR untersucht und im Verhältnis zur L28-RNA angegeben.

# 3.4 Identifizierung PHD2-abhängiger Veränderungen im Transkriptom und Proteom

PHD2 wird im Vergleich zu PHD1 und PHD3 ubiquitär exprimiert und scheint einen stärkeren Einfluss auf die HIF-abhängige hypoxische Genexpression zu haben. Dementsprechend sind PHD2<sup>-/-</sup> Mäuse nicht lebensfähig (Takeda et al. 2006). Um neben der Regulation von HIF-1 $\alpha$  weitere mögliche PHD2-abhängige Signaltransduktionswege zu identifizieren, wurden die 2.1.1-16-Zellen für Screening-Untersuchungen genutzt. Es wurden PHD2-abhängige Transkriptom- und Proteomveränderungen (Gen-Array und 2D-Gel-Analyse) untersucht.

# 3.4.1 Transkriptomuntersuchung

Für die Transkriptomuntersuchung wurden 2.1.1-16-Zellen und T-REx-HeLa-Zellen mit bzw. ohne Zugabe von 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin für 96 Stunden bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert (pro Bedingung 3 unabhängige biologische Replikate). Aus den so gewonnenen Zellextrakten wurde RNA isoliert und zunächst mittels quantitativer PCR ein signifikanter PHD2-Knockdown in Tetracyclin-induzierten 2.1.1-16-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dieselben RNA-Proben wurden für die Transkriptomanalyse weiter untersucht. Die Transkriptomanalyse wurde mit dem *Agilent 44K Human Whole Genome Array* durchgeführt.

In Abbildung 15 ist die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene von drei Vergleichsgruppen und deren Schnittmengen schematisch dargestellt. Der Vergleich zwischen 2.1.1-16-Zellen mit bzw. ohne Tetracyclin-Induktion ergab unter normoxischen Bedingungen 135 statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene (p < 0,01). Davon waren nach Tetracyclin-Induktion 86 Gene hoch- und 49 Gene herunterreguliert. Unter hypoxischen Bedingungen ergab der Vergleich zwischen 2.1.1-16-Zellen mit bzw. ohne Tetracyclin-Induktion 47 statistisch signifikant unterschiedlich exprimierte Gene (p < 0,01), von denen 7 Gene hoch- und 40 Gene herunterreguliert waren. T-REx-HeLa-Zellen zeigten sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie keine veränderte Genexpression in Abhängigkeit von der Tetracyclin-Behandlung, so dass ein unspezifischer Tetracyclin-Effekt ausgeschlossen werden konnte.

Bei 2.1.1-16-Zellen, die ohne Tetracyclin-Behandlung bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert wurden, waren im Vergleich zu 2.1.1-16-Zellen, die ohne Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> kultiviert wurden, 420 Gene statistisch signifikant hypoxisch induziert (p < 0.01).



Abb. 15: Schematische Darstellung der Transkriptomanalyse. Für die drei Vergleichsgruppen (20 % O<sub>2</sub> (2.1.1-16 +Tet) – 20 % O<sub>2</sub> (2.1.1-16 -Tet) bzw. 1 % O<sub>2</sub> (2.1.1-16 +Tet) – 1 % O<sub>2</sub> (2.1.1-16 -Tet) bzw. 1 % O<sub>2</sub> (2.1.1-16 -Tet) – 20 % O<sub>2</sub> (2.1.1-16 -Tet) ist jeweils die Anzahl der hoch- bzw. herunterregulierten Gene innerhalb der Gruppe sowie die Schnittmenge der übereinstimmend regulierten Gene angegeben.

Es konnten 7 Gene identifiziert werden, die sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie in 2.1.1-16-Zellen in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown unterschiedlich exprimiert werden, jedoch nicht hypoxisch induzierbar sind, also höchstwahrscheinlich nicht durch HIF reguliert werden. Von diesen 7 Genen sind 3 Gene hochreguliert (PGM2L1 (*phosphoglucomutase 2-like 1*), FAP (*fibroblast activation protein, alpha*) und PTPRE (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, E*)) und 4 Gene herunterreguliert (AES (*amino-terminal enhancer of split*), RASSF2 (*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2*), OASL (2'-5'-oligoadenylate synthetase-like) und TSPAN8 (*tetraspanin8*)). In Tabelle 3 sind diese Gene genauer beschrieben.

11 Gene waren sowohl hypoxisch reguliert als auch gleichermaßen unter Normoxie in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown exprimiert. Differentiell exprimierte Gene unter Hypoxie mit und ohne Tetracyclin im Vergleich zu hypoxisch induzierten Genen ergab eine Schnittmenge von 9 Genen, die in beiden Vergleichsgruppen herunterreguliert waren (Abb. 15, Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Transkriptomanalyse. Die Tabelle beschreibt die in der Transkriptomuntersuchung identifizierten differentiell exprimierten Gene. Es wurden 7 Gene identifiziert, die sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie in Abhängigkeit des PHD2-Knockdowns in 2.1.1-16-Zellen unterschiedlich exprimiert werden, jedoch nicht hypoxisch induzierbar sind. 11 Gene werden sowohl hypoxisch induziert als auch in ihrer Expression von dem PHD2-Knockdown unter Normoxie beeinflusst. 9 Gene konnten identifiziert werden, die hypoxisch induziert werden und gleichzeitig unter Hypoxie mit bzw. ohne Tetracyclin unterschiedlich exprimiert werden.

Gen Name	Gen Beschreibung	1 % O <sub>2</sub> -/+Tet x-fache Veränderung	p-Wert	20 % O <sub>2</sub> - /+Tet, x-fache Veränderung	p-Wert	Accession no.	Agilent ID	Gen ID
PGM2L1	phosphoglucomutase 2-like 1	2,8	3,70e-06	4,3	2,14e-04	NM_173582	A_32_P122703	283209
FAP	fibroblast activation protein, alpha	2,6	1,24e-03	7,7	8,00e-07	NM_004460	A_23_P56746	2191
PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	2,3	2,14e-03	2,9	5,40e-06	NM_130435	A_23_P138495	5791
AES	amino-terminal enhancer of split	-2,1	1,16e-03	-3,1	2,36e-03	NM_198969	A_24_P416728	166
RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	-2,1	4,47e-04	-3,3	2,04e-05	NM_170774	A_23_P166087	9770
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	-2,2	2,47e-05	-4,6	8,00e-07	NM_198213	A_23_P139786	8638
TSPAN8	tetraspanin8	-3,4	4,15e-05	-7,8	2,00e-07	NM_004616	A_23_P36531	7103
Gen Name	Gen Beschreibung	20 % O <sub>2</sub> - /+Tet x-fache Veränderung	p-Wert	1 %-20 % O <sub>2</sub> -Tet, x-fache Veränderung	p-Wert	Accession no.	Agilent ID	Gen ID
COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	3,2	3,40e-06	10,6	8,00e-04	NM_001848	A_32_P32254	1291
LYPD3	LY6/PLAUR domain containing 3	3,8	4,30e-06	8,8	8,30e-04	NM_014400	A_23_P39265	27076
VLDLR	very low density lipoprotein receptor	3,5	1,20e-06	6,4	3,90e-06	NM_003383	A_23_P43476	7436
CRLF1	cytokine receptor-like factor 1	5,0	2,00e-06	6,0	1,30e-05	NM_004750	A_23_P56197	9244
COL5A1	collagen, type V, alpha 1	2,9	9,89e-05	5,2	7,59e-04	NM_000093	A_23_P158593	1289
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	3,1	3,09e-05	4,1	5,93e-05	NM_018948	A_24_P11384	54206
S100P	S100 calcium binding protein P	-3,3	1,11e-03	5,5	5,0e-07	NM_005980	A_23_P58266	6286
CA12	carbonic anhydrase XII	-3,6	1,49e-05	4,9	1,85e-05	NM_001218	A_24_P330518	771
SLC12A3	solute carrier family 12 (sodium/chloride transporters), member 3	-4,6	1,11e-05	4,9	3,2e-06	NM_000339	A_23_P77653	6559
SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	-3,0	1,10e-04	4,5	1,0e-07	NM_016354	A_23_P5903	28231

