Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie

(Prof. Dr. med. D. M. Katschinski)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss des Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne 2-Enzyms auf die Migration der myeloischen Zelllinien RAW und J774

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Maximilian Johannes Steinhardt

aus Augsburg

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
Betreuerin:	Prof. Dr. Dörthe Katschinski
Ko-Referent:	Prof. Dr. Ralph Kehlenbach
Promotor-Vertreterin:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 26.04.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss des Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne-2-Enzyms auf die Migration der myeloischen Zelllinien RAW und J774" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Würzburg, den 06.04.2017 ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis IV

Tabellenverzeichnis VI

Abkürzungsverzeichnis VII

1 Einleitung 1

1.1 Hypoxie 1

1.2 Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF) 1

1.2.1 Struktur von HIF 1

1.2.2 Regulation von HIF 3

1.2.3 HIF-Effekte 5

1.3 Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne-Enzyme 6

1.3.1 Struktur und katalytische Aktivität 7

1.3.2 Physiologische Rolle und Modulation von PHDs 8

1.4 Bedeutung der Makrophagen in der Immunantwort 8

1.4.1 Schlüsselstellung der Makrophagen im Immunsystem 9

1.4.2 Makrophagen und Tumoren 12

1.4.3 Hypoxie und Makrophagen 13

1.5 Zelladhäsion und -migration 14

1.6 Ziele 15

2 Material und Methoden 17

2.1 Material 17

2.1.1 Chemikalien 17

2.1.2 Puffer 18

2.1.3 Restriktionsendonukleasen 19

2.1.4 Antikörper 20

2.1.5 Kulturmedien 20

2.1.6 Zellstämme 21
2.1.7 Bakterienstämme 21
2.1.8 Plasmide 21
2.1.9 Oligonukleotidprimer 22
2.1.10 Kits 23
2.1.11 Software 23
2.1.12 Geräte und Utensilien 24
2.1.13 Elektrophoresegele 26
2.2 Methoden 27
2.2.1 RNA-Isolation 27
2.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration 27
2.2.3 Reverse Transkription 28
2.2.4 Real-Time PCR 28
2.2.5 Zellkultur 29
2.2.6 Mechanismen der genetischen Manipulation 29
2.2.7 Transformation von E. coli-Stämmen 30
2.2.8 Plasmididentifikation 31
2.2.9 Vektorproduktion 32
2.2.10 Transduktion 34
2.2.11 SDS-Gelelektrophorese 35
2.2.12 Western Blotting 36
2.2.13 Detektion 37
2.2.14 Migrationsassay 37
2.2.15 *Scratch Assay* 40
2.2.16 Bestimmung der Verdopplungszeiten 41
2.2.17 Mikroskopische Aufnahmen zur Morphologiebestimmung 43
2.2.18 Statistische Auswertung 43
3 Ergebnisse 44

3.1 Einfluss von Hypoxie auf die Makrophagenzelllinien RAW und J774 44

3.1.1 Stabilisierung von HIF-1α durch Hypoxie in RAW- und J774-Zellen 44

3.1.2 Induktion von HIF-1 Zielgenen in RAW- und J774-Zellen durch Hypoxie 45

3.2 Einfluss eines PHD2-*knockdowns* auf HIF-1α und dessen Zielgene 46

3.2.1 Nachweis verringerter PHD2-Expression in transduzierten Zelllinien 47

3.2.2 HIF-1α-Stabilisierung durch eine verringerte PHD2-Expression 47

3.2.3 Induktion typischer HIF-1-Zielgene durch eine verringerte PHD2-Expression 49

3.3 Einfluss der PHD2-Reduktion auf Mobilität und Proliferation 52

3.3.1 Kein Effekt auf Migration der Zelllinien durch PHD2-*knockdown* 52

3.3.2 Einfluss des *knockdowns* im *Scratch Assay* 54

3.3.3 Auswirkungen eines *knockdowns* auf die Zellproliferation 56

3.4 Reversibilität der Effekte durch Rekonstitution von PHD2 56

3.4.1 Nachweis der PHD2-Rekonstitution bei RAW-Zellen 57

3.4.2 Folgen der PHD2 Rekonstitution 59

3.4.3 Zellmorphologie von RAW-Zellen in Abhängigkeit von der PHD2-Expression 60

3.4.4 Einfluss der Rekonstitution auf *Scratch Assay* 62

3.4.5 Auswirkungen der Rekonstitution auf Proliferation 65

4 Diskussion 66

5 Zusammenfassung 74

6 Literaturverzeichnis 75

Lebenslauf 88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Proteindomänen von HIF-1α 2
Abbildung 2: PHDs werden durch HIF-1α reguliert 4
Abbildung 3: PHDs katalysieren die Hydroxylierung eines spezifischen Prolylrestes 7
Abbildung 4: Auslöser und Auswirkungen der Makrophagenpolarisierung 11
Abbildung 5: Die Wirkungen von Entzündung und Hypoxie sind molekular gekoppelt 14
Abbildung 6: Kontrollrestriktionen der eingesetzten Plasmide 31
Abbildung 7: Karten der eingeführten Plasmide zur Vektorproduktion 33
Abbildung 8: Prinzip des verwendeten Migrationsassays 38
Abbildung 9: Methode zur Zellzählung im Migrationsassay 40
Abbildung 10: Auswertungsverfahren des *Scratch Assays* 41
Abbildung 11: Messbereich der Wachstumskurve 43
Abbildung 12: Hypoxie führt in RAW- und J774-Zellen zu einer HIF-1α-Stabilisierung 44
Abbildung 13: Hypoxie führt in den RAW- und J774- Zellen zu einer verstärkten RNA-Expression HIF-1-abhängiger Gene 45
Abbildung 14: Nachweis verringerter PHD2-Expression in den *knockdown* Zelllinien 47
Abbildung 15: Ein PHD2-*knockdown* führt in RAW-Zellen zu einer HIF-1α Stabilisierung 48
Abbildung 16: PHD2-*knockdown* ist bei J774-Zellen auch auf Proteinebene beobachtbar und führt zu HIF-1α-Stabilisierung 49
Abbildung 17: Eine verringerte PHD2-Expression führt zu einer Induktion typischer HIF-1-Zielgene bei RAW-Zellen 50
Abbildung 18: Eine verringerte PHD2-Expression führt zu einer Induktion typischer HIF-1-Zielgene bei J774-Zellen 51
Abbildung 19: Ein PHD2-*knockdown* zeigt keinen Effekt auf die Migration von Makrophagen 53
Abbildung 20: Eine Verringerte PHD2-Expression in RAW Zellen führt zu einer verringerten Wiederbesiedelung im *Scratch Assay* 54
Abbildung 21: Eine verringerte PHD2-Expression in J774-Zellen zeigt keine Änderung der Wiederbesiedelung im *Scratch Assay* 55
Abbildung 22: Das Maß der PHD2-Expression hat keine Auswirkungen auf Proliferation der Makrophagenzelllinien 56
Abbildung 23: Eine Rekonstitution mit humaner PHD2 führt zu einer Normalisierung der HIF-1α-Proteinspiegel 57

Abbildung 24: Die Rekonstitution von PHD2 in mP2 KD RAW-Zellen führt unter Normoxie und Hypoxie zu einem normalisierten Expressionsmuster von HIF-Zielgenen 59
Abbildung 25: Der *knockdown* von PHD2 in RAW-Zellen hat Einfluss auf deren Zellmorphologie 61
Abbildung 26: Eine PHD2-Rekonstitution führt zum Rückgang des Effekts bei der Wiederbesiedelung im *Scratch Assay* bei RAW-Zellen 64
Abbildung 27: Eine Rekonstitution der PHD2-Expression hat keine Auswirkungen auf die Proliferation der RAW-Makrophagenzelllinien 65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste kommerziell erhältlicher Chemikalien und Lösungen 17
Tabelle 2: Pufferzusammensetzungen 18
Tabelle 3: Eingesetzte Enzyme 19
Tabelle 4: Eingesetzte Antikörper 20
Tabelle 5: Eingesetzte Kulturmedien 20
Tabelle 6: Kultivierte Zellstämme 21
Tabelle 7: Eingesetzte Plamide 21
Tabelle 8: Eingesetzte Primer 22
Tabelle 9: Eingesetzte Kits 23
Tabelle 10: Benutzte Software 23
Tabelle 11: Benutzte Mess- und Arbeitsgeräte 24
Tabelle 12: Benutzte Verbrauchsgegenstände 25
Tabelle 13: Verwendete Elektrophoresegele 26
Tabelle 14: Einstellungen eines RT-PCR - Laufs 29
Tabelle 15: Zur Transfektion eingesetzte Plasmidmengen 32
Tabelle 16: Mittels Transduktion erstellte Zellstämme 34
Tabelle 17: Zusammensetzung der SDS - Gele 36

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
ARNT	*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein*
bHLH	*basic helix-loop-helix*
BMDM	*bone marrow derived macrophage*
CBP	CREP – bindendes Protein
CCL	Chemokin C-C Motiv-Ligand
cDNA	*complementary DNA*
CODD	C-terminale *oxygen-dependent degradation domain*
CREP	*cAMP response element-binding protein*
CSF	*colony-stimulating factor*
Ct	*cycle threshold*
CTAD	C-terminale transaktivierende Domäne
CXCL	Chemokin C-X-C Motiv-Ligand
DAMP	*damage associated molecular pattern*
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DNA	*deoxyribonucleic acid*
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere (lat. *et alii*)
FCS	*fetal calf serum*
FIH	*factor inhibiting HIF*
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLUT-1	Glukose-Transporter 1
GTP	Guanosintriphosphat
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	*hypoxia responsive element*
IFN- γ	Interferon-γ
iNOS	induzierbare NO-Synthase
K_m	Michaelis-Menten Konstante
LB	*lysogeny broth*
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
mRNA	*messenger RNA*
miRNA	*micro RNA*
muLV	murines Leukämievirus
NF-$\varkappa$B	*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*
NLS	*nuclear localization signal*
NODD	N-terminale *oxygen-dependent degradation domain*
NTAD	N-terminale Transaktivierungsdomäne
ODDD	*oxygen-dependent degradation domain*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	*patogen associated molecular pattern*
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration (lat.: *pondus hydrogenii*)

PHD	Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne-Proteine
pVHL	von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein
qRT-PCR	*quantitative real time polymerase chain reaction*
RNA	*ribonucleic acid*
rpm	*revolutions per minute*
SD	*standard deviation*
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
shRNA	*small hairpin RNA*
siRNA	*short interfering RNA*
TAM	Tumorassoziierte Makrophage
TGF-β	Tumor growth factor - β
Th1/2	T-Helferzellsubtyp 1/2
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Hypoxie

Sauerstoff (O_2) wird bei Wirbeltieren über die Lunge aufgenommen (äußere Atmung) und zur effektiven Gewinnung des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) im Rahmen der Zellatmung (innere Atmung) verbraucht. Der Transport erfolgt über den Blutkreislauf, und der Sauerstoff erreicht das Gewebe letztendlich über Diffusion aus den Kapillaren. Die Sauerstoffversorgung sollte den Verbrauch nicht unterschreiten. Ist dies der Fall, so spricht man von Hypoxie. Bei einer kompletten Abwesenheit von O_2 spricht man von Anoxie.

Sauerstoffmangel geht bei unangepassten Zellen stets mit Funktionseinschränkungen einher. Daher hat der Körper verschiedene Adaptionsmechanismen entwickelt, wie zum Beispiel die Erhöhung des Atemzeitvolumens oder - langfristig - des Hämoglobingehalts im Blut sowie die Angio(neo)genese. Auch auf zellulärer Ebene findet Anpassung statt. So steht Zellen die anaerobe Glykolyse offen, aber auch die Proteinexpression ändert sich. Hauptmediator der mittel- und langfristigen transkriptionellen Reaktionen ist der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF), ein Transkriptionsfaktor.

1.2 Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)

Das als Transkriptionsfaktor fungierende Protein HIF ist Hauptmediator der Zell- und Systemhomöostase unter Hypoxie. Es beeinflusst dabei unter anderem Zellmetabolismus, Apoptose und Angiogenese. Auch unter einer Vielzahl von pathologischen Bedingungen wie zum Beispiel Entzündung, Ischämien und Tumorwachstum spielt HIF eine wichtige Rolle (Semenza 2014).

Seit seiner Entdeckung im Jahre 1995 ist er daher von großem Interesse für die Medizin. Seine Beteiligung in zahlreichen pathologischen Prozessen konnte schlüssig nachgewiesen werden (Semenza 2000). Daher hat HIF Eingang in therapeutische und prognostische Überlegungen der praktischen Medizin gefunden (Zhang Z *et al.* 2011; Unruh *et al.* 2003). Die Expression von funktionellem HIF ist evolutionär hochkonserviert und lebenswichtig für Wirbeltiere (Iyer *et al.* 1998b). Mäuse mit spezifischem HIF-1α *knockout* sterben noch innerhalb der embryonalen Entwicklung (Iyer *et al.* 1998a).

1.2.1 Struktur von HIF

Als Transkriptionsfaktor aktives HIF ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus einer HIFα- und einer HIFβ-Untereinheit (Iyer *et al.* 1998a). Beide werden den basischen Helix-Loop-Helix

(bHLH)-Transkriptionsfaktoren zugeordnet (Wang *et al.* 1995). Die α-Untereinheiten HIF-1α, HIF-2α und HIF-3α bilden im Nucleus zusammen mit einer β-Untereinheit (HIF-β) die funktionellen Transkriptionsfaktoren HIF-1, HIF-2 und HIF-3. Diese auch auch als *aryl hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT) bezeichnete, 91 – 94 kDa schwere β-Untereinheit (Wang und Semenza 1996) ist stets im Zellkern lokalisiert (Chilov *et al.* 1999), die α-Untereinheit findet sich zunächst vor allem im Zytoplasma. Die Dimerisierung im Nucleus ist zwingende Voraussetzung für die Funktion als Transkriptionsfaktor (Wang *et al.* 1995). Während HIF-2α ein gewebespezifisches Expressionsmuster aufweist (Tian *et al.* 1997; Ema *et al.* 1997; Flamme *et al.* 1997; Hogenesch *et al.* 1997), wird HIF-1α ubiquitär exprimiert (Wang *et al.* 1995).

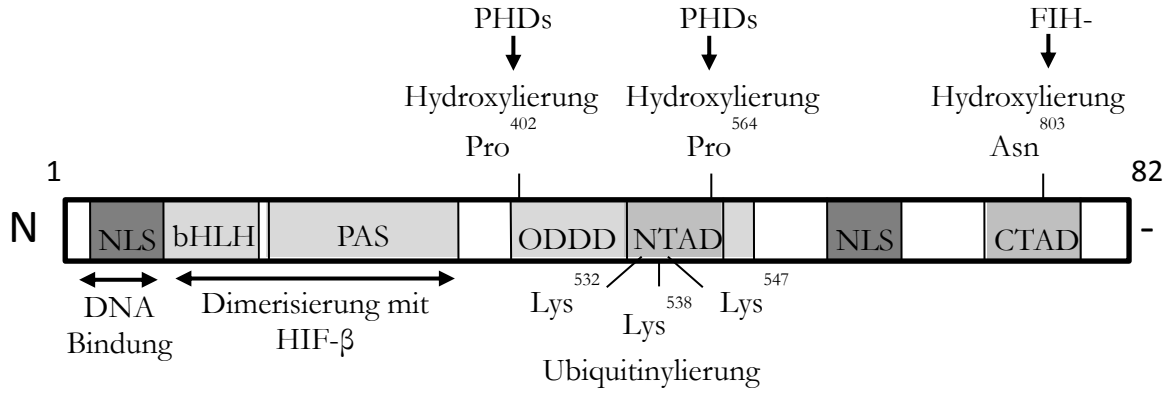


Abbildung 1: Darstellung der Proteindomänen von HIF-1α
Dargestellt ist der schematische Aufbau des Proteins HIF-1α inklusive seiner funktionellen Domänen. Hervorgehoben sind Abschnitte, in denen posttranslatorische Modifikationen spezifischer Aminosäurereste möglich sind (modifiziert nach Kaluz *et al.* 2008, Seite 17).

Die im Rahmen dieser Arbeit bedeutendste HIF-1α-Untereinheit ist in Abbildung 1 gezeigt. Die PAS-Untereinheit, welche die Dimerisierung mit HIF-β vermittelt und verantwortlich für die Bindung an das sogenannte *hypoxia responsive element* (HRE) ist bezeichnet eine *consensus*-Basenfolge 5`-G/ACGTG`-3` mit variablen Nachbarbasenfolgen in regulatorischen Bereichen HIF-abhängiger Gene (Wenger 2005). Zur spezifischen, sauerstoffabhängigen Regulation, welche durch Prolyl-4-Hydroxylase Domäne Enzyme (PHDs) geschieht, besitzt das Protein die sogenannten *oxygen-dependent degradation domains* (ODDD), welche N- und C-terminal existieren (NODD/CODD). Durch Hydroxylierung der beiden Aminosäuren Pro^{402} (Prolin an der Position 402 vom N-Terminus aus) und Pro^{564} wird HIF-1α für den proteasomalen Abbau markiert (Huang *et al.* 1998; Jaakkola *et al.* 2001). Des Weiteren finden sich in dem Protein eine N- und eine C- terminale Transaktivierungsdomäne (NTAD/CTAD). NTAD wird von den Aminosäuren 531-575 gebildet, CTAD von der Sequenz der Aminosäuren 786-826. Sie können Kofaktoren und Inhibitoren binden (Jiang *et al.* 1997; Pugh *et al.* 1997). Das am besten untersuchte Beispiel ist FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*), welcher den Asparaginrest an der Position 803 hydroxyliert und durch Beeinträchtigung der Induktion zur Verminderung der

transkriptionellen Aktivität von HIF-1 beiträgt (Lando *et al.* 2002). Es ist aber im Gegensatz zu anderen Mechanismen nicht pVHL (von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein)-abhängig (Sang *et al.* 2002). Der Translokationsprozess zur Passage der α-Untereinheiten in den Nucleus wird durch zwei NLSs (*nuclear localisation signals*) vermittelt (Kallio *et al.* 1998; Ikuta *et al.* 1998).

1.2.2 Regulation von HIF

Die Regulation von HIF findet auf mehreren Ebenen statt. So wurde nachgewiesen, dass dies zum einen durch Beeinflussung der Boten-Ribonukleinsäuren (*messenger ribonucleic acid*, mRNA)-Stabilität geschieht, welche durch miRNAs (*micro* RNAs) vermindert werden kann. Dies geschieht zum Beispiel unter lang anhaltender Hypoxie (Bruning *et al.* 2011) oder nach maligner Entartung (Taguchi *et al.* 2008). Mit Tristetrapolin wurde auch ein HIF-1α-mRNA-destabilisierendes Protein beschrieben (Chamboredon *et al.* 2011). Zur Regulation von HIF-1α auf posttranslationaler Ebene wurden in den letzten Jahren viele Daten erhoben und es zeichnet sich eine hohe Komplexität der Regulationsvorgänge ab. Daher seien nur einige von besonderer Bedeutung genannt. Hierfür muss zunächst zwischen sauerstoffabhängiger und nicht-sauerstoffabhängiger Regulation unterschieden werden.

Während die HIFβ Untereinheit konstitutiv exprimiert wird und sich fast ausschließlich im Zellkern befindet (Chilov *et al.* 1999), werden die HIFα-Untereinheiten in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck in der Zelle entweder stabilisiert oder proteasomal degradiert, wodurch ihnen eine regulatorische Funktion zukommt. So hat HIF-1α in Zellen mit ausreichender Sauerstoffversorgung eine Halbwertszeit von nur etwa 5 Minuten (Huang *et al.* 1998), während unter Sauerstoffmangel keine Hydroxylierung stattfinden kann. Dadurch entgeht HIFα der Erkennung durch den pVHL-Ubiquitinligasekomplex und reichert sich so in der Zelle an. Da die physiologischen Sauerstoffpartialdrücke in den verschiedenen Geweben stark variieren, existieren starke Unterschiede der HIFα-Konzentration in den Geweben (Carreau *et al.* 2011). Andere Studien finden jedoch auch innerhalb derselben Gewebe deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Partialdrücken - je nach Verbrauch, Durchblutung und Kapillardichte. Die Angaben variieren hier von etwa 0,5 bis 34 mmHg (Sitkovsky und Lukashev 2005). Bei ausreichender Sauerstoffsättigung des zirkulierenden Blutes ist HIF-1α nur in Geweben mit ohnehin geringer Durchblutung, z.B. den kortikalen Anteilen der Niere, oder hoher Sauerstoffausschöpfung, z.B. Herz und Gehirn, vorhanden (Stoka *et al.* 2001). Es ist jedoch auch bekannt, dass Organe mit physiologischer Hypoxie Mechanismen besitzen, welche eine chronische HIF-Aktivierung unterdrücken. Ein gutes Beispiel findet sich im Hoden, in dem der Sauerstoffpartialdruck stets gering ist. Dort konnte die HIF-Isoform hHIF-1αTe nachgewiesen werden, welche mit HIF-1β

einen inaktiven Komplex bildet und so die Aktivität von HIF-1α unterdrückt (Depping *et al.* 2004).

Im Rahmen der sauerstoffabhängigen Regulation sind die PHDs, welche die Hydroxylierung der Prolylreste in der ODDD katalysieren, von herausragender Bedeutung. Dadurch wird es der E3 Ubiquitinligase pVHL, dem Produkt des von Hippel-Lindau-Gens, möglich, an HIF-1α zu binden. Durch die folgende Polyubiquitinylierung wird HIF-1α für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert (Huang *et al.* 1998; Kallio *et al.* 1999; Ohh *et al.* 2000; Maxwell *et al.* 1999, siehe Abbildung 2).

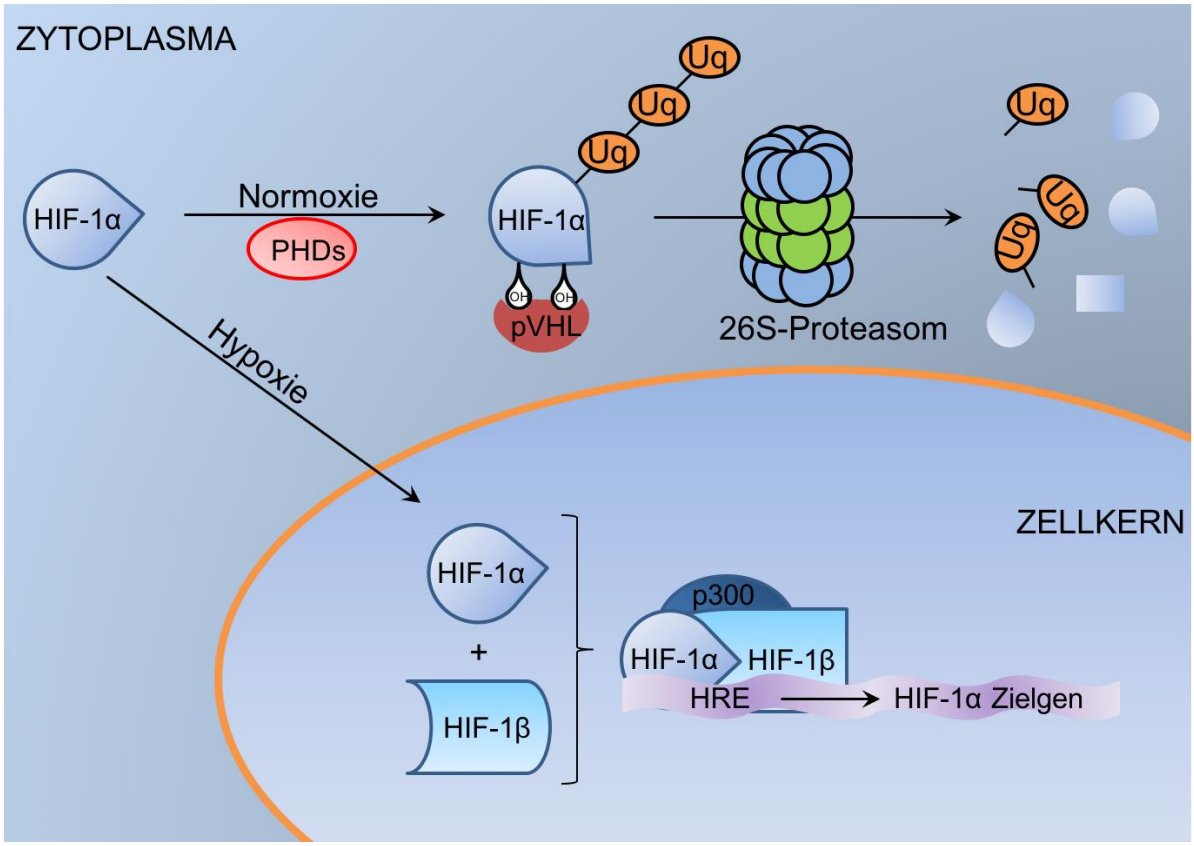


Abbildung 2: PHDs werden durch HIF-1α reguliert

Die PHDs hydroxylieren bei ausreichenden Sauerstoffkonzentrationen HIF-1α und ermöglichen die Bindung der E3 Ligase (pVHL). Durch die nachfolgende Ubiquitinylierung erfolgt der Abbau durch das 26S-Proteasom. Unter Hypoxie erfolgt die Stabilisierung von HIF-1α mit nachfolgender Translokation in den Zellkern, wo HIF-1α mit HIF-1β und p300 einen aktiven Transkriptionskomplex bildet und an ein *hypoxia responsive element* (HRE) bindet. Dadurch wird die Transkription seiner Zielgene ermöglicht.

Die zentrale Rolle von pVHL in der HIF-1α-Regulation manifestiert sich bei der retinozerebellären Angiomatose, bei der es bei pVHL-Mangel mit verstärkter HIF-1-Aktivität zu inadäquater Zielgenexpression kommt. Ein gehäuftes Vorkommen von Tumoren mit hoher Gefäßdichte ist die Folge (Kaelin 2007).

Da HIF-1α vor allem im Zellplasma vorliegt, muss, bevor eine transkriptionelle Aktivität erfolgen kann, ein Import in den Zellkern stattfinden. Dieser aktive, energieverbrauchende Vorgang benötigt ein NLS (Kallio *et al.* 1998). Unverzichtbar für die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 ist zudem das Protein p300, welches auch als *cAMP response element-binding protein* (CREP)– bindendes Protein (CBP) bekannt ist und ubiquitär exprimiert wird. Durch Acetylierung der Histone der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) sorgt es für eine HIF-1-angepasste Konformation der Chromatinstruktur, wodurch die Bindung des Transkriptionsfaktors bedeutend erleichtert wird. So wird die Transkriptionsaktivität gesteigert (Arany *et al.* 1996).

Es ist eine Vielzahl weiterer Faktoren bekannt, welche unabhängig von der Sauerstoffkonzentration Einfluss auf Translation, Synthese, Abbau oder Transaktivierung von HIF-1α nehmen. Dies trifft vor allem für eine Reihe an Wachstumsfaktoren und Onkogene zu. So ist zum Beispiel bekannt, dass Insulin über das Enzym Phosphoinositol-3-Kinase die HIF-1α-Translation induziert (Treins *et al.* 2002). Auch andere Kinasen, wie zum Beispiel die *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), beeinflussen die Transaktivierungsaktivität von HIF-1α durch Phosphorylierung (Lee *et al.* 2002). Auch die M2-Isoform der Pyruvatkinase steigert durch Phosphorylierung die Transkriptionsaktivität von HIF-1 und HIF-2. Da sie selbst Zielgen von HIF-1α ist, liegt hier ein positiver Feedbackmechanismus vor (Luo *et al.* 2011).

Der für Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose wichtige Transkriptionsfaktor NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*), welcher unter anderem bei Entzündungsvorgängen erhöhte Aktivität zeigt, nimmt ebenfalls direkten Einfluss auf die HIF-Transkription (van Uden *et al.* 2011), zudem induziert er die bereits erwähnte MAPK. Des Weiteren fungiert der unter Zellproliferation exprimierte *Hypoxia associated factor* (HAF) als HIF-1α-spezifische Sauerstoff- und pVHL-unabhängige E3 Ligase und führt als solcher zur Degradation von HIF-1α (Koh und Powis 2009). Auch der Acetylierungszustand des Proteins spielt eine Rolle in der Regulation seiner Aktivität, so zum Beispiel durch einen Apoptosemodulator (Xenaki *et al.* 2008). Während die sauerstoffabhängige Regulation von HIF-1 einen generellen Mechanismus darstellt, sind die weiteren sauerstoffunabhängigen Regulationsmechanismen von HIF-1 zum Teil zelltyp- und zellkontextabhängig.

1.2.3 HIF-Effekte

Die HIF-Isoformen 1 und 2 zeigen überlappende, aber nicht identische Zielmuster mit teils entgegengesetztem Wirkungsprofil (Raval *et al.* 2005; Keith *et al.* 2012; Hu *et al.* 2003). Bisher wurden über einhundert direkte und über eintausend indirekte HIF-Zielgene identifiziert (Schödel *et al.* 2011). Die primären Effekte werden über die verstärkte Expression der

entsprechenden Zielgene erreicht. Über die Mechanismen zur Herunterregulation von bestimmten Genen unter Hypoxie ist wenig bekannt, am wahrscheinlichsten sind es aber sekundäre Effekte (Ortiz-Barahona *et al.* 2010). Seine Wirkung entfaltet der Transkriptionsfaktor zum Beispiel über den Mediator *vascular endothelial growth factor* (VEGF, Forsythe *et al.* 1996). Dieser stellt die langfristige Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Angiogenese sicher. Essentiell ist aber auch die induzierbare NO-Synthetase (iNOS, Melillo *et al.* 1995), durch welche kurzfristig gestiegenem Bedarf im Gewebe durch lokale Vasodilatation entgegengewirkt wird. Auch wird durch erhöhte Transkription von Tyrosinhydroxylase die Atmungsfrequenz gesteigert und durch Steigerung der Erythropoietinspiegel die Anzahl roter Blutkörperchen, welche zum Sauerstofftransport benötigt werden, erhöht (Wang und Semenza 1993). Zahlreiche weitere direkte Zielgene wurden beschrieben, zum Beispiel das Transferrin- und das Coeruloplasmingen, welche im Zusammenspiel die Eisenaufnahme und -verwertung steigern und so z.B. eine erhöhte Erythrozytenproduktion in Zeiten erhöhten Bedarfs möglich machen (Tacchini *et al.* 1999; Lok und Ponka 1999; Mukhopadhyay *et al.* 2000). Die Bildung des Glucosetransporters 1 (GLUT-1) sowie an der Glykolyse beteiligter Enzyme wird induziert, um im Rahmen der weniger effektiven anaeroben Glykolyse die Produktion von ATP adäquat zu halten (Ebert *et al.* 1995; Semenza *et al.* 1996). Viele der HIF-Wirkungen sind zelltypspezifisch (Kelly *et al.* 2003). Die Funktion von HIF beschränkt sich jedoch nicht allein auf die Transkription, sondern auch auf Protein-Proteininteraktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren (Dang *et al.* 2011) sowie die Expression von miRNAs (Camps *et al.* 2008) und Beeinflussung epigenetischer Vorgänge (Arany *et al.* 1996).

HIF-3α zeigt aufgrund seiner Vielzahl an Splicevarianten verschiedene Effekte. So wird weitestgehend von einer inhibitorischen Funktion ausgegangen (Hara *et al.* 2001), es gibt jedoch auch Hinweise auf eine spezifische, transkriptorische Funktion (Zhang *et al.* 2014).

1.3 Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne-Enzyme

Die Proteinstruktur und -funktion von Prolyl-4-Hydroxylasen ist hochkonserviert. Lange vor der Funktion der HIF-spezifischen Prolyl-4-Hydroxylasen war die Rolle der Dioxigenasereaktion zum Beispiel in der posttranslationalen Modifikation der Kollagentripelhelix bekannt (Gorres und Raines 2010).

Unter normoxischen Bedingungen findet durch HIF-spezifische PHDs eine ständige Hydroxylierung an Pro^{402} und Pro^{564} von HIF-1α statt (Epstein *et al.* 2001). Bisher sind drei Isoformen (PHD1, PHD2, PHD3) bekannt. Sie wurden als mögliche prognostische und therapeutische Marker und Ziele der praktischen Medizin identifiziert (Jaakkola und Rantanen

2013; Jokilehto *et al.* 2010; Andersen *et al.* 2011; Peurala *et al.* 2012; Kaelin 2010; Takayanagi und Eguchi 2011).

1.3.1 Struktur und katalytische Aktivität

Die HIF-spezifischen Prolylhydroxylasen weisen ein unterschiedliches molekulares Gewicht auf. Die Angaben variieren dabei für PHD1 (40 bzw. 43 kDa), PHD2 (46 kDa) und PHD3 (17 bzw. 24 kDa, Ivan *et al.* 2002). Bei PHD1 liegt dies im Translationsbeginn an verschiedenen Startcodonen innerhalb des Gens begründet (Tian *et al.* 2006), bei PHD3 ist der Unterschied auf alternatives Splicing zurückzuführen (Cervera *et al.* 2006). Auch die Verteilung innerhalb der Zelle ist ein wichtiges Unterscheidungskriterium. So findet man PHD1 vor allem im Zellkern, während PHD2 vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist und PHD3 in gleicher Verteilung auftritt (Metzen *et al.* 2003).

