

Analyse der gewebespezifischen Zusammensetzung des Transkriptionsfaktorkomplexes Hypoxie- induzierbarer Faktor zur Erythropoietin- Genexpression mit Hilfe von Fluoreszenz-Resonanz- Energie-Transfer

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät
Biologie und Geografie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Diplom Biochemikerin
Rebecca Konietzny

aus Duisburg

Februar 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Zeitraum von November 2006 bis Dezember 2009 im Arbeitskreis von **Prof. Dr. Fandrey am Institut für Physiologie** der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Fandrey
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Meyer
3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. D. Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni. 2010

Publikationen

1. Brandt S., Blissenbach M., Grewe B., **Konietzny R.**, Grunwald T., Überla K. (2007). *Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation.* PLoS Pathog. 3: e54
2. **Konietzny R.**, König A., Wotzlaw C., Bernadini A., Berchner-Pfannschmidt U., Fandrey J. (2009). *Molecular imaging: into in vivo interaction of HIF-1alpha and HIF-2alpha with ARNT.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 1177: 74-81
3. Wotzlaw C., Gneuss S., **Konietzny R.**, Fandrey J. (2010). *Nanoscopy of the cellular response to hypoxia by means of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and new FRET software.* PMC Biophys. (in Revision)
4. Ma J. *, **Konietzny R.** *, Stolze I., Delos Reyes B., Freitag P., Berchner-Pfannschmidt U., Fandrey J. (2010). *Retinoic acid enhances hypoxia-induced erythropoietin expression in neuroblastoma cells by cooperation of the HIF-1 binding site and the DR-2 element.*
* gleichberichtigte Erstautoren (in Vorbereitung)

Kongressbeiträge (publizierte Abstracts)

1. **Konietzny R.** (2007). *Tissue-specific assembly of the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) complex in control of erythropoietin expression.* (Vortrag) Annual Retreat of the DFG Graduate Training Program *Transcription, chromatin structure and DNA repair in development and differentiation* 1431/1, Vollmarstein
2. **Konietzny R.**, Wotzlaw C., Berchner-Pfannschmidt U., Fandrey J. (2007). *Gewebespezifische Zusammensetzung des Transkriptionsfaktorkomplexes Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 zur Erythropoietin-Genexpression.* (Poster) 6. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen, Abstractband S. 60
3. **Konietzny R.**, Berchner-Pfannschmidt U., Fandrey J. (2008). *Tissue specific assembly of the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) complex controlling erythropoietin expression.* (Poster) Keystone Meeting Molecular, Cellular, Physiological, and Pathogenic Responses to Hypoxia J6, Vancouver, Kanada, Abstractband S. 158

4. **Konietzny R.**, König A., Berchner-Pfannschmidt U., Fandrey J. (2008). *Analysing the transcription factor complex controlling the tissue specific erythropoietin expression by FRET.* (Poster) 87th Annual Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft, Köln, Acta Physiologica 192, Suppl.663, PM05-03
5. **Konietzny R.** (2008). *Tissue specific regulation of Epo gene expression.* (Vortrag) Annual Retreat of the DFG Graduate Training Program (1431/1) *Transcription, chromatin structure and DNA repair in development and differentiation*, Dormagen-Zons
6. **Konietzny R.**, Ma Y., Stolze I., Trinidad B., Freitag P., Berchner-Pfannschmidt U., Fandrey J. (2008). *Retinsäure stimuliert unter Hypoxie die Erythropoietin-Genexpression in Neuroblastomzellen durch Interaktion der HIF-Bindestelle und dem DR-2 Element.* (Poster) 7. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen, Abstractband S. 61
7. **Konietzny R.**, Ma Y., Stolze I., Trinidad B., Freitag P., Berchner-Pfannschmidt U., Fandrey J. (2009). *Hypoxia induced erythropoietin gene expression in neuroblastoma cells is enhanced by retinoic acid.* (Poster) The New York Academy of Sciences *Hypoxia and Consequences; from Molecule to Malady*, New York, USA, Abstractband Nr.43
8. **Konietzny R.**, Ma Y., Stolze I., Trinidad B., Freitag P., Berchner-Pfannschmidt U., Fandrey J. (2009). *Retinoic acid enhance the erythropoietin gene expression under hypoxia in neuroblastoma cells.* (Poster) 88th Annual Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft, Giessen, Acta Physiologica 195, Suppl.669, p45 P152
9. **Konietzny R.** (2009). *ErythrPOitin.* (Vortrag) Annual Retreat of the DFG Graduate Training Program *Transcription, chromatin structure and DNA repair in development and differentiation* 1431/1, Dormagen-Zons