Gen Beschreibung	1 % O <sub>2</sub> -/+Tet x-fache Veränderung	p-Wert	1 %-20 % O <sub>2</sub> -Tet, x-fache Veränderung	p-Wert	Accession no.	Agilent ID	Gen ID
golgin-like hypothetical protein LOC440321	-2,8	4,09e-03	7,7	7,5e-06	NM_001012 452	A_24_P264166	440321
NK2 homeobox 1	-2,1	0,002225	7,6	0	NM_003317	A_24_P61490	7080
transmembrane protein 145	-2,4	7,31e-04	6,7	3,0e-07	NM_173633	A_23_P67127	284339
TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	-2,2	3,18e-03	5,7	1,32e-05	NM_015975	A_32_P627	51616
MAX interactor 1	-2,0	3,81e-03	5,5	1,1e-06	NM_005962	A_23_P161399	4601
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E	-2,1	4,06e-03	5,5	1,2e-06	XM_927029	A_23_P428640	90673
solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	-2,2	4,30e-04	4,4	1,4e-06	NM_003043	A_24_P46093	6533
potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1	-2,7	1,18e-03	4,3	4,4e-06	NM_002237	A_23_P210581	3755
similar to Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin-8) (CK-8) (Keratin-8) (K8)	-2,5	0,009519	4,0	0,006879	XR_017100	A_24_P67395	149501
	Gen Beschreibunggolgin-like hypothetical protein LOC440321NK2 homeobox 1transmembrane protein 145TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa MAX interactor 1protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1similar to Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin-8) (CK-8) (Keratin-8) (K8)	Gen Beschreibung1% O2 -/+Tet stache veränderunggolgin-like hypothetical protein LOC440321-2,8NK2 homeobox 1-2,1transmembrane protein 145-2,4TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa-2,2MAX interactor 1-2,0protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6-2,7potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1-2,7similar to Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin-8) (CK-8) (Keratin-8) (K8)-2,5	Gen Beschreibung1% O2 -/+Tet stack Veränderungp-Wert stack Veränderunggolgin-like hypothetical protein LOC440321-2,84,09e-03NK2 homeobox 1-2,10,002225transmembrane protein 145-2,47,31e-04TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa-2,23,18e-03MAX interactor 1-2,03,81e-03protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E-2,14,06e-03solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6-2,74,30e-04potassium voltage-gated channel, subfamily G, nember 1-2,71,18e-03similar to Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin-8) (CK-8) (Keratin-8) (K8)-2,50,009519	Gen Beschreibung         1% O2 -/+Tet t-fache veränderung         p-Wert         1%-20 % O2 -Fet, x-fache veränderung           golgin-like hypothetical protein LOC440321         -2,8         4,09e-03         7,7           NK2 homeobox 1         -2,1         0,002225         7,6           transmembrane protein 145         -2,4         7,31e-04         6,7           TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa         -2,20         3,18e-03         5,57           MAX interactor 1         -2,0         3,81e-03         5,55           protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E         -2,22         4,30e-04         4,4           potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1         -2,2,7         1,18e-03         4,3           similar to Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin-8) (CK-8) (Keratin-8) (K8)         -2,5         0,009519         4,0	Gen Beschreibung         1% O2 -/+Tet stache Veränderung         p-Wert         1%-20 % O2 Tet, x-fache Veränderung         p-Wert           golgin-like hypothetical protein LOC440321         -2,8         4,09e-03         7,7         7,5e-06           NK2 homeobox 1         -2,1         0,002225         7,6         0           transmembrane protein 145         -2,4         7,31e-04         6,7         3,0e-07           TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa         -2,2         3,18e-03         5,5         1,1e-06           MAX interactor 1         -2,1         4,06e-03         5,5         1,2e-06           solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6         -2,2         4,30e-04         4,4         1,4e-06           potassium voltage-gated channel, subfamily G, eurotin 1, type II cytoskeletal 8         -2,7         1,18e-03         4,3         4,4e-06	Gen Beschreibungl% 02 -/+Tet xfache veränderungp-Wertl%-20 % 02 veränderungp-WertAccession no.golgin-like hypothetical protein LOC440321-2,84,09e-037,77,5e-06MA_001012NK2 homeobox 1-2,10,0022257,60NM_003317transmembrane protein 145-2,47,31e-046,73,0e-07NM_173633TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa-2,23,18e-035,51,1e-06NM_005962MAX interactor 1-2,03,81e-035,51,2e-06NM_027029subuni 3E-2,24,06e-035,51,2e-06NM_003043protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)-2,24,30e-044,41,4e-06NM_003043subuni 3E-2,24,30e-044,41,4e-06NM_002237potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1-2,50,0095194,00,006879XE_017100	Gen Beschreibungly% 02 -/FTe schach Veränderungly% 20 % 02 -Feck schach Veränderungp-WertkcessionAglent Dgolgin-like hypothetical protein LOC440321-2.44.90e-037.77.5e-06M.01012A_24_P61490NK2 homeobox 1-2.10.0022257.60NM_00317A_24_P61490transmembrane protein 145-2.47.31e-046.73.0e-07NM_17363A_23_P67127TAPB RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa-2.23.18e-035.71.32e-05NM_010592A_32_P61739MAX interactor 1-2.03.81e-035.51.1e-06NM_005962A_23_P161399protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)-2.14.06e-035.51.2e-06NM_003043A_24_P46093solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6-2.2A.30e-044.41.4e-06NM_003043A_24_P46093potassium voltage-gated channel, subfamily G subfamily S transporter, subfamily S 

### 3.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese der 2.1.1-16-Zellen

Als Screening-Methode für PHD2-abhängige Proteomveränderungen wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese gewählt. 2.1.1-16-Zellen wurden mit bzw. ohne Behandlung mit 1 µg/ml Tetracyclin für 96 Stunden bei 20 % O<sub>2</sub> kultiviert. Als Kontrolle dienten T-REx-HeLa-Zellen, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Mit den Proteinextrakten der 2.1.1-16-Zellen wurde zunächst ein signifikanter PHD2-Knockdown nach Tetracyclin-Induktion mithilfe von Western-Blot-Untersuchungen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dieselben Zelllysate wurden anschließend für die 2D-Gelelektrophorese verwendet. Nach Färbung der 2D-Gele mit Coomassie wurde ein Proteinspot identifiziert, der in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown verstärkt exprimiert wird (Abb. 16). Bei T-REx-HeLa-Zellen war kein vergleichbarer Effekt zu beobachten. Der Proteinspot wurde aus dem Gel ausgestanzt und anschließend mit Trypsin verdaut. In der massenspektrometrischen Analyse wurde der Proteinspot als Cofilin1 identifiziert.



Abb. 16: 2D-Gel-Analyse. T-REx-HeLa-Zellen bzw. 2.1.1-16-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 1  $\mu$ g/ml Tetracyclin für 96 Stunden bei 20 % O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde mithilfe der 2D-Gelelektrophorese untersucht. Abgebildet ist ein Ausschnitt der Coomassie-gefärbten Gele mit dem in der anschließenden Massenspektroskopie identifizierten Proteinspot für Cofilin1.

# 3.4.3 Cofilin1 wird PHD2-abhängig phosphoryliert

Cofilin1 ist ein Mitglied der ADF/Cofilin-Familie und spielt eine wichtige Rolle im Aktinfilament-Umbau. Cofilin1 ist ein kleines Protein (19 kDa), welches ubiquitär exprimiert wird. Es bindet an F-Aktin und depolymerisiert dieses (Nishida et al. 1984). Die entstehenden Aktinmonomere (G-Aktin) können an anderer Stelle wieder zu F-Aktin polymerisiert werden. Außerdem durchtrennt Cofilin1 bestehende Aktinfilamente, an die Aktinmonomere wieder neu binden können (Bamburg 1999; Carlier et al. 1999). Dies ist entscheidend für die Zellmotilität. Die Aktivität von Cofilin1 wird durch Phosphorylierung des N-terminalen Serin3 reguliert (Agnew et al. 1995). Diese reversible Phosphorylierung wird durch die LIM-Kinase katalysiert (Arber et al. 1998). In phosphorylierter Form kann Cofilin1 nicht an F-Aktin binden und ist damit inaktiviert. Dadurch wird F-Aktin stabilisiert.

Um zu überprüfen, ob die Proteinexpression bzw. die Phosphorylierung von Cofilin1 PHD2-abhängig reguliert wird, wurde die Proteinexpression von Cofilin1 in 2.1.1-16-Zellen in einem unabhängigen Experiment untersucht. 2.1.1-16-Zellen und T-REx-HeLa-Zellen wurden 96 Stunden mit bzw. ohne Zugabe von 10 µg/ml Tetracyclin bei 20 % bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. Mithilfe von Western-Blot-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Cofilin1 sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie bei Herunterregulation von PHD2 stärker phosphoryliert wird (Abb. 17). Die Gesamtexpression an Cofilin1 ist unabhängig von der PHD2-Proteinexpression.



Abb. 17: Western-Blot-Untersuchungen hinsichtlich der phospho-Cofilin1- und gesamt-Cofilin1-Expression in Abhängigkeit eines PHD2-Knockdowns. T-REx-HeLa-Zellen bzw. 2.1.1-16-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin bei 20 % O<sub>2</sub> bzw. während der letzten 24 Stunden bei 1 % O<sub>2</sub> kultiviert. 96 Stunden nach Zugabe von Tetracyclin wurden die Zellen lysiert und die Expression von PHD2, phospho-Cofilin1 (p-Cof1), gesamt-Cofilin1 (Cof1) und  $\beta$ -Aktin in Western Blots nachgewiesen.