Sie alle katalysieren mit der Hydroxylierung von Prolinresten die gleiche, nicht reversible Reaktion. Das Sauerstoffmolekül der an das Prolin der Aminosäuresequenz Leu-Xaa-Xaa-Leu-Ala-Pro angefügten –OH Gruppe stammt aus O_2. Ihre Funktion als Sauerstoffsensor spiegelt sich in ihren Michaelis-Menten-Kontanten (K_m)-Werten wider, welche abhängig von Assay und Quelle sowie Substratlänge, als auch der jeweiligen CODD/NODD der verschiedenen HIF-Isoformen, zwischen 230 und 250 µM O_2 liegen. Damit sind sie weit über der physiologischen Sauerstoffkonzentration des Zytoplasmas angesiedelt (Ehrismann *et al.* 2007; Hirsila *et al.* 2003), welche etwa 100 kPa im arteriellen Blut, jedoch nur 15 – 30 kPa in wenig stoffwechselaktiven Geweben beträgt (Ward 2008). Die Aktivität der PHDs wird daher in entscheidendem Maße vom vorliegenden Sauerstoffpartialdruck bestimmt. PHDs zählen zu der Familie der Fe (II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Zudem benötigen sie Ascorbat für ihre Prolylhydroxylaseaktivität (Schofield und Ratcliffe 2004).

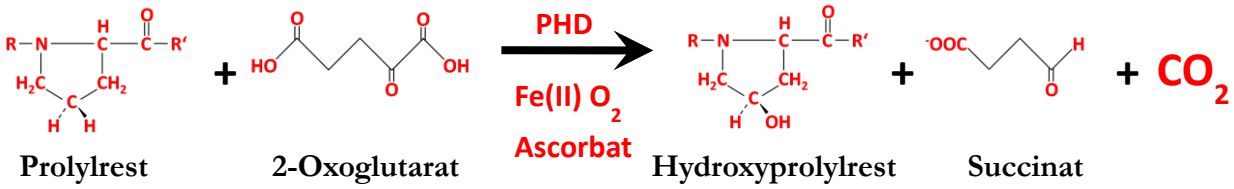


Abbildung 3: PHDs katalysieren die Hydroxylierung eines spezifischen Prolylrestes

Die PHDs katalysieren die Hydroxylierungsreaktion von Prolinresten. Für diese Reaktion werden 2-Oxoglutarat, Sauerstoff (O_2), Ascorbat und zweiwertiges Eisen (Fe II) benötigt. Produkte der Reaktion sind Hydroxyprolin, Succinat und Kohlenstoffdioxid (CO_2)

1.3.2 Physiologische Rolle und Modulation von PHDs

PHDs nehmen eine kritische Rolle in der embryologischen Entwicklung ein. Murine Experimente zeigten, dass eine fehlende PHD1- oder 3-Expression zu lebensfähigen Organismen führt (Takeda *et al.* 2006). Mäuse mit induziertem PHD2-Mangel weisen eine erhöhte intrauterine Sterblichkeit und Wachstumsverzögerung, vermutlich aufgrund einer plazentaren Fehlentwicklung, sowie Herzfehler auf (Ozolins *et al.* 2009).

Die Regulation der PHDs hat sich in den letzten Jahren als zunehmend komplexer herausgestellt. Seit langem ist bekannt, dass die HIF-spezifischen PHDs 2 und 3 im Rahmen eines negativen Rückkopplungseffektes selbst HIF-Zielgene darstellen (Metzen *et al.* 2005; Berra *et al.* 2001). Unter Hypoxie kommt es daher zu einer verstärkten Expression und damit zur schnelleren Degradation von HIF-α bei Reoxygenierung (Berra *et al.* 2003; del Peso *et al.* 2003).

Es hat sich gezeigt, dass die PHDs in den Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden und verschieden starke Affinitäten zu den HIF-α-Isoformen besitzen. Die hohe Spezifität für die HIF-1α-NODD spricht nach heutigem Kenntnisstand für PHD2 als wichtigste HIF-1α-spezifische Prolyl-4-Hydroxylase (Appelhoff *et al.* 2004). Neuerdings mehren sich die Hinweise, dass PHD3 nicht-redundant für die Hydroxylierung von HIF-2α zuständig sein könnte (Bishop 2008).

PHDs spielen hierbei als wichtigste Regulatoren von HIF-α, aber auch in HIF-unabhängiger Weise eine bedeutende Rolle in der Tumorprogression und werden je nach Tumor als proliferationsfördernd oder antiproliferativ beschrieben (Jokilehto und Jaakkola 2010). Zudem ist der Zusammenhang zwischen Malignität und PHD2 nicht linear. Es wurde gezeigt, dass leichte Aktivitätsverminderungen zu einem maligneren Phänotyp führen als starke (Lee *et al.* 2008). In diesem Zusammenhang sind Hinweise auf ganz HIF- unabhängige Effekte von PHDs interessant. So wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass die Erhöhung von PHD 1, 2 oder 3 ein unabhängig schlechter prognostischer Marker - also unabhängig von HIF - in der Tumorprogression ist (Andersen *et al.* 2011). PHD2 nimmt aber auch direkt über Suppression der Zyklin D1-Expression HIF-unabhängig durch Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase an der Regulation der Zellproliferation teil (Su Y *et al.* 2012).

1.4 Bedeutung der Makrophagen in der Immunantwort

Makrophagen sind dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Sie werden durch ihre gewebsspezifischen Differenzierungen unterschieden. Ihre Vorläuferzellen, die Monozyten, welche in den primären lymphatischen Organen entstehen und im Blut zirkulieren, machen etwa 3% der Leukozyten des peripheren Bluts aus. Ihr Vorkommen in fast allen Geweben sowie ihre

hohe funktionelle Plastizität haben dazu geführt, dass sie in der Immun- und Tumorforschung vermehrt Aufmerksamkeit erhalten.

1.4.1 Schlüsselstellung der Makrophagen im Immunsystem

Der Mensch ist in seiner Umwelt von Mikroorganismen umgeben, lebt aber auch in Symbiose mit ihnen. Man schätzt, dass die Zahl an Bakterien im menschlichen Körper die der eigenen Zellen um das Zehnfache übersteigt. Die Zahl verteilt sich vor allem auf die Haut sowie den Genital- und Gastrointestinaltrakt (Qin *et al.* 2010). Eine funktionierende Abwehr ist essentiell für die Begrenzung der physiologischen Besiedelung. Ohne sie können auch nicht-obligat pathogene Keime zur Sepsis mit Todesfolge führen.

Es kann zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem unterschieden werden. Das angeborene Immunsystem ist von Geburt an funktionsfähig, passt sich jedoch nicht an und erkennt somit nur eine begrenzte Anzahl an Erregerstrukturen. Änderungen treten nur über Generationen durch natürliche Selektion auf (Travis 2009). Das adaptive Immunsystem dagegen wird ein Leben lang an das Erregerspektrum angepasst. Da diese Veränderungen aber nicht in die Keimbahn eingehen, können sie nicht vererbt werden. Für die Ausübung seiner Funktionen benötigt das adaptive Immunsystem ein funktionierendes angeborenes Immunsystem. Makrophagen sind über Zytokine und als Teil der Antigene präsentierenden Zellpopulation in der Lage, die adaptive Immunantwort einzuleiten. Dies geschieht über die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren ins Gewebe. Makrophagen stellen somit eines der wichtigsten Bindeglieder zwischen den beiden Systemen dar.

Die Aufgaben des angeborenen Immunsystems umfassen die Erkennung und erste Abwehr gegen eindringende Mikroorganismen, die Einleitung einer Entzündungsreaktion sowie die Aktivierung, Aufrechterhaltung und Terminierung der adaptiven Immunantwort. Es besteht zum einen aus den natürlichen Barrieren des Körpers wie den *tight junctions* in den Epithelien, zum anderen aus den vorrangig in der Leber produzierten Serumproteinen, welche einer Entzündung zugeordnet werden, wie dem C-reaktiven Protein, Komplementfaktoren und Mannose bindende Proteinen. Viele Zellen, welche im Allgemeinen nicht mit der Immunantwort in Verbindung gebracht werden, sezernieren die prokaryotoxischen Defensine und Cathelicidine. Die eigentlichen Effektorzellen der angeborenen Immunantwort sind die phagozytierenden Zellen, zu denen auch die Makrophagen gehören. Sie speichern und sezernieren Lysozyme, die dem Verdau der Mikroorganismen extrazellulär oder in Zellkompartimenten dienen. Des Weiteren exprimieren sie sensitive und spezifische Rezeptoren, die sogenannte *pathogen* und *damage associated molecular patterns* (PAMPs/DAMPs) erkennen. PAMPS sind evolutionär hochkonservierte Membrankomponenten, die bei Viren, Pilzen, Würmern und Bakterien vorkommen. Unter

anderem Polycsaccaride und nichtmethylierte DNA sowie virale, doppelsträngige RNA werden diesen zugeordnet. Sogenannte *pattern recognition receptors* sind zellständig und führen zur transmembranösen Signalweitergabe. Die bekanntesten sind die sogenannten *Toll-like*-Rezeptoren. Die DAMPs dagegen sind eine Übergruppe körpereigener Strukturen, die aktivierend und chemotaktisch auf Zellen der Immunantwort wirken. Sie umfassen unter anderem molekulare Bestandteile von Proteinen, die nur bei Zellzerfall auftreten. Häufig überschneiden sich die PAMP- und DAMP-assoziierten Reaktionen, da traumatisch entstandene Epitheldefekte häufig mit Infektionen einhergehen und umgekehrt Infektionen meist zu Gewebeschäden führen.

Ein gutes Beispiel für die Bedeutung der Makrophagenfunktion ist die Wundheilung. Die ins Defektareal gelangenden Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Nach der Differenzierung sind diese die wichtigste Quelle von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Sie sezernieren Hormone, die zum Fortschritt der Defektheilung nötig sind, so zum Beispiel *insulin-like growth factor*, Thrombospondin-1 und Plasminogenaktivatoren. Diese sind zusammen mit den Matrixmetalloproteinasen wichtig zur Restrukturierung des Gewebes (Rømer *et al.* 1996). Die Makrophagen beseitigen nekrotische Zellen und Zelltrümmer. Zudem werden die Adhäsion und Migration weiterer Leukozyten eingeleitet, auch solcher, die der adaptiven Immunantwort zugeordnet werden (Hübner *et al.* 1996; Chedid *et al.* 1994; Di Pietro 1995; Fritsch *et al.* 1997).

Auch im Laufe einer lokalen Entzündung sind Makrophagen nach den Neutrophilen – von denen je nach Infektsituation 50 bis 100 Milliarden aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden (Summers *et al.* 2010) – die zu Beginn der Reaktion bedeutsamsten, synergistisch arbeitenden Zellen (Silva 2010). Der Ablauf einer Infektantwort ähnelt der Wundheilung: Die dabei sezernierten antimikrobiotischen Proteine, Zytokine und Entzündungsmediatoren stellen potente Abwehrmechanismen dar, können allerdings auch das umliegende Gewebe schädigen. Daher ist eine adäquate Beendigung der selbstunterhaltenden Immunantwort wichtig. Es sind vor allem die Makrophagen, die durch immunsuppressive Botenstoffe, z.B. Interleukin (IL) -10 und *tumor growth factor* β (TGF β), die Immunantwort beenden und proinflammatorische Zelltrümmer nach Abschluss der Entzündung oder Wundheilung phagozytieren (Fox *et al.* 2010). Nach Abschluss der Wund- oder Infektreaktion werden proliferative Signalstoffe wie VEGF und PDGF sezerniert und tragen zu Defektheilung und Gefäßwachstum bei (Barrientos *et al.* 2008).

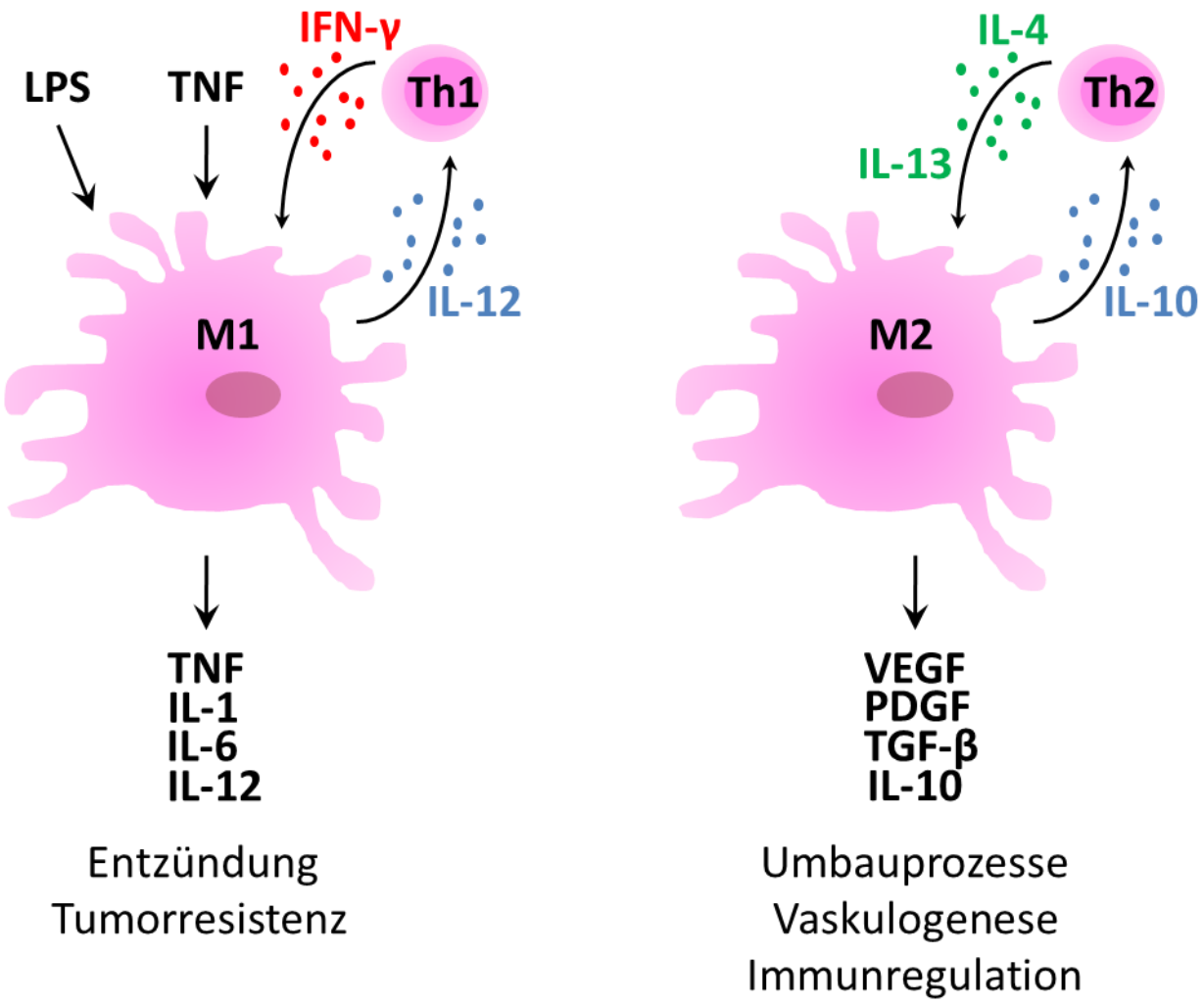


Abbildung 4: Auslöser und Auswirkungen der Makrophagenpolarisierung

Das Schaubild zeigt das vereinfachte Modell der Makrophagenpolarisierung. Die Zellen prägen abhängig von Umwelt und Zusammensetzung der angebotenen Zytokine verschiedene Phänotypen mit unterschiedlicher Funktion und Wirkung aus. Sind Makrophagen LPS, TNF oder IFN-γ ausgesetzt, so bilden sie einen zytotoxischen M1-Phänotyp aus, während die M2-Polarisation immunregulatorische und proliferative Wirkungen besitzt. Der jeweilige Phänotyp wird in einem positiven Rückkopplungsmechanismus vom adaptiven Immunsystem über entsprechende T-Helferzellen unterhalten und verstärkt.

Im Rahmen der Makrophagenfunktion spielt ihre Differenzierung eine wichtige Rolle. Analog zu der T-Helferzellpopulation werden sie grob unterteilt in M1- und M2-polarisierte Makrophagen (Mantovani *et al.* 2004; Martinez *et al.* 2009). Da sie in gesundem Gewebe meist einen gemischten Phänotyp aufweisen (Sica und Mantovani 2012), müssen sowohl die klassische (M1-) als auch die alternative (M2-) Polarisierung als Extreme aufgefasst werden. Stout *et al.* schlugen daher ein Modell vor, in dem Makrophagen eine stufenweise und reversible Differenzierung im Kontinuum zwischen M1 und M2 erfahren (Stout *et al.* 2005). Die M1-Differenzierung umfasst die klassische proinflammatorische und mikrobiozide Makrophagenfunktion, die während oben genannter

Reaktion auftritt. Ausschlaggebend für einen Expressionstyp M1 sind die T-Helferzellsubtyp-1 (Th1) Zytokine wie z.B. Interferon-γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor (TNF) sowie Lipopolysaccharide (LPS). Sie stimulieren die oben geschilderte Immunantwort, welche auch dem Schema der Th1-geleiteten Antwort durch CD4+ Lymphozyten entspricht. Die Differenzierung von Makrophagen zum M2-Phänotyp geschieht in späteren Stadien der Entzündung. Er wird als antiinflammatorisch eingestuft. Auslöser sind vermutlich vor allem TGF-β und IL-10 (Freire-de-Lima *et al.* 2006) sowie die T-Helferzellsubtyp-1 (Th2)-Zytokine IL-4 und 13. In der Folge werden die proinflammatorische Aktivität herunterreguliert und die Funktion auf die Beendigung der Entzündung sowie Reparatur des Defektareals konzentriert.

1.4.2 Makrophagen und Tumoren

Wie oben geschildert ist die physiologische Entzündungsantwort durch Makrophagen induziert, aufrechterhalten und limitiert. Zahlreiche Beispiele belegen jedoch auch die enge Verknüpfung von chronischen, also nicht selbstlimitierten Entzündungen und malignen Erkrankungen. *In vitro* und im Mausmodell konnten Hinweise gesammelt werden, dass chronische Entzündungen sowohl an Initiation, Promotion als auch Progression eines Tumors beteiligt sein könnten (Balkwill *et al.* 2005; Karin und Greten 2005; Karin 2006). Dafür gibt es eine Reihe naheliegender Gründe, so zum Beispiel führt der erhöhte Zellumsatz bei Entzündungen zu einer Reihe von Änderungen an Proteinen, die an Zellzykluskontrolle, Apoptose, oxidativem Stress und DNA Reparatur beteiligt sind. Dies geht mit einer erhöhten Gefahr für maligne Entartung einzelner Zellen einher.

Murine und menschliche Tumoren bestehen zu einem großen Teil auch aus Makrophagen, da die malignen Zellen und das umgebende Stroma eine Vielzahl an Chemostimulantien sezerniert. Dazu gehören u.a. *chemokine* (mit C-C Motiv) *ligand 2* (CCL2), *colony-stimulating factor-1* (CSF1) und *chemokine* (C-X-C Motiv) *ligand 12* (CXCL12). Es wurde gezeigt, dass eine hohe Makrophagendichte in Tumoren mit schlechter Prognose einhergeht (Bingle *et al.* 2002; Heusinkveld und van der Burg 2011), vermutlich unter anderem über eine beobachtete erhöhte intratumorale Angiogenese und Lymphogenese und der damit erhöhten Metastasierungshäufigkeit (Clear *et al.* 2010). Daher liegt der zunächst kontraintuitive Schluss nahe, dass Makrophagen das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren fördern. Mit Ausnahme des Colonkarzinoms (Ong *et al.* 2012) konnte dies für fast alle anderen untersuchten Karzinome gezeigt werden, darunter Brust-, hepatozelluläres, Pankreas-, Prostata-, Zervix- und NSCL Karcinom sowie Melanome (Leek *et al.* 1996; Capece *et al.* 2013; Mielgo und Schmid 2013; Nonomura *et al.* 2011; Utrera-Barillas *et al.* 2010; Zhang BC *et al.* 2011; Chen *et al.* 2011). Wu und Zheng schlugen in einem ausführlichen Review vor, dass Tumoren die Makrophagen mit

zunehmender Nähe zum Tumorkern und den Tumorstammzellen vom M1 zum M2 Phänotyp „umerziehen“, um für sie potenziell schädlichen Makrophageneffekten zu entgehen und günstige Bedingungen für das Tumorwachstum zu schaffen. Da die Tumorzellen auch den Gesetzen der Selektion unterworfen sind, ist eine populationsinterne Entwicklung derartiger Überlebensstrategien schlüssig (Wu und Zheng 2012). In Tumoren liegen Makrophagen daher meist M2-polarisiert vor und es wurde gezeigt, dass sie hohe Level an Arginase und nur wenige reaktive Sauerstoffspezies, NO oder proinflammatorische Zytokine sezernieren. Hinzu kommt, dass die tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) wenig aktiv in der Präsentation von Antigenen sind (Solinas *et al.* 2009; Qian und Pollard 2010). Diverse Zytokine, die die Initiation, Promotion und Progression maligner Erkrankungen fördern, wurden identifiziert. Die meisten dieser Botenstoffe werden von Makrophagen unter Hypoxie sezerniert und führen zum Aufbau und der Erhaltung eines tumorsupportiven Mikromilieus (Lin und Karin 2007).

Daher haben TAMs in den letzten Jahren verstärkt Aufmerksamkeit erhalten. In letzter Zeit wurde auch Augenmerk auf die Verwendung von Makrophagen als Biomarker und Therapieziel gesetzt (Mukhtar *et al.* 2011; Tang *et al.* 2013). Auch die von ihnen abgesonderten Zytokine wurden bereits als Therapieziel ausgemacht (Baay *et al.* 2011).

1.4.3 Hypoxie und Makrophagen

Wie sich zeigt, herrscht in den Geweberegionen, in denen die Makrophagenfunktion sowohl physiologisch als auch pathologisch bedeutsam wird, aufgrund von erhöhten Stoffwechselvorgängen und ungenügender Versorgung meist ein hypoxisches Milieu (Hollander *et al.* 2001). Eine Beteiligung von HIF sowohl in malignen Zellen als auch TAMs ist belegt (Sica *et al.* 2008). Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass sich Makrophagen vor allem in hypoxischen Arealen eines Tumors finden lassen (Murdoch *et al.* 2008).

So ist es nicht verwunderlich, dass sich der HIF Signalweg als zentral für die Ausübung der Makrophagenfunktion gezeigt hat. In myeloisch-spezifischen HIF-1α *knockouts* bei Mäusen konnten eine verminderte Migration, Invasion und Phagozytose der Makrophagen gezeigt werden (Cramer *et al.* 2003). 2005 wurde gezeigt, dass die Präsenz von Gruppe A-Streptokokken ein stärkerer HIF-α-Stabilisator ist als Hypoxie (Peyssonnaux *et al.* 2005), wobei das bei Entzündung verstärkt gebildete NO und NFκB die entscheidenden Bindeglieder darstellen (Sandau *et al* 2001). Dies verdeutlicht, wie auch ohne Hypoxie auf die Wirkungen des HIF-Signalwegs zur Verstärkung und Aufrechterhaltung einer physiologischen Funktion zurückgegriffen wird. HIF-1 ist neben NFκB Hauptaktivator der TAM-Polarisierung zu M1 (Sica *et al.* 2008). Es wird deutlich, dass Hypoxie neben Entzündung eine grundlegende Voraussetzung

für die Makrophagenfunktion ist und die beiden Signalwege einander verstärken (Rius *et al.* 2008; Bosco *et al.* 2008).

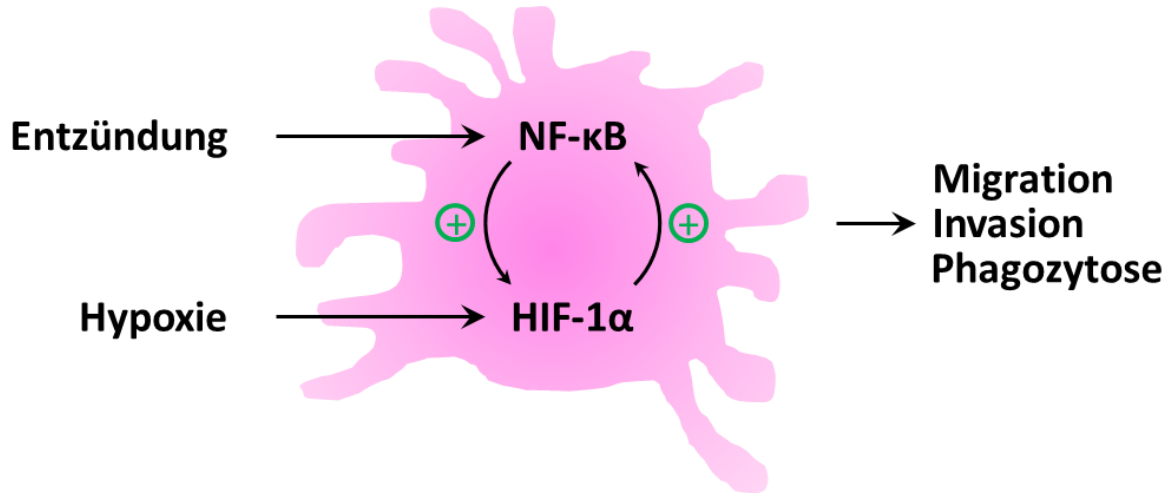


Abbildung 5: Die Wirkungen von Entzündung und Hypoxie sind molekular gekoppelt

Hypoxie spielt für die Makrophagenfunktion eine ebenso wichtige Rolle wie die Entzündung. Die beiden Transkriptionsfaktoren NF-κB und HIF verstärken einander gegenseitig: HIF erhöht die Aktivität von NF-κB, welches wiederum dessen Transkription induziert. Die Genprodukte beider Faktoren sind unabdingbar für die Ausführung der physiologischen Makrophagenfunktion.

Zur Funktion von PHD2 als weiterem wichtigen Regulator des HIF-Signalwegs in Makrophagen gibt es nur ungenügende Daten. Mamlouk *et al.* berichteten kürzlich, dass ein PHD2-*knockout* in myeloischen Zellen und T-Lymphozyten das Tumorwachstum bei Mäusen reduziert (Mamlouk *et al.* 2014), was ein Hinweis auf verstärkte Makrophagenaktivität sein könnte. Es konnte auch gezeigt werden, dass ein myeloidspezifischer PHD2 *knockout* die Entzündungsantwort der Makrophagen unterdrückt und somit die Ausbildung arteriosklerotischer Veränderungen verhindert (Ikeda *et al.* 2013). Die beiden Veröffentlichungen bleiben ohne Angaben zur Kausalität. Zu HIF-unabhängigen Wirkungen von PHD2 bei Makrophagen existieren keine gesicherten Erkenntnisse.

1.5 Zelladhäsion und -migration

Die Fähigkeit einer Zelle sich in das Gewebe einzuordnen ist essentiell für ihre Funktion. Zellen ohne funktionierende Kontakte zur extrazellulären Matrix (ECM) werden apoptotisch (Frisch und Francis 1994). Die Verbindung zwischen Zelle und ECM wird durch Proteine mit Transmembrandomäne, die sogenannten Integrine, hergestellt. Diese fungieren gleichzeitig als Rezeptoren und verhindern durch Beeinflussung antiapoptotischer Zykline den programmierten Zelltod (Hynes 2002). Sie bilden so genannte Fokalkontakte mit der ECM und verankern mit einer intrazellulären Domäne auch das Zytoskelett. Dies findet vor allem über die Proteine

Vinculin und Talin statt. Es wurde nachgewiesen, dass die Ausbildung von Fokalkontakten von zentraler Wichtigkeit für die Zellwanderung ist (Kuo 2013). Aktin und Integrine stabilisieren sich gegenseitig und sind in ihrer Funktion voneinander abhängig (Hong *et al.* 2013). Aktin in seiner Filamentkonformation, kurz F-Aktin, ist zentraler Bestandteil des Zytoskeletts (Small *et al.* 1998) und damit von grundlegender Wichtigkeit für Zellfunktionen die eine Änderung der Zellform erfordern, wie zum Beispiel Migration und Adhäsion (Zhang *et al.* 2008).

Ein direkter Zusammenhang zwischen molekularen Anpassungsvorgängen auf Hypoxie und der Zelladhäsion und –migration konnte gezeigt werden. In hypoxischen Arealen finden eine HIF-1α-vermittelte verstärkte Migration der Tumorzellen (Zhang *et al.* 2013; Yang *et al.* 2014) sowie verminderte interzelluläre und Zell-Matrixadhäsion statt (Esteban *et al.* 2006; Erler *et al.* 2006). Adhäsion, Migration und Zellpolarität sind die wichtigsten Faktoren im Rahmen der Metastasierung (Thiery *et al.* 2009). Im Rahmen der Tumorforschung ist seit Langem bekannt, dass unter hypoxischen Bedingungen *in vivo* die Metastasierungsrate stark zunimmt (Lu und Kang 2010). Es ist bekannt, dass eine HIF-1α Überexpression die Adhäsion glatter Muskelzellen an die ECM vermindert (Corley *et al.* 2005) und ein HIF-1α-*knockdown* zur Ausprägung eines wenig migratorischen Phänotyps führt (Shen *et al.* 2013).

Bezüglich Makrophagen sind die Erkenntnisse hierzu weniger dicht. Cramer *et al.* führten 2003 Experimente mit HIF-1α-depletierten Peritonealmakrophagen durch und beobachteten eine in Bezug auf den Wildtyp stark verringerte Adhäsion auf simulierter ECM. Auch die Invasionskapazität der Makrophagen mit *knockdown* gegen 5% fetales Kälberserum (FCS) war stark eingeschränkt. Sie zeigten zudem eine starke Abnahme gerichteter Migration.

1.6 Ziele

Wie aufgezeigt stehen Makrophagen im Fokus vieler Krankheitsprozesse. Die Rolle von PHD2 im Tumorgeschehen ist noch nicht komplett verstanden. Es sind sowohl antiproliferative als auch prokanzerogene Effekte einer PHD2-Depletion von Tumorzellen nachgewiesen worden. Während es bereits eingehende Studien zu ihnen gibt, existieren trotz existenter PHD2-*knockout*-Zelllinien keine Daten zur Migration von Makrophagen unter PHD2-Beeinflussung. Bisher wurden zu Experimenten native Makrophagen herangezogen, welche für jede Versuchsreihe neu isoliert und behandelt werden müssen. Die Erstellung einer Zelllinie mit nachgewiesenen ähnlichen Eigenschaften könnte die translationale Forschung bezüglich PHD2 daher bedeutend erleichtern.

Aufgrund der dargelegten zentralen Bedeutung von TAMs in Tumorprogression und Entzündung und der Wichtigkeit des HIF Signalwegs in ihrer Funktion treten die PHDs in den Vordergrund. Diese kommen auch als therapeutische Ziele, sowohl pharmakologisch als auch

gentherapeutisch, in Betracht. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher untersucht, welchen Einfluss das HIFα-beeinflussende Enzym PHD2 auf die Migration von Makrophagen besitzt. Da die Migration der Zellen einen elementaren Bestandteil ihrer Funktion darstellt, wurde besonderes Augenmerk hierauf gelegt. Zu diesem Zweck wurde ein PHD2-*knockdown* in den zwei immortalisierten Makrophagenlinien RAW und J774 erstellt. Diese wurden zu Experimenten herangezogen. Zunächst wurde untersucht, ob auch bei den erstellten Makrophagenzelllinien eine Beeinflussung von HIF-1α vorliegt und ob die Änderung der HIF Zielgene den aus bekannten Experimenten abgeleiteten Erwartungen hinsichtlich der Transkription entsprechen oder ob sich Unterschiede ergeben.

Im Weiteren wurden Experimente durchgeführt um zu klären, ob sich der *knockdown* auf das Migrationsverhalten der Zellen auswirkt. Sich durch den *knockdown* ergebende Effekte wurden mit einer Rekonstitution des vermindert exprimierten Gens PHD2 verifiziert. Die Summe der Experimente kann Hinweise auf die *in-vivo*-Bedeutung von PHD2 für die Makrophagenfunktion geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Der überwiegende Teil der für diese Arbeit benutzten Chemikalien stammte von Sigma-Aldrich aus Hamburg. Chemikalien, die von anderen Herstellern stammten, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Liste kommerziell erhältlicher Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Mix, 30% (Rotiporese® Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose Broad Range	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bio-Rad Protein Assay (Bradford Reagent)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blastizidin	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Hamburg
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	PAN™ biotech GmbH, Passau
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
fetales Kälberserum (FCS)	PAN™ biotech GmbH, Passau
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glycerol (= Glycerin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hexadimethrinbromid (Polybrene®)	Invitrogen Live Technologies™ Corp.,Carlsbad/CA, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA
Luminol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Milchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
p-Cumarsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin for cell culture	PAN™ biotech GmbH, Passau
Ponceau S	Sigma Life Science, Hamburg
Proteaseinhibitor complete mini	Roche, Mannheim
Puromycin	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA
Roti-Safe Gel Stain	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) 1mol/l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS (*sodium dodecyl sulfate*)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trixton X100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIzol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau	Fluka, Seelze
Trypsin for cell culture	PAN™ biotech GmbH, Passau
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.1.2 Puffer

Die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit benutzten Puffer sind in Tabelle 2 aufgelistet. Falls nicht anders angegeben, wurden die Bestandteile in zweifach destilliertem Wasser gelöst.