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Erythropoietin	1
1.2	Transkriptionsfaktoren	4
1.2.1	Hypoxie-induzierbarer Faktor	4
1.2.2	Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF-4 α	7
1.2.3	Der nukleäre Hormon-Rezeptor RXR α	8
1.2.4	Der transkriptionelle Ko-Aktivator CBP	9
1.3	Zielsetzung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Proteinbiochemische Methoden	12
2.2	RNA Methoden	14
2.3	Molekularbiologische Methoden	18
2.4	Zytologische Methoden	28
2.5	Konfokale Lasermikroskopie (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)	32
2.6	Laborgeräte	36
2.7	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Gewebespezifische Erythropoietin-Genexpression	38
3.1.1	Einfluss von all- <i>trans</i> -Retinsäure auf die EPO-Expression in Neuroblastomzellen	39
3.1.2	HNF-4 α -Expression in Neuroblastomzellen der Linie Kelly	46
3.1.3	Einfluss von Hypoxie auf die EPO-mRNA-Expression in Nierenzellen	47
3.2	Nachweis der Protein-Protein-Interaktion am 3' Enhancer des Erythropoietin-Gens mittels FRET	54
3.2.1	Klonierung der Fusionsproteine	54
3.2.2	Interaktionsstudie der HIF-Untereinheiten in U2OS-Zellen	57
3.2.3	Interaktionsstudie von HNF-4 α mit HIF-Untereinheiten in U2OS-Zellen	61
3.2.4	Interaktionsstudie von HNF-4 α mit dem intakten HIF-1-Komplex in U2OS-Zellen	63

3.2.5	Interaktionsstudie der HIF-Untereinheiten und von HNF-4 α mit den HIF-Untereinheiten in HK120-Zellen	64
3.2.6	Interaktionsstudie von HNF-4 α mit CBP	66
4	Diskussion	68
4.1	Gewebespezifische Erythropoietin-Genexpression	68
4.1.1	Gesteigerte hypoxische EPO-Expression unter at-RA-Gabe in Neuroblastomzellen	68
4.1.2	Verminderte EPO-Expression in Kelly-Zellen durch endogenes HNF-4 α	72
4.1.3	Gewebespezifische Induktion der hypoxischen EPO-Expression in HK120-Zellen durch den Faktor HNF-4 α	72
4.2	Nachweis der Protein-Protein-Interaktion am 3' Enhancer des Erythropoietin-Gens mittels FRET	76
4.2.1	Kompaktere Komplexbildung von HIF-1 α als von HIF-2 α mit ARNT	76
4.2.2	Interaktion von HNF-4 α mit dem HIF-Komplex am 3' Enhancer über CBP	78
5	Zusammenfassung	79
6	Literatur	81
7	Anhang	91
7.1	Abkürzungsverzeichnis	91
7.2	Abbildungsverzeichnis	92
7.3	Tabellenverzeichnis	92
7.4	Klonierungsplasmide	93
7.5	Lebenslauf	96
7.6	Erklärung	97
7.7	Danksagung	98

1 Einleitung

1.1 Erythropoietin

Alle aeroben Organismen sind auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung ihrer Organe und Gewebe angewiesen. Als Konsequenz und Antwort auf einen Sauerstoffmangel (Hypoxie) wird eine schnelle Kaskade an lebensrettenden Mechanismen aktiviert. Diese Antwort setzt ein hoch entwickeltes System voraus, dass effizient auf physiologische Änderungen reagieren kann. Sauerstoffmangel im Gewebe kann aus verminderter Sauerstoffaufnahme (Höhenaufenthalt) oder reduziertem Sauerstofftransport (Anämie) resultieren (Wilber, 2001; Elliott, 2008; Storz und Moriyama, 2008; Buemi *et al.*, 2009). Dem Mensch stehen eine Reihe kurzfristiger Anpassungsmechanismen zur Verfügung, um diese Mangelsituation zu kompensieren. Zeitweilige Erhöhung der Atem- und Pulsfrequenz erhöht aktiv die Sauerstoffzufuhr ins Gewebe. Jedoch muss auch ein Mechanismus für die Anpassung an eine dauerhaft niedrige Sauerstoffkonzentration zur Verfügung stehen. Dies geschieht über eine gesteigerte Erythropoese (Abb. 1-1).