# 3.4.4 PHD2-abhängige Veränderung der Anordnung von F-Aktin

Cofilin1 beeinflusst die Umsatzrate von F-Aktin. Um den Einfluss des PHD2-Knockdowns auf das Zytoskelett zu überprüfen, wurde F-Aktin in 2.1.1-16-Zellen und T-REx-HeLa-Zellen mit bzw. ohne Zugabe von Tetracyclin mit Phalloidin angefärbt und die Anordnung von F-Aktin verglichen. Dafür wurden 2.1.1-16-Zellen und T-REx-HeLa-Zellen für 96 Stunden mit bzw. ohne 10 µg/ml Tetracyclin behandelt. In Abbildung 18 ist für jede Bedingung jeweils ein repräsentatives Bild von Phalloidin-gefärbten Zellen dargestellt. 2.1.1-16-Zellen mit Tetracyclin-induziertem PHD2-Knockdown zeigen eine auffällige Anordnung des F-Aktin. Es ist vermehrt in parallelen Strängen angeordnet, den sogenannten Aktin-Stressfasern. In den nicht Tetracyclin-induzierten 2.1.1-16-Zellen und in den T-REx-HeLa-Zellen mit bzw. ohne Tetracyclin-Behandlung wird weniger F-Aktin angefärbt. Aktin-Stressfasern sind kaum vorhanden, das Zytoskelett erscheint stärker im Umbau begriffen.

Eine geblindete Person ordnete insgesamt 50 Bilder (pro Bedingung 11 bis 14 Bilder) nach der Struktur der Aktinfilamente in Gruppen ein. Bilder von 2.1.1-16-Zellen mit Tetracyclin-induziertem PHD2-Knockdown wurden zu 92 % einer Gruppe zugeordnet, zu der keine Bilder anderer Bedingungen zugeordnet wurden.



Abb. 18: Darstellung von F-Aktin mittels Fluoreszenzmikroskopie. T-REx-HeLa-Zellen bzw. 2.1.1-16-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin für 96 Stunden bei 20 % O<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und das F-Aktin mit Phalloidin gefärbt.

#### 3.4.5 In-vitro-Wundheilungsassay (Scratch Assay)

Da PHD2 die Phosphorylierung von Cofilin1 und im Einklang damit die Ausbildung von Aktin-Stressfasern beeinflusst, stellt sich die Frage, ob PHD2-abhängig die Zellmotilität verändert wird. Deshalb wurde ein In-vitro-Wundheilungsassay durchgeführt (Abb. 19). Nach Setzen einer "Wunde" in einem konfluenten Zellrasen mithilfe einer Pipettenspitze wird die Geschwindigkeit beobachtet, mit der die zellfreie Fläche wieder mit Zellen bedeckt ist. Dies ist u. a. von Zellproliferation, Zelladhäsion und Zellmotilität abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die zellfreie Fläche von 2.1.1-16-Zellen nach Induktion des PHD2-Knockdowns mit Tetracyclin signifikant langsamer wieder bedeckt wird. 48, 55 und 73 Stunden nach Setzen des Zellrasendefektes war im Vergleich zu den nicht Tetracyclin-induzierten Zellen signifikant mehr zellfreie Fläche vorhanden. Für die T-REx-HeLa-Zellen konnte kein Tetracyclin-abhängiges Verhalten in dem Test beobachtet werden.



Abb. 19: Scratch Assay. (A) T-REx-HeLa-Zellen bzw. 2.1.1-16-Zellen (stabil transfiziert mit einer Tetracyclin-induzierbaren PHD2-shRNA) wurden mit bzw. ohne Zugabe von 10  $\mu$ g/ml Tetracyclin für 96 Stunden kultiviert. Anschließend wurde mit einer Pipettenspitze der Zellrasen unterbrochen ("Scratch"). Der Zellrasendefekt wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Setzen des "Scratch" fotografiert. Anhand einer standardisierten computerbasierten Auswertung der Bilder wurde der prozentuale Anteil zellfreier Fläche bestimmt. (B) Repräsentative Aufnahmen von "Scratch"-Wunden 55 Stunden nach Setzen des Zellrasendefektes.

# **4** Diskussion

PHD-Enzyme arbeiten als Sauerstoffsensoren der Zelle, indem sie abhängig von der Sauerstoffkonzentration den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  hydroxylieren und damit für den Abbau markieren (Epstein et al. 2001). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert die Expression von mehr als 70 Genen, die im weitesten Sinne für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung essentiell sind (Wenger et al. 2005).

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Tetracyclin-induzierbaren PHD-Knockdown-Zelllinie. Anhand dieser Zelllinie sollten die Auswirkungen eines PHD-Knockdowns untersucht und neue HIF-unabhängige PHD-Substrate identifiziert werden. In der Literatur mehren sich Hinweise, dass PHDs neben der Regulation von HIF- $\alpha$  auch weitere zelluläre Funktionen beeinflussen (Koditz et al. 2007). Daher könnten solche Zellmodelle genutzt werden, um HIF-unabhängige PHD Substrate oder Signalwege zu identifizieren. PHD-Inhibitoren werden bereits in Phase-II-Studien getestet. Sie sollen unter anderem zur Therapie einer chronischen Anämie von niereninsuffizienten Patienten eingesetzt werden und könnten die Gabe von rekombinantem EPO ersetzen. Die Identifikation von PHDabhängigen Signalwegen verstärkt daher zum einem das grundlegende Verständnis der zellulären Funktion unter hypoxischen Bedingungen. Zum anderen könnten die Erkenntnisse dazu genutzt werden, weitere Indikationen für die Inhibition von PHDs und die zu erwartenden Nebenwirkungen von PHD-Inhibitoren aufzudecken.

# 4.1 Etablierung einer Tetracyclin-induzierbaren PHD-Knockdown-Zelllinie

Für die Etablierung der PHD-Knockdown-Zelllinie wurden T-REx-HeLa-Zellen verwendet, die nach Transfektion eines geeigneten shRNA-Plasmids einen Tetracyclininduzierbaren Knockdown ermöglichen. Die Verwendung einer induzierbaren Knockdown-Zelllinie hat mehrere Vorteile gegenüber transienten Transfektionen von siRNAs bzw. shRNA-Plasmiden und nicht-induzierbaren, stabil transfizierten shRNA-Zelllinien: Zum einen steht im Gegensatz zu Experimenten mit transienten Transfektionen ein stabiles reproduzierbares Zellmodell zur Verfügung. Durch die konstante Knockdown-Effizienz im Vergleich zu möglicherweise schwankenden Transfektionseffizienzen bei transienten Transfektionen sind die Experimente mit stabil transfizierten Zellklonen untereinander besser vergleichbar. Zum anderen können im Vergleich zu Zelllinien mit einem stabilen nicht-induzierbaren Knockdown die untersuchten Effekte bei dem Tetracyclin-induzierbaren Knockdown in einen zeitlichen Zusammenhang zur Induktion des Knockdowns gestellt werden. Dadurch ist es möglich, zwischen kurzfristigen Effekten als Antwort auf den Knockdown und längerfristigen Effekten zu differenzieren. Darüber hinaus besteht bei einem stabilen Knockdown die Gefahr, dass dieser nach einem längeren Zeitraum von den Zellen kompensiert wird.

Ein Nachteil des T-REx-Systems besteht darin, dass unklar bleibt, ob Tetracyclin abgesehen von der Induktion des Knockdowns weitere unbekannte Effekte auslöst, die fälschlicherweise als Folge des Knockdowns interpretiert werden. Um unspezifische Tetracyclin-Effekte auszuschließen, wurden zur Kontrolle untransfizierte T-REx-HeLa-Zellen mit und ohne Tetracyclin behandelt. In der vorliegenden Arbeit konnten unspezifische Tetracyclin-Effekte in allen durchgeführten Experimenten ausgeschlossen werden.

Für die Generierung einer möglichst effizienten PHD2-Knockdown-Zelllinie wurde sowohl die Tetracyclin-Konzentration zur Induktion des Knockdowns titriert als auch der Zeitpunkt für einen optimalen Knockdown nach Tetracyclin-Induktion bestimmt. Die RNA-Expression von PHD2 ist in 2.1.1-16-Zellen 48 Stunden nach Tetracyclin-Induktion am stärksten vermindert. Im Vergleich zu 2.1.1-16-Zellen ohne Tetracyclin-Behandlung ist die PHD2-RNA-Expression unter Normoxie auf 33 % und unter Hypoxie auf 13 % reduziert. Auf Proteinebene zeigte sich der stärkste PHD2-Knockdown 96 Stunden nach Induktion. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der PHD2-Halbwertszeit von 20 Stunden (Barth et al. 2007). Durch die Zugabe von Tetracyclin konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt bzw. bei keiner der verwendeten Tetracyclin-Konzentration ein 100 %iger Knockdown des PHD2-Proteins erreicht werden. Eine geringe PHD2-Expression war stets nachweisbar. Dieser Befund ist typisch für Knockdown-Experimente und unterscheidet dieses Modell unter anderem von Knockout-Modellen.