Tabelle 2: Pufferzusammensetzungen

Puffer	Zusammensetzung
DNA-Ladepuffer	89 mM Tris-Borat, 89 mM Borsäure 2 mM EDTA 50 % Glycerol 0,25 % Bromphenolblau
Laemmli-Puffer	190 mM SDS 55 mM EDTA 55 mM NaH_2PO_4 25 % Glycin 20 % β-Mercaptoethanol 0,1 % Bromphenolblau
Laufpuffer SDS-PAGE	125 mM Tris, 1,25 mM Glycin und 0,5 % SDS
Luminollösung	250 mM Luminol in 50 µl DMSO

	80 mM Cumarinsäure in 10 µl DMSO 2 µl H_2O_2 auf 10 ml mit 1 M TRIS HCl pH 6,8
Lysis-Puffer für Proteinextraktion	400 mM NaCl 10 mM TrisHCl/pH 8 1 mM EDTA/pH 8 0,1 % TritonX100
PBS (*phosphate buffered saline*)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10,2 mM Na_2HPO_4*$2H_2O$ 1,8 mM KH_2PO_4
TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer	44,5 mM Tris-Borat, 44,5 mM Borsäure, 20 mM EDTA
Transferpuffer für Western Blot	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

2.1.3 Restriktionsendonukleasen

Die im Rahmen dieser Arbeit benutzen Endonukleasen können in Tabelle 3 eingesehen werden. Alle wurden von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, bezogen

Tabelle 3: Eingesetzte Enzyme

Endonuklease	Erkennungssequenz	Restriktionsstücke
EcoRI	5'GAATTC3'	5'G AATTC3'
	3'CTTAAG5'	3'CTTAA G5'
PvuII	5'CAGCTG3'	5'CAG CTG3'
	3'GTCGAC5'	3'GTC GAC5'

2.1.4 Antikörper

Zur Durchführung des Immunoblottings eingesetzte Antikörper, deren Hersteller, die verwendeten Verdünnungen und die Katalognummern sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Eingesetzte Antikörper

Art	von	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nr.
primäre Antikörper gegen				
humanes PHD2	rabbit	1:1.000	Abcam, Cambridge	ab4561
murines HIF-1α	rabbit	1:500	Novus Biologicals, Littleton	NX 100-479
murines PHD2	rabbit	1:500	Novus Biologicals, Littleton	NB100-2219
ß-Aktin	mouse	1:10.000	Sigma-Aldrich, Hamburg	A5441
sekundäre Antikörper gegen				
F_c mouse, HRP-konjugiert	goat	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas/TX, USA	sc-2005
F_c rabbit, HRP-konjugiert	goat	1:16.000	Sigma -Aldrich, Hamburg	A 0545

2.1.5 Kulturmedien

Die in dieser Arbeit benutzten Medien zur Bakterien- oder Zellkultivierung sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Eingesetzte Kulturmedien

Medium	Hersteller oder Zusammensetzung
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)	PAN™ biotech GmbH, Passau
LB (lysogeny broth)	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt mit ddH_2O auf 1 l, pH 7
OptiMEM™	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA

Zur Herstellung von Bakterienkultur-Agarplatten wurden dem LB-Medium 15 g/l Agarose zugefügt.

2.1.6 Zellstämme

Alle in dieser Arbeit aufgeführten *in vitro* Versuche wurden mit Zellen aus künstlich hergestellten Linien durchgeführt. Alle wurden von der ATTC Cell Biology Collection/Wesel bezogen.

Tabelle 6: Kultivierte Zellstämme

Name	Beschreibung
HEK293FT	Embryonale Nierenzelllinie. Exprimiert T-large Antigen (SV40). Ursprung aus HEK293 Zelllinie. Bezogen von Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA.
J774A.1	Murine ♀ Zelllinie. Monozyten/Makrophagen aus Retikulumzellkarzinom.
MDA-MB-231	Mammakarzinomzelllinie. Adenokarzinom, ♀.
RAW 264.7	Murine ♂ Zelllinie. Muriner Abelson-Leukämievirus – transformierte Makrophagen.

2.1.7 Bakterienstämme

Zur Produktion der Vektoren wurde der Stamm Escherichia coli TOP 10 von Invitrogen Life Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA verwendet.

2.1.8 Plasmide

In Tabelle 7 sind die Plasmide ausgeführt, die zum Einbringen der wirksamen Sequenzen, also zum *sh-silencing* oder zur Produktion und Überexpression rekombinanter Proteine, benutzt wurden. Deren Restriktion zur Verifikation der Plasmide ist in Abbildung 6 gezeigt.

Tabelle 7: Eingesetzte Plasmide

Name	Eigenschaften/Produkt	Bezug von
pLP1	Plasmid mit CMV-Promoter, β-Globin Intron, *pol*- und *gag*-Sequenzen sowie Ampicillinresistenz, Polyadenylierung der viralen RNA, pUCori zur Vervielfältigung in Escherichia coli (E. coli). Siehe auch Abbildung 7.	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA.
pLP2	Plasmid mit RSV Enhancer/Promoter und Sequenz für das Rev Protein, welches über RRE *gag*- und *pol*-induziert und Rev-abhängigen Export viraler DNA ermöglicht sowie Ampicillinresistenz, Polyadenylierung der viralen RNA, pUCori zur Vervielfältigung in E. coli. Siehe auch Abbildung 7.	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA.
pLP/VSVG	Plasmid mit Promoter, β-Globin Intron und Sequenzen für das VSV-Glykoprotein, welches aus Sicherheitsgründen HIV-1 *env* ersetzt sowie Ampicillinresistenz, Polyadenylierung der viralen RNA, pUCori zur Vervielfältigung in E. coli. Siehe auch Abbildung 7.	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA.

pLENTI6/V5	Plasmid mit RSV Enhancer/Promoter zur tat-unabhängigen Produktion der viralen RNA in der Wirtszelle, LTRs, HIV-1 psi Sequenz zur viralen Verpackung, Blastizidin- und Ampicillinresistenz sowie CMV-Promoter mit den Rekombinationsorten attR1/2 welche eines der Gene von Interesse rekombinant erhielten. Siehe auch Abbildung 7.	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA.

Die Gene von Interesse waren im Einzelnen:

GFP	Grün fluoreszierendes Protein. Kann bei 395 nm Wellenlänge exzitiert werden und gibt darunter Licht mit Emissionsmaximum 509 nm ab.
sh hP2	*small hairpin RNA*, gerichtet gegen humanes PHD2
sh mP2	*small hairpin RNA*, gerichtet gegen murines PHD2
hP2	Sequenz, die zur Expression von humanen PHD2 führt.

2.1.9 Oligonukleotidprimer

In Tabelle 8 sind die Primer aufgeführt, die zur Durchführung der qRT-PCR (*quantitative real time-polymerase chain reaction*) verwendet wurden. Sie wurden in einer Konzentration von 20 µM eingesetzt.

Tabelle 8: Eingesetzte Primer

Ziel-mRNA		Basenfolge		Hybridisierung bei
S12	for	*5'* GAAGCTGCCAAGGCCTTAGA	*3'*	58°C
	rev	5' CTTCCACCAACCAACGTCAA	3'	
PHD3	for	*5'* GGCCGCTGTATCACCTGTAT	*3'*	58°C
	rev	5' TACGACTTCTTTCCCGTCTT	3'	
VEGFa	for	*5'* CAGGCTGCTGTAACGATGAA	*3'*	60°C
	rev	5' AACTCTCGCCTCTTTCGTAA	*3'*	
GLUT-1	for	*5'* TCTCTGTCGGCCTCTTTGTT	*3'*	60°C
	rev	5' CATAGGACAACGGGAAGACG	*3'*	
PHD2 Exon3/5	for	*5'* TTGCTGACATTGAACCCAAA	*3'*	60°C
	rev	5' GGATGTCGGAGAGTCAACGG	*3'*	

2.1.10 Kits

Für einige Reaktionen und Isolierungsschritte wurden kommerziell erhältliche Kits benutzt. Sie sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Eingesetzte Kits

Verwendungszweck	Name	Hersteller
cDNA (*complementary* DNA) Synthese	Synthesis Kit #K1612	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Plasmidisolation	CompactPrep Plasmid Purification Midi Kit	QIAGEN, Hilden
qRT-PCR	Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix	Agilent/Stratagene, Santa Clara/CA, USA
Transduktion	ViraPower™ Bsd Lentiviral Support Kit	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA

2.1.11 Software

Die Datenverarbeitung erfolgte am PC. Für verschiedene Anwendungen wurden die in Tabelle 10 aufgezählten Programme benutzt.

Tabelle 10: Benutzte Software

Programm	Anwendung	Hersteller
AxioVision 4.6.3	Aufnahmen im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Oberkochen
CorelDraw	Graphische Bearbeitung aufgenommener Bilder	Corel Corp., Ottawa, Kanada
GraphPad PRISM	Statistische Auswertung und Erstellung von Graphen	GraphPad Software Inc., LaJolla/CA, USA
ImageJ	Auswertung aufgenommener Bilder	*public freeware* http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html
Multi Gauge	Lumineszenzdetektion	Fujifilm Corp., Tokyo, Japan
Vector NTI	Sequenzanalyse von Plasmiden, Planung von Restriktionsschnitten	Invitrogen Live Technologies™ Corp., Carlsbad/CA, USA

2.1.12 Geräte und Utensilien

Die benutzten Geräte werden in Tabelle 11 gelistet, die verwendeten Verbrauchsgegenstände sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 11: Benutzte Mess- und Arbeitsgeräte

Zweck	Modell	Hersteller
50 ml Spritze für Filtersterilisation	BD Plastipak® ™	Becton, Dickinson and Company (BD) Biosciences, Franklin Lakes/NJ, USA
Abzug	Radionuklidabzug	Köttermann, Uetze-Häningsen
Agarosegel-elektrophoresekammer	Elektrophoresekammer Midi Plus	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bakterieninkubator	Minitron CB159	Inforns, Bottmingen & Binder, Tuttlingen
Chemolumineszenzdetektion	LAS 3000 Imager	Fujifilm, Düsseldorf
Cleanbench	HERAsafe KS 12	Heraeus Instruments, Hanau
Eismaschine	AF20	Scotsman Ice Systems, Pogliano Milanese, Italien
Elektroblotter	PerfectBlue Semi-Dry Electroblotter	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektroporation	Electroporator 2510	Eppendorf AG, Hamburg
Heizblock für 1500 µl Cups	Blockthermostat BT200	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden
Inkubator für O_2 Entzugsbedingungen	INVIVO$_2$ 400	3M Biotrace International Inc., Bridgend, England
Kamera für Zellkulturaufnahmen	Camedia C5060	Olympus K. K., Tokyo, Japan
Kühlzentrifugen	Centrifuge 5415R / 5810R Biofuge fresco	Eppendorf, Hamburg Heraeus Instruments, Hanau
Lichtquelle für Fluoreszenzmikroskopie	Colibri LED	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Oberkochen
Magnetrührer	Ikamag RH	IKA-Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen
Mehrfachdispenser für Bradford Assay	Handy Step® S	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Mikroskop und Kamera für Fluoreszenzmikroskopie	Observer	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Oberkochen
Mikroskop Zellkultur mit Polarisationsfilter	Motic AE30	Ted Pella, Inc., Redding/CA, USA
PCR Cycler	primus96	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Photometer	SmartSpec™ Plus	Bio-Rad, München
Pipetten 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl	Biopette™ A	Labnet International Inc., Woodbridge/NJ, USA
qRT-PCR Cycler	Mx3000P	Stratagene, LaJolla/CA, USA
SDS-PAGE-Ständer	PerfectBlue Doppelgelsystem Twin M	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spektrometer	Model 680	Bio-Rad, München

Stromversorgung für Blots und SDS-PAGE	Consort 231	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
UV Lichtquelle und Aufnahme	Gene Flash	Syngene Bio Imaging/Biocon, Bangalore, Indien
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia/NY, USA
Zellinkubator	CB 150l	Binder GmbH, Tuttlingen-Möhringen
Zellkulturpipette	pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Zellzählung	Neubauer improved 0,0025 mm^2	Paul Marienfeld laboratory glassware GmbH, Lauda-Königshofen
Zellzentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für 50 µl Cups	Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 12: Benutzte Verbrauchsgegenstände

Zweck	Modell	Hersteller
Boyden Chamber 24-Wells	Falcon® Multiwell™ 24-Well für Einsatz von Membraneinsätzen	Becton, Dickinson and Company (BD) Biosciences, Franklin Lakes/NJ, USA
Boyden Chamber Inlays	Falcon® Membraneinsätze 7 µm	Becton, Dickinson and Company (BD) Biosciences, Franklin Lakes/NJ, USA
Chemolumineszenzfilm	UltraCruz™ Autoradiography Film Blue 5X7	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas/TX, USA
Eppendorf Cups 2 ml, 1,5 ml, 200 ml, 50 ml	Reagiergefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier Western Blot	Whatman® Chromatography Paper 3 mm	Schleicher & Schuell Whatman® International, Maldstone, UK
Latexhandschuhe	Gentle Skin Sensitive L	Rösner-Mantby Meditrade, Kiefersfelden
Nitrozellulosemembran	Amersham™ Hybond™ ECL	GE Healtcare, Chalfont St Giles/Buckinghamshire, UK
PDVF Filter, Porendurchmesser 0,45 und 0,2 µm	Minisart®	Sartorius AG, Göttingen
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl	Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Wattetupfer	Wattestäbchen lang, kleiner Kopf	Karl Beese GmbH & Co. KG, Barsbüttel
Zellkultur 6-Well	Tissue Culture Plate 6-Well	Sarstedt, Newton, NC, USA
Zellkultur Cryoröhrchen	Cryo Pure Tube 1,8 ml	Sarstedt, Newton, NC, USA
Zellkultur Flaschen	Tissue Culture Flask	Sarstedt, Newton, NC, USA
Zellkultur Röhrchen 50 ml, 15 ml	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur Schalen	10 cm Tissue Culture Disc	Sarstedt, Newton, NC, USA

ZK-Pipettenspitzen 25 ml, 10 ml, 5 ml	Sarstedt Serological Pipette	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.13 Elektrophoresegele

Für die Auftrennung und halbquantitative Darstellung von Plasmiden oder Proteinen wurden Gele benutzt, die Moleküle unter Spannung ihrem Molekulargewicht oder der Größe nach auftrennen. Deren Zusammensetzung ist in

Tabelle 13 gelistet.

Tabelle 13: Verwendete Elektrophoresegele

Gel	Zusammensetzung
Agarosegel, 1 %	1 % Agarose Broad Range 0,003 % Rotisafe® in gewünschtem Volumen dest. H_2O
SDS-Trenngel, 12 %	34,769 % H_2O 40 % von 30 % Acrylamid-Mix 25 % 1,5M TRIS HCl (pH 8,8) 0,1 % von 10 % SDS 0,1 % von 10 % APS 0,004 % TEMED
SDS-Sammelgel, 5,1 %	70,29 % H_2O 17 % Acrylamid-Mix 12,5 % 1,0M TRIS HCl (pH 6,8) 0,1 % von 10% SDS 0,1 % von 10% APS 0,01 % TEMED

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus adhärenten Zellen wurde das Reagenz TRIzol benutzt, welches auf dem Prinzip der Phenolextraktion von Nukleinsäuren beruht. Tags vor der Isolation wurden $3x10^5$ Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät und 24 h der jeweils gewünschten Sauerstoffkonzentration unter Einhaltung der sonstigen Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO_2) ausgesetzt. Um die Zellmembranen zu lysieren, wurden im Anschluss auf die Entfernung des DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ein Waschschritt mit 500µ l PBS 0,5 ml TRIzol zugegeben, die Zellen vom Boden gelöst und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß auf Eis überführt. Nach 5 min wurden 300 µl Chloroform zugegeben und das Gemisch gut invertiert, sodass keine Phasentrennung mehr erkennbar war. Dann wurde in einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*, rpm) und 4 °C eine Schichtung der gelösten Stoffe in den Phasen herbeigeführt. Dadurch sammelten sich die Proteine in der unteren, Chloroform und Phenol enthaltenden Phase, während die relativ schwere DNA in einer Zwischenphase unter der RNA-Lösung in der wässrigen Phase enthalten war. Diese oberste Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol gemischt, wodurch die RNA bei je 10 min Raumtemperatur und -20 °C ausfiel. Das Produkt wurde für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde zum Waschen der isolierten RNA 1 ml 75 %igen Ethanols zugegeben und mit dem Pellet gemischt, worauf wiederum für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde wieder weitgehend abgenommen und die RNA 30 min lang an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser (0,1 %) aufgenommen und durch 10-minütige Erwärmung auf 56 °C darin gelöst. DEPC diente dabei als RNAse-Inhibitor. Die so gewonnene RNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

DNA- oder RNA-Proben, deren Konzentration bestimmt werden sollte, wurden 1:100 in H_2O verdünnt über die Absorption bei 260 nm, die der Konzentration direkt proportional ist, gemessen. Die Reinheit der Lösung konnte über den 260 nm/280 nm – Quotienten bestimmt werden. Eine Lösung ohne jede Verunreinigung weist hier einen Wert von 1,8 auf. Abweichungen davon kennzeichnen eine Kontamination mit anderen Molekülen. So sinkt etwa der Wert, wenn Proteine im Probenvolumen enthalten sind. Akzeptiert wurden nur Proben, die Werte zwischen 1,7 und 1,9 aufwiesen.

2.2.3 Reverse Transkription

Um RNA in cDNA umzuschreiben, wurde die RNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem murinen Leukämievirus (MuLV) eingesetzt. Als Transkriptionssubstrat wurde 1 µg der gewünschten RNA eingesetzt und mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 10,5 µl gebracht. Dann wurde 1 µl einer Oligo $(dT)_{18}$ – Lösung (0,5 µg/µl) zugegeben. Dieser Schritt macht die Reaktion spezifisch für mRNA, da die Primer spezifisch an deren 3‘- Poly-A-Schwanz binden und durch ihr phosphoryliertes Ende die Fortsetzung einer Transkription ermöglichen. Die Hybridisierung wurde für 10 min bei 65 °C kontrolliert in einem PCR Cycler durchgeführt, dann auf Eis gestoppt. Hier wurden nun 4 µl eines MuLV-optimierten, 5-fach konzentrierten Puffers zugegeben. Die Nukleotide wurden durch Zugabe von 2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) von einer Konzentration von je 20 mM bereitgestellt, RNAsen durch 1 µl RNAseinhibitor zu 20 U. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 µl MuLV-RT zu je 20 U gestartet und bei 37 °C, ebenfalls in einem PCR Cycler, durchgeführt. Nach 1 h wurde die Transkriptase durch Temperaturerhöhung auf 70 °C inaktiviert und die Reaktion gestoppt.

2.2.4 Real-Time PCR

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der klassischen PCR. Bei dieser werden spezifische kurze DNA-Stücke (Primer) eingesetzt, die komplementär an das 3‘-Ende eines einsträngigen DNA-Fragments binden und so die gezielte Replikation einer bestimmten Sequenz durch eine DNA-Polymerase ermöglichen. Da bei jedem Schritt eine Verdopplung der entsprechenden Abschnitte stattfindet, erfolgt eine exponentielle Amplifikation. Dabei wird in drei Schritten vorgegangen. Zuerst wird die Probe auf 95 °C erwärmt, wodurch sich die beiden DNA-Stränge der Probe durch Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander trennen. Im nächsten Schritt wird durch Abkühlung auf eine für die jeweiligen Primer spezifische Temperatur (zwischen 55 und 65 °C, abhängig von Länge und Basenzusammensetzung) die Anlagerung der Primer an die Stränge erreicht. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, was dem Temperaturoptimum für die thermoresistente DNA-Polymerase entspricht. Nach erfolgter Replikation der Vorlagen werden diese Schritte wiederholt. Bei der RT-PCR wird ein Fluoreszenzfarbstoff zugegeben, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und so die Messung der in der Probe enthaltenen DNA-Menge durch Bestimmung der Differenz des *cycle threshold* (ΔCt)-Werts erlaubt. Dieser gibt den Zyklusunterschied zwischen Referenzprobe und zu messender Probe an. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür SYBR Green I benutzt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 488 nm und die höchste Emission wurde bei 522 nm nach jedem Replikationsschritt gemessen. Um Abweichungen in der Fluoreszenz abzugleichen, wurde ein nicht-reagierender Farbstoff (ROX) zugegeben. Zum Ausgleich von Abweichungen, die aus

Ungenauigkeiten bei der RNA-Isolation oder der Effizienz der reversen Transkription resultierten, wurde zudem die Emission des stets basal exprimierten mS12-Gens für jede Probe abgeglichen. Für die Reaktion wurde der Brilliant II XYBR Green QPCR Master Mix von Agilent/Stratagene eingesetzt. 1 µl cDNA wurde mit 12,5 µl SYBR Green-Master Mix, 0,4 µl ROX sowie je 0,4 µl *sense*-Primer/*antisense*-Primer sowie 9,6 µl H_2O versetzt, abzentrifugiert und in folgendem Programm gemessen:

Tabelle 14: Einstellungen eines RT-PCR - Laufs

Funktion	Schritt	Temperatur	Zeit	Detektion	Wiederholungen
Vorbereitende Denaturierung	Denaturierung	95 °C	10 min	nein	0
PCR-Replikations-schritte	Denaturierung	95 °C	30 sec	nein	39
	Primerbindung	Primerspezifisch	20 sec	nein	
	Replikation	72 °C	30 sec	ja	
Erstellung einer Schmelzkurve	Denaturierung	95 °C	1 min	nein	0
	Primerbindung	Primerspezifisch	30 sec	nein	
	Denaturierung	95 °C	30 sec	ja	

2.2.5 Zellkultur

Alle Stämme wurden unter sterilen Bedingungen in DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) und fakultativ mit 1 % Penicillin/Streptomycinlösung sowie bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert (Standardbedingungen). Der Umsatz von einer Kulturflasche (75 cm^2) in die andere erfolgte alle 3 bis 4 Tage bei einer maximalen Zelldichte von 80 %.

Dazu wurde das Medium mit Hilfe einer sterilen Glaspipette abgesaugt und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mittels Trypsin + EDTA vom Flaschenboden abgelöst und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, 1:10 in Trypanblau gelöst und in einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Je nach Bedarf wurden nun Zellen für Versuche ausgesät und in einer Zahl zwischen 0,8 – $1{,}5 \times 10^6$ weiterkultiviert. Die Arbeiten erfolgten ausnahmslos unter einer Clean Bench. Stabile Zelllinien, die durch transduzierte Gene Resistenzen erhalten hatten, wurden nach jedem 5. Umsatz mit den entsprechenden Antibiotika behandelt, um die Qualität der Kultur zu erhalten.

2.2.6 Mechanismen der genetischen Manipulation

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche beruhen auf Zellen mit Veränderungen im Proteinsortiment. Um diese zu erreichen, wurde das Erbgut entsprechend modifiziert. Für die Erstellung dieser Veränderungen wurden kurze DNA-Stücke benutzt, die mit Hilfe von künstlich

erstellten Viren in die Zielzellen übertragen und dort an zufälligen Stellen und in hoher Zahl in das Erbgut integriert wurden. Im Wesentlichen wurde dabei auf zwei Mechanismen der Einflussnahme auf Proteinexpression zurückgegriffen: Zum einen wurden Gene eingesetzt, die durch Transkription zum Bau von RNA-Polynukleotiden führten, die in weiten Abschnitten mit physiologischen RNA-Transkripten komplementär waren. Diese so genannte *small hairpin* (sh)RNA bildet dann mit der Ziel-RNA einen Doppelstrang, der mit hoher Zuverlässigkeit abgebaut wird.

Auf diese Weise war es möglich, deren Translation in gewählte Proteine auf RNA-Ebene zu unterbinden und so eine Zielgenausschaltung zu erreichen. Der zweite Mechanismus beruhte ebenfalls auf dem Einbau fremder Gene ins Erbgut der Zielzellen, mit dem Unterschied, dass die darin enthaltene Information zur Bildung funktioneller Proteine führte. Die zur Bildung der gewünschten RNA oder entsprechender Proteine benötigte genetische Information wurde in Form von Plasmiden bereitgestellt.

2.2.7 Transformation von E. coli-Stämmen

Um gewünschte Mengen an Plasmiden zu erhalten, wurden E. coli-Stämme geschaffen, die das gewünschte Plasmid enthielten und dieses bei jeder Teilung mitreplizierten. Dies wurde mithilfe der Elektroporation bewerkstelligt. Dabei werden im Prinzip durch hochfrequente Elektropulse im Bereich von 2500 V bei 25 mF und 200 Ω Löcher in der Zellmembran erzeugt, durch die ein in hoher Konzentration vorliegendes Plasmid gelangen kann. Zur Amplifikation der Plasmide wurden daher zunächst elektrokompetente Escherichia coli TOP 10 – Bakterien in 1 ml LB-Medium mit 0,2 µg des jeweils gewünschten Plasmids gemischt und in einem Elektroporator permeabilisiert. Darauf wurden sie auf eine selektive Agar-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin ausgestrichen. Das enthaltene Antibiotikum sorgte zusammen mit der im Plasmid enthaltenen spezifischen Resistenz dafür, dass nur Bakterien, die die gewünschte Information aufgenommen hatten, anwuchsen. Nach 24-stündiger Inkubation wurde eine möglichst vereinzelte Kolonie aus dem Agar gestochen, um einen Einzelklon zu isolieren. Mit dieser wurden 150 ml LB-Medium angeimpft und 24 h bei 37 °C unter stetigem Schütteln (300 rpm) im Inkubator vermehrt. Die nun darin enthaltenen Bakterien wurden bei 4 °C und 3000 rpm für 20 min zentrifugiert, das überstehende LB-Medium abgenommen und mittels des kommerziell erhältlichen QUIAGEN Compact Prep Purification MIDI – Kits lysiert sowie das enthaltene Plasmid isoliert. Dieses beruht auf dem Prinzip des Anionenaustauschs. Die Plasmide wurden mittels des entsprechenden Protokolls isoliert.

2.2.8 Plasmididentifikation

Um sicherzustellen, dass ein isoliertes Plasmid dem gewünschten entsprach, wurde es mithilfe von Restriktionsendonukleasen und anschließender Agarosegelelektrophorese identifiziert. Dazu wurde 1 µg des entsprechenden Plasmids mit 1 U Enzym und 1,5 µl Puffer und H_2O auf 15 µl Reaktionslösung gebracht und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das ausgewählte Restriktionsenzym schnitt das Plasmid in bestimmte, für das Plasmid typische Fragmente definierter Größe. Alle Proben wurden 10:1 mit DNA-Ladepuffer versetzt. Danach wurden diese neben einer Probe, in der keine Restriktion stattgefunden hatte, in die Taschen eines einprozentigen Agarosegels in TBE-Puffer aufgetragen, welches zuvor aufgekocht und mit magnetischen Stäbchen gut gemischt wurde. Nun wurden die Plasmide bei 90 min bei 300 mA und 100 mV bei einer maximalen Leistung von 50 W ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Außerdem wurde ein 1 kb DNA-Marker aufgetragen, um die Fragmentgrößen bestimmen zu können. Dem Gel wurde vor der Abkühlung RotiSafe® zugegeben, welches ein Benzimidazol enthält. Diese haben die Eigenschaft, sich in die kleine Windung der DNA einzulagern. Das eingelagerte Molekül kann bei einer Wellenlänge von 290-320 nm gut angeregt werden und emittiert dabei eine Wellenlänge von 515 nm.

Die DNA wurde so bei einer Wellenlänge 302 nm sichtbar gemacht und fotografiert. Die ungeschnittenen sowie restringierten Plasmide sind in Abbildung 6 zu sehen.

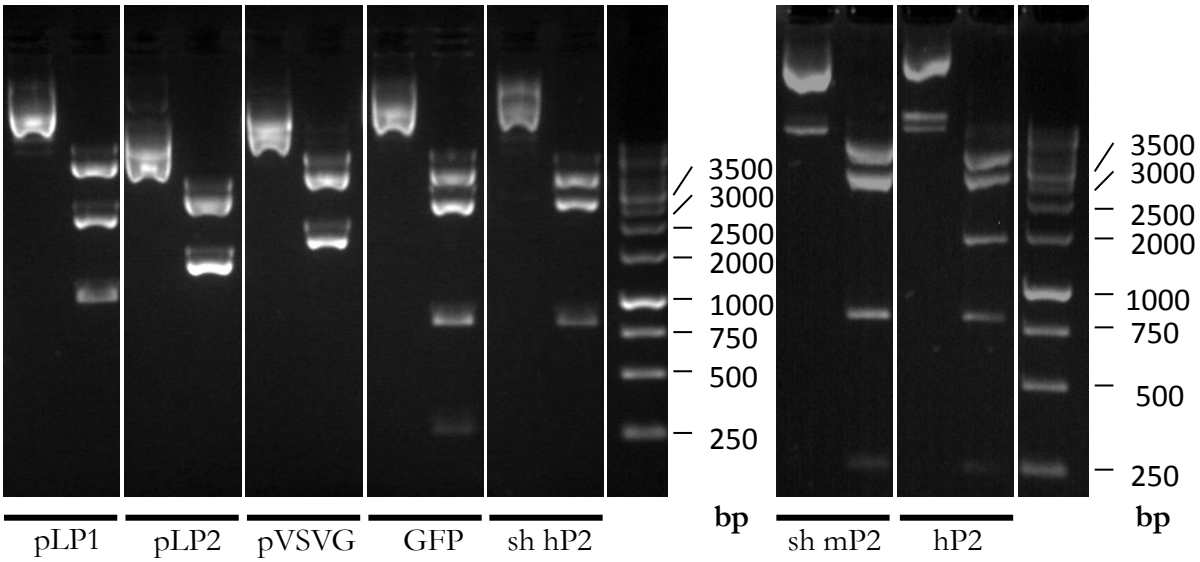


Abbildung 6: Kontrollrestriktionen der eingesetzten Plasmide

Alle benutzten Plasmide wurden je zweifach aufgetragen. Auf der jeweils linken Seite findet sich jedes Plasmid ungeschnitten, rechts davon mittels Restriktionsendonukleasen verdaute Stücke des Plasmids. Über diese Schnittstücke konnte das Plasmid identifiziert werden. Aufgrund der hohen Homologie von sh hP2 und sh mP2 sind die Schnittstücke von beinahe identischer Größe und können nicht voneinander differenziert werden.

2.2.9 Vektorproduktion

Zur Produktion der HIF-1 abgeleiteten Lentiviren wurden HEK293T- Zellen verwendet. Nach der Aussaat von $5x10^6$ Zellen in eine 10 cm Zellkulturschale adhärierten die Zellen innerhalb von 24 h, entsprechend einer Kongruenz von 90 %. Um optimalen Zellstoffwechsel zu gewährleisten, wurde dabei auf den Penicillin-/Streptomycinzusatz in den 10 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS verzichtet. Am Tag der folgenden Transfektion wurde dieses gegen 5 ml Opti-MEM ausgetauscht. Nun konnten separat in einem 2 ml-Reaktionsgefäß je 1,5 ml Opti-MEM gelöst werden:

Tabelle 15: Zur Transfektion eingesetzte Plasmidmengen

Vektor	Menge
Transfervektor (sh-RNA/gewünschtes Plasmid)	3,0 µg
pLP1	4,2 µg
LP2	2,0 µg
SV-G	2,8 µg

Zugleich wurden 36 µl Lipofectamine 2000 mit weiteren 1,5 ml Opti-MEM versetzt und die beiden Mischungen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden beide Lösungen zusammengeführt, sorgfältig gemischt und 20 min auf eine ausreichende Komplexbildung gewartet. Die Komplexe wurden danach vorsichtig tropfenweise auf die zu transfizierenden Kulturen gegeben, leicht geschwenkt und 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel zu DMEM, wiederum ohne Penicillin-/Streptomycinzusatz und 48 h später die Ernte des im Medium enthaltenen Virenstocks.

Die geernteten, das Virus enthaltenden Überstände wurden zunächst 15 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer aus dem Medium zu entfernen. Die Lösung wurde nun durch einen 45 µm-Filter steril filtriert, austariert und 90 min bei 40000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Darauf wurde der Überstand entfernt und das sedimentierte Virus in 1,5 ml DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin gelöst und bei -80 °C gelagert.