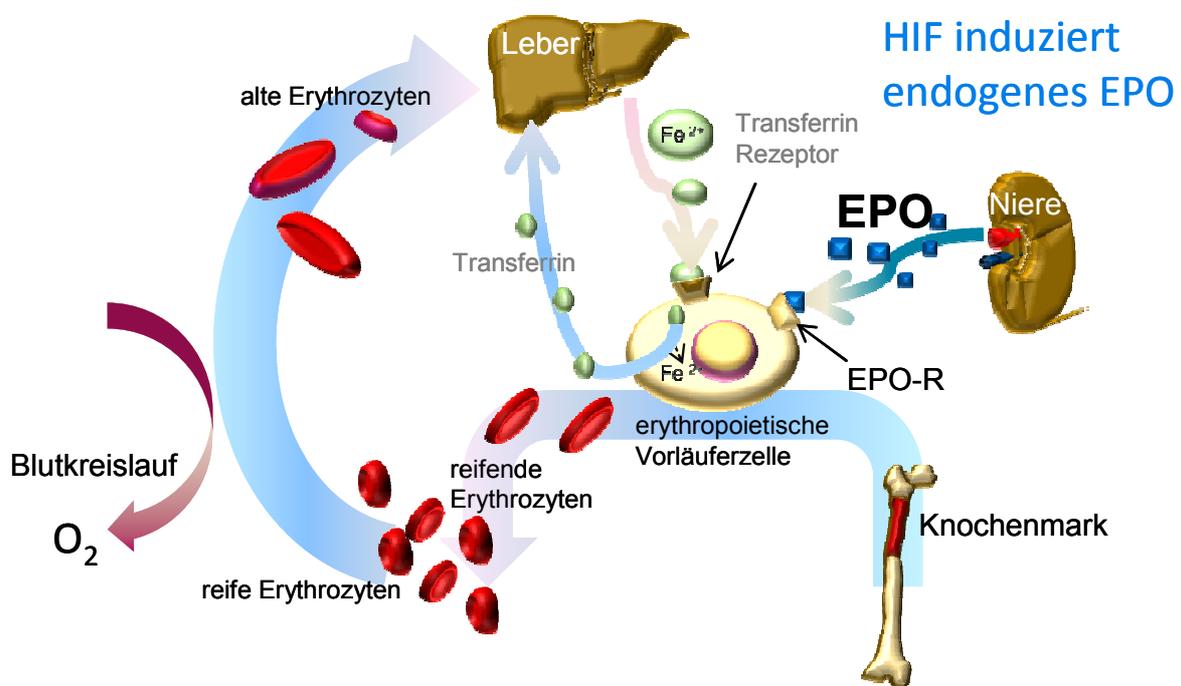


Abb. 1-1: Erythropoietin reguliert die Erythropoese.

Das Glykoprotein-Hormon Erythropoietin (EPO) wird in den Nieren nach Stimulation durch HIF (*hypoxia-inducible factor*) vermehrt gebildet und wirkt über EPO-Rezeptoren auf die Ausreifung der erythropoietischen Vorläuferzellen. Während der Erythrozyten-Entwicklung wird Eisen über Transferrin und dessen Rezeptor für die Häm-Synthese sichergestellt. Details siehe Text. (modifiziert nach FibroGen, 1999).

Erythropoietin (EPO) führt zu einer Heranreifung neuer Erythrozyten (Erythropoese) im Knochenmark. EPO bindet über spezifische EPO-Rezeptoren an die Zielzellen im Knochenmark und vergrößert zusammen mit anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie Interleukin-3 (IL-3) und *GM-colony-stimulating factor* (CSF) die Zahl der unreifen *burst-forming units-erythroid* (BFU-E) aus den primitiven multipotenten hämatopoetischen Stammzellen. Das Hormon EPO induziert außerdem den Übergang von den BFU-E zu den *colony-forming units-erythroid* (CFU-E). Jedoch übt EPO seine effektivste Wirkung auf die Heranreifung der CFU-E zu Normoblasten aus. Diese werden dann zum Retikulozyten und zum reifen Erythrozyten (Tsiftoglou *et al.*, 2009). Eine weitere Wirkung von EPO ist der Schutz der BFU-E, CFU-E und Proerythroblasten vor dem programmierten Zelltod (Apoptose), wodurch die Ausdifferenzierung zum Erythrozyten sichergestellt wird (Koury *et al.*, 1990). Der Sauerstofftransport erfolgt beim Erythrozyten durch Hämoglobin, das aus vier Globinketten mit jeweils einer Häm-Gruppe aufgebaut ist. Häm ist ein Protoporphyrin-IX-Ringsystem, das Eisen als Zentralatom koordinativ über vier N-Gruppen gebunden hat und über dieses Eisen-Atom Sauerstoff reversibel binden kann (Ronda *et al.*, 2008). Unter Hypoxie werden vermehrt Erythrozyten durch eine 5-10-fach induzierte EPO-Expression gebildet. Zusätzlich wird die Eisenverfügbarkeit (z.B. Transferrin, Transferrin-Rezeptor und Ferroportin) und die Menge an EPO-Rezeptor unter Hypoxie reguliert (Nemeth, 2008; Muñoz *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2006). Eine koordinierte und streng kontrollierte Erhöhung der Menge an Erythrozyten gewährleistet somit die Sauerstoffversorgung im Gewebe durch eine gesteigerte Sauerstoffkapazität des Blutes.