In publizierten Studien wurde gezeigt, dass durch eine transiente Transfektion von siRNA gegen PHD2 in HeLa-Zellen ein nahezu vollständiger PHD2-Knockdown erzielt werden kann (Stiehl et al. 2006). Eine so starke Knockdown-Effizienz wurde in 2.1.1-16-Zellen mit dem T-REx-System nicht erreicht. Nach dem hocheffizienten Knockdown durch transiente Transfektion von PHD2 siRNAs kann eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  in Normoxie beobachtet werden (Koditz et al. 2007; Stiehl et al. 2006). Es ist zu vermuten, dass in den 2.1.1-16-Zellen die Herunterregulation von PHD2 nicht ausreichend effizient ist, um eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  in Normoxie zu erreichen, die in Western-Blot-Untersuchungen nachgewiesen werden kann. Nach transienter Transfektion der induzierten

2.1.1.-16-Zellen mit einem HIF-Reportergenplasmid konnte tatsächlich eine erhöhte HIF-Aktivität nachgewiesen werden. Der Nachweis der HIF-Aktivität mittels Luciferase-Aktivität ist aber sehr viel sensitiver im Vergleich zum Immunnachweis des Proteins im Western Blot.

Nach Abschluss der Experimente für die vorliegende Arbeit wurde in weiterführenden Experimenten der Abteilung Herz- und Kreislaufphysiologie beobachtet, dass HIF-1 $\alpha$  in 2.1.1-16-Zellen nach Induktion des PHD2-Knockdowns stabilisiert wird. Dies ist unter Umständen auf die stetige Selektionierung des Zellklons mit Zeocin sowie veränderte Zellkulturbedingungen zurückzuführen (Anzucht der Zellen in Zellkulturflaschen, Induktion des PHD2-Knockdowns mit 10 µg/ml Doxycyclin, Harnstofflyse der Zellen mit IEF-Puffer).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand der 2.1.1-16-Zelllinie HIF-unabhängige PHD2-Signalwege zu identifizieren, um damit unter anderem ein besseres Verständnis für die möglichen Nebenwirkungen von PHD2-Inhibitoren zu bekommen. Bei einer systemischen Anwendung von PHD2-Inhibitoren kann nicht davon ausgegangen werden, dass in allen Zellen eine vollständige Inhibierung von PHD2 erreicht wird. Deshalb ist es wichtig, die Effekte eines vollständigen PHD2-Knockdowns von Effekten einer nur teilweise reduzierten PHD2-Expression zu unterscheiden und beides unabhängig von der HIF-1α-Expression zu untersuchen.

# 4.2 Identifizierung von PHD-abhängigen Transkriptom- und Proteomveränderungen

Um neben der Regulierung von HIF-1 $\alpha$  weitere mögliche PHD2-abhängige Signaltransduktionswege zu identifizieren, wurden 2.1.1-16-Zellen für Transkriptomuntersuchungen genutzt. Dabei wurden 7 Gene (Tetraspanin8, OASL, RASSF2, AES, PTPRE, FAP und PGM2L1) identifiziert, die sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown reguliert werden, jedoch nicht hypoxisch induzierbar sind, also höchstwahrscheinlich nicht von HIF-1 oder HIF-2 reguliert werden.

#### **Tetraspanin8**

Das Gen, welches für Tetraspanin8 kodiert, wird von den 7 Genen am stärksten abhängig von dem PHD2-Knockdown reguliert. Unter normoxischen Bedingungen wird Tetraspanin8 nach Tetracyclin-Induktion 7,8fach geringer exprimiert, unter hypoxischen Bedingungen 3,4fach geringer (Tabelle 3). Tetraspanin8, auch CO-029 genannt, ist ein Mitglied der Tetraspanin-Superfamilie. Tetraspanine sind integrale Membranproteine mit vier transmembranen Domänen (Maecker et al. 1997). Sie interagieren untereinander sowie mit verschiedenen anderen Membranproteinen wie Integrinen, Wachstumsfaktorrezeptoren oder intrazellulären Signalmolekülen (Tarrant et al. 2003). Wichtiger als die Funktion der einzelnen Bestandteile dieses sogenannten Tetraspanin-Webs ist die Kombination der Tetraspanine mit ihren Interaktionspartnern. Tetraspanine spielen eine Rolle für Zelladhäsion, Zellwachstum und Zellmotilität (Kanetaka et al. 2003; Lazo 2007). Der genaue molekulare Mechanismus von Tetraspanin8 ist bisher noch nicht bekannt. In hepatozellulären Karzinomzellen wurde jedoch eine verstärkte Expression von Tetraspanin8 nachgewiesen (Kanetaka et al. 2001). In metastasierenden Zelllinien ist die Expression von Tetraspanin8 sehr unterschiedlich.

Es konnte gezeigt werden, dass Tetraspanin8 mit Tetraspanin CD151 und dem Integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 interagiert. Die Expression dieses Komplexes scheint in Pankreas- und Colonkarzinomzellen mit einer erhöhten Zellmotilität einherzugehen (Gesierich et al. 2005). Das Rattenhomolog von Tetraspanin8 (D6.1A) fördert das Tumorwachstum, indem es die Angiogenese unabhängig von der Sauerstoffkonzentration induziert. Der genaue molekulare Mechanismus dieser proangiogenetischen Wirkung ist jedoch noch unklar (Gesierich et al. 2006).

# OASL

Unter normoxischen Bedingungen wird OASL in den induzierten PHD2-Knockdown-Zellen 4,6fach geringer exprimiert als in 2.1.1-16-Zellen ohne Knockdown. Unter Hypoxie wird es nach Tetracyclin-Zugabe 2,2fach geringer exprimiert. Das 56 kDa große Protein ist sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert und wird in den meisten menschlichen Geweben exprimiert, besonders stark in Leukozyten, im Colon und im Hoden (Hartmann et al. 1998b; Rebouillat et al. 1998). OASL ist ein Mitglied der 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase-Familie, zu der die Gene OAS1, OAS2 und OAS3 gehören (Hartmann et al. 1998b). OAS1-3-Proteine werden als latente Enzyme exprimiert und durch doppelsträngige RNA aktiviert (Hartmann et al. 1998a). Sie synthetisieren 2'-5'-Oligoadenylate, welche wiederum RNase L aktivieren. RNase L führt zur Degradierung von viraler RNA (Eskildsen et al. 2003). OASL wird wie OAS1-3 durch Interferon induziert. Im Gegensatz zu diesen besitzt OASL jedoch keine 2'-5'-OligoadenylatSynthetase Aktivität. Der C-Terminus enthält zwei ubiquitinähnliche Sequenzen (Hartmann et al. 1998b). Die biologische Funktion von OASL ist noch unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die ubiquitinähnliche Domäne von OASL mit MBD1 (*Methyl CpG binding protein 1*), einem transkriptionellen Repressor, interagiert (Andersen et al. 2004).

#### RASSF2

Unter Normoxie wird RASSF2 (*Ras association domain family 2*) in 2.1.1-16-Zellen nach Tetracyclin-Induktion des PHD2-Knockdowns 3,1fach geringer exprimiert als ohne Tetracyclin-Zugabe. Unter hypoxischen Bedingungen wird RASSF2 nach Induktion des PHD2-Knockdowns 2,1fach geringer exprimiert.

Das Tumorsuppressorgen RASSF2 interagiert GTP-abhängig mit dem Proto-Oncogen K-Ras und supprimiert dessen Aktivität. RASSF2 fördert Apoptose und einen Zellzyklusarrest und inhibiert auf diese Weise das Zellwachstum (Vos et al. 2003). RASSF2 wird in den meisten gesunden Geweben exprimiert, besonders stark jedoch in Gehirn, Lunge, Plazenta und in Blutzellen (Cooper et al. 2008; Vos et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass RASSF2 in verschiedenen Karzinomzellen durch Methylierung inaktiviert ist (Imai et al. 2008). Die Methylierung der DNA ist durch pharmakologische Inhibierung der DNA Methyltransferase reversibel (Issa 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass RASSF2 die transkriptionelle Aktivität von NF-κB unterdrückt (Imai et al. 2008).

# AES

AES (*amino-terminal enhancer of split*) wurde in 2.1.1-16-Zellen in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown nach Tetracyclin-Induktion unter normoxischen Bedingungen 3,3fach bzw. unter hypoxischen Bedingungen 2,1fach geringer exprimiert.

AES gehört zu der Familie der Groucho/TLE Proteine, einer Gruppe von transkriptionellen Corepressoren (Yu et al. 2001). AES kodiert für ein Protein aus 197 Aminosäuren, welches homolog zum N-Terminus des Drosophila-Groucho-Proteins ist. Dieser ist für die Interaktion zwischen den TLE-Familienmitgliedern wichtig (Tetsuka et al. 2000). Die Funktion von AES ist noch nicht vollständig geklärt. Für AES wurde bisher vor allem eine transkriptionelle Regulation beschrieben. Diese erfolgt zum einen durch Inhibierung der Corepressorfunktion anderer TLE-Proteine und zum anderen durch Interaktion mit der NF-κB Untereinheit p65 (Tetsuka et al. 2000).