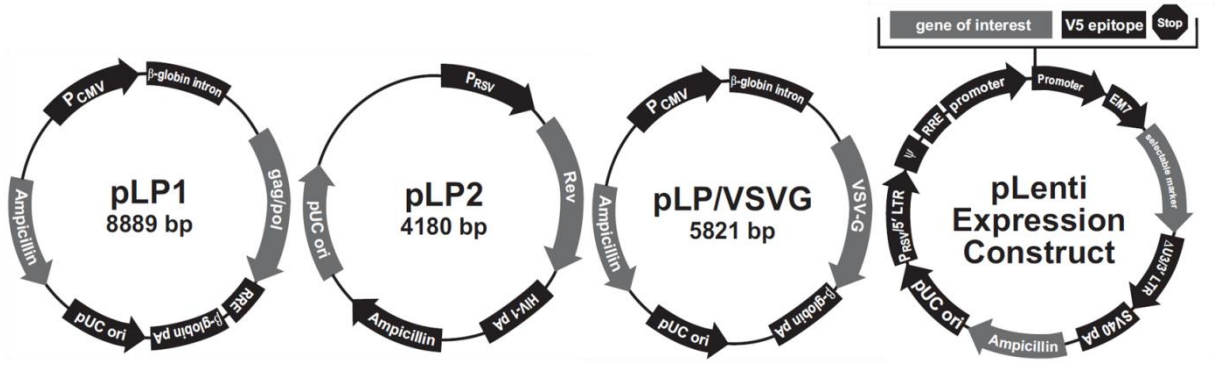


Abbildung 7: Karten der eingeführten Plasmide zur Vektorproduktion

Die eingesetzten Plasmide enthalten aus Gründen der biologischen Sicherheit nur Teile des endgültigen Vektors und sind so entworfen, dass fehlende Homologien der Basenfolgen untereinander eine Rekombination unwahrscheinlich machen. Zudem bewirkt eine Deletion im 3'LTR des pLenti Expressionsvektors die Selbstinaktivierung des Virus nach Transduktion. Die Plasmid-Lipofectamine-Komplexe sind in der Lage, mit der Zellmembran eukaryotischer Zellen zu verschmelzen und so die genetische Information in die Zelle zu bringen. In einer Zelle, in der mindestens ein Exemplar aller aufgeführten Plasmide vorhanden ist, werden unter Einfluss starker Promoter die Virusproteine gebaut, die sich gelegentlich um ein Plasmid mit der gewünschten genetischen Information, welche auf einem weiteren Plasmid bereitgestellt wurde, schließen und so den fertigen Transfervektor in Form eines Lentivirus bilden (nach Invitrogen Handbuch).

2.2.10 Transduktion

Sämtliche Zelllinien für die Versuche dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Transduktion erstellt.

Tabelle 16: Mittels Transduktion erstellte Zellstämme

Zelllinie	eingeführte sh-RNA gegen	eingeführtes Plasmid für
RAW WT	-	-
RAW hP2 KD	α-humanes PHD2	-
RAW mP2 KD	α-murines PHD2	-
RAW mP2 KD + GFP	α-murines PHD2	GFP
RAW mP2 KD + hP2	α-murines PHD2	humanes PHD2
J774 WT	-	-
J774 hP2 KD	α-humanes PHD2	-
J774 mP2 KD	α-murines PHD2	-
J774 mP2 KD + GFP	α-murines PHD2	GFP
J774 mP2 KD + hP2	α-murines PHD2	humanes PHD2

Die Viren in DMEM wurden, 1:10 in 1 ml DMEM verdünnt, auf 50% konfluente Zellkolonien der RAW/J774-Reihen in 10 cm Kulturschalen gegeben. Die Effizienz wurde durch die Zugabe von Polybrene (8 µg/µl), welches die ladungsbedingte Abstoßung der Viren von der Sialinsäure in Zellmembranen verringert, erhöht. Auch die Wildtypkontrollen wurden mit Polybrene behandelt. In den infizierten Zellen wurde die RNA revers transkribiert, aktiv in den Nukleus eingeschleust und stabil in das Wirtsgenom eingebaut, wodurch die Durchführung von Langzeitstudien und lange Kulturzeiten mit den Zelllinien möglich waren.

Zur Auslese der Zellen, in denen die Integration der Informationen in den genetischen Code erfolgt war, waren die Transfervektoren mit Antibiotikaresistenzen versehen worden. So konnten die sh-RNA-transgenen Zellen mit Puromycin ausgelesen werden, die plasmidrekonstituierten Linien mit Blasticidin, jeweils bei einer Konzentration von 4 µg/ml bzw. 20 µg/ml. Um den spezifischen *knockdown* zu erreichen, wurde eine der bereits gesplicten RNA für das PHD2 der murinen Zellen komplementäre shRNA eingesetzt (sh mP2). Um zu kontrollieren, ob die zu beobachtenden Effekte tatsächlich auf der Herunterregulation von murinem PHD2 beruhten, wurde eine Kontrolle eingesetzt, die der eingebrachten sh-mP2-RNA sehr ähnlich ist, ohne allerdings dieselbe Wirkung auf die murine PHD2-mRNA zu entfalten. Dafür wurde shRNA eingesetzt, die komplementär für die humane PHD2-mRNA ist, welche allerdings nicht in den murinen Zellen vorlag (hP2 KD).

Murine und humane mRNA und dementsprechend auch die jeweiligen Proteinprodukte der murinen und humanen PHD Gene sind sich sehr ähnlich (siehe Kapitel 1.3.1), die

Transduktion mit shRNA gegen humanes PHD2 führte allerdings zu keiner sichtbaren Beeinflussung der mRNA- oder Proteinlevel von PHD2 (siehe Abbildung 14). Daher war durch die Wahl dieser ähnlichen shRNA-Kontrolle die hohe Wahrscheinlichkeit gegeben, dass eventuelle, unbeabsichtigte Effekte der shRNA in den transduzierten Zellen, welche daher nicht auf dem *knockdown* von murinem PHD2 beruhen, auch in den Kontrollzelllinien auftreten.

Um die Evidenz, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf der Beeinflussung von PHD2 beruhen, zu erhöhen, wurde die *knockdown*-Zelllinie mit der DNA-Sequenz für humanes PHD2 transduziert, worauf mit einem Rückgang der Veränderungen unter murinem PHD2-Mangel gerechnet wurde. Die Menge an eingebrachtem humanen PHD2 in die Linie (mP2 KD + hP2 oder Rekonstitutionskontrolle) führte zu HIF-1α-Werten, welche wieder dem genetisch unveränderten, nur mit Polybrene behandelten Wildtyp (WT) entsprachen (s. Abbildung 23). Um auszuschließen, dass die Veränderung der Rekonstitution gegenüber dem *knockdown* durch die zweifache Transduktion und die damit verbundenen zufälligen genetischen Schäden am Genom der Zellen bedingt ist, wurde die *knockdown* Zelllinie zudem auch mit GFP transduziert (mP2 KD + GFP) und die Auswirkungen mit der PHD2-rekonstituierten Zelllinie abgeglichen.

2.2.11 SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) macht man sich die Massenunterschiede der Proteine in Lösung, z.B. in einem Zelllysat, zunutze, um sie im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufzutrennen.

Dafür wurden je Zelllinie zwei 10 cm-Schalen mit 10^6 Zellen in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin angeimpft und über Nacht weiter bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Zellzahl wurde mit 10^6 relativ gering gewählt, um Hypoxie in der Kultur und damit eine Verfälschung der Proteomik zu verhindern. Am nächsten Tag wurden das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 300 µl Lysis-Puffer und 33 µl Proteaseinhibitor behandelt, um nach mechanischer Ablösung ein Zelllysat möglichst gleichbleibender Proteinkonzentration zu gewinnen. Dieses wurde mit einer Pipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt und für 20 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer abzusetzen. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde vorsichtig in ein neues Cup pipettiert. Um in den späteren Auswertungen Fehler durch Konzentrationsabweichungen der Proteine zu verhindern, wurden diese gemessen und rechnerisch angeglichen. Zur Messung wurde das so genannte Bradford-Reagenz in einer 1:5-Verdünnung mit destilliertem Wasser verwendet. Es enthält den Farbstoff Coomasie-Brilliantblau G250. Dieser kann als Komplex an die Proteine binden und weist als solcher eine Änderung im Absorptionsspektrum von 465 nm auf 595 nm auf. Diese kann photometrisch gemessen werden

und ist in ihrer Zunahme der Proteinmenge direkt proportional. Um Referenzwerte zu gewinnen wurde Bovines Serumalbumin zu 0,25 – 0,5 – 1 – 1,5 – 2 – 3 – 4 µg eingesetzt, wobei die Konzentration der aufzutragenden Proteine innerhalb dieser Prüfwerte lag. Für jede Probe wurde nun ein 100 µg Protein entsprechendes Volumen je 1:5 mit Laemmli-Puffer + Mercaptoethanol gemischt, sowohl um die Probe zu färben als auch, um Disulfidbrücken aufzutrennen. Zusammen mit dem nun folgenden Schritt, in dem die Proben für 5 min 95 °C ausgesetzt waren, ist sichergestellt, dass ein hoher Prozentsatz der Proteine linear konfiguriert vorliegt. Je eine Probe wurde nun in eine Tasche des vorbereiteten SDS-Gels gegeben und darauf, mit Laufpuffer bedeckt, unter einen Strom von 40 mA bei maximal 300 V gesetzt. Dabei bewirkte das SDS mit seiner Eigenschaft, an die Proteine zu binden und sie ihrer Molekularmasse proportional negativ zu laden, dass diese, zum Pluspol wandernd, aufgetrennt wurden. In der vom Acrylamidpolymeren geformten Matrix konnten große Proteine dem elektrischen Strom weniger schnell folgen als kleine. So erfolgte eine zweidimensionale Auftrennung. Als Größenmarker wurde PreStained Page Ruler benutzt. Das elektrische Feld wurde vor dem Durchlaufen der 10 kDa-Bande ausgeschaltet. Der Einsatz eines Sammelgels vor dem Trenngel sorgte für eine verringerte Streuung von Proteinen gleicher Molekularmasse im Gel. Die Zusammensetzung der Gele kann in

Tabelle 17 eingesehen werden und hing von dem Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins ab.

Tabelle 17: Zusammensetzung der SDS-Gele

Substanz	**Trenngel 10 %**	**Trenngel 12 %**	**Sammelgel 5 %**
H_2O	11,9 ml	9,9 ml	6,8 ml
30 % Acrylamid-Mix	10,0 ml	12,0 ml	1,7 ml
1,5 M Tris pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	-
1,0 M Tris pH 6,8	-	-	1,25 ml
10 % SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,1 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,3 ml	0,3 ml	0,1 ml
TEMED	0,012 ml	0,012 ml	0,01 ml

2.2.12 Western Blotting

Das Western Blotting ist eine Methode, mit der man die per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine an eine Nitrozellulosemembran binden kann, die dann als Ausgangspunkt für Immunodetektionen dient.

Dazu wurde die Membran unter das Gel und auf eine dreifache Schicht Filterpapier gelegt. Diese Anordnung wiederum wurde mit einer weiteren dreifachen Filterpapierschicht bedeckt. Alle Komponenten waren zuvor in Transferpuffer getränkt worden. Diese wurden nun in einen *Semi-Dry Blotter* gelegt und für eine Stunde einem Strom von 2 mA/cm^2 Membran ausgesetzt. Im Anschluss wurde die Bloteffizienz mit einer Ponceau S-Färbung kontrolliert und dreimal für 15 min in PBS inkubiert, um Transferpuffer- und Ponceaureste auszuwaschen.

2.2.13 Detektion

Zur Analyse der Blots wurden spezifische Antikörper eingesetzt, die mit ihrem F_{ab}-Anteil an gewählte Domänen des zu detektierenden Proteins binden. Diese so genannten primären Antiköper werden sodann an ihrer F_c-Region von gegen sie gerichteten und mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten sekundären Antikörpern gebunden. Das gebundene Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol, welche zur Bildung von Photonen führt. Diese können registriert und somit benutzt werden, um die gebundenen Proteine nachzuweisen.

Um unspezifische Bindungen der eingesetzten Antikörper zu verhindern, wurde der Blot im Vorhinein 1 h mit 5 % Milchpulver-PBS inkubiert. Danach wurden 5 ml einer primären Antikörperlösung zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Blot dreimal je 15 min in PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Diese wurden abgegossen und durch 5 ml des sekundären Antikörpergemisches ersetzt, worin der Blot 1 h bei 20 °C inkubiert wurde. Nach weiterem dreimaligen Waschen zu je 15 min konnte die gebundene Peroxidase mit 20 ml einer Luminollösung reagieren. Der Blot wurde mithilfe eines elektronischen Sensors (im Fall von β-Aktin) oder eines lumineszenzempfindlichen Films (im Fall von HIF-1α und mP2/hP2) entwickelt. Zur Kontrolle, ob auch tatsächlich in jeder Probe gleich viel Protein aufgetragen wurde, wurde β-Aktin quantitativ detektiert, welches bei den verwendeten Zellen stets in gleicher Menge exprimiert wird und somit zum Mengenabgleich dienen kann. Die benutzen Antikörper sowie deren eingesetzte Verdünnungen können in Tabelle 4 eingesehen werden.

2.2.14 Migrationsassay

Um die Migrationsrate der Makrophagenzelllinien RAW und J774 bestimmen zu können, wurde die Wanderung gegen Kontrolle durch die Poren einer Boyden Kammer gemessen.

Hierfür wurden 24 h vor Versuchsdurchführung 10^5 MDA-MB-231-Zellen in 500 µl DMEM mit FCS in einer 24-Well-Migrationsplatte angesetzt. Die Kontrollen wurden zeitgleich mit 500 ml DMEM ohne FCS befüllt. 1 h vor Versuchsbeginn wurden die Boyden Kammern in Wells mit DMEM ohne FCS eingesetzt. So wurde verhindert, dass die MDA-MB-231-Zellen

über den Vortag an den Kammern anwuchsen, aber sichergestellt, dass diese erwärmt waren. Daraufhin wurden die in DMEM mit FCS gewachsenen Makrophagenzelllinien mit Trypsin/EDTA abgelöst, in und je Kammer 10^5 Zellen in 250 µl DMEM mit FCS gelöst gegeben und für 1 h zum Anwachsen inkubiert. Nach Kontrolle wurden die Makrophagen mit PBS gewaschen, das Medium gegen DMEM ohne FCS getauscht und die Chambers in die Wells mit FCS und MDA-MB-231-Zellen oder ohne FCS und Tumorzellen gehängt. Davon ausgehend, dass zwischen dem Medium ohne FCS und mit FCS und den parakrinen Botenstoffen der Tumorzellen ein Konzentrationsgefälle entstehen würde (siehe Abbildung 8), wurde der Versuch über 24 h unter Standardbedingungen inkubiert.

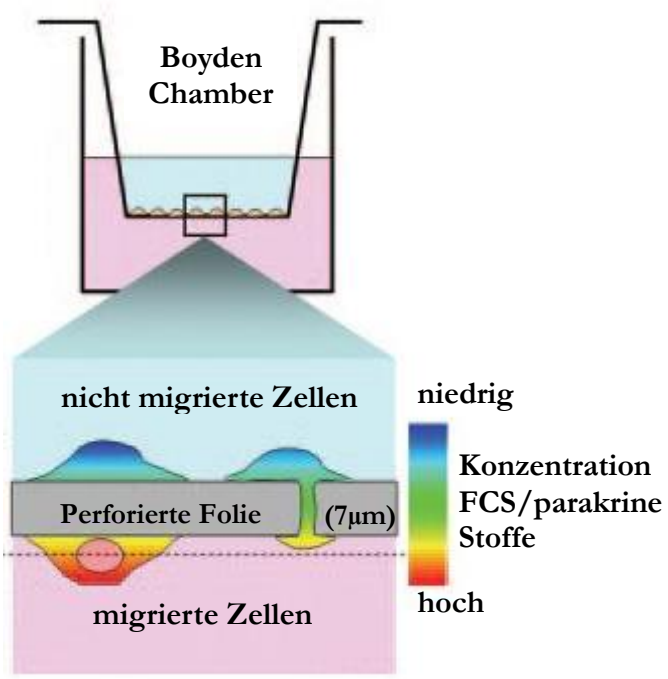


Abbildung 8: Prinzip des verwendeten Migrationsassays

Die mit den Zellen beladene Kammer wurde mit zusatzfreiem Medium in ein Well mit Chemotaxis-stimulierenden Substanzen gegeben. So entstand ein Konzentrationsgefälle, dem die am Boden angewachsenen Zellen durch die etwa 7 µm großen Perforationen der Bodenfolie folgen konnten. (nach Nagao *et al.* 2007, S. 1598)

Zur Analyse der Migrationsrate wurden frische Wells mit 500 µl DMEM ohne FCS mit Calcein AM in einer Konzentration von 5 µg/µl befüllt und auch das Medium in den Boyden Chambers durch DMEM ohne FCS gewechselt, um weiterer Migration vorzubeugen. Calcein AM ist membrangängig und wird im Zytoplasma stoffwechselaktiver Zellen hydrolysiert, wodurch es unter Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 485 nm fluoresziert und Licht von 530 nm Wellenlänge abgibt. Die Makrophagen wurden 1 h lang unter Standardbedingungen im calceinhaltigen Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen an der Oberseite der Boyden Chambers, welche als nicht gewandert definiert wurden, abgeschabt und gespült, sodass nur die

Zellen an der Unterseite der Boyden Chamber, welche als gewandert interpretiert wurden, übrig blieben. Die Boyden Chambers wurden in ein 24-Well, befüllt mit 750 µl PBS, gestellt und unter Ausschluss von Umgebungslicht mit Licht der Wellenlänge von 485 nm exzitiert und mittels Mikroskop und Kamera dokumentiert. Dabei wurde die Aufnahme 100 ms belichtet und je sieben Fotos gemacht (siehe Abbildung 9), wobei das jeweils oberste und unterste nur als Referenz der korrekten Bildfolge genommen wurden und aus den fünf verbliebenen ein Mittelwert der manuell ausgezählten Zellen gebildet wurde. Dabei wurde sichergestellt, dass keine überlappenden Bildausschnitte vorlagen, um die doppelte Zählung einzelner Zellen zu vermeiden.

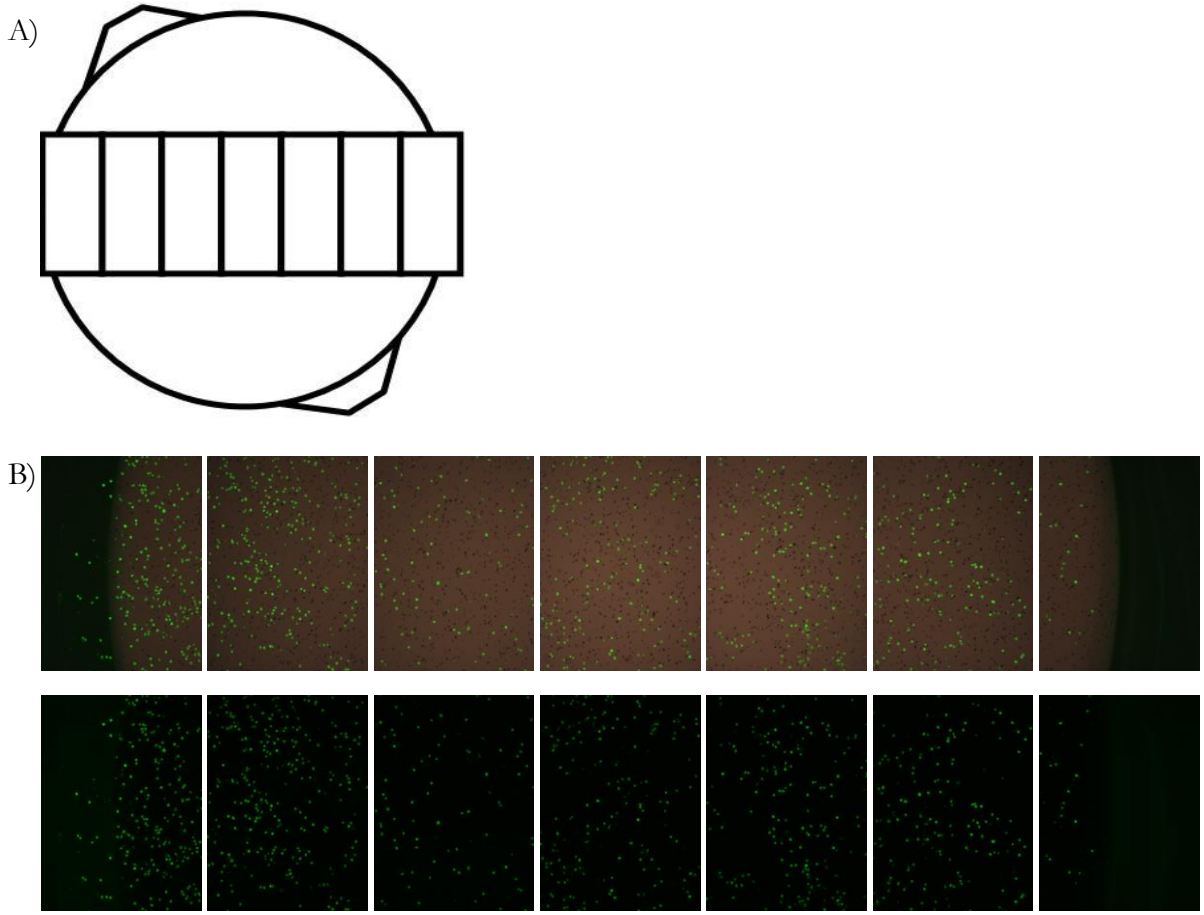


Abbildung 9: Methode zur Zellzählung im Migrationsassay

Zu jedem Well wurden mittels eines Fluoreszensmikroskops mit angeschlossener Kamera je sieben direkt aneinander liegende Bilder gemacht (A). Die fünf mittleren Bilder wurden als repräsentativ für das restliche Well angenommen. Zu jedem Well wurden diese Bilder zudem einmal mit weißem Licht und einmal unter LED Licht der Wellenlänge 485 nm aufgenommen. Die Übereinanderlagerung ist in der oberen Reihe in (B) zu sehen und wurde benutzt, um die Validität der Aufnahme zu beurteilen. Die untere Reihe zeigt dieselben Abschnitte unter reiner Exzitationsbeleuchtung und wurde zur Auszählung der Zellen benutzt.

2.2.15 *Scratch Assay*

Dieser *Assay* ist ein unspezifischer Versuch, der anzeigt, wie schnell eine Zelllinie in der Lage ist, eine bei dichtem Wachstum freigeschabte, etwa 10 µm dicke Linie im Zellrasen wieder zu besiedeln. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von $0{,}5 \times 10^5$ Zellen/ml zu 2 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin in je ein 6-Well pro Linie überführt und 36 h lang bei Standardbedingungen inkubiert. Danach wurden vorsichtig mittels einer 200 µl Pipettenspitze mit gleichmäßigem Druck je drei gleich dicke Linien in den Zellrasen gezogen und die Wells dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Nach 1 h, in der sich eventuell schwimmende Zellen absetzen konnten, wurde jede Linie an einer geeigneten Stelle fotografiert und die Position markiert.

Alle 12 h wurde nun die Kultur dreimal mit PBS gewaschen, in neues DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin überführt und nach einer weiteren Stunde an der markierten Stelle fotografiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die gezogenen Linien in einer der Zelllinien wieder zugewachsen waren. Die digitalen Fotografien wurden im Programm Image J nach einem speziell entwickelten Protokoll ausgewertet, welches in Abbildung 10 genau erläutert ist.

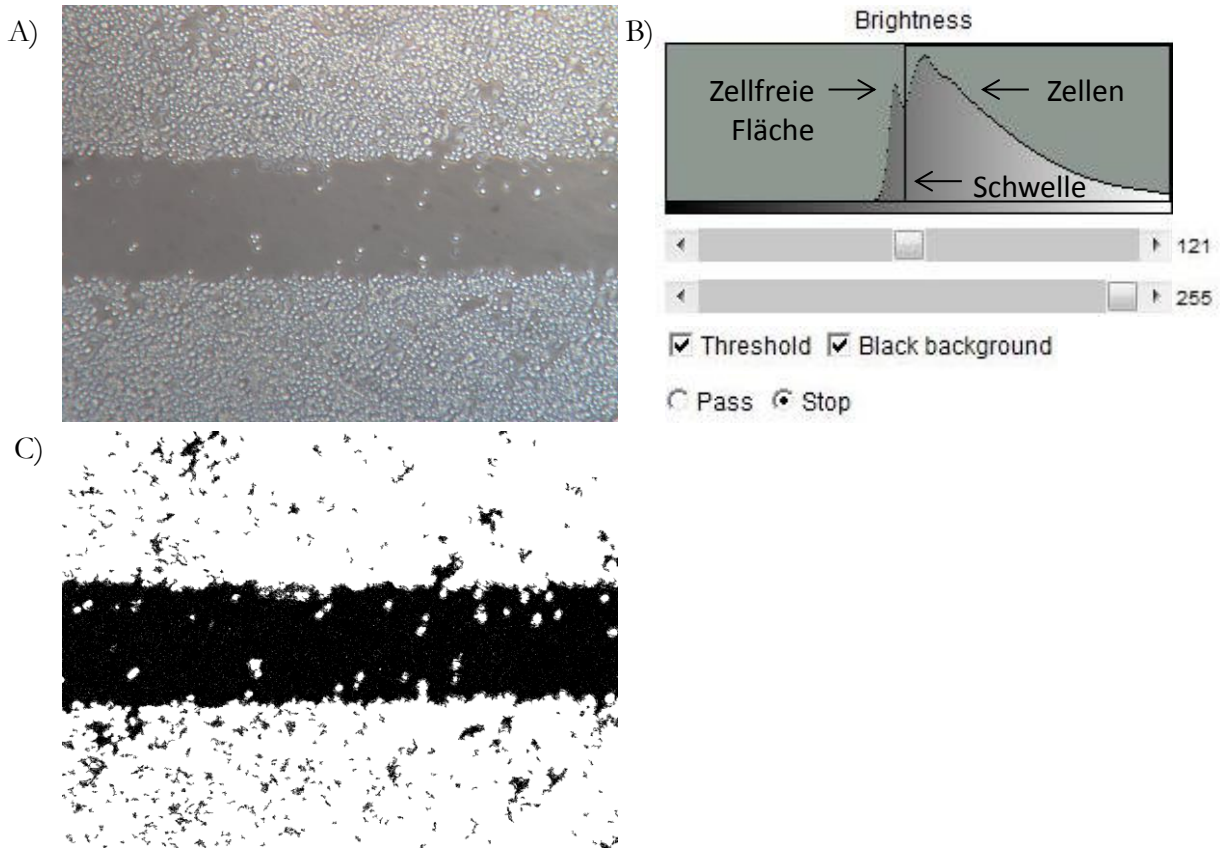


Abbildung 10: Auswertungsverfahren des *Scratch Assays*

Das native Bild (A, dargestellt sind RAW Zellen zum Zeitpunkt 0 h) wurde durch ein Histogramm der Helligkeit (B, x-Achse: Helligkeitsverlauf aller Pixel; y-Achse: Anzahl der Pixel) getrennt. Dabei erlaubte die Auftragung entlang der x-Achse eine gute Differenzierung zwischen zellfreier Fläche und Zellen. Alle Pixel mit geringerem Helligkeitswert als die angegebene Schwelle wurden als Schwarz gewertet, alle mit höherem als Weiß (C). Die Anzahl der schwarzen Pixel wurde in Relation zur Gesamtpixelzahl als prozentualer Anteil der nichtbewachsenen Fläche interpretiert.

2.2.16 Bestimmung der Verdopplungszeiten

Um im Rahmen des *Scratch Assays* eine Beeinflussung durch geänderte Teilungsraten der transduzierten Zelllinien auszuschließen, wurde eine Bestimmung der Verdopplungszeiten aller benutzten Zelllinien durchgeführt. Dazu wurden je Linie vier 6-Wells zu $5x10^4$ Zellen in 2 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät und unter

Standardbedingungen inkubiert. Alle 24 h wurden je Linie ein 6-Well entnommen, das Medium abgenommen und die Zellen mittels 500 µl Trypsin + EDTA vom Kulturboden abgelöst und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Lösung wurde mit weiteren 500 µl DMEM mit 10 % FCS verdünnt, um das Trypsin und EDTA zu inhibieren und dadurch die Zelllyse gering zu halten. Darauf wurden je Well drei 10 µl Proben in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Den 72 und 96 h Proben wurden weitere 500 bzw. 1000 µl DMEM mit 10 % FCS zugefügt, um die Zählbarkeit in der Zählkammer zu garantieren, die Verdünnungen jeweils in die Neubauer Formel mit einbezogen. Die Verdopplungszeit jeder Zelllinie wurde darauf, ausgehend von der Verdopplung jeder ausgesäten Zelle im linearen Bereich der erhaltenen Kurven (siehe Abbildung 11) sowie von einer Verdopplung jeder vorhandenen Zelle, berechnet:

$$log_2\big(f(t)\big) = kt + C$$

Demnach entspricht die Steigung k der gegebenen Geradengleichung

$$k = \frac{log_2\big(f(t_2)\big) - log_2(f(t_1))}{t_2 - t_1}$$

Da k die Zahl der Zellteilungen pro Stunde darstellt, ergibt sich zur Errechnung der exakten Verdopplungszeiten die Formel

$$\frac{1}{k} = \frac{t_2 - t_1}{log_2\left(\frac{f(t_2)}{f(t_1)}\right)}$$

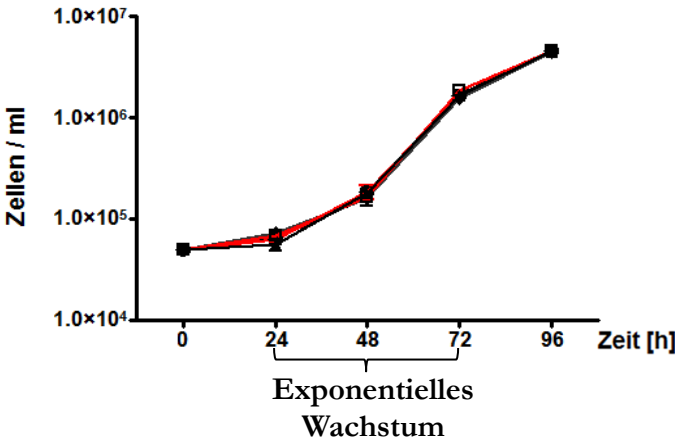


Abbildung 11: Messbereich der Wachstumskurve

Das Wachstum der Zelllinien (hier anhand der Interassayvarianz dreier Versuche mit RAW Zellen gezeigt, alle Linien) entsprach der klassischen Form mit *lag*-Phase (0 bis 24 h), in der ein fast stagnierendes Wachstum beobachtet werden konnte, gefolgt von der *log*-Phase, in der die Zellen exponentiell zu wachsen beginnen (24 bis 72 h), und einer Verlangsamungsphase (72 bis 96 h). Zum 96 h-Zeitpunkt war die Kulturschale voll bewachsen und eine Verminderung der Zellzahl konnte in der Folge beobachtet werden (nicht gezeigt).

2.2.17 Mikroskopische Aufnahmen zur Morphologiebestimmung

Für die Aufnahmen am Mikroskop, die zur Bestimmung der Morphologie unbehandelter Makrophagen genutzt wurden, wurden 10^6 Zellen je Linie in 15 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin gelöst und 24 h lang bei Standardbedingungen inkubiert. Daraufhin wurden sie mit Polarisationsfilter in 400-facher Vergrößerung fotografiert und die digitalen Fotografien manuell am Computer im Freeware Programm Image J ausgezählt.

2.2.18 Statistische Auswertung

Die erhaltenen Werte verschiedener Bedingungen und Zelllinien wurden im Programm Graph Pad über den einseitigen *Student t-Test* für unabhängige Proben auf signifikante Unterschiede überprüft. Die Signifikanzniveaus entsprechen dabei $p < 0{,}05$ (markiert als *), $p < 0{,}01$ (markiert als **) und $p < 0{,}001$ (markiert als ***) gewählt.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung (*standard deviation*, SD) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Hypoxie auf die Makrophagenzelllinien RAW und J774

Makrophagen werden in hypoxischen Arealen vermehrt vorgefunden. Sauerstoffmangel induziert und verstärkt viele ihrer spezifischen Funktionen. PHD2 ist Schlüsselregulator des Transkriptionsfaktors HIF, der die hierfür nötigen Gene ansteuert. In dieser Arbeit wird daher der Einfluss des Sauerstoffsensors PHD2 auf Makrophagen untersucht. Hier wurden die immortalisierten Zelllinien RAW und J774 herangezogen. Es wurde zunächst der Einfluss von Sauerstoffmangel auf die beiden Zelllinien untersucht.

3.1.1 Stabilisierung von HIF-1α durch Hypoxie in RAW- und J774-Zellen

HIF-1α ist der Hauptmediator der hypoxischen Reaktion und wurde zunächst mittels Western Blot untersucht, um die adäquate Reaktion der verwendeten Zelllinien auf Hypoxie nachzuweisen. Die Zellen wurden jeweils 4 h unter Normoxie (20 % O_2) oder Hypoxie (1 % O_2) inkubiert und anschließend die Proteinspiegel von HIF-1α untersucht (siehe Abbildung 12).