Die Regulation dieses Systems ist bei tumorbedingter oder chronischer Anämie gestört. Nach Cytokinfreisetzung durch aktivierte Makrophagen, Monozyten und lymphatischen Zellen, werden die EPO-Bildung und die Erythropoese bei diesen Krankheitsbildern gehemmt (Faquin *et al.*, 1992). Tumorzellen, Lymphomzellen, Autoimmunprozesse sowie andere Entzündungsreaktionen, stimulieren Makrophagen und Monozyten zur Ausschüttung von Interleukin-1 (IL-1), das dann T-Lymphozyten aktiviert. Die EPO-Bildung in der adulten Niere wird durch die Freisetzung von *interferon-alpha* und *-beta* (IFN- α , - β), *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), *transforming growth factor beta* (TGF- β) und IL-1 gehemmt. Diese Faktoren führen außerdem zu einer direkten Hemmung der Proliferation von BFU-E und CFU-E im Knochenmark (Means *et al.*, 1992).

Im adulten Menschen wird EPO vor allem in der Niere durch die interstitiellen Fibroblasten und zu einem geringen Prozentsatz durch die Hepatozyten der Leber gebildet (Jacobson *et al.*, 1957; Bachmann *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1993). Im Fall einer chronischen renalen

Insuffizienz kann die Leber jedoch nicht den Verlust der EPO-Produktion in der Niere kompensieren (Weidemann *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnte EPO im Gehirn, in der Gebärmutter, im Hoden und in der Milz nachgewiesen werden. EPO scheint im Gehirn ein frühes ontogenetisches Schutzsystem darzustellen, das Nervenzellen unter anderem vor der Degeneration schützt (Yu *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2002). Es wirkt antiapoptotisch, antioxidativ, entzündungshemmend, glutamininhibitorisch, neurotroph und angiogenetisch.

EPO ist ein Glykoprotein-Hormon mit 165 Aminosäuren und besitzt dadurch eine Gesamtmasse von 30,4 kDa. Drei N-glykosidisch (Asn 24, 38, 83) und eine O-glykosidisch (Ser 126) gebundene Zuckerseitenkette, sowie vier konservierte Cysteinreste werden für die Bioaktivität des Hormons benötigt (Delorme *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1992).

Bereits frühzeitig beschrieb Denis Jourdanet, dass Personen, die sich längere Zeit in alpinen Höhenlagen (hypobare Hypoxie) aufgehalten hatten, einen deutlichen Anstieg von Erythrozyten im Plasma, ähnlich wie Patienten mit Anämie (anämische Hypoxie), aufwiesen (Jourdanet, 1863). Im Jahr 1908 wurde das Hormon Erythropoietin erstmals in anämischem Blutplasma nachgewiesen, 1957 die Niere als Hauptbildungsort des EPOs identifiziert und 1977 wurde EPO erstmals aus Urin isoliert. 1985 gelang dann die Klonierung und Expression von rekombinantem humanem Erythropoietin (rhEPO) (für Originalreferenzen siehe Fandrey 2004).

Die Regulation des EPO-Gens auf molekularer Ebene unter Hypoxie war lange unbekannt. Es stellte sich heraus, dass das EPO-Gen zwischen den einzelnen Spezies hochkonserviert im Bereich des Promotors, des ersten Introns und einer 3' liegenden Region ist (Shoemaker und Mitsock, 1986). Erst 1991 zeigte sich, dass diese 3' Region im humanen und im murinen EPO-Gen unter Hypoxie eine Kontrollfunktion übernimmt (Semenza *et al.*, 1991; Pugh *et al.*, 1991). Diese 3' Region im humanen EPO-Gen wurde von Semenza und Wang weiter charakterisiert (Abb. 1-3). Sie beschrieben als Erste den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF, *hypoxia-inducible factor*), der in Hep3B-Zellen nach hypoxischer Stimulation (1 % O₂) an das 3' Enhancer-Element bindet (Semenza und Wang, 1992). Sowohl in verschiedenen EPO-produzierenden Zelllinien als auch in nicht EPO-produzierenden Zelllinien konnte die HIF-1-DNA-Bindungsaktivität nach hypoxischer Induktion nachgewiesen werden (Maxwell *et al.*, 1993; Wang und Semenza, 1993). Aus diesen Erkenntnissen wurde gefolgert, dass HIF-1 für eine generelle adaptive Anpassung bei verminderter Sauerstoffkonzentration verantwortlich ist. Nach biochemischer Aufreinigung zeigte sich, dass HIF-1 aus einem heterodimeren Proteinkomplex (HIF-1 α und HIF-1 β) besteht (Wang *et al.*, 1995). Des Weiteren wurden gewebespezifische Transkriptionsfaktoren entdeckt, die an der Regulation der EPO-