### PTPRE

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Genen wird PTPRE (protein tyrosine phosphatase, receptor type, E) in 2.1.1-16-Zellen in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown verstärkt exprimiert. Unter Normoxie wird PTPRE nach Induktion des PHD2-Knockdowns 2,3fach und unter Hypoxie 2,9fach stärker exprimiert. PTPRE ist ein Mitglied der Protein-Tyrosinphosphatase-Superfamilie. Durch die reversible Phosphorylierung von Tyrosinresten werden Proteine in ihrer Struktur und ihrer Funktion beeinflusst. Protein-Tyrosinphosphatasen sind damit die natürlichen Gegenspieler der Protein-Tyrosinkinasen. Es wurde gezeigt, dass PTPRE die Tyrosinkinasen der Scr-Familie Yes und Fyn dephosphoryliert und aktiviert (Granot-Attas und Elson 2004). Verschiedene Studien lassen vermuten, dass PTPRE eine Rolle bei der malignen Transformation von Tumorzellen spielt (Granot-Attas und Elson 2004).

# FAP

Das Gen, welches für das *fibroblast activation protein alpha* (FAP) kodiert, wurde in der Transkriptomanalyse der 2.1.1-16-Zellen als ein Gen identifiziert, das nach Induktion des PHD2-Knockdowns verstärkt exprimiert wird. Unter normoxischen Bedingungen wird das FAP-Gen nach Induktion des PHD2-Knockdowns 7,7fach stärker exprimiert und unter hypoxischen Bedingungen 2,6fach stärker.

FAP ist eine membrangebundene Serinprotease. Sie gehört zu der Enzymklasse der Post-Prolyl-Peptidasen und ist zu 48 % homolog mit der Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4). FAP besitzt im Gegensatz zu DPP4 jedoch zusätzlich sowohl Gelatinase- als auch Kollagenase-Aktivität (Kelly 2005). Es wird in den Stroma-Fibroblasten vieler epithelialer Tumoren, in den Fibroblasten von heilenden Wunden und in chronisch entzündlichem Gewebe exprimiert, nicht jedoch in normalem adulten Gewebe. Eine hohe FAP-Expression in metastasierenden Tumorzellen korreliert mit einer kürzeren Überlebensdauer (Henry et al. 2007). Im Mausmodell ist eine hohe FAP-Expression in Mammakarzinomen mit einem schnelleren Tumorwachstum und einer erhöhten Gefäßdichte assoziiert (Huang Y et al. 2004). In In-vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass FAP Einfluss auf Migration und Adhäsion hat. Je nach Zelllinie führte eine Überexpression von FAP zu einer gesteigerten oder auch reduzierten Migration bzw. Adhäsion. In allen untersuchten Zelllinien war eine erhöhte Apoptoserate zu beobachten (Wang X M et al. 2005).

#### PGM2L1

Das Gen, welches für PGM2L1 (*Phosphoglucomutase 2-like 1*) kodiert, wird in 2.1.1-16-Zellen nach Tetracyclin-Induktion des PHD2-Knockdowns unter Normoxie 4,4fach stärker exprimiert. Unter Hypoxie wird es in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown 2,8fach stärker exprimiert. PGM2L1 katalysiert die 1,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Synthese von Glucose-1,6-bisphosphat und anderer Aldose-Bisphosphate. Es ist ein 72 kDa großes Protein und wird im Gehirn stark exprimiert (Maliekal et al. 2007).

Betrachtet man die hier beschriebenen Gene und ihre Funktionen zusammen, dann fällt auf, dass sie einige Funktionen gemeinsam haben. Zellmotilität, Zelladhäsion, Angiogenese, Apoptose und die Aktivität von NF-κB werden teilweise in ähnlicher Weise beeinflusst. Weitere unabhängige Experimente sind notwendig, um den Einfluss eines PHD2-Knockdowns auf die hier beschriebenen Gene zu verifizieren und zu bestätigen. Es wäre zum einen sinnvoll, die Expression dieser Gene in 2.1.1-16-Zellen erneut mit unabhängiger cDNA mittels quantitativer PCR zu bestimmen. Zum anderen wäre es interessant, HeLa-Zellen unter der Behandlung mit dem PHD-Inhibitor DMOG sowie andere stabile PHD2-Knockdown-Zellklone hinsichtlich der Expression dieser Gene zu untersuchen. Bevor durch diese Experimente nicht bestätigt wurde, dass eine PHD2abhängige Genexpression vorliegt, müssen die vorliegenden Ergebnisse vorerst als hypothetisch angesehen werden, da trotz der verwendeten Kontrollgruppen unbekannte Faktoren einen Einfluss gespielt haben könnten.

Um die Funktion der beschriebenen Gene und deren Auswirkung auf den Phänotyp der Zellen weiter zu untersuchen, wäre es denkbar in weiteren Experimenten die einzelnen Gene überzuexprimieren bzw. mittels siRNA herunterzuregulieren und den entstehenden Phänotyp mit 2.1.1-16-Zellen zu vergleichen.

# 4.3 PHD2-abhängige Phosphorylierung von Cofilin1 und Veränderungen im Aktinfilament-Umbau

Neben den beschriebenen Transkriptomuntersuchungen wurden die 2.1.1-16-Zellen genutzt, um einen Einblick in PHD2-abhängige Proteomveränderungen zu bekommen. Dazu wurden Totalzell-Proteinextrakte, die aus Tetracyclin-induzierten bzw. unbehandelten Zellen gewonnen wurden, in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Dabei wurde ein differentiell exprimierter Proteinspot als Cofilin1 identifiziert,

welcher unter normoxischen Bedingungen in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown verstärkt exprimiert wurde. In Western Blots, die mit unabhängigen Proteinextrakten durchgeführt wurden, konnte bestätigt werden, dass die phosphorylierte Form von Cofilin1 nach Induktion des PHD2-Knockdown stärker exprimiert wird.

Cofilin1 ist ein Mitglied der ADF/Cofilin-Familie und ein wichtiger Regulator für den Aktinfilament-Umbau. Es bindet an Aktin und fördert die Dissoziation von Aktinmonomeren aus Aktinfilamenten. Das entstehende G-Aktin kann an anderer Stelle wieder für den Aufbau von Aktinfilamenten genutzt werden. Zusätzlich durchtrennt Cofilin1 bestehende Aktinfilamente. Dadurch entstehen vermehrt vorstehende sogenannte *barbed* Aktinenden, an die wieder neue Aktinmonomere binden können (Bamburg 1999; Carlier et al. 1999). Dieser Vorgang ist entscheidend für die Zytoskelettdynamik und Zellmotilität (Huang T Y et al. 2006). Zellmotilität spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen, z. B. im Rahmen der Embryogenese, bei Wundheilung oder auch bei der Metastasierung von Tumorzellen (DesMarais et al. 2005). Entsprechend seiner Bedeutung für das Zytoskelett sind Cofilin1-Knockout-Mäuse nicht überlebensfähig (Gurniak et al. 2005).

Cofilin1 ist ein 19 kDa großes Protein, welches ubiquitär exprimiert wird. Seine Aktivität wird durch die Phosphorylierung des N-terminalen Serin3 reguliert. In seiner phosphorylierten Form kann Cofilin nicht an Aktin binden, so dass die Aktinfilamente stabilisiert werden (Agnew et al. 1995). Die Dephosphorylierung und damit die Aktivierung von Cofilin1 wird durch die Phosphatasen Slingshot (SSH) und Chronophin (CIN) katalysiert (Huang T Y et al. 2006). Für die Phosphorylierung von Cofilin sind dagegen die LIM-Kinasen LIMK1 und LIMK2 sowie die TES-Kinasen (testikuläres Protein) TESK1 und TESK2 verantwortlich. Die TES-Kinasen werden vor allem im Hoden exprimiert (Huang T Y et al. 2006), während LIMK1 und LIMK2 ubiquitär exprimiert werden (Bernard 2007). Die LIM-Kinasen werden über einen komplexen Signalweg reguliert. Es wurde gezeigt, dass LIMK1 durch die Phosphorylierung des Threonin508 aktiviert wird. Diese Phosphorylierung wird durch die Kinasen ROCK (Rho associated, coiled-coil-forming protein kinase) und PAK1 (p21 aktivierte Kinase1) katalysiert, welche wiederum von den GTPasen Rho bzw. Rac reguliert werden (Edwards et al. 1999; Ohashi et al. 2000). LIMK2 wird über den Rho-ROCK-Signalweg durch Phosphorylierung des Threonin505 aktiviert (Amano et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in 2.1.1-16-Zellen nach Induktion des PHD2-Knockdowns Cofilin1 vermehrt in seiner phosphorylierten Form vorliegt. Die