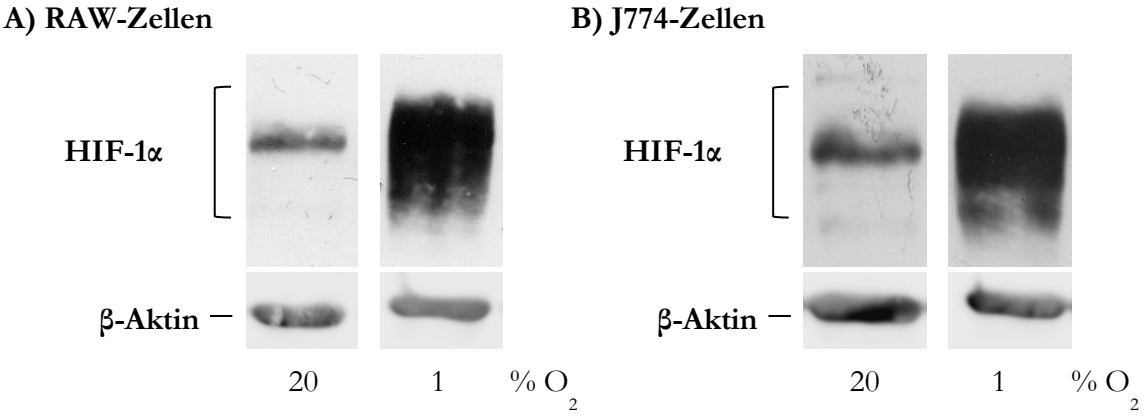


Abbildung 12: Hypoxie führt in RAW- und J774-Zellen zu einer HIF-1α-Stabilisierung

Mittels Western Blot wurden die Proteinlevel von HIF-1α in (A) RAW- und (B) J774- Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen 4 h lang unter normoxischen (20 % O_2) bzw. hypoxischen (1 % O_2) Bedingungen inkubiert und anschließend lysiert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurde die Proteinmenge von HIF-1α sowie von β-Aktin als Proteinladungskontrolle im *Western Blot* untersucht. Gezeigt ist eines von drei unabhängig durchgeführter Experimente.

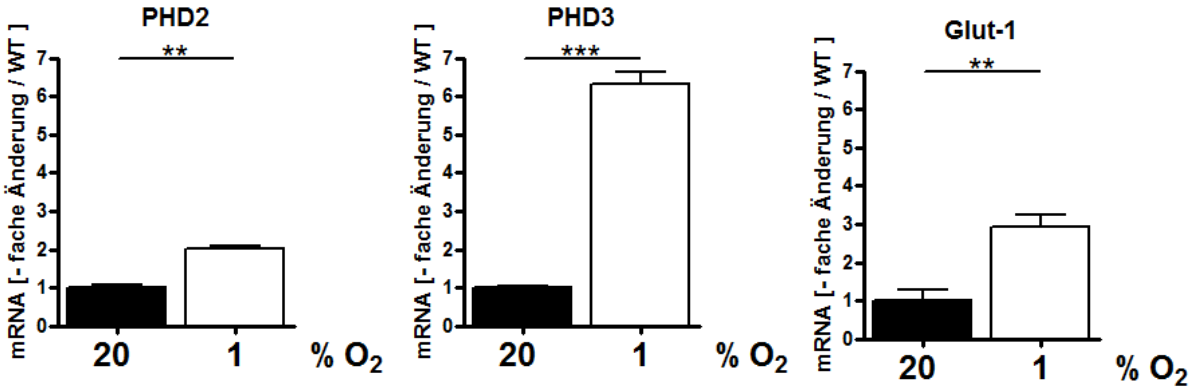
HIF-1α konnte sowohl bei den RAW- als auch bei den J774- Zellen nachgewiesen werden. Das Signal unter Normoxie (20 % O_2) war gut detektierbar, sodass auch hier von einem nicht vollständigen Abbau ausgegangen werden kann. Unter Hypoxie (1 % O_2) zeigt sich in beiden Zelllinien eine deutliche Signalverstärkung. Die Stabilisierung von HIF-1α ist bei beiden

Zelllinien sehr ausgeprägt. Anhand der detektierten Menge an β-Aktin ist gut erkenntlich, dass alle Proben in etwa gleicher Proteinmenge aufgetragen wurden.

3.1.2 Induktion von HIF-1 Zielgenen in RAW- und J774-Zellen durch Hypoxie

Um beurteilen zu können, ob die Transkriptionsaktivität von HIF-1 durch Hypoxie in den untersuchten Zellen gleichsinnig verändert wird, wurden einige wie in Abschnitt 1.2.3 als typisch beschriebene HIF-Zielgene des Transkriptionsfaktors untersucht (siehe Abbildung 13).

A) RAW-Zellen



B) J774-Zellen

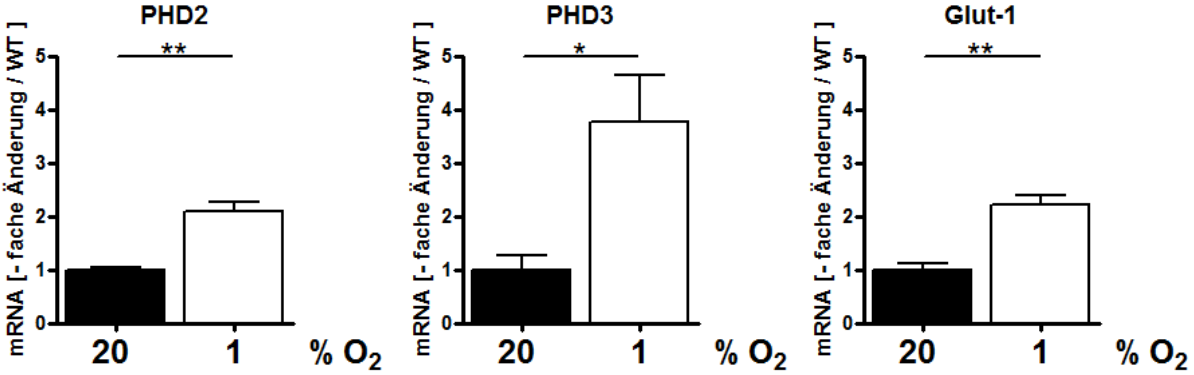


Abbildung 13: Hypoxie führt in den RAW- und J774- Zellen zu einer verstärkten RNA-Expression HIF-1-abhängiger Gene

Die Makrophagenzelllinien RAW und J774 wurden 4 h unter Normoxie (20 % O_2) oder Hypoxie (1 % O_2) inkubiert. Die vorhandene mRNA wurde mittels quantitativer RT-PCR gemessen und mit dem Referenzgen mS12 abgeglichen. Die Expression bei Normoxie wurde dabei gleich 1 gesetzt, sodass die Balken die relative Induktion abbilden. Gezeigt sind die Mittelwerte biologischer Triplikate ± SD eines von drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0{,}05$; ** = $p < 0{,}01$; *** = $p < 0{,}001$.

Zu beobachten sind erhöhte Level der mRNAs von PHD2, PHD3 und Glut-1. Sowohl bei den RAW- als auch bei den J774-Zellen bewirkt eine 4-stündige Hypoxie eine Verdopplung der mRNA-Konzentration von PHD2. Es unterliegt als Regulationsenzym von HIF-1α einer Rückkopplung. Im Gegensatz dazu zeigt PHD3 bei den J774-Zellen einen sehr starken Anstieg auf die fast vierfachen Werte im Vergleich zur Normoxie. Bei den RAW-Zellen liegt sie sogar 6-mal häufiger vor. Glut-1 wird als direktes Effektorgen, welches für den Glucosetransporter 1 kodiert, nach 4 h Hypoxie 2- bis 3-mal stärker exprimiert. Die untersuchten Zellen reagieren also auf Hypoxie mit der Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1α und der verstärkten Expression seiner Zielgene.

3.2 Einfluss eines PHD2-*knockdowns* auf HIF-1α und dessen Zielgene

Um den Einfluss von PHD2 auf die Makrophagenzelllinien zu untersuchen, wurden *knockdown*-Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion von PHD2-spezifischer shRNA generiert.

3.2.1 Nachweis verringerter PHD2-Expression in transduzierten Zelllinien

Zum Nachweis, ob die durchgeführte Transduktion mittels shRNA zum Abbau der PHD2-mRNA in den murinen Makrophagenzelllinien führt, wurden die intrazellulär vorliegenden mRNA-Spiegel mittels quantitativer RT-PCR gemessen (siehe Abbildung 14).

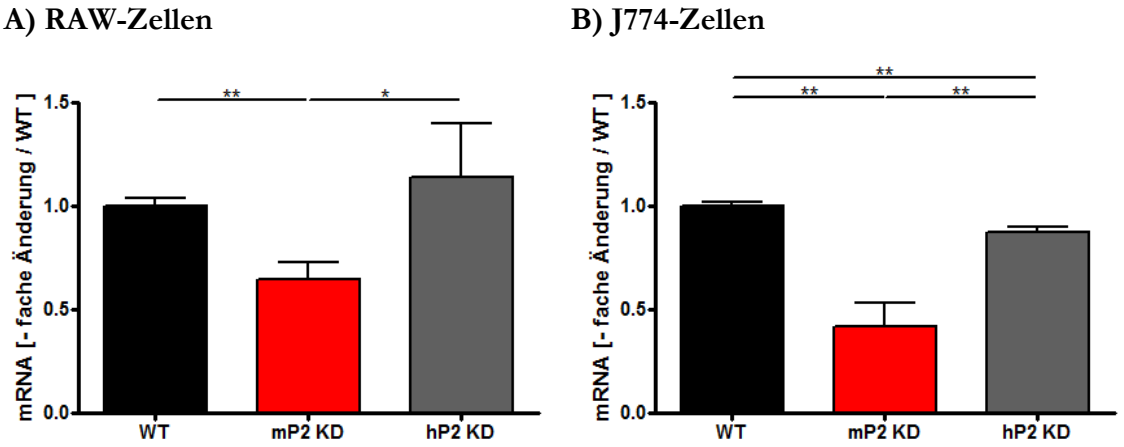


Abbildung 14: Nachweis verringerter PHD2-Expression in den *knockdown* Zelllinien

A) RAW- und B) J774-Zellen wurden stabil mit shRNA gegen murines PHD2 lentiviral transduziert (mP2 KD). Als Kontrolle dienten die unbehandelte Zelllinie (WT) sowie Zellen, die mit shRNA gegen humanes PHD2 transduziert worden waren (hP2 KD). Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR gemessen und mit dem Referenzgen mS12 abgeglichen. Die Expression bei Normoxie wurde dabei gleich 1 gesetzt, sodass die Balken die relative Erhöhung bzw. Erniedrigung abbilden. Gezeigt sind die Mittelwerte biologischer Triplikate ± SD eines von drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0{,}05$; ** = $p < 0{,}01$.

In der durch Transduktion mit der zum RNA Produkt des murinen PHD2-Gens komplementären shRNA zeigt sich in den RAW-Zellen eine 40-prozentige Verringerung der PHD2-mRNA, in den J774-Zellen beträgt diese 60 %. Die Kontrolle mit shRNA gegen humane PHD2-mRNA ist bei den RAW-Zellen nicht signifikant verändert, in den J774-Zellen dagegen um etwa 10 % geringer als im Wildtyp.

3.2.2 HIF-1α-Stabilisierung durch eine verringerte PHD2-Expression

Zielprotein der PHD2-gesteuerten Hydroxylierung ist HIF-1α (Epstein *et al.* 2001). Aufgrund der Wichtigkeit dieser Reaktion in der hypoxischen Zellantwort wird in dieser Arbeit darauf der Schwerpunkt gelegt. Zunächst wurde untersucht, ob der PHD2-*knockdown* in den verwendeten Zelllinien Wirkung auf die intrazelluläre Proteinmenge von HIF-1α hat. In Abbildung 15 ist ein direkter Vergleich der hypoxischen Regulation von HIF-1α in den WT-Zellen und den mP2 KD bzw. hP2 KD-Zellen dargestellt.

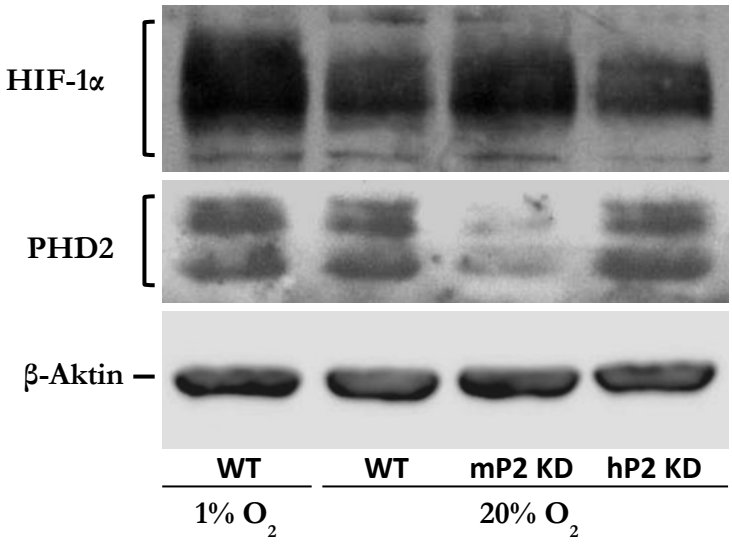


Abbildung 15: Ein PHD2-*knockdown* führt in RAW-Zellen zu einer HIF-1α Stabilisierung

Im *Western Blot* wurden die Proteinlevel von HIF-1α und PHD2 von RAW-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen 4 h lang unter normoxischen (20 % O_2) bzw. hypoxischen (1 % O_2) Bedingungen inkubiert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurden die Proteinmengen von HIF-1α und β-Aktin als Proteinladungskontrolle im *Western Blot* untersucht. Gezeigt ist eines von drei unabhängig durchgeführter Experimente.

Der PHD2-*knockdown* der mP2 KD-Zellen ist gut erkennbar, die Kontrollzelllinie hP2 KD zeigt keine Veränderung der PHD2-Proteinmenge. In den normoxisch kultivierten Wildtyplinien sowie in der hP2 KD-Kontrolllinie ist das HIF-1α-Signal weniger stark detektierbar. Deutlich wird aber auch hier, dass selbst unter Normoxie und geringer Zelldichte HIF-1α in gewissem Maße vorliegt. In den *knockdown*-Zellen mP2 KD ist PHD2 in geringerem Maße vorhanden. Daraus folgt, dass weniger HIF-1α hydroxyliert wurde und damit die intrazellulären HIF-1α-Proteinspiegel anstiegen. Unter den hypoxischen Bedingungen (1 % O_2), denen der WT ebenfalls ausgesetzt wurde, steht PHD2 nicht genug Sauerstoff zur Verfügung, um HIF-1α in ausreichender Menge zu hydroxylieren. Daher sind die HIF-1α-Proteinlevel unter hypoxischen Bedingungen erhöht. Die HIF-1α-Level zeigen sich im *knockdown* allerdings nicht ganz so hoch wie unter Hypoxie. Anhand der detektierten Menge an β-Aktin ist gut erkenntlich, dass alle Proben in etwa gleicher Menge aufgetragen wurden.

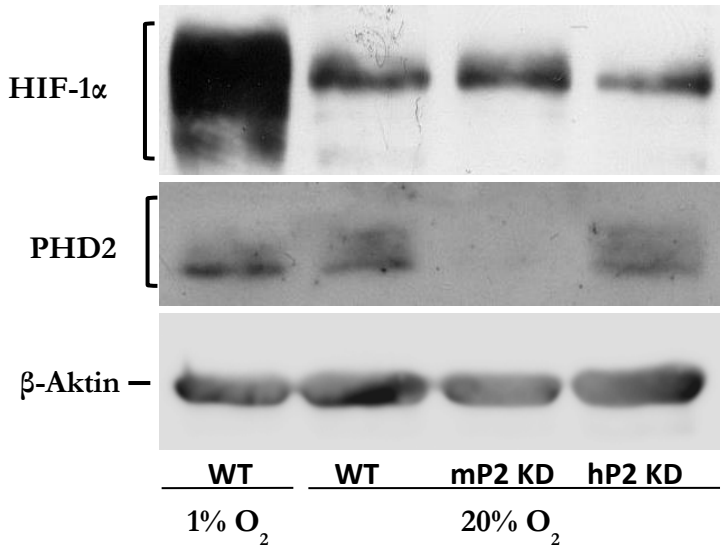


Abbildung 16: PHD2-*knockdown* ist bei J774-Zellen auch auf Proteinebene beobachtbar und führt zu HIF-1α-Stabilisierung

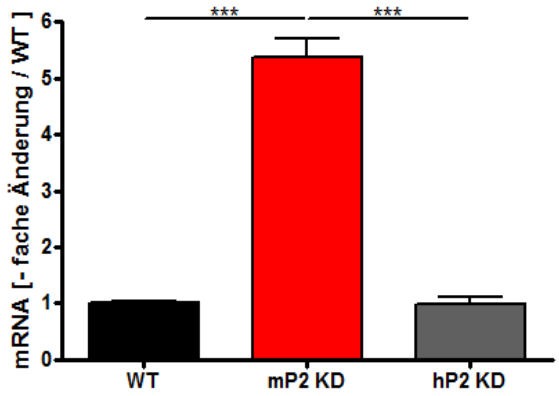
Mittels *Western Blot* wurden die Proteinmengen von HIF-1α und PHD2 in J774-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen 4 h lang in einer Dichte von 10^6 unter normoxischen (20 % O_2) bzw. hypoxischen (1 % O_2) Bedingungen inkubiert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurden die Proteinmengen von HIF-1α und β-Aktin als Proteinladungskontrolle untersucht. Gezeigt ist eines dreier unabhängig durchgeführter Experimente.

Auch bei den J774-Zellen ist der PHD2-*knockdown* der mP2 KD-Zelllinie deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 16). Auffällig ist, dass sich hier - im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch mit RAW-Zellen - die HIF-1α-Level der unter Normoxie kultivierten Zellen kaum unterscheiden. Trotz des erkennbaren starken PHD2-*knockdowns* ist die normoxische Stabilisierung von HIF-1α im Vergleich zu Wildtyp und Kontrolle kaum erhöht. Die hypoxische Inkubation der Wildtypzellen zeigt hingegen eine deutliche HIF-1α-Stabilisierung. Anhand der detektierten Menge an β-Aktin ist gut erkenntlich, dass alle Proben in etwa gleicher Proteinmenge aufgetragen wurden.

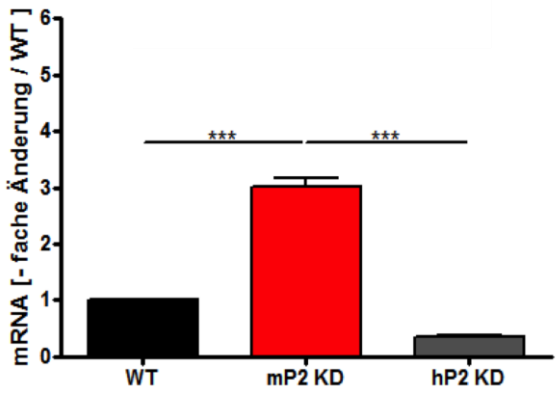
3.2.3 Induktion typischer HIF-1-Zielgene durch eine verringerte PHD2-Expression

Die Analyse der HIF-1-Zielgene PHD3, VEGF und Glut-1 soll zeigen, ob die Änderung der PHD2- und HIF-1α-Proteinlevel auch einen Effekt auf die Transkriptionsaktivität von HIF-1 hat (siehe Abbildung 17).

A) PHD3



B) VEGF



C) GLUT-1

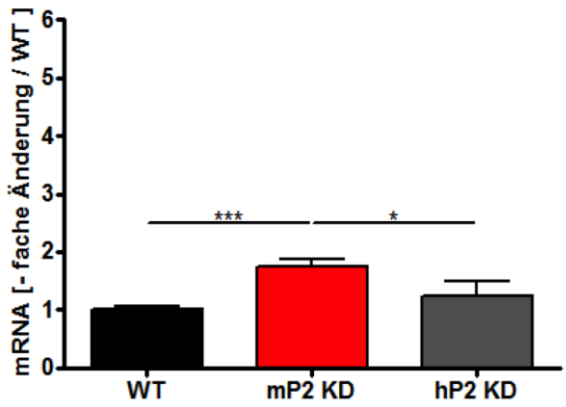
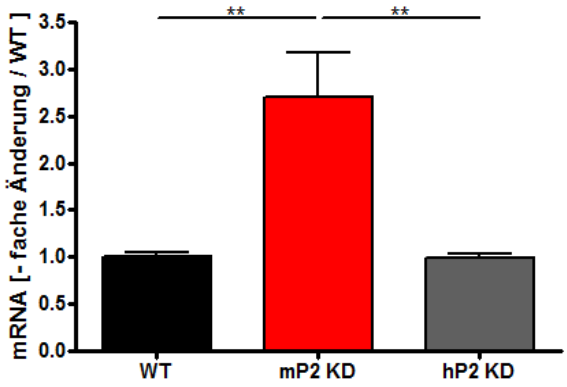


Abbildung 17: Eine verringerte PHD2-Expression führt zu einer Induktion typischer HIF-1-Zielgene bei RAW-Zellen

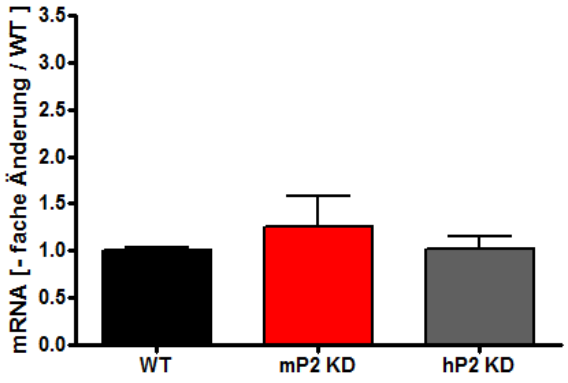
RAW-Zellen wurden stabil mit shRNA gegen murines PHD2 transduziert (mP2 KD). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit shRNA gegen humanes, in diesen Zellen nicht vorhandenes PHD2 (hP2 KD) transduziert wurden. Die mRNA Level von PHD3, VEGF und GLUT-1 wurde mittels quantitativer RT-PCR gemessen und mit dem Referenzgen mS12 abgeglichen. Gezeigt sind die Mittelwerte biologischer Triplikate ± SD eines von drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0{,}05$; *** = $p < 0{,}001$.

PHD3 ist ein typisches Zielgen von HIF-1 im Sinne einer negativen Rückkopplung. Im nur 40 - prozentigen *knockdown* der RAW-Zellen mP2 KD zeigt sich hier eine 8-fache Erhöhung der mRNA-Level gegenüber dem Wildtyp und der Kontrolle. Auch VEGF-RNA wird verstärkt detektiert, die Menge der mRNA steigt im PHD2-*knockdown* auf das Dreifache. GLUT-1 kann in doppelter Konzentration im Vergleich zum Wildtyp und zur Kontrolle nachgewiesen werden.

A) PHD3



B) VEGF



C) GLUT-1

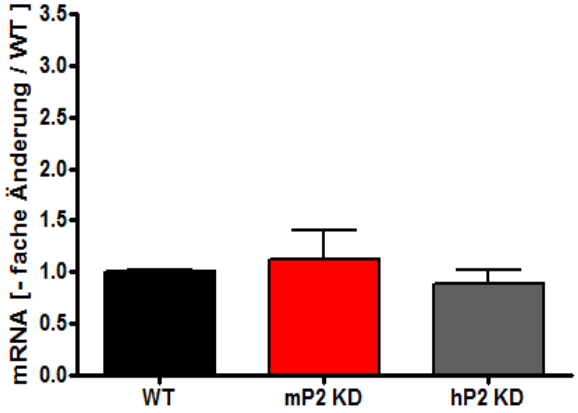


Abbildung 18: Eine verringerte PHD2-Expression führt zu einer Induktion typischer HIF-1-Zielgene bei J774-Zellen

J774-Zellen wurden stabil mit shRNA aus lentiviralen Vektoren gegen murines PHD2 transduziert (mP2 KD). Als Kontrolle dienten die unbehandelte Zelllinie (WT) sowie Zellen, die mit shRNA gegen humanes, in diesen Zellen nicht vorhandenes PHD2 (hP2 KD) transduziert worden waren. Die mRNA-Mengen von PHD3, VEGF und GLUT-1 wurde mittels quantitativer RT-PCR gemessen und mit dem Referenzgen mS12 abgeglichen. Gezeigt sind die Mittelwerte biologischer Triplikate ± SD eines von drei unabhängigen Experimenten. ** = $p < 0{,}01$.

Der etwa 60 - prozentige *knockdown* der J774-Zelllinie mP2 KD führte zu einer etwa 2,5-fachen Erhöhung der intrazellulären PHD3-Level. Für die ebenfalls untersuchten mRNAs von VEGF und GLUT-1 ergab sich in keinem der durchgeführten Versuche ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Zellen mit und ohne PHD2-*knockdown* (siehe Abbildung 18).

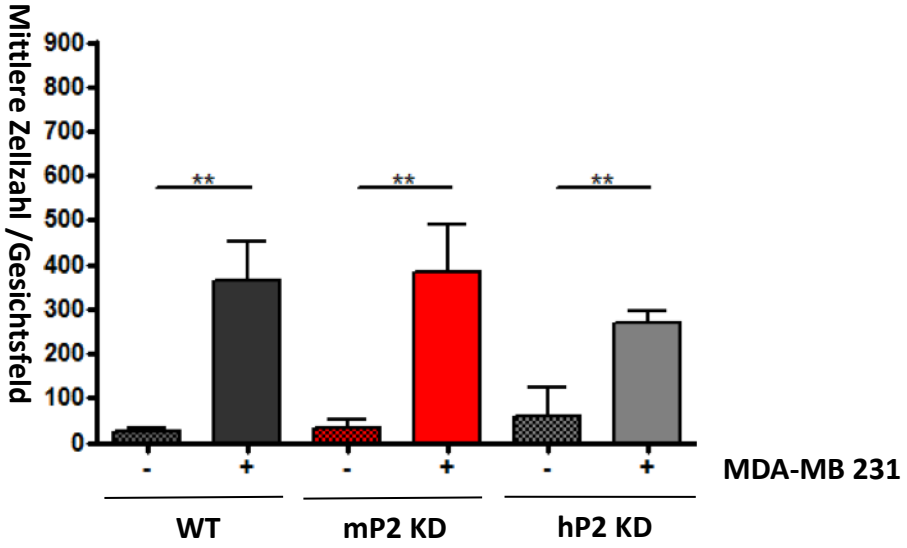
3.3 Einfluss der PHD2-Reduktion auf Mobilität und Proliferation

Makrophagen sind zur Ausführung ihrer physiologischen Funktion im Körper grundlegend auf ihre Fähigkeit zur Migration angewiesen. In dieser Arbeit wird daher der Einfluss eines PHD2-*knockdowns* auf die Motilität der Makrophagenzelllinien *in vitro* untersucht. Da Unterschiede in der Proliferation Migrationsversuche beeinflussen können, wurde auch diese untersucht.

3.3.1 Kein Effekt auf Migration der Zelllinien durch PHD2-*knockdown*

Der Einfluss von PHD2 auf die Migration unter Stimulation wurde im *Boyden Chamber Assay* untersucht, welcher einen migrationsspezifischen Ansatz bietet (Lackie *et al.* 1987, siehe Abbildung 19).

A) RAW-Zellen



B) J774-Zellen

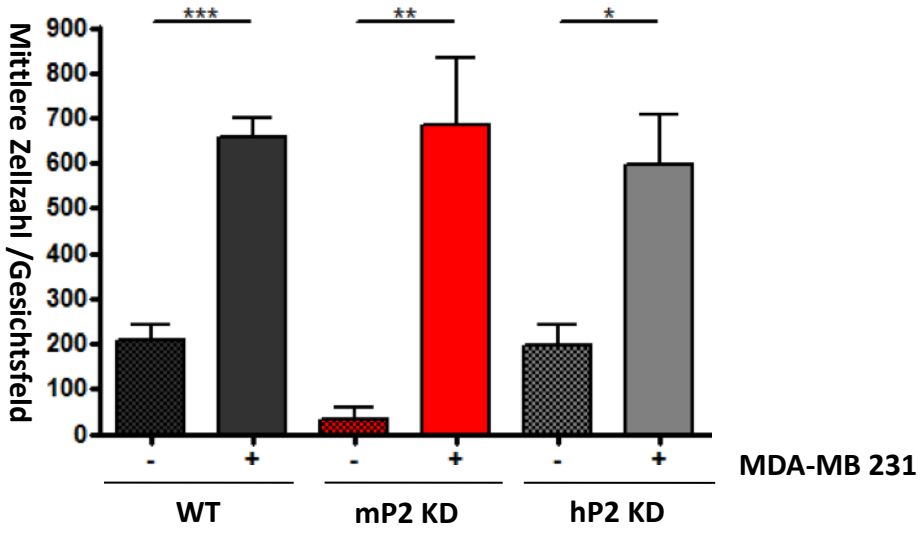


Abbildung 19: Ein PHD2-*knockdown* zeigt keinen Effekt auf die Migration von Makrophagen

A) RAW- und B) J774-Zellen wurden keinem Stiumulus (-) oder MDA-MB 231-Zellen ausgesetzt (+) und nach 24 h migrierten Zellen ausgezählt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte dreier biologischer Triplikate ± SD. Das Experiment wurde je dreimal durchgeführt. * = $p < 0{,}05$; ** = $p < 0{,}01$; *** = $p < 0{,}001$.

MDA-MB 231-Zellen wurden einem humanen Adenokarzinom der Mamma entnommen und bieten als solche wichtige chemotaktische Signale, denen Makrophagen, ihrer physiologischen Funktion entsprechend, gerichtet folgen. Ohne Stimulus findet eine ungerichtete Migration statt.

Sowohl bei den RAW- als auch bei den J774-Zellen stieg durch die Konfrontation mit MDA-MB 231-Zellen die Zahl der migrierten Makrophagen. Ohne Stimulation zeigten die RAW-

Zellen eine geringe Migration von etwa 50 Zellen/Gesichtsfeld, welche mit MDA-MB 231-Zellen auf etwa 350 Zellen/Gesichtsfeld stieg. Die J774-Zellen zeigten eine etwas höhere Migration von etwa 100 Zellen/Gesichtsfeld ohne und von etwa 600 Zellen/Gesichtsfeld unter Stimulation. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *knockdown* waren weder bei RAW- noch bei J774-Zellen zu beobachten. Weder die gerichtete noch die ungerichtete Migration unterschieden sich zwischen Wildtyp und *knockdown*-Zellen.

Zu beachten sind die recht hohe Standardabweichung und eine hohe Interassayvarianz, welche trotz vieler Änderungen im Protokoll nicht vermindert werden konnte.

3.3.2 Einfluss des *knockdowns* im *Scratch Assay*

Eine weitere etablierte Möglichkeit, die Migration von Zellen zu untersuchen, ist der *Scratch Assay* (Ashby und Zijlstra 2012). Dabei wird untersucht, wie schnell eine Zellpopulation in der Lage ist, eine definierte freie Fläche durch Migration zu besiedeln. Die Zeit, in der dies geschieht, ist jedoch neben der Migration auch von anderen Faktoren abhängig, so zum Beispiel der Proliferationsgeschwindigkeit und der Adhäsionsstärke der Zellen.