Expression beteiligt sind. Der Hauptbildungsort von EPO wandert kurz nach der Geburt sukzessiv von der fötalen Leber (unter Kontrolle von RXR α , *retinoic X receptor alpha*) zu den adulten Nieren (unter Kontrolle von HNF-4 α , *hepatocyte nuclear factor-4alpha*) (Galson *et al.*, 1995). In Neuroblastomzellen als Modell für die neuronale Expression von EPO ist die pO₂-abhängige EPO-Bildung unabhängig von HNF-4, wobei in diesen Zellen, wie in der Fetalzeit, möglicherweise statt HNF-4 ein Retinsäure-Rezeptor an den 3'Enhancer binden. Die Charakterisierung der Transkriptionsfaktoren, die an der hypoxischen Regulation von EPO beteiligt sind und deren Bedeutung für die Adaptation an verringerte Sauerstoffbedingungen war in den Blickpunkt der Forschung gerückt.

1.2 Transkriptionsfaktoren

1.2.1 Hypoxie-induzierbarer Faktor

Der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) ist der Schlüsselregulator der Anpassungsmechanismen auf Sauerstoffmangel. HIF ist ubiquitär exprimiert und bildet strukturell ein $\alpha\beta$ -Heterodimer. Beide Untereinheiten gehören zu der bHLH (*basic helix-loop-helix*) PAS (*Period / ARNT / Single minded*) Transkriptionsfaktor-Familie (Wang *et al.*, 1995). Die beiden N-terminal gelegenen bHLH- und PAS-Domänen sind entscheidend für die Bildung eines Heterodimers zwischen der α - (120kDa) und der β - (90kDa) Untereinheit und der sequenzspezifischen Bindung an die DNA (bHLH-Domäne) (Gu *et al.*, 2000). Es sind 3 Isoformen für die α -Untereinheit bekannt (Gu *et al.*, 1998), wobei in der vorliegenden Arbeit HIF-1 α und HIF-2 α untersucht wurden (Abb. 1-2). Diese beiden Isoformen weisen eine hohe Identität auf, beispielsweise sind die bHLH zu 85 % und die PAS Domäne zu 70 % identisch. Die C-TAD (*C-terminal transactivation domain*) Domäne ist zu 69 % identisch. In der ODD (*oxygen-dependent degradation domain*) und der N-TAD (*N-terminal transactivation domain*) sind speziell die Aminosäuren um die beiden Sauerstoff-sensitiven Prolin-Reste (HIF-2 α : P405 und P530; HIF-1 α : P402 und P564) hoch konserviert (70 %) (Hu *et al.*, 2007). Das hohe Maß an Identität spiegelt sich auf der Regulationsebene der beiden α -Untereinheiten wider (Abb. 1-2). Beide werden rapide unter normoxischen Bedingungen poly-ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut (Huang *et al.*, 1998; Salceda und Caro, 1997). Dies geschieht vor allem über die posttranslationale Hydroxylierung der bereits erwähnten Prolin-Reste durch die PHDs 1-3 (*prolyl hydroxylase domain containing enzymes*) (Jakkola *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2001, Bruick und McKnight *et al.*, 2001).

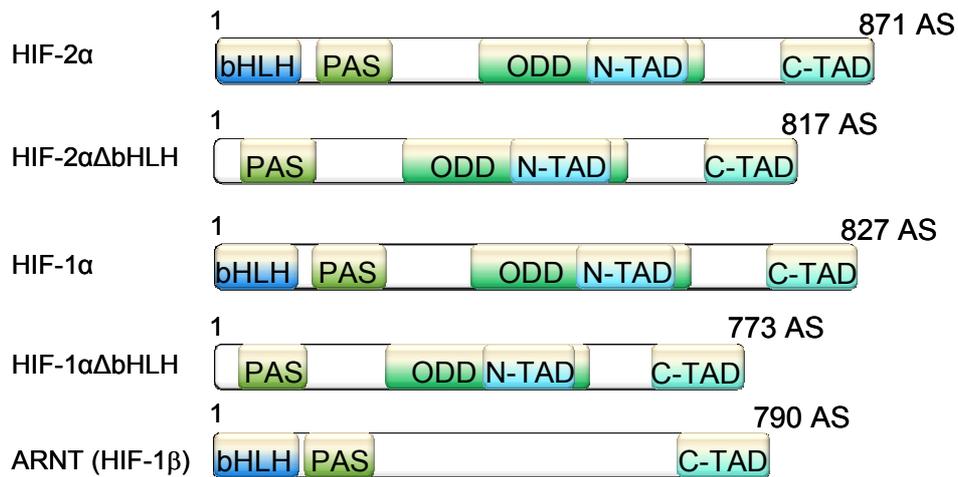


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der HIF-Untereinheiten.