Proteinexpression von Cofilin1 wurde durch den PHD2-Knockdown jedoch nicht beeinflusst. Mit der vermehrten Phosphorylierung von Cofilin1, welche durch die LIM-Kinase katalysiert wird, ist eine Stabilisierung der Aktinfilamente assoziiert. Amano et al. konnten zeigen, dass die Expression von LIMK2 in HeLa-Zellen die Entstehung von Aktin-Stressfasern, Membranblässchen und fokalen Adhäsionen induziert (Amano et al. 2001). Passend zu diesem Ergebnis konnte nachgewiesen werden, dass in 2.1.1-16-Zellen nach Induktion des PHD2-Knockdowns im Vergleich zu 2.1.1-16-Zellen ohne Tetracyclin-Induktion und zu T-REx-HeLa-Zellen vermehrt Aktin-Stressfasern vorliegen. Aktin-Stressfasern sind parallel angeordnete Stränge von Aktinfilamenten und spielen eine wichtige Rolle für Zelladhäsion, Zellkontraktion und Veränderungen der Zellmorphologie (Hotulainen und Lappalainen 2006). Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine definierte "Wunde" im konfluenten Zellrasen bei 2.1.1-16-Zellen nach Induktion des PHD2-Knockdowns signifikant langsamer wieder zuwächst als bei den Vergleichsgruppen. Dieser Vorgang ist unter anderem von Zellproliferation, Zelladhäsion und Zellmotilität abhängig. In weiterführenden Experimenten, die in der Abteilung für Herz- und Kreislaufphysiologie durchgeführt wurden, konnten in 2.1.1-16-Zellen jedoch keine Veränderungen der Zellteilungsrate in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass eher Zelladhäsion und Zellmotilität und weniger die Zellproliferation durch einen PHD2-Knockdown beeinflusst werden.

Es sind weitere Experimente notwendig, um festzustellen, ob PHD2 direkt mit Cofilin1 oder mit einem anderen regulierenden Protein des Signaltransduktionswegs interagiert. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des Rho-ROCK-Signalwegs notwendig ist, um durch eine verstärkte Aktivierung von LIMK2 in HeLa-Zellen die Entstehung von Aktin-Stressfasern, Membranblässchen und fokalen Adhäsionen zu induzieren (Amano et al. 2001). Diese Ergebnisse legen die Hypothese nahe, dass der PHD2-abhängige Effekt auf die Aktinfilamente nicht auf eine direkte Interaktion zwischen PHD2 und Cofilin1 zurückzuführen ist, sondern dass PHD2 an einem anderen regulierenden Protein des Signalwegs angreift.

In weiterführenden Experimenten wäre es interessant, den Einfluss von PHD2 auf die Phosphorylierung von Cofilin1 in 2.1.1-16-Zellen auch in unabhängigen Zelllinien mit einem transienten oder stabilen PHD2-Knockdown zu untersuchen.

### 4.4 Konsequenzen einer PHD2-Inhibition

PHD2-Inhibitoren werden bereits in Phase-II-Studien getestet. Sie sollen unter anderem zur Behandlung der chronischen Anämie bei niereninsuffizienten Patienten eingesetzt werden. Bisher werden die Patienten in der Regel mit rekombinant hergestelltem Erythropoietin behandelt, um einer chronischen Anämie entgegenzuwirken. PHD2-Inhibitoren könnten durch eine Steigerung der HIF-Expression die endogene Rest-EPO-Produktion fördern und damit eine interessante Alternative zu der bisherigen Therapie mit rekombinantem EPO darstellen. Dafür ist es jedoch unerlässlich, die möglichen Nebenwirkungen von PHD2-Inhibitoren genau zu untersuchen. Ein breites Spektrum von möglichen Nebenwirkungen ergibt sich dadurch, dass durch die Steigerung der HIF-1-Expression nicht nur EPO sondern mehr als 70 weitere Zielgene von HIF-1 beeinflusst werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zusätzliche bisher unbekannte möglicherweise HIF-unabhängige PHD-Substrate zu identifizieren. Durch ein weiterreichendes Verständnis der PHDs können Rückschlüsse auf weitere mögliche Nebenwirkungen von PHD2-Inhibitoren gezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein PHD2-Knockdown in 2.1.1-16-Zellen zu einer verstärkten Phosphorylierung von Cofilin1, zur Entstehung von Aktin-Stressfasern und zu einem verlangsamten Zuwachsen einer definierten Zellwunde führt. Gleichzeitig konnten in den Transkriptomuntersuchungen weitere PHD2-abhängig exprimierte Gene identifiziert werden, die mit Zelladhäsion bzw. Zellmotilität in Verbindung gebracht werden können (z. B. Tetraspanin8 und FAP). Daher kann vermutet werden, dass PHD2 über die veränderte Expression der oben beschriebenen Gene bzw. der Phosphorylierung von Cofilin1 Zelladhäsion und Zellmotilität beeinflusst. Beide Zellfunktionen sind z. B. an Wundheilungsprozessen oder Tumormetastasierung beteiligt. In weiterführenden Studien sollte daher geklärt werden, ob der PHD2-vermittelte Effekt auf die Cofilin-Phosphorylierung HIF-abhängig bzw. unabhängig ist. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit PHD2 über diesen Weg die physiologisch notwendige Zellmotilität bzw. pathophysiologische Zellmotilität (Wundheilung, Metastasierung etc.) beeinflusst.

Um die physiologische Bedeutung des zellulären Sauerstoffsensings sowie deren therapeutische Manipulation durch PHD-Inhibitoren besser verstehen, einschätzen und reduzieren zu können, bleibt die Untersuchung verschiedener PHD2-abhängiger Faktoren und Signalwege eine spannende Aufgabe innerhalb der funktionellen Charakterisierung der PHD2.

# 5 Zusammenfassung

PHD1-3 sind sauerstoffabhängige Enzyme, die den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF- $1\alpha$ ) hydroxylieren und damit für den Abbau markieren. HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von mehr als 70 Genen reguliert, die im weitesten Sinne für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung essentiell sind. Unter Sauerstoffmangel sind die PHDs inaktiv, so dass die HIF-1 $\alpha$ -Proteinlevel ansteigen und HIF-1-Zielgene, u. a. das Erythropoietin-Gen, induziert werden. PHD-Inhibitoren werden bereits in Phase-II-Studien getestet. Sie sollen unter anderem zur Therapie der chronischen Anämie bei niereninsuffizienten Patienten eingesetzt werden und die Gabe von rekombinantem EPO ersetzen.

Es ist bisher wenig darüber bekannt, ob die PHDs neben der Regulation von HIF-1 $\alpha$  noch weitere zelluläre Funktionen beeinflussen. Um HIF-unabhängige PHD-Substrate zu identifizieren und damit auch die Wirkungen und Nebenwirkungen von PHD-Inhibitoren besser einschätzen zu können, wurden Tetracyclin-induzierbare PHD2- und PHD3-Knockdown-Zelllinien etabliert und die Bedingungen für einen möglichst effizienten Knockdown optimiert. Weiterführend wurden die Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression von PHD1-3 sowie HIF-1 $\alpha$  und dessen Zielgen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) charakterisiert. Im Vergleich zu PHD1 und PHD3 scheint PHD2 unter Normoxie die entscheidende Rolle für die HIF-1 $\alpha$ -Regulation zu spielen. Daher wurde die Tetracyclininduzierbare PHD2-Knockdown-Zelllinie 2.1.1-16 genutzt, um PHD2-abhängige Transkriptom- und Proteomveränderungen (Gen-Array und 2D-Gelelektrophorese) zu untersuchen.

In der Transkriptomanalyse konnten 7 Gene identifiziert werden, die in Abhängigkeit von dem PHD2-Knockdown unterschiedlich exprimiert werden, jedoch nicht hypoxisch induzierbar sind, d. h. höchstwahrscheinlich nicht durch HIF-1 reguliert werden. Von diesen 7 Genen sind 3 Gene hochreguliert (PGM2L1 (*phosphoglucomutase 2-like 1*), FAP (*fibroblast activation protein, alpha*) und PTPRE (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, E*)) und 4 Gene herunterreguliert (AES (*amino-terminal enhancer of split*), RASSF2 (*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2*), OASL (2'-5'-oligoadenylate synthetase-like) und TSPAN8 (*tetraspanin8*)). Interessanterweise haben die beschriebenen Gene einige Funktionen gemeinsam: Zellmotilität, Zelladhäsion, Angiogenese, Apoptose und die Aktivität von NF-κB werden teilweise in ähnlicher Weise beeinflusst.