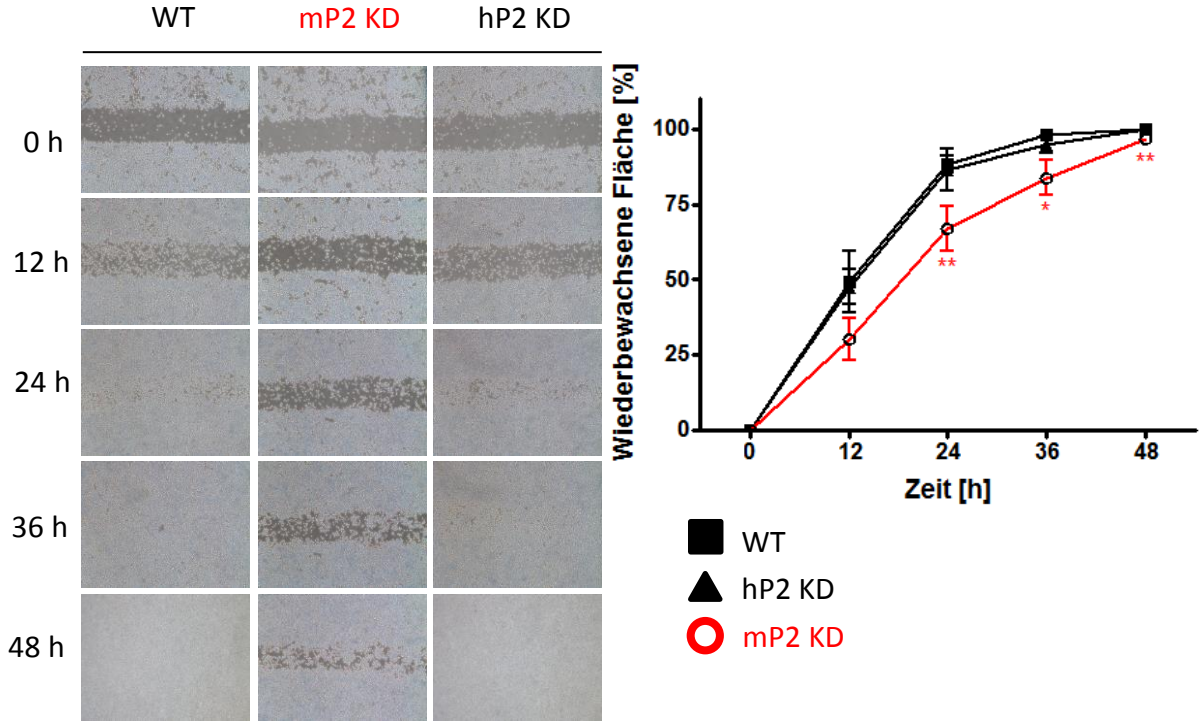


Abbildung 20: Eine Verringerte PHD2-Expression in RAW-Zellen führt zu einer verringerten Wiederbesiedelung im *Scratch Assay*

Die RAW-Zellen konnten 24 h in einer 6-Wellplatte anwachsen. Danach wurde ein Bereich der zu 90 % konfluenten Kultur mit einer 200 µl Pipettenspitze abgeschabt und der Verlauf durch Wiederbesiedlung alle 12 h fotografiert. Die nach 24 h wieder bewachsene Fläche wurde mit der Fläche des ursprünglichen *Scratches* in Verhältnis gebracht. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte dreier Versuche mit je 18 biologisch gleichwertigen Verläufen ± SD. Der Versuch wurde je dreimal durchgeführt. * = $p < 0{,}05$; ** = $p < 0{,}01$.

Die *in-vitro*-Besiedelung freier Flächen erfolgt im Wesentlichen über Migration und Absetzen von losen Zellen. Hier zeigte sich bei den RAW-Zellen, dass beim Wildtyp und der Kontrolle hP2 KD nach 48 h das zum Zeitpunkt 0 h unbesiedelte Areal wieder bewachsen war (siehe Abbildung 20). In den *knockdown*-Zellen (mP2 KD) zeigte sich eine durchschnittlich geringere Wiederbesiedelungsgeschwindigkeit, welche 24 h nach Versuchsbeginn im Vergleich zum WT und der *knockdown*-Kontrolle signifikant wurde und 48 h danach etwa 96 % betrug. Auffällig war die hohe Signifikanz im 48 h Bereich, obwohl sich die wieder bewachsene Fläche prozentual nur wenig unterschied. Das liegt darin begründet, dass das jeweilige Areal vom WT und der Kontrolle in fast allen Proben zu 100 % bewachsen war, in den *knockdown*-Zellen war dies nie der Fall.

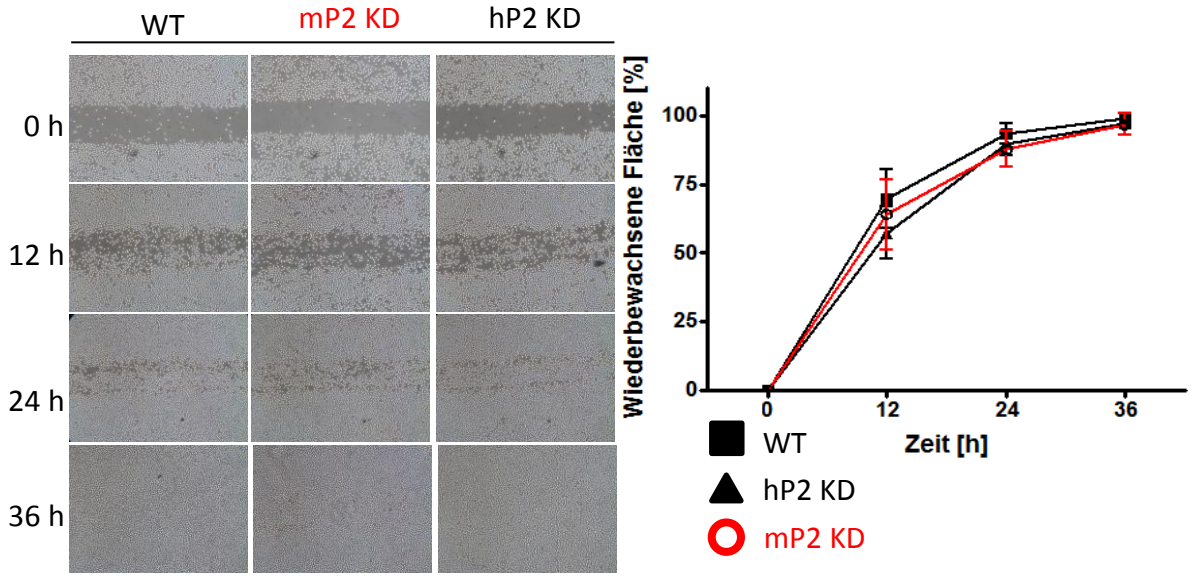


Abbildung 21: Eine verringerte PHD2-Expression in J774-Zellen zeigt keine Änderung der Wiederbesiedelung im *Scratch Assay*

Die J774-Zellen konnten 24 h anwachsen. Danach wurde ein Bereich in der zu 90 % konfluenten Kultur mit einer 200 µl Pipettenspitze abgeschabt und der Verlauf alle 12 h fotografiert. Die nach 24 h wieder bewachsene Fläche wurde mit der Fläche des ursprünglichen *Scratches* in Verhältnis gebracht. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte achtzehn biologisch gleichwertiger Verläufe ± SD. Der Versuch wurde je dreimal durchgeführt.

Bei den J774- und mP2 KD-Zellen zeigte sich im Verlauf von 36 h kein signifikanter Unterschied zum WT und zur Kontrolle hP2 KD in den durchgeführten Versuchen (siehe Abbildung 21).

3.3.3 Auswirkungen eines *knockdowns* auf die Zellproliferation

Wie erwähnt, könnten Unterschiede in der Besiedelung der zellfreien Fläche im *Scratch Assay* (siehe 3.3.2) auch auf eine veränderte Teilungsgeschwindigkeit zurückzuführen sein. Um diesen Einfluss auszuschließen, wurde die Verdopplungszeit der einzelnen Zelllinien bestimmt.

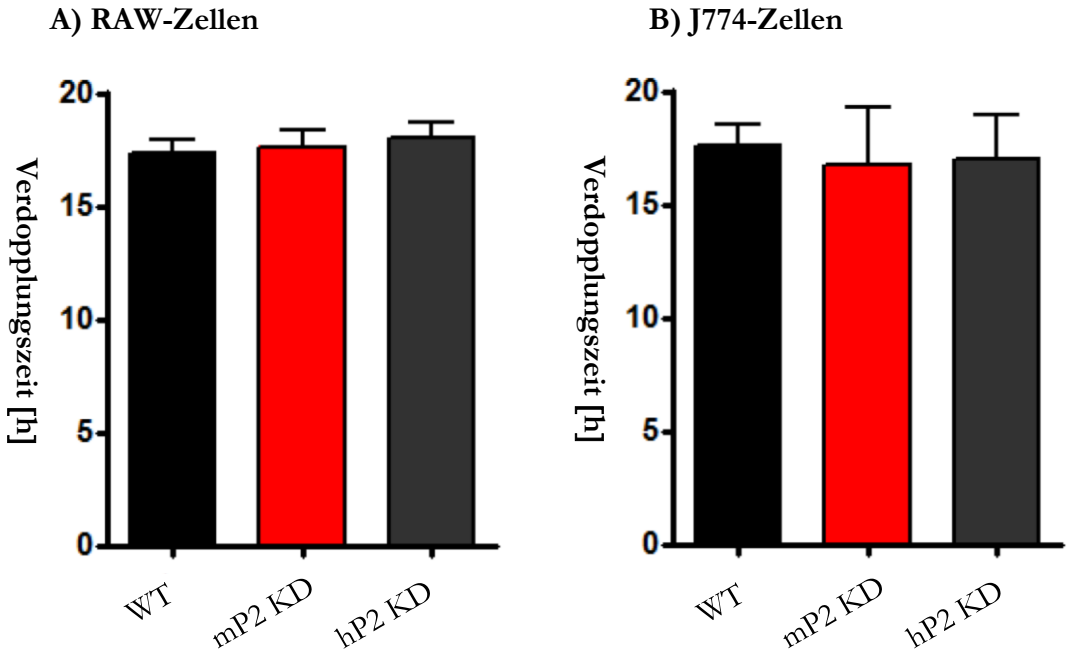


Abbildung 22: Das Maß der PHD2-Expression hat keine Auswirkungen auf Proliferation der Makrophagenzelllinien

A) RAW- und B) J774-Zellen wurden mit einer definierten Zellzahl ausgesät und über vier Tage täglich gezählt. Als Generationszeit wird die Verdopplungszeit der untersuchten Zellen angenommen. Gezeigt ist die Interassayvarianz, gebildet aus den Mittelwerten gleicher Messungen (n = 6) ± SD dreier unabhängiger Experimente.

Davon ausgehend, dass sich sowohl bei RAW- als auch J774-Zellen alle Zellen in gleichen Abständen mitotisch teilten, wurde im log Zeitraum des *in-vitro*-Zellwachstums für alle Zelllinien eine Verdopplungszeit von etwa 17 h errechnet (siehe Abbildung 22). Weder bei RAW- noch bei J774-Zellen zeigte sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen der *knockdown*-Zelllinie mP2 KD und dem WT oder der Transduktionskontrolle hP2 KD.

3.4 Reversibilität der Effekte durch Rekonstitution von PHD2

Um die Hinweise, dass die Beeinflussung der Wiederbesiedelungsgeschwindigkeit im *Scratch Assay* durch den PHD2-*knockdown* verursacht war, zu erhärten, wurde in Zellen der RAW-Reihe mP2 KD die Expression von PHD2 rekonstituiert. Dazu wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches die cDNA für humanes PHD2 beinhaltet. Da sich in den J774-Zellen kein signifikanter Unterschied gezeigt hatte, waren diese nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen.

3.4.1 Nachweis der PHD2-Rekonstitution bei RAW-Zellen

Zunächst wurden die PHD2 rekonstituierten RAW-Zellen auf RNA- und Protein-Ebene hinsichtlich ihrer PHD2-Expression untersucht (siehe Abbildung 23). Es wurde mit den mP2KD+GFP-Zellen auch eine Rekonstitutionskontrolle erstellt, welche eine Beeinflussung durch die erneute Transfektion ausschließen soll.

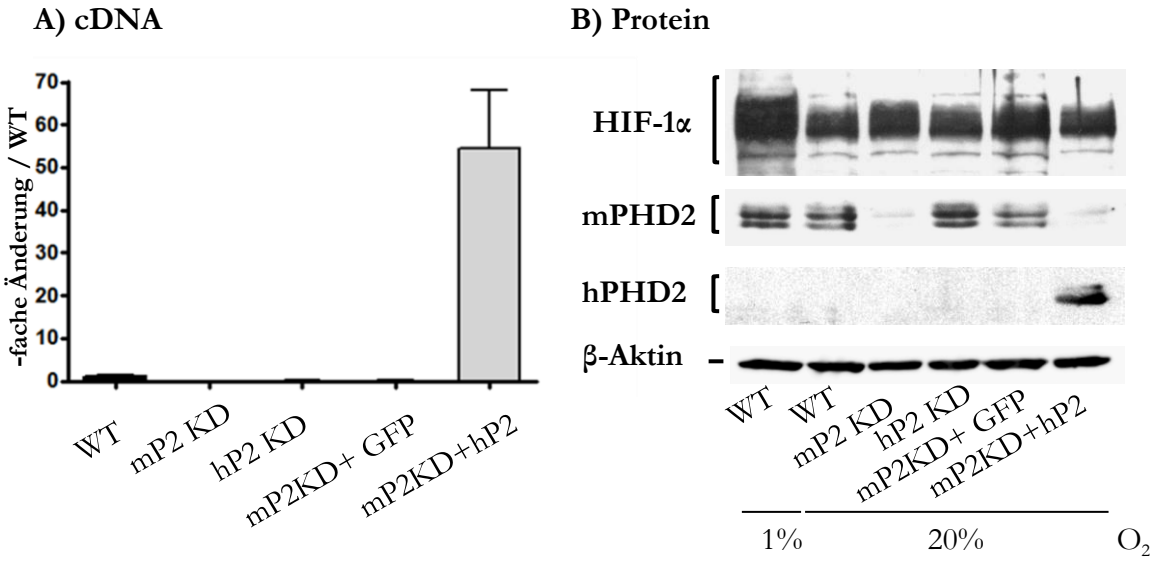


Abbildung 23: Eine Rekonstitution mit humaner PHD2 führt zu einer Normalisierung der HIF-1α-Proteinspiegel

(A) Die mRNA-Expression von humanem PHD2 wurde mittels quantitativer RT-PCR gemessen und mit dem Referenzgen mS12 abgeglichen. (B) Im *Western Blot* wurden die Proteinlevel von HIF-1α, murinem PHD2 (mPHD2) sowie humanem PHD2 (hPHD2) aller erstellter RAW-Zelllinien untersucht. Dazu wurden die Zellen 4 Stunden lang unter normoxischen (20 % O_2) bzw. hypoxischen (1 % O_2) Bedingungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte biologischer Triplikate ± SD.

Deutlich sichtbar war das positive Signal durch die Antikörper gegen humanes PHD2 im Zelllysat der mP2 KD + hP2-Zelllinie, welches in den anderen Linien klar negativ blieb. Die Signale beim murinen PHD2 zeigten, dass der *knockdown* der Linie mP2 KD noch vorhanden war, auch die rekonstituierte Linie mP2 KD + hP2 wies ein deutlich reduziertes Signal für murines PHD2 auf. In der *knockdown*-Kontrolle hP2 KD war das Signal etwa so stark wie beim WT. Die ebenfalls aus der *knockdown*-Linie erstellte Rekonstitutionskontrolle mP2 KD + GFP besaß im Vergleich mit den anderen mP2 KD Linien eine höhere Konzentration an murinem PHD2 im Zytoplasma. Die HIF-1α-Werte zeigten sich, wie auch bei der mP2 KD-Linie, deutlich erhöht im Vergleich zum Wildtyp und den hP2 KD-Zellen. Die hohen HIF-1α-Level wie der Wildtyp unter Hypoxie wurden allerdings nicht erreicht. Die HIF-1α-Level der Rekonstitution befanden sich auf denen des Wildtyps.

In der qPCR zeigte die Rekonstitutionslinie mP2 KD + hP2 eine 50- bis 60-fache Steigerung an humanem PHD2, wobei die Signale im WT eher als unspezifische Reaktionen gewertet werden mussten. Die Rekonstitution ist also auch auf RNA-Ebene deutlich. Anhand der detektierten Menge an β-Aktin ist gut zu erkennen, dass alle Proben in etwa gleicher Menge aufgetragen wurden.

3.4.2 Folgen der PHD2 Rekonstitution

Es ist von zentraler Bedeutung zu wissen, ob die Expressionsstärke der HIF Zielgene in der Rekonstitution mit dem Wildtyp vergleichbar ist. Daher wurde die Expression von PHD2 und anderen typischen Zielgenen von HIF unter Normoxie und Hypoxie mittels RT-PCR ermittelt.

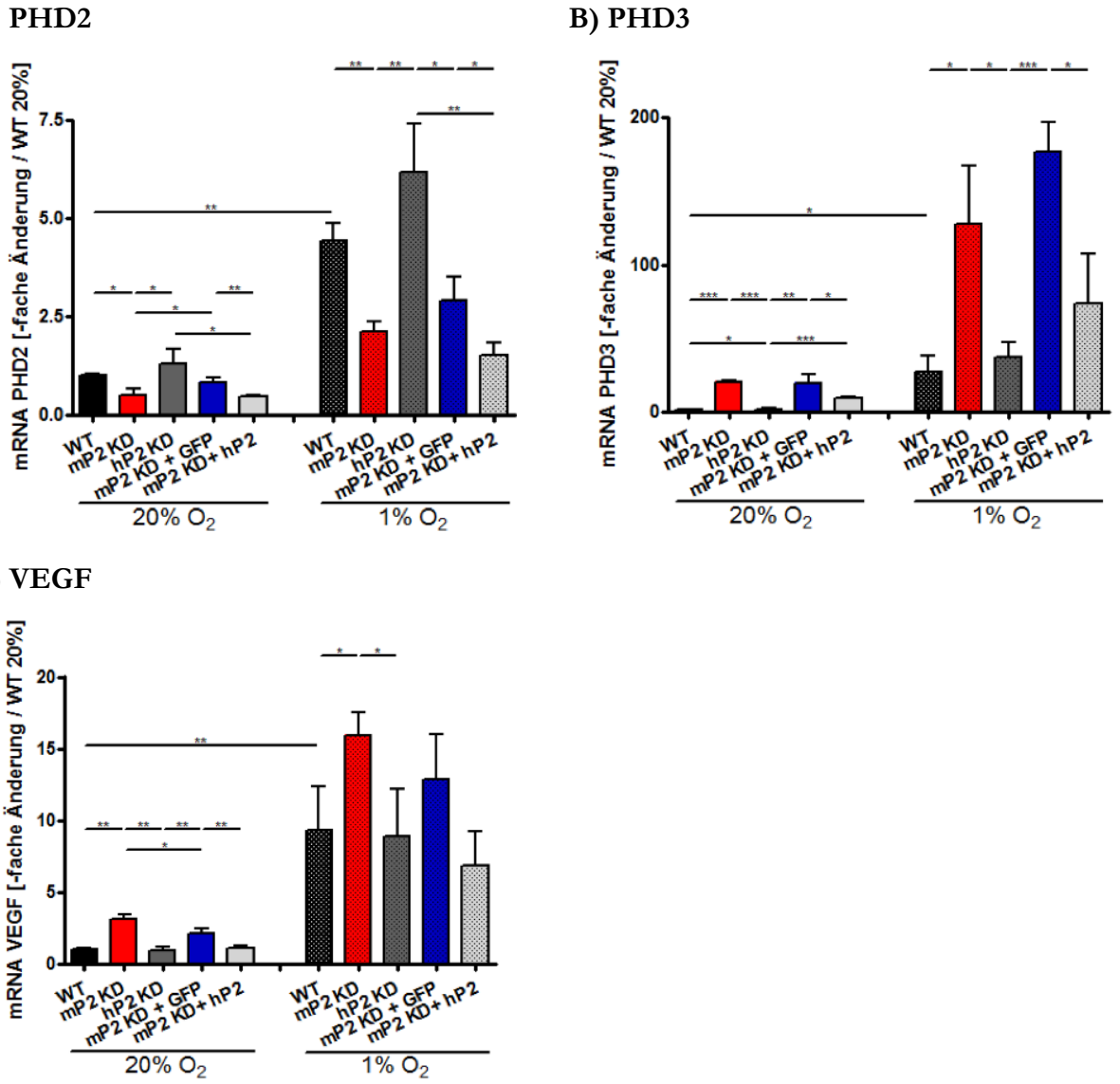


Abbildung 24: Die Rekonstitution von PHD2 in mP2 KD RAW-Zellen führt unter Normoxie und Hypoxie zu einem normalisierten Expressionsmuster von HIF-Zielgenen

RAW-Zellen wurden stabil mit shRNA gegen murines PHD2 transduziert (mP2 KD) und mit humanem PHD wieder rekonstituiert (mP2 KD + hP2). Als Kontrollen dienten die unbehandelte Zelllinie (WT) sowie *knockdown*-Zellen, die mit shRNA gegen humanes, in diesen Zellen nicht vorhandenem PHD2 (hP2 KD) oder mit GFP (mP2 KD + GFP) transduziert worden waren. Die mRNA-Expression von murinem PHD2, PHD3 und VEGF wurde mittels quantitativer RT-PCR gemessen und mit dem Referenzgen mS12 abgeglichen. Gezeigt sind die Mittelwerte biologischer Triplikate ± SD. * = $p < 0{,}05$; ** = $p < 0{,}01$; *** = $p < 0{,}001$.

In Bezug auf PHD2 zeigte sich eine Reduktion der *knockdown*-Zelllinie mP2 KD um etwa die Hälfte gegenüber dem Wildtyp. Die PHD2-Level der Rekonstitutionslinie mP2 KD + hP2 waren mit denen des *knockdowns* gut vergleichbar. Wie bereits aus dem *Western Blot* (siehe 3.4.1) zu entnehmen, lag der PHD2 *knockdown* bei der Rekonstitutionskontrolle mP2 KD + GFP nur vermindert vor, die Menge an detektierter PHD2-RNA war um etwa 20 % geringer als beim Wildtyp. Die *knockdown*-Kontrolle unterschied sich in der PHD2-Proteinmenge nicht signifikant vom Wildtyp. Unter Hypoxie zeigte sich eine fast 5-fache Erhöhung an detektierbarer PHD2 mRNA im Zytoplasma aller untersuchten RAW-Zelllinien, wobei die Unterschiede zueinander identisch blieben.

Bei PHD3 zeigte sich, bedingt durch die erhöhte Transkriptionsaktivität von HIF-1 unter PHD2-Defizienz, ein anderes Bild. Die *knockdown*-Zelllinie mP2 KD wies ca. 20-mal höhere PHD3 Level auf als der Wildtyp unter Normoxie. Ebenso verhielt es sich mit der *knockdown*-Kontrolle und der Rekonstitutionskontrolle. Die Linie mP2 KD + GFP unterschied sich nicht signifikant vom *knockdown* und hatte eine 20-fach erhöhte PHD3-mRNA-Konzentration, verglichen mit Wildtyp und Kontrolle, deren PHD3-mRNA-Level mit denen des Wildtyps vergleichbar waren. Interessant war die Rekonstitutionszelllinie mP2 KD + hP2. Bei ihr konnten im Vergleich zum Wildtyp und zur *knockdown*-Kontrolle nur geringfügig erhöhte Konzentrationen der mRNA von PHD3 gemessen werden. Das eingebrachte humane PHD2 hatte also eine signifikante Aktivität, was in Unterschieden der mRNA-Expression der HIF-1 Zielgene messbar wurde. Unter Hypoxie zeigten sich etwa 25-mal höhere Level an PHD3 mRNA in Wildtypzellen, verglichen mit den normoxischen Messungen, höhere Werte also als unter *knockdown*, wo sie nur auf das 20-fache der gemessenen Werte stiegen.

Die PHD3 mRNA-Konzentration des *knockdowns* und der Rekonstitutionskontrolle blieben signifikant erhöht, in Hypoxie erfolgte lediglich eine Steigerung auf das 6- bis 7-fache.

In der Messung der VEGF mRNA Konzentration zeigte sich ein ähnlicher Zusammenhang. Die in der *knockdown* Zelllinie messbaren Mengen waren im Vergleich zum Wildtyp etwa 3-fach erhöht, die der Rekonstitutionskontrolle 2-fach, während die *knockdown*-Kontrolle keinen signifikanten Unterschied aufwies. Dies galt hier auch für die Rekonstitutionslinie mP2 KD + hP2. Die einzig signifikanten Unterschiede wies die *knockdown*-Linie gegenüber dem Wildtyp und der *knockdown*-Kontrolle auf (siehe Abbildung 24).

3.4.3 Zellmorphologie von RAW-Zellen in Abhängigkeit von der PHD2-Expression

Bei Makrophagen hängen Morphologie und Migrationsverhalten eng zusammen (Ma und Baumgartner 2013). Daher ist auch eine eventuelle Änderung der Zellmorphologie wegweisend

im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung des Zytoskeletts, was eine Beeinflussung von Zellkontakten oder Mikrotubulisystem wahrscheinlich macht. Daher wurde der Anteil der pseudopodienbildenden Zellen gemessen.

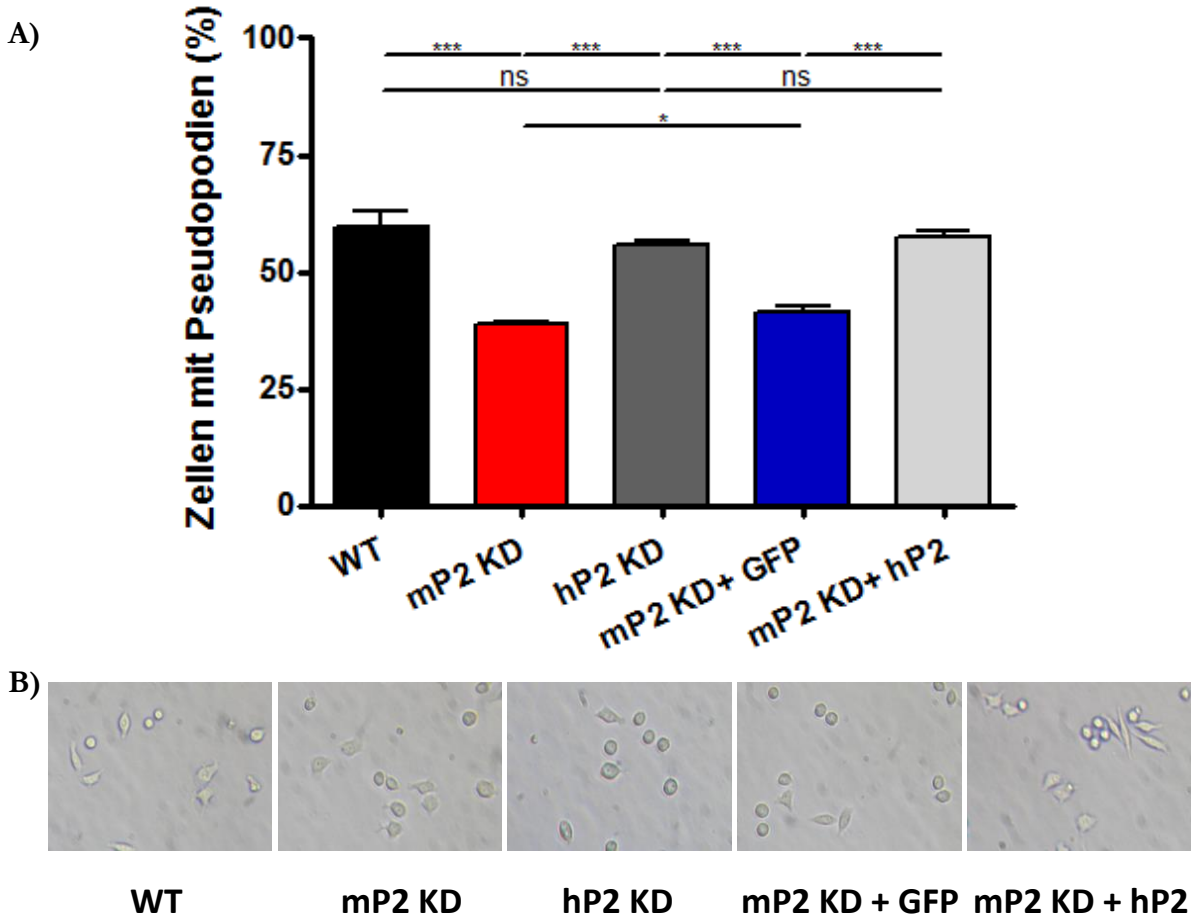


Abbildung 25: Der *knockdown* von PHD2 in RAW-Zellen hat Einfluss auf deren Zellmorphologie

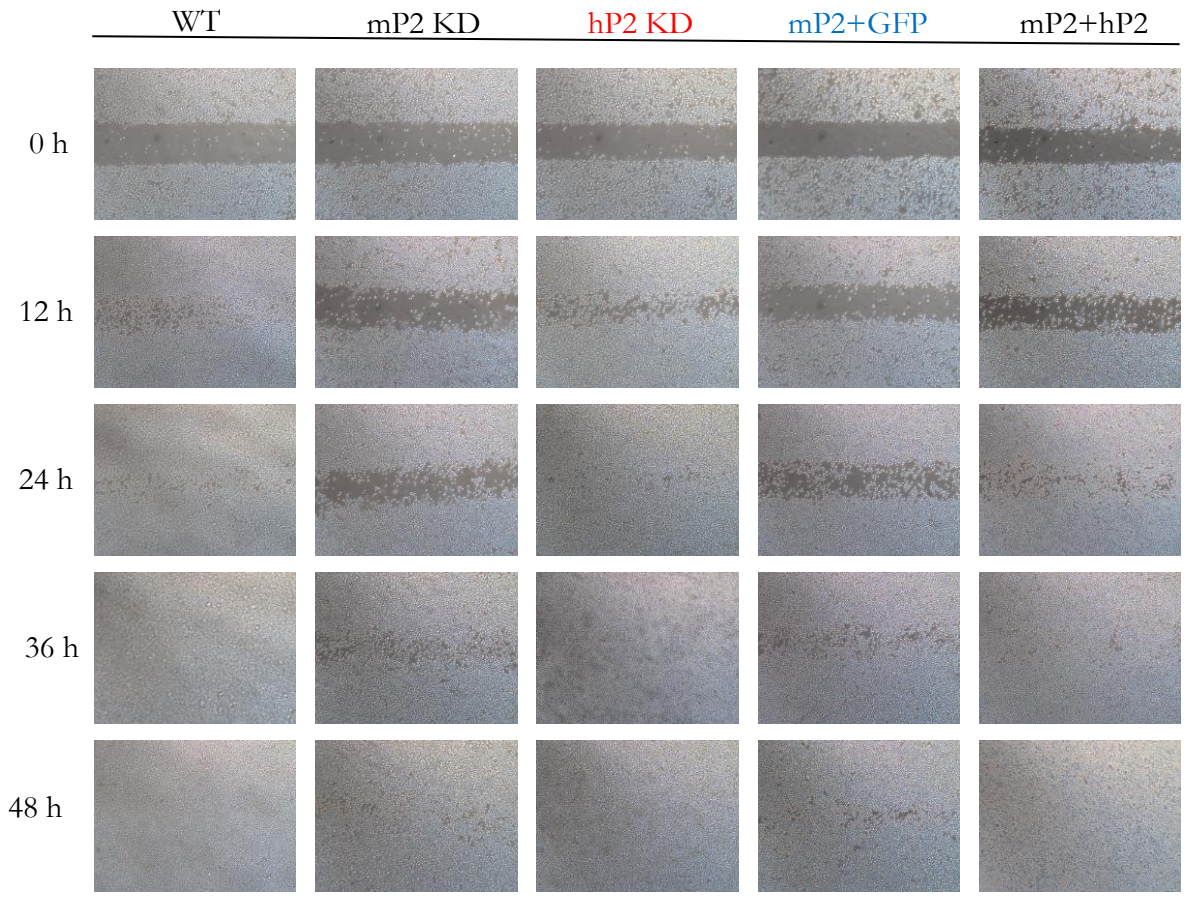
(A) Die Zelllinien wurden zwei Tage nach Aussaat fotografiert. Die Anzahl der Zellen mit Pseudopodien wurde in Verhältnis mit der Gesamtzellzahl gebracht. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte der Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche mit je 25 Bildern ± SD. (B) Exemplarische Darstellung der beobachteten Zellmorphologie. * = $p < 0{,}05$; *** = $p < 0{,}001$.

In der lichtmikroskopischen Aufnahme wurde zwischen Zellen mit und ohne ausgebildete Pseudopodien unterschieden. Hier zeigte sich, dass im Wildtyp etwa 60 % der Zellen Scheinfüßchen ausgebildet hatten. Dasselbe galt für die *knockdown*-Kontrolle hP2 KD und die Rekonstitution mP2 KD + hP2-Zellen (siehe Abbildung 25). Beide Zelllinien zeigten trotz geringer Standardabweichungen keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Die Zahl der Makrophagen mit Pseudopodien war beim *knockdown* der RAW-Linie um etwa ein Drittel auf 40 % aller Zellen vermindert. Im Vergleich zu den drei genannten Linien ergab sich ein

hochsignifikanter Unterschied. Der Anteil an Zellen mit Scheinfüßchen unterschied sich in der Rekonstitutionskontrolle mP2 KD + GFP nur wenig vom *knockdown*, jedoch ergab sich auch hier ein signifikanter Unterschied. Dies könnte am verringerten *knockdown* in dieser Linie liegen (vgl. Abbildung 23).

3.4.4 Einfluss der Rekonstitution auf *Scratch Assay*

Es wurde gezeigt, dass die RAW-PHD2-*knockdown*-Zellen unbewachsene Flächen im S*cratch Assay* signifikant langsamer als der Wildtyp besiedeln. Daher wurde überprüft, ob der Effekt durch die Rekonstitution von PHD2 reversibel ist.