Schematische Darstellung der HIF α - und β -Untereinheiten mit Angabe der jeweiligen Anzahl der Aminosäuren. Die Proteine HIF-1 α (Gen: Chromosom 14) und HIF-2 α (Gen: Chromosom 2) sind in den dargestellten Domänen hoch konserviert. Die bHLH (*basic helix-loop-helix*)-Domäne dient der DNA Bindung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mutanten hergestellt, bei denen die DNA-bindende Domäne deletiert wurde. (HIF-1 α ΔbHLH und HIF-2 α ΔbHLH). Zusätzlich hat ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), die β -Untereinheit, (Gen: Chromosom 1) eine und HIF α zwei *transactivation domains* (TAD), die u.a. Bindestellen für CBP (*cAMP response element binding protein*) / p300 enthalten. Innerhalb der ODD und der N-TAD liegen Prolin-Reste nach deren Hydroxylierung unter Sauerstoff die pVHL-vermittelte Degradation der α -Untereinheit stattfindet.

Die Aktivität der PHDs ist von molekularem Sauerstoff abhängig und macht sie so zu den am besten geeigneten Kandidaten für die Sauerstoffmessung in Zellen. Außerdem werden das Substrat 2-Oxoglutarat sowie die Kofaktoren Eisen und Vitamin C für die Hydroxylierung der HIF α -Untereinheit benötigt. Unter Hypoxie ist unzureichend Sauerstoff für diese Hydroxylierungsreaktionen verfügbar, der Abbau der HIF α -Untereinheiten unterbleibt, so dass sie akkumulieren.

Die HIF α -Untereinheit kann mit der konstitutiv exprimierten β -Untereinheit im Zellkern dimerisieren. Die Interaktion findet über die bHLH- und PAS-Domänen statt und ein funktioneller DNA-Bindungskomplex wird gebildet. Dieser bindet dann spezifisch an die HIF-Erkennungssequenz 5'-RCGTG-3' (wobei R entweder ein A oder G ist) und führt zur Transkription der entsprechenden Zielgene, z.B. EPO (Abb. 1-3) (Wenger *et al.*, 2005). Zusätzlich zum Abbau der α -Untereinheit kann die Transkriptionsaktivität von HIF durch Hydroxylierung eines Asparaginrestes in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (C-TAD) des HIF α -Proteins blockiert werden, da dies die Rekrutierung der Transkriptionskofaktoren CBP (*cAMP response element binding protein*) / p300 verhindert. Diese Asparaginyhydroxylase wird als *factor inhibiting HIF-1* (FIH-1) bezeichnet (Fandrey *et al.*, 2006).

HIF-1 β ist auch unter dem Namen ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) bekannt und wurde erstmals unabhängig von HIF α als Komponente innerhalb der *xenobiotic-sensing* AHR (*aryl hydrocarbon receptor*)-Signalkaskade beschrieben (Hoffmann, *et al.*, 1991). ARNT dient einer Vielzahl von bHLH-PAS Proteinen (HIF α , AHR, SIM und sich selbst) als Dimerisationspartner.