In der 2D-Gelelektrophorese wurde ein Proteinspot, der abhängig von dem PHD2-Knockdown reguliert wird, als Cofilin1 identifiziert. In unabhängigen Experimenten wurde bestätigt, dass Cofilin1 sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie nach Induktion des PHD2-Knockdowns verstärkt in seiner phosphorylierten und damit inaktiven Form vorliegt. Cofilin1 hat einen fördernden Einfluss auf den Aktinfilament-Umbau und spielt damit eine wichtige Rolle für die Zytoskelettdynamik und Zellmotilität. In Übereinstimmung damit konnte nachgewiesen werden, dass die Induktion des PHD2-Knockdowns in 2.1.1-16-Zellen ein vermehrtes Vorliegen von Aktin-Stressfasern zur Folge hat. Außerdem wurde gezeigt, dass eine definierte "Wunde" im konfluenten Zellrasen bei 2.1.1-16-Zellen nach Induktion des PHD2-Knockdowns signifikant langsamer wieder zuwächst als bei den Vergleichsgruppen.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse kann vermutet werden, dass eine Inhibition von PHD2 unter anderem Einfluss auf Zellmotilität und Zelladhäsion hat. Inwiefern sich dies auf physiologische Vorgänge und pathophysiologische Prozesse wie Wundheilung und Metastasierung etc. auswirkt, muss weiter untersucht werden.

# 6 Literatur

- Abu-Farha M, Niles J und Willmore WG (2005): Erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase protein is stabilized by low oxygen and proteasomal inhibition. Biochem Cell Biol. <u>83</u>, 620-630
- Agnew BJ, Minamide LS und Bamburg JR (1995): Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. J Biol Chem <u>270</u>, 17582-17587
- Amano T, Tanabe K, Eto T, Narumiya S und Mizuno K (2001): LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. Biochem J <u>354</u>, 149-159
- Andersen JB, Strandbygard DJ, Hartmann R und Justesen J (2004): Interaction between the 2'-5' oligoadenylate synthetase-like protein p59 OASL and the transcriptional repressor methyl CpG-binding protein 1. Eur J Biochem <u>271</u>, 628-636
- Aprelikova O, Chandramouli GV, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK, Linehan WM und Barrett JC (2004): Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxiainducible factors. J Cell Biochem <u>92</u>, 491-501
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O und Caroni P (1998): Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIMkinase. Nature <u>393</u>, 805-809
- Baek JH, Mahon PC, Oh J, Kelly B, Krishnamachary B, Pearson M, Chan DA, Giaccia AJ und Semenza GL (2005): OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha. Mol Cell <u>17</u>, 503-512
- Bamburg JR (1999): Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. Annu Rev Cell Dev Biol <u>15</u>, 185-230
- Barth S, Nesper J, Hasgall PA, Wirthner R, Nytko KJ, Edlich F, Katschinski DM, Stiehl DP, Wenger RH und Camenisch G (2007): The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. Mol Cell Biol <u>27</u>, 3758-3768
- Benjamini Y und Hochberg Y (1995): Controlling the false discovery rate: A practical an powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc <u>57</u>, 289-300
- Bernard O (2007): Lim kinases, regulators of actin dynamics. Int J Biochem Cell Biol <u>39</u>, 1071-1076
- Berra E, Roux D, Richard DE und Pouyssegur J (2001): Hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) escapes O<sub>2</sub>-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. EMBO Rep <u>2</u>, 615-620
- Blais JD, Filipenko V, Bi M, Harding HP, Ron D, Koumenis C, Wouters BG und Bell JC (2004): Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. Mol Cell Biol. <u>24</u>, 7469-7482
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem <u>72</u>, 248-254
- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A und Brines M (2003): Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. Proc Natl Acad Sci U S A <u>100</u>, 4802-4806
- Carlier MF, Ressad F und Pantaloni D (1999): Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. J Biol Chem <u>274</u>, 33827-33830

- Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I et al. (2002): Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. N Engl J Med <u>346</u>, 469-475
- Chomczynski P und Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem <u>162</u>, 156-159
- Cioffi CL, Liu XQ, Kosinski PA, Garay M und Bowen BR (2003): Differential regulation of HIF-1 alpha prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. Biochem Biophys Res Commun <u>303</u>, 947-953
- Cooper WN, Dickinson RE, Dallol A, Grigorieva EV, Pavlova TV, Hesson LB, Bieche I, Broggini M, Maher ER, Zabarovsky ER et al. (2008): Epigenetic regulation of the ras effector/tumour suppressor RASSF2 in breast and lung cancer. Oncogene <u>27</u>, 1805-1811
- Dalgard CL, Lu H, Mohyeldin A und Verma A (2004): Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors. Biochem J <u>380</u>, 419-424
- del Peso L, Castellanos MC, Temes E, Martin-Puig S, Cuevas Y, Olmos G und Landazuri MO (2003): The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. J Biol Chem <u>278</u>, 48690-48695
- DesMarais V, Ghosh M, Eddy R und Condeelis J (2005): Cofilin takes the lead. J Cell Sci <u>118</u>, 19-26
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M und Dvorak AM (1995): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol <u>146</u>, 1029-1039
- Ebert BL, Firth JD und Ratcliffe PJ (1995): Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct *Cis*-acting sequences. J Biol Chem 270, 29083-29089
- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM und Gill GN (1999): Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. Nat Cell Biol <u>1</u>, 253-259
- Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H, Jacob S, Herrmann M und Siren AL (2004): Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. Metab Brain Dis <u>19</u>, 195-206
- Elvidge GP, Glenny L, Appelhoff RJ, Ratcliffe PJ, Ragoussis J und Gleadle JM (2006): Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutaratedependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and other pathways. J Biol Chem <u>281</u>, 15215-15226
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y und Fujii-Kuriyama Y (1997): A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. Proc Natl Acad Sci U S A <u>94</u>, 4273-4278
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A et al. (2001): C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. Cell <u>107</u>, 43-54
- Eskildsen S, Justesen J, Schierup MH und Hartmann R (2003): Characterization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family. Nucleic Acids Res <u>31</u>, 3166-3173
- Fandrey J und Bunn HF (1993): In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. Blood <u>81</u>, 617-623

- Ferrara N und Davis-Smyth T (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev <u>18</u>, 4-25
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD und Semenza GL (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxiainducible factor 1. Mol Cell Biol <u>16</u>, 4604-4613
- Friedrich CA (2001): Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. Hum Mol Genet <u>10</u>, 763-767
- Gerald D, Berra E, Frapart YM, Chan DA, Giaccia AJ, Mansuy D, Pouyssegur J, Yaniv M und Mechta-Grigoriou F (2004): JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. Cell <u>118</u>, 781-794
- Gesierich S, Paret C, Hildebrand D, Weitz J, Zgraggen K, Schmitz-Winnenthal FH, Horejsi V, Yoshie O, Herlyn D, Ashman LK et al. (2005): Colocalization of the tetraspanins, CO-029 and CD151, with integrins in human pancreatic adenocarcinoma: impact on cell motility. Clin Cancer Res <u>11</u>, 2840-2852
- Gesierich S, Berezovskiy I, Ryschich E und Zoller M (2006): Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. Cancer Res <u>66</u>, 7083-7094
- Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Okhotin D, Voloshin Y, Choyke PL, Butman JA, Jedlickova K, Prchal JT und Polyakova LA (2004): Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. Blood <u>103</u>, 3924-3932
- Granot-Attas S und Elson A (2004): Protein tyrosine phosphatase epsilon activates Yes and Fyn in Neu-induced mammary tumor cells. Exp Cell Res <u>294</u>, 236-243
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L und Bradfield CA (1998): Molecular characterization and chromosomal localization of a third α-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3α. Gene Expr <u>7</u>, 205-213
- Gurniak CB, Perlas E und Witke W (2005): The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. Dev Biol 278, 231-241
- Hai T und Hartman MG (2001): The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. Gene <u>273</u>, 1-11
- Hartmann R, Norby PL, Martensen PM, Jorgensen P, James MC, Jacobsen C, Moestrup SK, Clemens MJ und Justesen J (1998a): Activation of 2'-5' oligoadenylate synthetase by single-stranded and double-stranded RNA aptamers. J Biol Chem <u>273</u>, 3236-3246
- Hartmann R, Olsen HS, Widder S, Jorgensen R und Justesen J (1998b): p59OASL, a 2'-5' oligoadenylate synthetase like protein: a novel human gene related to the 2'-5' oligoadenylate synthetase family. Nucleic Acids Res <u>26</u>, 4121-4128
- Henry LR, Lee HO, Lee JS, Klein-Szanto A, Watts P, Ross EA, Chen WT und Cheng JD (2007): Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. Clin Cancer Res <u>13</u>, 1736-1741
- Hirsilä M, Koivunen P, Gunzler V, Kivirikko KI und Myllyharju J (2003): Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxiainducible factor. J Biol Chem <u>278</u>, 30772-30780
- Hirsilä M, Koivunen P, Xu L, Seeley T, Kivirikko KI und Myllyharju J (2005): Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. FASEB J <u>19</u>, 1308-1310
- Hotulainen P und Lappalainen P (2006): Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. J Cell Biol <u>173</u>, 383-394

- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B und Simon MC (2003): Differential roles of hypoxia-inducible factor  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) and HIF- $2\alpha$  in hypoxic gene regulation. Mol Cell Biol 23, 9361-9374
- Huang J, Zhao Q, Mooney SM und Lee FS (2002): Sequence determinants in hypoxiainducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. J Biol Chem <u>277</u>, 39792-39800
- Huang TY, DerMardirossian C und Bokoch GM (2006): Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. Curr Opin Cell Biol <u>18</u>, 26-31
- Huang Y, Wang S und Kelly T (2004): Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer. Cancer Res <u>64</u>, 2712-2716
- Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A und Vingron M (2002): Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. Bioinformatics <u>18 Suppl 1</u>, S96-104
- Imai T, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Ogi K, Sogabe Y, Kashima L, Maruyama R, Nojima M, Mita H et al. (2008): Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. Cancer Sci <u>99</u>, 958-966
- Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, Merino M, Trepel J, Zbar B, Toro J et al. (2005): HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. Cancer Cell <u>8</u>, 143-153
- Issa JP (2007): DNA methylation as a therapeutic target in cancer. Clin Cancer Res <u>13</u>, 1634-1637
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS und Kaelin Jr WG (2001): HIFα targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. Science <u>292</u>, 464-468
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY et al. (1998): Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1α. Genes & Development <u>12</u>, 149-162
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ et al. (2001): Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. Science <u>292</u>, 468-472
- Kanetaka K, Sakamoto M, Yamamoto Y, Yamasaki S, Lanza F, Kanematsu T und Hirohashi S (2001): Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma. J Hepatol <u>35</u>, 637-642
- Kanetaka K, Sakamoto M, Yamamoto Y, Takamura M, Kanematsu T und Hirohashi S (2003): Possible involvement of tetraspanin CO-029 in hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer cells. J Gastroenterol Hepatol <u>18</u>, 1309-1314
- Kappel S, Matthess Y, Zimmer B, Kaufmann M und Strebhardt K (2006): Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes. Nucleic Acids Res <u>34</u>, 4527-4536
- Kelly T (2005): Fibroblast activation protein-alpha and dipeptidyl peptidase IV (CD26): cell-surface proteases that activate cell signaling and are potential targets for cancer therapy. Drug Resist Updat <u>8</u>, 51-58
- Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, Bohlen P und Kerbel RS (2000): Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. J Clin Invest 105, R15-24
- Knowles HJ, Raval RR, Harris AL und Ratcliffe PJ (2003): Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. Cancer Res <u>63</u>, 1764-1768

- Koditz J, Nesper J, Wottawa M, Stiehl DP, Camenisch G, Franke C, Myllyharju J, Wenger RH und Katschinski DM (2007): Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor. Blood <u>110</u>, 3610-3617
- Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI und Myllyharju J (2004): Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. J Biol Chem <u>279</u>, 9899-9904
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ und Whitelaw ML (2002): Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. Science 295, 858-861
- Lazo PA (2007): Functional implications of tetraspanin proteins in cancer biology. Cancer Sci <u>98</u>, 1666-1677
- Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD et al. (2000): Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. Cancer Res <u>60</u>, 5565-5570
- Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW und Thistlethwaite PA (2000): Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. N Engl J Med <u>342</u>, 626-633
- Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R und Taubman MB (2002): Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. Biochem Cell Biol <u>80</u>, 421-426
- Macdougall IC und Eckardt KU (2006): Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential new treatments for anaemia. Lancet <u>368</u>, 947-953
- Maecker HT, Todd SC und Levy S (1997): The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. FASEB J <u>11</u>, 428-442
- Maliekal P, Sokolova T, Vertommen D, Veiga-da-Cunha M und Van Schaftingen E (2007): Molecular identification of mammalian phosphopentomutase and glucose-1,6-bisphosphate synthase, two members of the alpha-D-phosphohexomutase family. J Biol Chem <u>282</u>, 31844-31851
- Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C und Gassmann M (1996): Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. Eur J Neurosci <u>8</u>, 666-676
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW und Ratcliffe PJ (2001): Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. EMBO J <u>20</u>, 5197-5206
- Masson N, Appelhoff RJ, Tuckerman JR, Tian YM, Demol H, Puype M, Vandekerckhove J, Ratcliffe PJ und Pugh CW (2004): The HIF prolyl hydroxylase PHD3 is a potential substrate of the TRiC chaperonin. FEBS Lett <u>570</u>, 166-170
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER und Ratcliffe PJ (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 399, 271-275
- Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W et al. (2003a): Intracellular localisation of human HIF-1α hydroxylases: implications for oxygen sensing. J Cell Sci <u>116</u>, 1319-1326
- Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J und Brune B (2003b): Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. Mol Biol Cell <u>14</u>, 3470-3481
- Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M, Skals M, Habelhah H, Bhoumik A, Kadoya T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Frappell PB et al. (2004): Siah2 regulates

stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. Cell <u>117</u>, 941-952

- Nishida E, Maekawa S und Sakai H (1984): Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. Biochemistry 23, 5307-5313
- Nytko KJ, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH und Stiehl DP (2007): Regulated function of the prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) oxygen sensor proteins. Antioxid Redox Signal <u>9</u>, 1329-1338
- Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S und Mizuno K (2000): Rhoassociated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. J Biol Chem <u>275</u>, 3577-3582
- Pescador N, Cuevas Y, Naranjo S, Alcaide M, Villar D, Landazuri MO und Del Peso L (2005): Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. Biochem J <u>12</u>, 12
- Prabhakar NR und Kline DD (2002): Ventilatory changes during intermittent hypoxia: importance of pattern and duration. High Alt Med Biol <u>3</u>, 195-204
- Produktbeschreibung des Eingangsvektors pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO; Invitrogen, Karlsruhe o. J. (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pentr\_h1to\_map.pdf)
- Rebouillat D, Marie I und Hovanessian AG (1998): Molecular cloning and characterization of two related and interferon-induced 56-kDa and 30-kDa proteins highly similar to 2'-5' oligoadenylate synthetase. Eur J Biochem <u>257</u>, 319-330
- Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM und Kasprzak KS (2004): Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. J Biol Chem <u>279</u>, 40337-40344
- Schofield CJ und Ratcliffe PJ (2005): Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. Biochem Biophys Res Commun <u>30</u>, 30
- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB und Gottlieb E (2005): Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. Cancer Cell <u>7</u>, 77-85
- Semenza GL (2002): Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. Intern Med <u>41</u>, 79-83
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O und Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem <u>68</u>, 850-858
- Smyth GK: Limma: linear models for microarray data; in: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R an Bioconductor; hrsg. v. R. Gentleman, V. Carey et al.; Springer, New York 2005, 397-420
- Stiehl DP, Wirthner R, Koditz J, Spielmann P, Camenisch G und Wenger RH (2006): Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. J Biol Chem <u>281</u>, 23482-23491
- Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan LJ, Nagy A und Fong GH (2006): Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. Mol Cell Biol <u>26</u>, 8336-8346
- Tan CC, Eckardt KU, Firth JD und Ratcliffe PJ (1992): Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. Am J Physiol <u>263</u>, F474-481
- Tarrant JM, Robb L, van Spriel AB und Wright MD (2003): Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface. Trends Immunol <u>24</u>, 610-617
- Tetsuka T, Uranishi H, Imai H, Ono T, Sonta S, Takahashi N, Asamitsu K und Okamoto T (2000): Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by association

with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats. J Biol Chem <u>275</u>, 4383-4390

- Trent C, Tsuing N und Horvitz HR (1983): Egg-laying defective mutants of the nematode Caenorhabditis elegans. Genetics <u>104</u>, 619-647
- Tuckerman JR, Zhao Y, Hewitson KS, Tian YM, Pugh CW, Ratcliffe PJ und Mole DR (2004): Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases. FEBS Lett 576, 145-150
- Vos MD, Ellis CA, Elam C, Ulku AS, Taylor BJ und Clark GJ (2003): RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor. J Biol Chem <u>278</u>, 28045-28051
- Wang GL und Semenza GL (1993): Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. J Biol Chem <u>268</u>, 21513-21518
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA und Semenza GL (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. Proc Natl Acad Sci U S A <u>92</u>, 5510-5514
- Wang XM, Yu DM, McCaughan GW und Gorrell MD (2005): Fibroblast activation protein increases apoptosis, cell adhesion, and migration by the LX-2 human stellate cell line. Hepatology <u>42</u>, 935-945
- Warnecke C, Griethe W, Weidemann A, Jurgensen JS, Willam C, Bachmann S, Ivashchenko Y, Wagner I, Frei U, Wiesener M et al. (2003): Activation of the hypoxia-inducible factor-pathway and stimulation of angiogenesis by application of prolyl hydroxylase inhibitors. FASEB J <u>17</u>, 1186-1188
- Wenger RH (2002): Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. FASEB J <u>16</u>, 1151-1162
- Wenger RH, Stiehl DP und Camenisch G (2005): Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. Sci STKE 2005, re12
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW et al. (1998): Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: Characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1α. Blood <u>92</u>, 2260-2268
- Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH et al. (2000): Hypoxia-inducible expression of tumorassociated carbonic anhydrases. Cancer Res <u>60</u>, 7075-7083
- Yu X, Li P, Roeder RG und Wang Z (2001): Inhibition of androgen receptor-mediated transcription by amino-terminal enhancer of split. Mol Cell Biol <u>21</u>, 4614-4625