WT
mP2 KD
hP2 KD
mP2+GFP
mP2+hP2
0 h
12 h
24 h
36 h
48 h

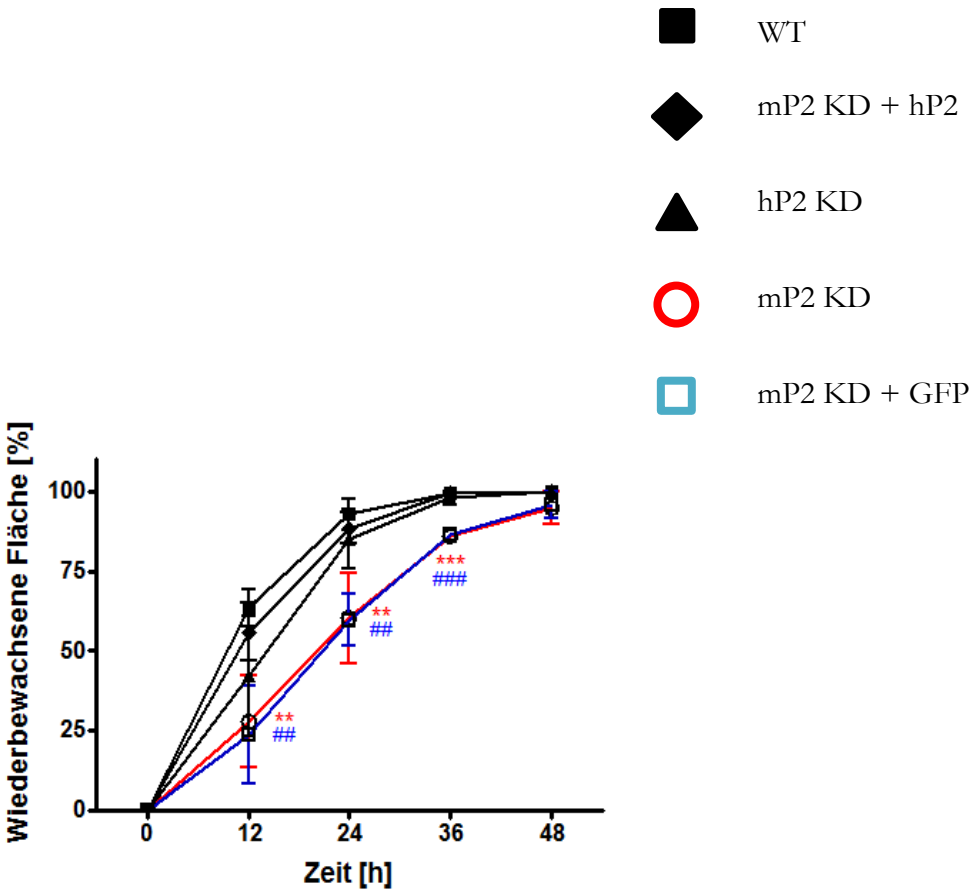


Abbildung 26: Eine PHD2-Rekonstitution führt zum Rückgang des Effekts bei der Wiederbesiedelung im *Scratch Assay* bei RAW-Zellen

Die RAW-Zellen konnten 24 h in einer 6-Wellplatte anwachsen. Danach wurde ein Bereich in der zu 90 % konfluenten Kultur mit einer 200 µl Pipettenspitze abgeschabt und der Verlauf der Wiederbesiedelung alle 12 h fotografiert. Die nach 24 h wieder bewachsene Fläche wurde mit der Fläche des ursprünglichen *Scratches* in Verhältnis gebracht. Gezeigt ist die Interassayvarianz dreier unabhängiger Versuche, jeder jeweils mit achtzehn gleichwertigen Verläufen ± SD. Signifikanzen beziehen sich auf den Wildtyp. ** /## = $p < 0{,}01$; *** /### = $p < 0{,}001$.

Im *Scratch Assay* der RAW-Zelllinien zeigte sich über 48 h eine Wiederbesiedelung des WT von etwa 60 % nach 12 h. Nach 24 h war die Fläche bereits zu 90 % bewachsen und nach 36 und 48 h zu fast 100 %. Die Mittelwerte der *knockdown*-Kontrolle hP2 KD und Rekonstitution mP2 KD + hP2 verliefen ähnlich und wiesen im Vergleich keine signifikanten Änderungen zu keinem der erfassten Zeitpunkte auf. Die Zelllinien mP2 KD und die Rekonstitutionskontrolle mP2 KD + GFP wiesen ein sehr ähnliches Wiederbesiedelungsmuster auf. 12 h nach Versuchsbeginn betrug der Anteil an wiederbewachsener Fläche nur 25 %, nach 24 h 55 % und nach 36 h 80 % (siehe Abbildung 26).

3.4.5 Auswirkungen der Rekonstitution auf Proliferation

Wie erwähnt könnten im *Scratch Assay* in der Wiederbesiedelung freier Flächen aufgetretene Unterschiede (siehe 3.3.2) auch auf eine veränderte Teilungsgeschwindigkeit zurückzuführen sein. Um diesen Einfluss auch bei den Zellen mit rekonstituierter PHD2-Expression auszuschließen, wurde die Verdopplungszeit der einzelnen Zelllinien bestimmt.

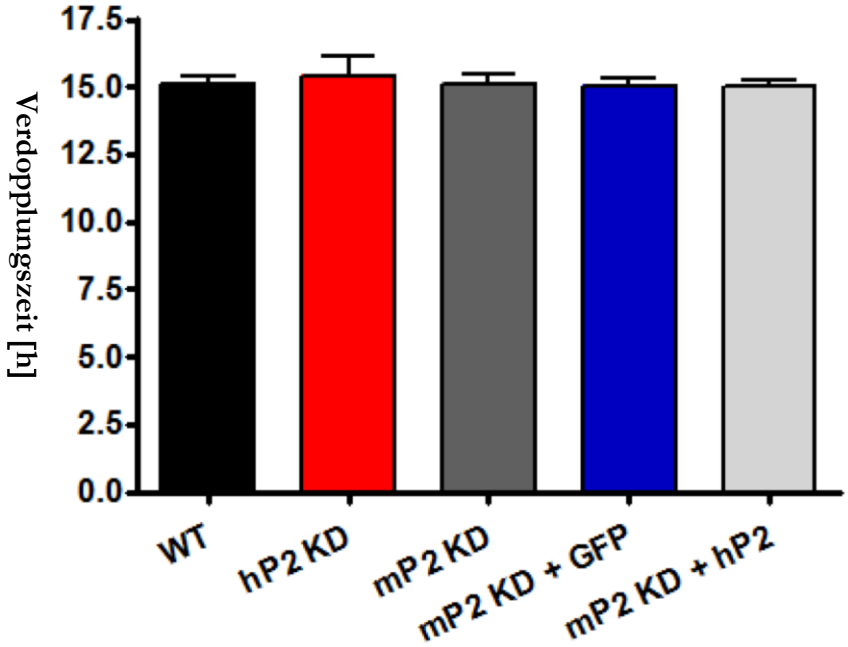


Abbildung 27: Eine Rekonstitution der PHD2-Expression hat keine Auswirkungen auf die Proliferation der RAW-Makrophagenzelllinien

RAW-Zellen aller erstellten Zelllinien wurden ausgesät und über vier Tage täglich gezählt. Gezeigt ist die Interassayvarianz, gebildet aus den Mittelwerten biologisch gleicher Messungen (n = 6) ± SD dreier unabhängiger Experimente.

Davon ausgehend, dass sich sowohl bei RAW alle Zellen in gleichen Abständen mitotisch geteilt hatten, wurde im *log* Zeitraum des *in vitro* Zellwachstums für alle Zelllinien eine Verdopplungszeit von etwa 17 h errechnet. Weder bei RAW- noch bei J774-Zellen zeigte sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen der *knockdown*-Zelllinie mP2 KD, der Rekonstitutionskontrolle mP2 KD + GFP und dem Wildtyp oder Transduktionskontrolle (hP2 KD) bzw. der Rekonstitution (mP2 KD + hP2).

4 Diskussion

Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Abwehr und stellen ein zentrales Bindeglied zum adaptiven Immunsystem dar. Im Vorgang der Wundheilung sind die von ihnen produzierten Zytokine sowie phagozytotischen, antibakteriellen und reorganisierenden Funktionen unabdingbar. Im Rahmen von Tumorerkrankungen tragen sie aufgrund dieser Funktionen als sogenannte tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) oftmals zum Fortschreiten eines soliden Malignoms bei. Daher stellen sie ein mögliches Ziel der onkologischen Therapie dar.

Sowohl in Wunden und Entzündungen als auch im Umfeld der meisten Tumoren herrscht Sauerstoffmangel. HIF ist der zentrale Transkriptionsfaktor für die Anpassung von Körperzellen an Sauerstoffmangel und vermittelt auch die reaktiven Funktionen der Makrophagen und ihrer Vorläuferzellen.

Prolyl-4-Hydroxylasen sind durch ihre Möglichkeit, HIF unter Vorkommen von Sauerstoff zu modifizieren und somit dem proteasomalen Abbau zuzuführen, ein zentrales Instrument eukaryotischer Zellen, die HIFα-Stabilität unter Normoxie negativ zu regulieren. Aufgrund der zahlreichen Effekte von HIF in pathologischen Vorgängen sind sie daher ein mögliches Ziel für Medikamentenwirkungen (Xia *et al.* 2012). Speziell bei Makrophagen gibt es wenige Anhaltspunkte der Wirkung einer PHD-Beeinflussung. Im Hinblick auf die Möglichkeit, Makrophagen verschiedener Polarisation, wie zum Beispiel die tumorproliferativen TAMs, gezielt pharmakologisch zu treffen, kommt dem große Bedeutung zu (Cieslewicz *et al.* 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen eines PHD2-*knockdowns* auf die murinen Makrophagenzelllinien RAW 264.7 und J774A.1 untersucht und mit den Auswirkungen von Hypoxie verglichen. Dadurch können Folgen und Sinn einer pharmakologischen PHD2-Beeinflussung beurteilt und in Abgleich mit HIF-*knockdown*-Studien auch Hinweise auf HIF-unabhängige Effekte gefunden werden. Auch der Gewinn weiterer Erkenntnisse über die in der Literatur bisher weitgehend auf den Transkriptionsfaktor beschränkte Wirkung von PHD2 war ein Ziel dieser Arbeit.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die ausgewählten Zelllinien im Wildtyp in Hypoxie regelrecht verhalten: Ursächlich hierfür ist das Enzym PHD2. Es hydroxyliert HIF-1α am Pro^{402} und Pro^{564} innerhalb der ODDD und markiert es somit für die Polyubiquitinierung durch pVHL. Daraufhin erfolgt die proteasomale Degradation von HIF-1α. Unter Normoxie (20 % O_2) steht PHD2 genug Sauerstoff zur Verfügung, um HIF-1α effizient zu hydroxylieren, was zur Erkennung des pVHL-Komplexes und damit zum regelmäßigen Abbau des Transkriptionsfaktors führt. Daher ist es unter Normoxie nur schwach nachweisbar. Unter den

gegebenen hypoxischen Bedingungen (1 % O_2) steht PHD2, bedingt durch seinen hohen K_M-Wert, nicht genug gelöster O_2 zur Verfügung, um HIF-1α zu hydroxylieren. Aus diesem Grund ist der HIF-1α-Proteinlevel in den untersuchten Zelllinien unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen erhöht.

In der weiterhin durchgeführten qPCR konnte gezeigt werden, dass sich der quantitative Unterschied auch in der Transkription bekannter HIF-1-Zielgene niederschlägt. Auch die gemessenen Proteinmengen von PHD3 und GLUT-1 waren in Hypoxie um ein Vielfaches höher als unter Normoxie. Auch der für andere Zellen vorbeschriebene negative Feedback Mechanismus durch verstärkte Expression von PHD2 konnte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Die physiologische Reaktion der RAW- und J774-Zellen war eine gegebene Voraussetzung für die Verwendung in dieser Arbeit.

Im Folgenden wurden für RAW- und J774-Zellen PHD2-*knockdown*-Linien erstellt. Hier konnte zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung für RAW-Zellen eine Verminderung der PHD2 Konzentration auf etwa 60 %, beim J774-*knockdown* auf 40 % im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Die *knockdown*-Effizienz war damit sehr niedrig, verglichen mit Veröffentlichungen, welche mit der shRNA Technik mit 60-80 % Verminderung weitaus geringere mRNA-Level der Zielgene erreichten (vgl. Svoboda *et al.* 2001). Ein Grund hierfür könnten die gewählten RAW- und J774-Zellen sein, welche wie andere immortalisierte Makrophagenlinien eine schlechte Transduktionseffizienz aufweisen (Burke *et al.* 2002). Des Weiteren erfolgte die Optimierung der bis Beginn der Arbeit nicht etablierten Versuche nach der Erstellung der *knockdown*-Zelllinien und Rekonstitutionen. Auch die PHD2-*Western Blots* waren mit der zunächst benutzten Charge an mPHD2-Antikörpern lange nicht zufriedenstellend durchführbar. Die hier gezeigten Daten wurden bis zu drei Jahre nach Transfektion erhoben. Trotz Kryokonservierung lagen zwischen 1,5 und 5 Wochen in Kultur mit Umsetzen und erneuter Antibiotikaselektion zwischen Erstellung und Versuchsdurchführung. Die zur Darstellung gewählten qPCRs zur *knockdown*-Effizienz stammen aus Validitätsgründen wie auch die *Boyden Chamber* und *Scratch Assay* Daten aus späten Kulturen. In dieser Zeit kann es zur Resistenzbildung nicht transduzierter Zellen gegen die angewandten Antibiotika gekommen sein. Eine weitere Möglichkeit ist der Verlust des jeweils eingebrachten shRNA-Gens ohne Resistenzverlust. Auch eine Kontamination zwischen transduzierten und damit mit Resistenz versehenen, aber nicht genetisch identischen Zelllinien ist nicht auszuschließen.

Im *Western Blot* zeigte sich, dass der *knockdown* auch auf Proteinebene darstellbar ist. Die PHD2-Reduktion führte bei RAW-Zellen zu einer starken HIF-1α-Stabilisierung, welche jedoch nicht so stark wie die im WT unter Hypoxie war. Im Western Blot von J774-Lysat war PHD2 nicht nachweisbar, eine deutliche Stabilisierung von HIF-1α konnte jedoch trotz der im Vergleich

zu RAW-Zellen geringeren PHD2 Konzentration auch in anderen *Blots* nicht nachgewiesen werden. In der qPCR zu den HIF-1α-Zielgenen zeigte sich bei den RAW-Zellen ein erwartetes Expressionsprofil, in dem in der *knockdown*-Zelllinie bei erhöhter HIF-1α-Menge die HIF-1-Zielgene VEGF, GLUT-1 und PHD3 um ein Vielfaches stärker exprimiert wurden. Bei nur geringfügig erhöhter HIF-1α-Expression im J774-*knockdown* zeigten sich auch keine signifikant gesteigerten Mengen an VEGF oder GLUT-1. PHD3 hingegen zeigte eine stark erhöhte Expression. Dies könnte als Kompensationsmechanismus gedeutet werden, bei dem in J774-Zellen die PHD3-Expression durch HIF-1 Stabilisierung nach Verlust von PHD2 gesteigert wird, um unter Normoxie die HIF-1α-Level im Sinne einer negativen Rückkopplung gering zu halten. PHD2 wird als Hauptregulator von HIF angesehen (Berra *et al.* 2003), PHD3 spielt eine wichtige Rolle unter andauernden und schweren Hypoxien (Appelhoff *et al.* 2004; Ginouvès *et al.* 2008). Swain *et al.* zeigten jedoch umgekehrt, dass ein PHD3-*knockdown* keine Auswirkung auf HIF-1α-Stabilisierung oder Expression der Zielgene hatte. Auch beobachteten sie keine Kompensation durch PHD2 (Swain *et al.* 2014) bei Makrophagen, die aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Mäusen differenziert wurden (*bone marrow derived macrophages*, BMDM). Dies spricht gegen einen bestehenden Kompensationsmechanismus der HIF-spezifischen Prolyl-Hydroxylasen untereinander. Auch ein zelllinien- oder klonspezifischer Effekt ist im Rahmen dieser Arbeit nicht auszuschließen.

Zur Überprüfung der in dieser Arbeit festgestellten signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und *knockdown*-Zellen wurde ein PHD2-Rekonstitutionsklon mit weiterer Kontrolle erstellt. Hier zeigten sich im *Western Blot* ein erhaltener PHD2-*knockdown* sowie regelhafte HIF-1α-Proteinlevel. Mittels qPCR konnte die eingebrachte humane PHD2-Variante eindeutig nachgewiesen werden. In der Rekonstitutionskontrolle zeigte sich ein verminderter *knockdown* bei erhaltener HIF-1α-Stabilisierung. In der Folge wurden qPCRs mit den Zelllinien durchgeführt. Hier zeigte sich äquivalent zu den Proteinuntersuchungen ein erhaltener *knockdown* des murinen PHD2 in der Rekonstitution und relativ dazu leicht auf etwa 70 % erhöhte mPHD2-RNA-Level in der Kontrolle. Die HIF-Zielgene PHD3 und VEGF wurden ebenfalls untersucht und es konnten erhöhte RNA-Spiegel im *knockdown* und der Rekonstitutionskontrolle nachgewiesen werden. In der Rekonstitution waren die PHD3-RNA-Level niedriger als in den *knockdown*-Linien, jedoch auch signifikant höher im Vergleich zum Wildtyp und der *knockdown*-Kontrolle, während sich für VEGF kein bedeutsamer Unterschied ergab. Dies könnte u.a. daran liegen, dass die VEGF-mRNA-Level auch sonst keinen vergleichbar starken Anstieg wie PHD3 gezeigt hatten und ein eventueller Unterschied daher aufgrund der Messungenauigkeit nicht signifikant wirkt. Auch unter Hypoxie fällt die Erhöhung der VEGF-Level nicht vergleichbar stark aus wie bei PHD3. Die Konzentration von detektierbarer VEGF-mRNA steigt hier nur auf das etwa 9-

fache beim Wildtyp. Die verringerte Expression von HIF-1-Zielgenen liegt vermutlich an der eingebrachten humanen PHD2-Variante, die HIF-1α wieder hydroxyliert, somit dem Abbau zuführt und dadurch die verringerte Aktivität des murinen PHD2 ausgleicht. Alle qPCR-Messungen wurden zudem auch nach Inkubation der Zellen in Hypoxie durchgeführt. In diesen zeigten sich dieselben relativen Änderungen wie in Normoxie: Der PHD2-*knockdown* bestand auch hier weiterhin in mP2KD sowie der PHD2-Rekonstitution und ihrer Kontrolle. In ihnen wurden in der Folge mehr PHD3 und VEGF gemessen. Es ergab sich im Vergleich mit den Messungen nach Normoxie eine Verminderung der relativen Unterschiede zwischen den verschiedenen Klonen: In Hypoxie stiegen die absoluten Werte der HIF-1-Zielgene auf bis das 20-fache der Normoxiewerte an. In Hypoxie und *knockdown*, also unter in dieser Versuchsreihe maximaler Stimulation, erfolgte lediglich eine um das 7-8-fach erhöhte Transkription der HIF-1-Zielgene. Möglicherweise ist hier ein Maximum der HIF-1-Transkriptionsaktivität erreicht.

Im migrationsspezifischen *Boyden Chamber Assay* zeigte sich keine signifikante Änderung der Migrationsrate des *knockdowns* gegenüber dem Wildtyp. Obwohl mit MDA-MB-Zellen und FCS eine gerichtete Migration von Makrophagen durch die poröse Membran induziert werden konnte, führten auch ausführliche Protokollanpassungen zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Klonen. Im *Scratch Assay* dagegen zeigte sich in der RAW-Versuchsreihe eine signifikante Verlangsamung der Wiederbesiedelung im *knockdown*, welche sich in der erstellten PHD2-Rekonstitution verlor und in der Rekonstitutionskontrolle erhalten blieb. Damit kann ein PHD2-*knockdown*-spezifischer Effekt angenommen werden. In den J774-Zellen aber zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die einfachste Erklärung für einen auftretenden Unterschied zwischen den Zelllinien in beiden Versuchen könnte eine durch den PHD2-*knockdown* verminderte Proliferation sein, denn der *Scratch Assay* verlief über einen längeren Zeitraum. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten jedoch weder bei RAW- noch J774-Zellen einen signifikanten Unterschied der Proliferation. In der Literatur findet sich kein Hinweis einer direkten Beeinflussung von PHD2 auf die Proliferation von Zellen. Dem durch einen PHD2-*knockdown* verstärkt exprimierten PHD3 wird aber unter normoxischen Bedingungen ein proapoptotischer Effekt bescheinigt, während es unter Hypoxie proliferatorische Wirkung zu haben scheint (Jaakkola und Rantanen 2013). Bezüglich der Rolle von HIF-1α lassen sich unterschiedliche Ergebnisse finden. So beobachteten Su *et al.* eine Verminderte Proliferation von MCF-7-Zellen im HIF-1α *knockdown* mittels *short interfering* (siRNA, Su K *et al.* 2012), während Vogel *et al.* keinen Unterschied im Tetrazyklin induzierten siRNA-*knockdown* bei HeLa-Zellen beschreiben (Vogel *et al.* 2010). Im Hinblick auf die Verdoppflungszeit der Zelllinien ergab sich in dieser Arbeit für keine der erstellten Zelllinien ein signifikanter Unterschied zum RAW- oder J774-Wildtyp.

In Zusammenschau zeigt sich für die RAW-Zelllinie im *Scratch Assay* ein deutlich signifikanter Unterschied, während sich in der *Boyden Chamber*-Versuchsreihe keine Abweichung der Werte des *knockdown*-Klons, verglichen mit dem Wildtyp, ergibt. Es ist denkbar, dass der *Boyden Chamber Assay* nicht sensitiv genug ist, um bedeutsame Unterschiede in der Migration darzustellen, oder auch dass die *knockdown*-Effizienz des benutzten Klons zu gering war. Jedoch ergab der für den Nachweis einer Änderung der Migration weniger sensitive *Scratch Assay*, dass ein bedeutender Unterschied in der Wiederbesiedelungsgeschwindigkeit zwischen Wildtyp und *knockdown* besteht. Da der *Boyden Chamber Assay* auch als selektiv bezüglich der Detektion migratorischer Unterschiede zwischen Zellklonen angesehen werden kann, ist nicht auszuschließen, dass der aufgetretene Unterschied im *Scratch Assay* in anderen Ursachen als einer veränderten Migration begründet liegt. So ist eine Verringerung der Adhäsion denkbar, welche die Lösung der Makrophagen vom Plattenboden bedingt und so über nicht migrationsabhängige Vorgänge zum Anwachsen auf freien Oberflächen führt. Dadurch würde der *Scratch Assay* nachhaltiger betroffen werden als der *Boyden Chamber Assay*, für den eine gerichtete Migration zwingend stattfinden muss, um die Unterseite der Membran zu erreichen. Ein Nachweis der direkten Beeinflussung der Zellkontakte durch PHD2-*knockdown* konnte bereits erbracht werden (Vogel *et al.* 2010).

Interessant ist auch, dass sich in Bezug auf die Migration sowohl im *Scratch* als auch im *Boyden Chamber Assay* für die J774-Zelllinie keine signifikanten Unterschiede ergeben. Dies ist insbesondere bemerkenswert, da im J774-Klon sogar ein deutlich ausgeprägterer *knockdown* von PHD2 vorliegt als im RAW-*knockdown* Klon. Einen bedeutsamen Unterschied jedoch findet man in der HIF-1α-Stabilisierung, welche im J774-Klon kaum stattfindet. Da daher nur in der RAW-Linie geringere HIF Level vorliegen und auch nur bei dieser eine verminderte Migration beobachtet wird, kann man vermuten, dass es sich hier um einen HIF-spezifischen Effekt handelt. Es gibt viele Hinweise auf eine direkte Beteiligung von HIF an der Migration myeloischer Zellen (Cramer *et al.* 2003). Jedoch finden Vogel *et al.* in PHD2-*knockdown* HeLa-Zellen auch HIF-unabhängige Mechanismen, die zur Änderung des Verhaltens im *Scratch Assay* führen (Vogel *et al.* 2010). Tetrazyklin induzierbare PHD2-*knockdown* Zellen zeigten eine wesentlich schlechtere Wiederbesiedelung im *Scratch Assay*. Vogel *et al.* führen dies ausschließlich auf ein verändertes Migrationsverhalten zurück. Diese These wird durch von ihnen ebenfalls beobachtete Änderungen in der Struktur des Zytoskeletts gestützt, wo sie geänderte F-Aktinformationen, bedingt durch Beeinflussung des Rho Guanositriphosphat (GTP-)ase/Cofilinsignalwegs, beschreiben. Ähnliche Fehlregulationen von F-Aktin wurden mit einer verminderten Zellwanderung einer Brustkrebszelllinie in Verbindung gebracht (Olson and Sahai 2009). Aufgrund der vielfältigen Funktionen in der Zelle überrascht es nicht, dass auch ein starker

Zusammenhang zwischen F-Aktin und der Adhäsion von Zellen nachgewiesen wurde (Hong *et al.* 2013). Daher kann auch in dieser Arbeit ein durch verminderte Adhäsion bedingter Unterschied im unspezifischen *Scratch Assay* nicht ausgeschlossen werden, was die signifikanten Unterschiede zwischen RAW-Wildtyp und PHD2-*knockdown* erklären kann. Leider ist aus den Blots der Veröffentlichung von Hong *et al.* kein Zusammenhang zwischen den PHD2- und HIF-1α-Leveln ersichtlich.

Die in dieser Arbeit festgestellten Änderungen der Makrophagenmorphologie in der *knockdown*-Linie gegenüber Wildtyp und Rekonstitutionsklon sprechen ebenfalls für einen Zusammenhang der beobachteten verlangsamten Wiederbesiedelung im *Scratch Assay* unter PHD2-*knockdown*. Die Ergebnisse gehen mit den von Vogler *et al.* gemachten Erkenntnissen einher. Sie beobachteten unter 24-stündiger Hypoxie eine verminderte Migrationsgeschwindigkeit im *Scratch Assay*, konnten hier jedoch einen von HIF-unabhängigen Effekt nachweisen (Vogler *et al.* 2013). Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit die Veränderung des Zytoskeletts der Makrophagen nicht eingehend untersucht, doch zeigten RAW-Zellen im Wildtyp sowie in der PHD2-Rekonstitution eine höhere Neigung zur Pseudopodienbildung als der *knockdown*-Klon. Dies könnte ebenfalls ein Hinweis auf eine höhere Zytoskelettorganisation sein, die mit der Ordnung von F-Aktin zusammenhängt (Stricker *et al.* 2010). Vogler *et al.* unterscheiden weiterhin zwischen dem Migrationsverhalten von L929-Fibroblasten im *Scratch*- und im Einzelzellassay. Sie zeigen Evidenz, dass im Gegensatz zu Hypoxie die HIF-1α-Depletion der Fibroblasten die Migrationsneigung im Einzelzellassay vermindert. Da eine Depletion des Transkriptionsfaktors HIF-1α jedoch durch eine verminderte Transkription auch zu einer geringeren Expression des Zielgens PHD2 führt, kann im Hinblick auf die hier beobachteten Veränderungen ein mit der Verringerung der PHD2-Level bedingter Effekt nicht sicher ausgeschlossen werden.

In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen zu aus einem *Glioblastoma multiforme* isolierten Zellen interessant, welche unter siRNA-induzierter HIF-1α-Ausschaltung sowohl im *Scratch* als auch im *Boyden Chamber Assay* einen nur wenig migratorischen Phänotyp zeigen (Shen *et al.* 2013). Dies spricht gegen einen strikten Zusammenhang zwischen der PHD2-Expression und der Zellmigration in dieser Arbeit. Man beobachtet *in vivo* in Arealen mit vermindertem Sauerstoffangebot eine verstärkte Migration (Zhang *et al.* 2013; Yang *et al.* 2014) und verminderte interzelluläre sowie Zell-Matrixadhäsion (Esteban *et al.* 2006; Erler *et al.* 2006). Da auch diese Reaktionen als HIF-abhängig beschrieben wurden, sprechen die in dieser Arbeit widersprüchlichen Beobachtungen zum Migrationsverhalten in Zusammenschau für einen makrophagen- oder zelllinienspezifischen Effekt.

Die präsentierten Daten wurden insbesondere in Hinblick auf die *in-vitro*-Beeinflussung des Phänotyps, der Migration und molekularen Auswirkungen eines PHD2-*knockdowns* in zwei unterschiedlichen murinen Makrophagenzelllinien untersucht. Im Vergleich zwischen RAW- und J774-Zellen zeigte sich bereits auf molekularer Ebene ein Unterschied in der Beeinflussung von HIF-1α-Level durch einen PHD2-*knockdown*. Dies verdeutlicht die stets vorhandene Möglichkeit klonspezifischer Auswirkungen auf die Untersuchungsergebnisse. Die oben jeweils hervorgehobenen Unterschiede zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und anderen Veröffentlichungen zeigen das ebenso wie die Tatsache, dass häufig nicht-myeloische Zellreihen verwendet wurden. Auch wenn es sich beim HIF-Signalweg, genauso wie bei Migration und Proliferation, die weitergehend untersucht wurden, um eine sehr grundlegende Zellfunktion handelt, so sind gewebe- und zellartspezifische Effekte nicht ausgeschlossen.

Des Weiteren sind beide Zelllinien immortalisierte Hybriden, die bereits seit einigen Jahrzehnten isoliert sind und eine unbekannte Anzahl an Zellzyklen durchlaufen haben. Dadurch ausgelesene Überlebensvorteile sind nicht unwahrscheinlich und können zur Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse führen. Beide Punkte verdeutlichen die Notwendigkeit einer Fortführung der Experimente mit BMDM *in vitro*. Auch *in vivo* Untersuchungen wären möglich, so wäre beispielsweise ein granulo- und monozytenspezifischer *knockout* mittels LysM Cre-Rekombination möglich (Goren *et al.* 2009).

Geht man davon aus, dass die hier gezeigten signifikanten Ergebnisse eine Folge der modifizierten PHD2-Level sind, so zeigt dies, dass eine differenziertere Sicht auf Experimente zum Transkriptionsfaktor HIF nötig ist.

Weiterhin wird klar, dass in Studien, welche sich auf HIF konzentrieren, häufig ein möglicher PHD2-induzierter Effekt vernachlässigt wird. Zum einen ist PHD2 wie auch die anderen PHDs ein HIF Zielgen. Unter Hypoxie fehlt der Hydroxylase zwar ein wichtiges Substrat, es gibt aber Hinweise darauf, dass unter chronischer Hypoxie eine Steigerung der intrazellulären enzymatischen Aktivität durch eine gesteigerte Expression von HIF-1α stattfindet (Ginouvès *et al.* 2008). Zudem kann auch unter nicht hypoxischen Bedingungen eine HIF-Stabilisierung stattfinden (Kuschel *et al.* 2012). Daher könnten die Prolyl-Hydroxylasen für einige HIF-assoziierte Wirkungen verantwortlich sein. Im Rahmen der Forschung hinsichtlich PHD-spezifischer Pharmazeutika, welche im Augenblick nur mit Hoffnung auf eine spezifische HIF-Beeinflussung entwickelt werden, ist dies von hoher Relevanz und gibt Anlass zu weiterer *in-vitro*-Forschung mit *knockout*-Modellen, bevor in diese Richtung weitergedacht werden kann. Jedoch könnten auch umgekehrt im Tiermodell eingesetzte PHD2-Hemmstoffe Rückschlüsse auf eventuelle PHD2-spezifische Effekte bieten. Eleganter wären aber vorhergehende PHD2-

knockout oder Überexpressionsmodelle *in vitro* mit kombiniertem HIF-1α-*knockout* unter Hyp- und Normoxie. So könnte zwischen PHD2- und HIF-1α spezifischen Effekten differenziert werden.

Diese Arbeit zeigt, dass vor einem möglichen pharmakologischen Einsatz von HIF-Modulatoren weitere Studien zu den gewebe- und zellspezifischen Wirkungen von HIF und PHD2 durchgeführt werden müssen. Zum einen kann die systemische Beeinflussung eines derart grundlegenden Transkriptionsfaktors wie HIF durch PHD2 nicht nebenwirkungsfrei sein; zum anderen ist eine zellspezifische Beeinflussung des ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktors wichtig. Wie in dieser Arbeit gezeigt, kann eine PHD2-Beeinflussung auch die Migration oder Adhäsion myeloischer Zellen im Sinne einer unerwünschten Arzneimittelwirkung ändern. So könnte z.B. die zur Anämiebehandlung nötige HIFα-Stabilisierung einen ungünstigen Einfluss auf die Proliferation von Tumoren haben. Ein durch eine gestiegene Erythropoietin-Produktion erzielter Effekt wäre jedoch auch bei Tumoranämien interessant.

Die Übertragbarkeit einer *in vivo* stattfindenden Hypoxie von den in dieser Arbeit dargelegten Ergebnissen ist aus den oben genannten Gründen möglicher PHD2-spezifischer Effekte nicht möglich. Zwar ist auch *in vivo* eine verminderte Migration von Zellen des monozytären Systems gezeigt worden. Dies führte zu der Vermutung eines „*trappings*“ von Makrophagen in hypoxischen Arealen, nach der sich diese, stochastisch normal verteilt, durch ausbleibende Wanderung in diesen Gebieten ansammeln. Vermutlich jedoch spielen andere Faktoren eine weitaus wichtigere Rolle, wie z.B. der in letzter Zeit verstärkt untersuchte und unter Hypoxie verstärkt exprimierte *migration inhibitory factor* (Fu *et al.* 2010) sowie eine gerichtete Migration entlang der Sauerstoffgradienten und verstärkte Extravasation (Murdoch *et al.* 2004). Auch die explizit unter hypoxischen Bedingungen ausgeführten Versuche sind nicht auf *in-vivo*-Verhältnisse übertragbar, da sich die Partialdrücke zu stark unterscheiden und die *in vitro* als normoxisch geltenden Werte im menschlichen Körper so gut wie nicht vorkommen (Semenza 2001).