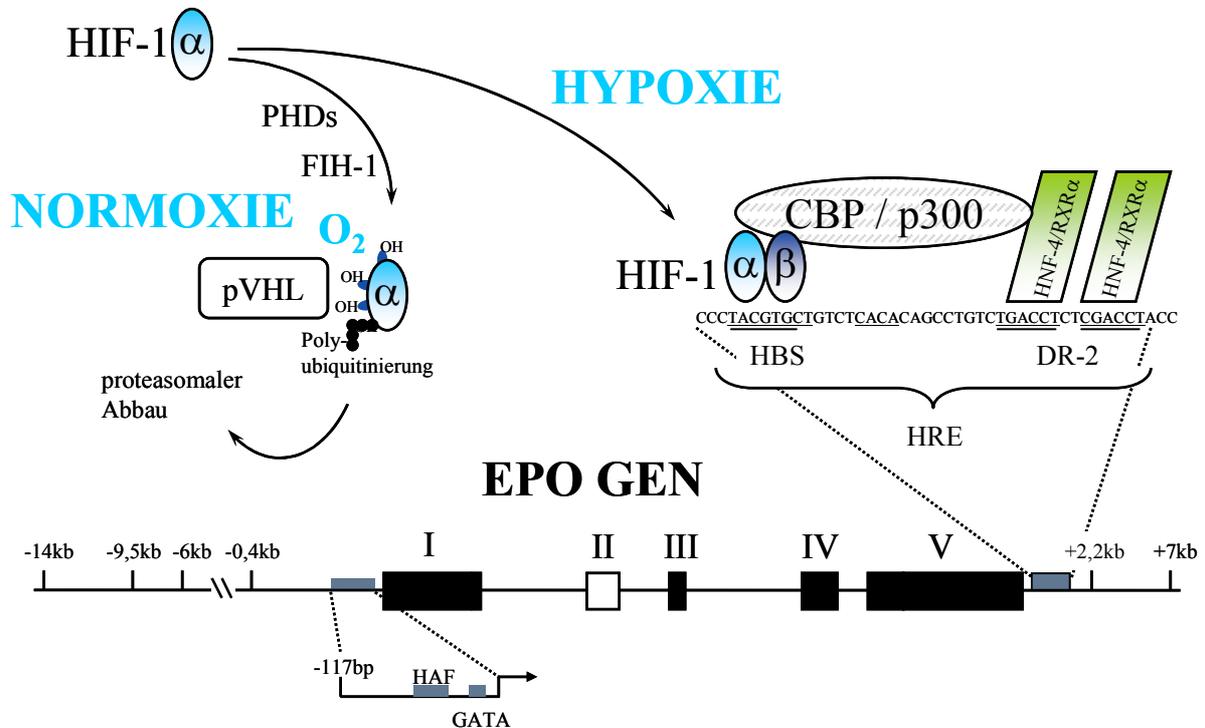


Abb. 1-3: Aufbau des Erythropoietin-Gens und HIF-1 α Regulation.

Das EPO-Gen befindet sich auf Chromosom 7 (Position 7q21-7q22) und umfasst 5,4 *kilo base pairs* (kb) mit 5 Exons und 4 Introns. Eine 8 Basenpaar große *Cis*-aktive Konsensussequenz (5'-TACGTGCT-3') innerhalb des EPO-Gens wurde im 3' Enhancer als Bindestelle für HIF identifiziert (HBS (*HIF binding site*)). Die 3' Enhancer Region besitzt neben der HBS ein CACA-Element und eine DR-2 (*direct repeat of two hexanucleotides separated by two base pairs*)-Bindestelle. An die DR-2-Bindestelle konnte die Bindung gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren (HNF-4 α und RXR α) beschrieben werden. Jedoch ist ein Faktor für das CACA bis dato unbekannt. Diese drei Elemente werden als HRE (*hypoxia-responsive element*) bezeichnet. HIF-1 α wird unter Normoxie (O₂) nach Hydroxylierung durch die PHDs (*prolyl hydroxylase*) mit Hilfe des pVHL (*von Hippel-Lindau protein*) proteasomal abgebaut. Unter Hypoxie kommt es zu einer Stabilisierung von HIF-1 α ; diese Untereinheit transloziert in den Kern und bildet mit HIF-1 β ein Heterodimer. Der HIF-Komplex steuert so mit anderen gewebespezifischen Faktoren und transkriptionellen Koaktivatoren CBP / p300 die Hypoxie-induzierbare EPO-Genexpression (modifiziert nach Fandrey, 2004).

Erythropoietin ist damit ein HIF-induzierbares Gen, dass zusätzlich unter der Kontrolle weiterer Transkriptionsfaktoren steht. Zu diesen Faktoren zählt unter anderem HNF-4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 alpha*), der eine gewebespezifische Expression gewährleistet (Abb. 1-3).

1.2.2 Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF-4 α

Ursprünglich wurde HNF-4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) als Regulator für leberspezifische Gene identifiziert (Sladek *et al.*, 1990). HNF-4 α ist besonders in der frühen Entwicklung, aber auch beim Erwachsenen für die Regulation zahlreicher Gene wichtig (Makita *et al.*, 2001). Außer in der Leber (Hepatocyten) wird HNF-4 α in den Nieren (Proximaler Tubulus), im Darm und in geringen Mengen in Magen, Pankreas (β -Zellen) und Nebenhoden exprimiert. In den Nieren sind große HNF-4 α Proteinmengen vorhanden, jedoch ist EPO in diesem Organ das bisher einzig bekannte HNF-4 α -Zielgen (Galson *et al.*, 1995). Mehrere hundert Zielgene, die an Lipid-, Aminosäure- und Glukose-Metabolismus, Leber-Differenzierung, Zelladhäsion und Immunreaktionen beteiligt sind, sind bekannt (Gonzalez, 2008). Mutationen in dem HNF-4 α -Gen führen somit zu schweren Erkrankungen (Ryffel, 2001). HNF-4 α ist in den funktionalen Domänen evolutionär hoch konserviert. Die HNF-4 α -Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen und durch die unterschiedliche Verwendung von zwei Promotoren (Abb. 1-4) (Drewes *et al.*, 1996).