Dennoch können die hier gewonnenen Ergebnisse zu einem besseren Verständnis des Verhaltens von Makrophagen in Hypoxie führen und legen einen Grundstock für weiterführende Experimente.

5 Zusammenfassung

HIF-1 ist ein unabdingbarer Transkriptionsfaktor für die Makrophagenfunktion, da diese zu großen Teilen in hypoxischen Geweben stattfindet. Seine α-Untereinheit wird von Prolyl-4-Hydroxylase-Domäne-Enzymen sauerstoffabhängig für den proteasomalen Abbau markiert, weswegen HIF-1α unter Sauerstoffmangel stabilisiert wird und daher eine verstärkte transkriptionelle Aktivität zeigt. Der Hauptmediator der HIF-1-Hydroxylierung ist PHD2, dessen Funktion noch nicht abschließend verstanden ist, da es Hinweise auf HIF-1-unabhängige Effekte gibt.

Um die Rolle von PHD2 in Makrophagen besser zu verstehen, wurde der Effekt eines PHD2-k*nockdowns* in den Makrophagenzelllinien RAW und J774 auf die Migration der Zellen untersucht. Zunächst wurden durch Einbringen von shRNA über einen lentiviralen Vektor ein PHD2-*knockdown* sowie ein Kontrollklon beider Zelllinien erstellt. Der erfolgreiche *knockdown* wurde auf Proteinebene mittels *Western Blot* und auf RNA-Ebene über RT qPCR auch auf RNA Ebene nachgewiesen. Darauf wurde die RNA-Expression der RAW- und J774-Zelllinien von HIF-1 Zielgenen mittels qPCR gemessen. Hier zeigte sich auch bei Makrophagen das bei anderen Zelllinien beschriebene vermehrte Vorkommen von VEGF, PHD3 und GLUT-1 -mRNA.

Im *Boyden Chamber Assay* zeigte sich keine PHD2-abhängige Beeinflussung der Migration. Im *Scratch Assay* fand sich bei den RAW-Zellen eine verzögerte Wiederbesiedelung der freien Fläche bei unveränderter Verdopplungszeit. Hierauf wurde eine Rekonstitution der *knockdown*-Zellen durch virale Retransfektion eines Plasmids, das die kodierende Sequenz der humanen PHD2 enthält, durchgeführt. Der vermutete PHD2-abhängige Effekt konnte dadurch rückgängig gemacht werden. Mikroskopisch zeigte sich nach Zählung der Pseudopodien eine PHD2-abhängige Beeinflussung der Zellmorphologie. Diese kann ein Hinweis auf eine HIF-1α- oder PHD2-abhängige Beeinflussung des Zytoskeletts sein. Da das Zytoskelett nicht nur für die Migration eine wichtige Rolle spielt, sondern auch eine grundlegende Bedeutung in der Zelladhäsion hat, ist nicht auszuschließen, dass die Verminderung der Adhäsionsfähigkeit durch einen PHD2-*knockdown* Ursache der beobachteten Effekte ist.

Daher müssen die hier gezeigten Daten zu Makrophagen durch Migrationsstudien unter Hyp- und Normoxie und kombiniertem PHD2- und HIF-1α-*knockdown* ergänzt werden und die zytoskelettspezifischen, PHD2-abhängigen molekularen Veränderungen gefunden werden. Dann erst können die HIF-1- und PHD2-abhängigen Effekte in Krankheitsprozessen besser verstanden werden.

6 Literaturverzeichnis

Andersen S, Donnem T, Stenvold H, Al-Saad S, Al-Shibli K, Busund L, Bremnes RM (2011): Overexpression of the HIF hydroxylases PHD1, PHD2, PHD3 and FIH are individually and collectively unfavorable prognosticators for NSCLC survival. PLoS ONE 6, e23847

Appelhoff RJ, Tian Y, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM (2004): Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. J Biol Chem 279, 38458–38465

Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM (1996): An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. Proc Natl Acad USA 93, 12969–12973

Ashby WJ, Zijlstra A (2012): Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. Integ Biol (Camb) 4, 1338–1350

Baay M, Brouwer A, Pauwels P, Peeters M, Lardon F (2011): Tumor Cells and Tumor-Associated Macrophages: Secreted Proteins as Potential Targets for Therapy. Clin Dev Immunol 2011, 1–12

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A (2005): Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. Cancer Cell 7, 211–217

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008): Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen 16, 585–601

Berra E, Richard DE, Gothié E, Pouysségur J (2001): HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1α degradation. FEBS Lett 491, 85–90

Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouysségur J (2003): HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. EMBO J 22, 4082–4090

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002): The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. J Pathol 196, 254–265

Bishop T, Gallagher D, Pascual A, Lygate CA, de Bono JP, Nicholls LG, Ortega-Saenz P, Oster H, Wijeyekoon B, Sutherland AI (2008): Abnormal Sympathoadrenal Development and Systemic Hypotension in PHD3-+ /- Mice. Mol Cell Biol 28, 3386–3400

Bosco MC, Puppo M, Blengio F, Fraone T, Cappello P, Giovarelli M, Varesio L (2008): Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. Immunobiology 213, 733–749

Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, Fitzpatrick SF, Cheong A, Scholz CC, Simpson DA, Leonard MO, Tambuwala MM, Cummins EP (2011): MicroRNA-155 Promotes Resolution of

Hypoxia-Inducible Factor 1 Activity during Prolonged Hypoxia. Mol Cell Biol 31, 4087–4096

Burke B, Sumner C, Maitland N, Lewis CE (2002): Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets. J Leukoc Biol 72, 417-428

Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, Ragoussis J (2008): hsa-miR-210 Is Induced by Hypoxia and Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer. Clin Cancer Res 14, 1340–1348

Capece D, Fischietti M, Verzella D, Gaggiano A, Cicciarelli G, Tessitore A, Zazzeroni F, Alesse E (2013): The Inflammatory Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma: A Pivotal Role for Tumor-Associated Macrophages. BioMed Res Int 2013, 1–15

Carreau A, Hafny-Rahbi BE, Matejuk A, Grillon C, Kieda C (2011): Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. J Cell Mol Med 15, 1239–1253

Cervera AM, Apostolova N, Luna-Crespo F, Sanjuan-Pla A, Garcia-Bou R, McCreath KJ (2006): An alternatively spliced transcript of the PHD3 gene retains prolyl hydroxylase activity. Cancer Lett 233, 131–138

Chamboredon S, Ciais D, Desroches-Castan A, Savi P, Bono F, Feige J, Cherradi N (2011): Hypoxia-inducible factor-1α mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. Mol Biol Cell 22, 3366–3378

Chedid M, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA (1994): Regulation of Keratinocyte Growth Factor Gene Expression by Interleukin l. J Biol Chem 269, 10753–10757

Chen P, Huang Y, Bong R, Ding Y, Song N, Wang X, Song X, Luo Y (2011): Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. Clin Cancer Res 17, 7230–7239

Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH (1999): Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1α. J Cell Sci 112, 1203–1212

Cieslewicz M, Tang J, Yu JL, Cao H, Zavaljevski M, Motoyama K, Lieber A, Raines EW, Pun SH (2013): Targeted delivery of proapoptotic peptides to tumor-associated macrophages improves survival. Proc Natl Acad Sci USA 110, 15919–15924

Clear AJ, Lee AM, Calaminici M, Ramsay AG, Morris KJ, Hallam S, Kelly G, MacDougall F, Lister TA, Gribben JG (2010): Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. Blood 115, 5053–5056

Corley KM, Taylor CJ, Lilly B (2005): Hypoxia-inducible factor 1alpha modulates adhesion, migration, and FAK phosphorylation in vascular smooth muscle cells. J Cell Biochem 96, 971–985

Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V (2003): HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. Cell 112, 645-657

Dang EV, Barbi J, Yang H, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR (2011): Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1. Cell 146, 772–784

Depping R, Hägele S, Wagner KF, Wiesner RJ, Camenisch G, Wenger RH, Katschinski DM (2004): A Dominant-Negative Isoform of Hypoxia-Inducible Factor-1 Specifically Expressed in Human Testis. Biol Reprod 71, 331–339

Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ (1995): Hypoxia and Mitochondrial Inhibitors Regulate Expression of Glucose Transporter-1 via Distinct Cis-acting Sequences. J Biol Chem 270, 29083–29089

Ehrismann D, Flashman E, Genn DN, Mathioudakis N, Hewitson KS, Ratcliffe PJ, Schofield CJ (2007): Studies on the activity of the hypoxia-inducible-factor hydroxylases using an oxygen consumption assay. Biochem J 401, 227

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y (1997): A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. Proc Natl Acad Sci USA 94, 4273–4278

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A (2001): C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. Cell 107, 43–54

Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le Q, Chi JA, Jeffrey SS, Giaccia AJ (2006): Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. Nature 440, 1222–1226

Esteban MA, Tran MG, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, Raval RR, O'Brien TS, Maxwell PH (2006): Regulation of E-cadherin Expression by VHL and Hypoxia-Inducible Factor. Cancer Res 66, 3567–3575

Flamme I, Fröhlich T, Reutern M von, Kappel A, Damert A, Risau W (1997): HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1a and developmentally expressed in blood vessels. Mech Dev 63, 51–60

Forsythe JA, Jiang B, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol 16, 4604

Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG (2010): Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. J Innate Immun 2, 216–227

Freire-de-Lima CG, Xiao YQ, Gardai SJ, Bratton DL, Schiemann WP, Henson PM (2006): Apoptotic Cells, through Transforming Growth Factor-beta, Coordinately Induce Anti-inflammatory and Suppress Pro-inflammatory Eicosanoid and NO Synthesis in Murine Macrophages. J Biol Chem 281, 38376–38384

Frisch SM, Francis H (1994): Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis. J Cell Biol 124, 619–626

Fritsch C, Simon-Assmann P, Kedinger M, Evans GS (1997): Cytokines Modulate Fibroblast Phenotype and Epithelial-Stroma Interactions in Rat Intestine. Gastroenterology 112, 826–838

Fu H, Luo F, Yang L, Wu W, Liu X (2010): Hypoxia stimulates the expression of macrophage migration inhibitory factor in human vascular smooth muscle cells via HIF-1α dependent pathway. BMC Cell Biol 11, 66

Ginouvès A, Ilc K, Macias N, Pouysségur J, Berra E (2008): PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. Proc Natl Acad Sci USA 105, 4745–4750

Goren I, Allmann N, Yogev N, Schürmann C, Linke A, Holdener M, Waisman A, Pfeilschifter J, Frank S (2009): A Transgenic Mouse Model of Inducible Macrophage Depletion. The Am J Pathol 175, 132–147

Gorres KL, Raines RT (2010): Prolyl 4-hydroxylase. Crit Rev Biochem Mol Biol 45, 106–124

Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N (2001): Expression and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-3α in Human Kidney: Suppression of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3α. Biochem Biophys Res Commun 287, 808–813

Heusinkveld M, van der Burg SH (2011): Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. J Transl Med 9, 216

Hirsila M, Koivunen P, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J (2003): Characterization of the Human Prolyl 4-Hydroxylases That Modify the Hypoxia-inducible Factor. J Biol Chem 278, 30772–30780

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu Y, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA (1997): Characterization of a Subset of the Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Superfamily That Interacts with Components of the Dioxin Signaling Pathway. J Biol Chem 272, 8581–8593

Hollander AP, Corke KP, Freemont AJ, Lewis CE (2001): Expression in Hypoxia-Inducible Factor 1alpha by Macrophages in the Rheumatoid Synovium. Arthritis Rheum 7, 1540–1544

Hong S, Troyanovsky RB, Troyanovsky SM (2013): Binding to F-actin guides cadherin cluster assembly, stability, and movement. J Cell Biol 201, 131–143

Hu C, Wang L, Chodosh LA, Keith B, Simon MC (2003): Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. Mol Cell Biol 23, 9361–9374

Huang LE, Gu Jie, Schau Maureen, Bunn FH (1998): Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitinproteasome pathway. Proc Natl Acad Sci USA 95, 7987–7992

Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S (1996): Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. Cytokine 8, 548–556

Hynes RO (2002): Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell 110, 673–687

Ikeda J, Ichiki T, Matsuura H, Inoue E, Kishimoto J, Watanabe A, Sankoda C, Kitamoto S, Tokunou T, Takeda K (2013): Deletion of PHD2 in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling. J Am Heart Assoc 2, e000178

Ikuta T, Eguch H, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K (1998): Nuclear Localization and Export Signals of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor. J Biol Chem 273, 2895–2904

Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, Michelson KS, Günzler V, Kondo K, Yang H, Sorokina I, Conaway RC, Conaway JW (2002): Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. Proc Natl Acad Sci USA 99, 12459–13464

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY (1998a): Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1alpha. Genes Dev 12, 149–162

Iyer NV, Leung SW, Semenza GL (1998b): The Human Hypoxia-Inducible Factor 1 Gene: HIF1A Structure and Evolutionary Conservation. Genomics 52, 159–165

Jaakkola PM, Mole DR, Tian Y, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A von, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ (2001): Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. Science 292, 468–472

Jaakkola PM, Rantanen K (2013): The regulation, localization, and functions of oxygen-sensing prolyl hydroxylase PHD3. Biol Chem 394, 449-57

Jiang B, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL (1997): Transactivation and Inhibitory Domains of Hypoxia-inducible Factor 1alpha: Modulation Of Transcriptional Activity By Oxygen Tension. J Biol Chem 31, 19253–19260

Jokilehto T, Jaakkola PM (2010): The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. J Cell Mol Med 14, 758–770

Jokilehto T, Högel H, Heikkinen P, Rantanen K, Elenius K, Sundström J, Jaakkola PM (2010): Retention of prolyl hydroxylase PHD2 in the cytoplasm prevents PHD2-induced anchorage-independent carcinoma cell growth. Exp Cell Res 316, 1169–1178

Kaelin WG (2007): von Hippel-Lindau Disease. Annu Rev Pathol Mech Dis 2, 145–173

Kaelin WG Jr (2010): New cancer targets emerging from studies of the Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. Ann NY Acad Sci 1210, 1–7

Kallio PJ, Okamoto K, O'brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L (1998): Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1α. EMBO J 17, 6573–6586

Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L (1999): Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factor 1alpha by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. J Biol Chem 274, 6519–6525

Kaluz S, Kaluzová M, Stanbridge EJ (2008): Regulation of gene expression by hypoxia: Integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. Clin Chim Acta 395, 6–13

Karin M (2006): Nuclear factor-κB in cancer development and progression. Nature 441, 431–436

Karin M, Greten FR (2005): NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat Rev Immunol 5, 749–759

Keith B, Johnson RS, Simon MC (2012): HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. Nat Rev Cancer 12, 9–22

Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL (2003): Cell Type-Specific Regulation of Angiogenic Growth Factor Gene Expression and Induction of Angiogenesis in Nonischemic Tissue by a Constitutively Active Form of Hypoxia-Inducible Factor 1. Circ Res 93, 1074–1081

Koh MY, Powis G (2009): HAF: the new player in oxygen-independent HIF-1α degradation. Cell Cycle 8, 1359–1366

Kuo JC (2013): Mechanotransduction at focal adhesions: integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells. J Cell Mol Med 17, 704-712

Kuschel CA, Simon P, Tug S (2012): Functional regulation of HIF-1α under normoxia-is there more than post-translational regulation? J Cell Physiol 227, 514–524

Lackie JM, Chaabane N, Crocket KV (1987): A critique of the methods used to assess leucocyte behaviour. Biomed Pharmacother 41, 265–278

Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK (2002): FIH-1 is an asparagin hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. Genes Dev 16, 1466–1471

Lee E, Yim S, Lee S, Park H (2002): Two Transactivation Domains of Hypoxia-inducible Factor-1α Regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK Pathway. Mol Cells 14, 9–15

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL (1996): Association of Macrophage Infiltration with Angiogenesis and Prognosis in Invasive Breast Carcinoma Prognosis in Invasive Breast Carcinoma. Cancer Res 56, 4625–4629

Lin W, Karin M (2007): A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin Invest 117, 1175–1183

Lok CN, Ponka P (1999): Identification of a Hypoxia Response Element in the Transferrin Receptor Gene. J Biol Chem 274, 24147–24152

Lu X, Kang Y (2010): Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Metastasis. Clin Cancer Res 16, 5928–5935

Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, Semenza GL (2011): Pyruvate Kinase M2 Is a PHD3-Stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. Cell 145, 732–744

Ma M, Baumgartner M (2013): Filopodia and Membrane Blebs Drive Efficient Matrix Invasion of Macrophages Transformed by the Intracellular Parasite Theileria annulata. PLoS One 8, e75577

Mamlouk S, Kalucka J, Singh RP, Franke K, Muschter A, Langer A, Jakob C, Gassmann M, Baretton GB, Wielockx B (2014): Loss of prolyl hydroxylase-2 in myeloid cells and T-lymphocytes impairs tumor development. Int J Cancer 134, 849-58

Mantovani A, Sica A, Sozziani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 25, 677–686

Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009): Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. Annu Rev Immunol 27, 451–483

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Eamonn RM, Ratcliffe PJ (1999): The tumour suppressor proteinVHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 399, 271–275

Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L (1995): A Hypoxia-responsive Element Mediates a Novel Pathway of Activation of the Inducible Nitric Oxide Synthase Promoter. J Exp Med 182, 1683–1693

Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W (2003): Intracellular localisation of human HIF-1α hydroxylases: implications for oxygen sensing. J Cell Sci 116, 1319–1326

Metzen E, Stiehl DP, Doege K, Marxsen JH, Hellwig-Bürgel T, Jelkmann W (2005): Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. J Biol Chem 387, 711–717

Mielgo A, Schmid MC (2013): Impact of tumour associated macrophages in pancreatic cancer. BMB Rep 46, 131–138

Mukhopadhyay CK, Mazunder B, Fox PL (2000): Role of Hypoxia-inducible Factor-1 in Transcriptional Activation of Ceruloplasmin by Iron Deficiency. J Biol Chem 275, 21048–21054

Mukhtar RA, Nseyo O, Campbell MJ, Esserman LJ (2011): Tumor-associated Macrophages in Breast Cancer as Potential Biomarkers for New Treatments and Diagnostics. Expert Rev Mol Dia 11, 91–100

Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE (2008): The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer 8, 618–631

Nagao T, Quin C, Grosheva I, Maxfield FR, Pierini LM (2007): Elevated Cholesterol Levels in the Plasma Membranes of Macrophages Inhibit Migration by Disrupting RhoA Regulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27, 1596-1602

Nonomura N, Takayama H, Nakayama M, Nakai Y, Kawashima A, Mukai M, Nagahara A, Aozasa K, Tsujimura A (2011): Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. BJU Int 107, 1918–1922

Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim T, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG (2000): Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β-domain of the von Hippel–Lindau protein. Nat Cell Biol 2, 423–427

Olson MF, Sahai E (2009): The actin cytoskeleton in cancer cell motility. Clin Exp Metastasis 26, 273–287

Ong S, Tan Y, Beretta O, Jiang D, Yeap W, Tai JJY, Wong W, Yang H, Schwarz H, Lim K (2012): Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. Eur J Immunol 42, 89–100

Ortiz-Barahona A, Villar D, Pescador N, Amigo J, del Peso L (2010): Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. Nucleic Acids Res 38, 2332–2345

Ozolins TR, Fisher TS, Nadeau DM, Stock JL, Klein AS, Milici AJ, Morton D, Wilhelms MB, Brissette WH, Li B (2009): Defects in embryonic development of EGLN1/PHD2 knockdown transgenic mice are associated with induction of Igfbp in the placenta. Biochem Biophys Res Commun 390, 372–376

Peurala E, Koivunen P, Bloigu R, Haapasaari K, Jukkola-Vuorinen A (2012): Expressions of individual PHDs associate with good prognostic factors and increased proliferation in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 133, 179–188

del Peso L, Castellanos MC, Temes E, Martín-Puig S, Cuevas Y, Olmos G, Landázuri 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 278, 48690–48695

Peyssonnaux C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS (2005): HIF-1α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. J Clin Invest 115, 1806–1815

di Pietro LA (1995): Wound Healing: The Role of the Macrophage and other Immune Cells. Shock 4, 233–240

Pugh CW, O'Rourke J, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ (1997): Activation of Hypoxia-inducible Factor 1: Definition of Regulatory Domains within the alpha Subunit. J Biol Chem 272, 11205–11214

Qian B, Pollard JW (2010): Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. Cell 141, 39–51

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T (2010): A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464, 59–65

Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li J, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ (2005): Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. Mol Cell Biol 25, 5675–5686

Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M (2008): NF-κB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1α. Nature 453, 807–811

Rømer J, Bugge TH, Fyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Danø K (1996): Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. Nat Med 2, 287–292

Sandau KB, Fandrey J, Brüne B (2001): Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide. Blood 97, 1009–1015

Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J (2002): Carboxyl-Terminal Transactivation Activity of Hypoxia-Inducible Factor 1 Is Governed by a von Hippel-Lindau Protein-Independent, Hydroxylation-Regulated Association with p300/CBP. Mol Cell Biol 22, 2984–2992

Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR (2011): High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. Blood 117, e207–e217

Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 343-54

Semenza GL (2000): HIF-1 and human disease: one highly involved factor. Genes Dev 14, 1983–1991

Semenza GL (2001): Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. Trends Mol Med 7, 345–350

Semenza GL (2014): Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology. Annu Rev Pathol 9, 47–71

Semenza GL, Jiang B, Leung SW, Passantino R, Concordet J, Maire P, Giallongo A (1996): Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. J Biol Chem 271, 32529–32537

Shen SH, Kwan A, Chen Y, Wang Z (2013): Effect of silencing HIF-1α on proliferation, invasion and migration of glioblastoma U87 cells. Neurol Sci 34, 365–371

Sica A, Mantovani A (2012): Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest 122, 787–795

Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A (2008): Macrophage polarization in tumour progression. Semin Cancer Biol 18, 349–355

Silva MT (2010): When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. J Leukoc Biol 87, 93–106

Sitkovsky M, Lukashev D (2005): Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1α and adenosine receptors. Nat Rev Immunol 5, 712–721

Small JV, Rottner K, Kaverina I, Anderson KI (1998): Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. Biochim Biophys Acta 1404, 271–281

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P (2009): Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J Leukoc Biol 86, 1065–1073

Stoka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D (2001): HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. FASEB J 15, 2445–2453

Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J (2005): Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. J Immunol 175, 342–349

Stricker J, Falzone T, Gardel ML (2010): Mechanics of the F-actin cytoskeleton. J Biomech 43, 9–14

Su K, Tian Y, Wang J, Shi W, Luo D, Liu J, Tong Z, Wu J, Zhang J, Wei L (2012): HIF-1α Acts Downstream of TNF-α to Inhibit Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Expression and Modulates the Adhesion and Proliferation of Breast Cancer Cells. DNA Cell Biol 31, 1078–1087

Su Y, Loos M, Giese N, Metzen E, Büchler MW, Friess H, Kornberg A, Büchler P (2012): Prolyl hydroxylase-2 (PHD2) exerts tumor-suppressive activity in pancreatic cancer. Cancer 118, 960–972

Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER (2010): Neutrophil kinetics in health and disease. Trends Immunol 31, 318–324

Svoboda P, Stein P, Schultz RM (2001): RNAi in Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos: Effectiveness of Hairpin dsRNA. Biochem Biophys Res Comm 287, 1099–1104

Swain L, Wottawa M, Hillemann A, Beneke A, Odagiri H, Terada K, Endo M, Oike Y, Farhat K, Katschinski DM (2014): Prolyl-4-hydroxylase domain 3 (PHD3) is a critical terminator for cell survival of macrophages under stress conditions. J Leukoc Biol 96, 365–375

Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G (1999): Transferrin Receptor Induction by Hypoxia. J Biol Chem 274, 24142–24146

Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, Cao K, Matsuyama Y, Goto H, Takahashi T (2008): Identification of Hypoxia-Inducible Factor-1 as a Novel Target for miR-17-92 MicroRNA Cluster. Cancer Res 68, 5540–5545

Takayanagi T, Eguchi S (2011): Inhibition of Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein: A Novel Therapy for Cardiovascular Diseases? Hypertension 58, 354–355

Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan L, Nagy A, Fong G (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 26, 8336–8346

Tang X, Mo C, Wang Y, Wei D, Xiao H (2013): Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. Immunology 138, 93–104

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009): Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. Cell 139, 871–890

Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997): Endothelial PAS domain protein (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. Genes Dev 11, 72–82

Tian Y, Mole DR, Ratcliffe PJ, Gleadle JM (2006): Characterization of different isoforms of the HIF prolyl hydroxylase PHD1 generated by alternative initiation. Biochem J 397, 179-86

Travis J (2009): Origins. On the Origin of The Immune System. Science 324, 579–582

Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Semenza GL, van Obberghen E (2002): Insulin Stimulates Hypoxia-inducible Factor 1 through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Target of Rapamycin-dependent Signaling Pathway. J Biol Chem 277, 27975–27981

van Uden P, Kenneth NS, Webster R, Müller HA, Mudie S, Roche S (2011): Evolutionary Conserved Regulation of HIF-1b by NF-kB. PLoS Genet 7, 1–15

Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH (2003): The hypoxia-inducible factor-1α is a negative factor for tumor therapy. Oncogene 22, 3213–3220

Utrera-Barillas D, Castro-Manrreza M, Castellanos E, Gutiérrez-Rodríguez M, Arciniega-Ruíz de Esparza O, García-Cebada J, Velazquez JR, Flores-Reséndiz D, Hernández-Hernández D, Benítez-Bribiesca L (2010): The role of macrophages and mast cells in lymphangiogenesis and angiogenesis in cervical carcinogenesis. Exp Mol Path 89, 190–196

Vogel S, Wottawa M, Farhat K, Zieseniss A, Schnelle M, Le-Huu S, Ahlen Mv, Malz C, Camenisch G, Katschinski DM (2010): Prolyl Hydroxylase Domain (PHD) 2 Affects Cell Migration and F-actin Formation via RhoA/Rho-associated Kinase-dependent Cofilin Phosphorylation. J Biol Chem 285, 33756–33763

Vogler M, Vogel S, Krull S, Farhat K, Leisering P, Lutz S, Wuertz CM, Katschinski DM, Zieseniss A (2013): Hypoxia Modulates Fibroblastic Architecture, Adhesion and Migration: A Role for HIF-1α in Cofilin Regulation and Cytoplasmic Actin Distribution. PLoS ONE 8, e69128

Wang GL, Semenza GL (1993): Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia inducible factor 1 DNA-binding activity: Implications for models of signal transduction. Blood 82, 3610–3615

Wang GL, Semenza GL (1996): Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. J Biol Chem 270, 1230–1237

Wang GL, Jiang B, Rue EA, Semenza GL (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular 02 tension. Proc Natl Acad USA 92, 5510–5514

Ward JP (2008): Oxygen sensors in context. Biochim Biophys Acta 1777, 1–14

Wenger RH (2005): Integration of Oxygen Signaling at the Consensus HRE. Science STKE 2005, 1–13

Wu Y, Zheng L (2012): Dynamic Education of Macrophages in Different Areas of Human Tumors. Cancer Microenviron 5, 195–201

Xenaki G, Ontikatze T, Rajendran R, Stratford IJ, Dive C, Krstic-Demonacos M, Demonacos C (2008): PCAF is an HIF-1α cofactor that regulates p53 transcriptional activity in hypoxia. Oncogene 27, 5785–5796

Xia Y, Choi H, Lee K (2012): Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. Eur J MedChem 49, 24–40

Yang F, Liu M, Yang F, Che J, Li W, Zhai W, Wang G, Zheng J, Li X (2014): VPA inhibits renal cancer cell migration by targeting HDAC2 and down-regulating HIF-1α. Mol Biol Rep 41, 1511–1518

Zhang BC, Gao J, Wang J, Rao ZG, Wang BC, Gao JF (2011): Tumor-associated macrophages infiltration is associated with peritumoral lymphangiogenesis and poor prognosis in lung adenocarcinoma. Med Oncol 28, 1447–1452

Zhang P, Yao Q, Lu L, Li Y, Chen P, Duan C (2014): Hypoxia-Inducible Factor 3 Is an Oxygen-Dependent Transcription Activator and Regulates a Distinct Transcriptional Response to Hypoxia. Cell Rep 6, 1110-21

Zhang X, Jiang G, Cai Y, Monkley SJ, Critchley DR, Sheetz MP (2008): Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. Nat Cell Biol 10, 1062–1068

Zhang Y, Liu Q, Wang F, Ling E, Liu S, Wang L, Yang Y, Yao L, Chen X, Wang F (2013): Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1α. J Pineal Res 55, 121–130

Zhang Z, Yan J, Chang Y, Yan SS, Shi H (2011): Hypoxia Inducible Factor-1 as a Target for Neurodegenerative Diseases. Curr Med Chem 18, 4335–4343

Lebenslauf

Ich wurde am siebten April 1988 in Augsburg geboren. Von 1994 bis 1998 besuchte ich die Grundschule in Kissing und besuchte daraufhin bis zu meinem Abitur im Jahre 2007 das Wernher-von-Braun-Gymnasium Friedberg, welches heute Staatliches Gymnasium Friedberg heißt. Hier führte ich in der Mittelstufe das Amt des Klassensprechers, in der gymnasialen Oberstufe schließlich das Amt des Kollegstufensprechers aus.

Im Rahmen einer Epstein-Barr-Virusinfektion kam ich erstmals in Kontakt mit der Ärzteschaft. Hier entschloss ich mich, das fachliche Interesse bereits geweckt, Arzt zu werden. Im Rahmen einer 20-seitigen Facharbeit, welche in Bayerns G9 Pflicht war, behandelte ich das „Ökosystem Pfütze". Für diese erhielt ich den Carl-Friedrich von Martius-Preis für Umweltforschung des Helmholtz-Zentrums München.

Nach dem Abitur 2007 entschied ich mich für ein Freiwilliges Soziales Jahr in der Asklepios Lungenfachklinik München, um weitere Einblicke in den Arztberuf zu gewinnen. 2008 begann ich mein Medizinstudium in Göttingen. Hier sah ich mich in meiner Überzeugung, Arzt zu werden, stetig bestärkt. Nicht nur die Faszination an den „großen" Fächern Biochemie, Physiologie und Anatomie, sondern auch mein Interesse an den ergänzenden Fächern Biologie, Physik, Chemie und Psychologie zeigten mir, dass ich das richtige Studium gewählt hatte. Ich engagierte mich als wissenschaftliche Hilfskraft in der Anatomie.

In den Semesterferien der Vorklinik absolvierte ich zusätzlich die Ausbildung zum Rettungssanitäter beim Roten Kreuz Augsburg. 2010 legte ich ein „sehr gutes" erstes Staatsexamen Medizin ab und wurde in die Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen. Zudem begann ich, immer schon sportlich aktiv, Lacrosse zu spielen, übernahm im Laufe der Jahre eine Trainerposition und praktiziere den Sport nach wie vor mit Begeisterung.

Nach dem Physikum bemühte ich mich, begeistert von der Physiologie, um eine Doktorandenstelle in der Physiologie bei Frau Prof. Dr. Katschinski, welche mich in den vorhergegangenen Semestern sehr beeindruckt hatte. Hier lernte ich im Rahmen von Versuchen mit selbsterstellten Knockoutzelllinien Blotting, qPCR und FACS Techniken und setzte mein sechstes Studiensemester aus, um mich neun Monate allein der Laborarbeit zu widmen.

Um meine Fertigkeiten im Labor zu erweitern, arbeitete ich 2012 drei Monate an der New York University, wo ich im Rahmen der Arrhythmieforschung mit der Durchführung von OPs und Gewebeisolation an Ratten betraut wurde, Erfahrung in histologischer Probenaufbereitung sowie *patch-clamp* Techniken sammeln konnte und an einer wissenschaftlichen Veröffentlichung mitwirkte. Im klinischen Studienabschnitt engagierte ich mich als Tutor im STÄPS des Universitätsklinikums Göttingen für Untersuchungskurse. 2013 starb mein Vater an einem kleinzelligen Bronchialkarzinom. Im November 2014 legte ich erfolgreich mein 2. Staatsexamen Medizin ab.

Seit 2015 arbeite ich am Universitätsklinikum Würzburg als Assistenzarzt für Innere Medizin und Onkologie, ein Jahr auf einer Schwerpunktstation für Leukämien und Lymphome, ein halbes Jahr auf der Gastroenterologie und aktuell in der Infektiologie, wo ich hauptsächlich HIV-, Tuberkulose- und Hepatitispatienten betreue. Ich arbeite nebst der klinischen Tätigkeit in einer klinisch-onkologischen Studiengruppe zu CAR-T-Zellen und plane nach Abschluss meiner Dissertation, mich noch weiter in klinische Projekte einzubinden.