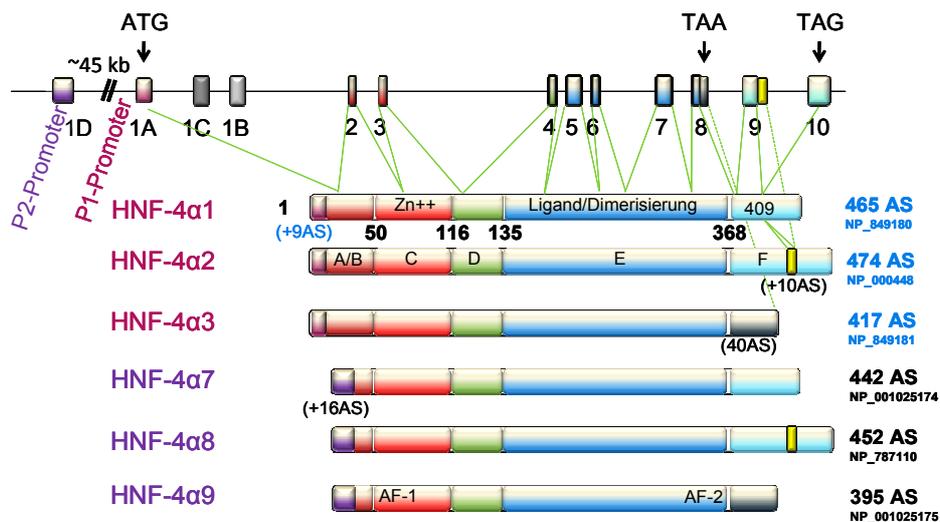


Abb. 1-4: Schematische Darstellung des HNF-4 α -Gens und seiner Splicevarianten.

Das menschliche HNF-4 α -Gen befindet sich auf Chromosom 20 (Position 20q13.1-q13.2). Es umfasst 10 Exons, wobei ein zweiter Promotor, P2, 45 kb stromaufwärts des ersten Promotors, P1, liegt. Sechs Spleißvarianten sind nachgewiesen worden, die Anzahl der Aminosäuren ist angegeben. Neben der DNA-Bindungsdomäne (C), mit zwei Zink-Finger Motiven, und der Ligandenbindungsdomäne (E), mit der Aktivierungsfunktion AF-2, verfügt HNF-4 α über eine N-terminale A / B Domäne mit der Aktivierungsfunktion AF-1, eine flexible Gelenkdomäne (D) und eine C-terminale Repressionsdomäne (F), die seine Aktivität negativ modulieren kann (modifiziert nach Sladek *et al.*, *Transcription Factor Encyclopedia*, 2009).

Der Promotor P1 initiiert Splicevarianten, die das Exon 1A enthalten (Isoformen $\alpha 1$ - $\alpha 3$), während der Promotor P2 Transkripte mit Exon 1D (Isoformen $\alpha 7$ - $\alpha 9$) produziert (Boj *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001). Die Isoformen $\alpha 2$ und $\alpha 8$ sind die alternativen Spleißvarianten der Isoformen $\alpha 1$ und $\alpha 7$, die zusätzlich 10 Aminosäuren in der F-Domäne enthalten (Li *et al.*,

2006). In der adulten Niere wird die Expression von HNF-4 α hauptsächlich durch den proximalen P1-Promotor reguliert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Splicevariante HNF-4 α 2 untersucht. Bei dieser Isoform ist die Inhibition der Koaktivatorbindung durch die F-Domäne aufgehoben bzw. die Interaktion mit den Koaktivatoren verstärkt (Sladek *et al.*, 1999; Ruse *et al.*, 2002). Die Anzahl der Isoformen deutet auf unterschiedliche Funktionen hin und variiert mit der Entwicklung, Differenzierung und Herkunft des Gewebes (Nakhei *et al.*, 1998; Sladek und Seidel, 2001; Suaud *et al.*, 1997; Torres-Padilla *et al.*, 2001).

Dieser zu der *nuclear hormone receptor* (NHR) Superfamilie gehörende Transkriptionsfaktor bindet an die DNA über DRs (*direct repeats*)-Erkennungssequenzen als Homodimer. Durch diese Besonderheit der ausschließlichen Homodimerbildung charakterisiert HNF-4 α eine eigene Subfamilie IV (Jiang *et al.*, 1995). Die Liganden von NHR sind meist hydrophobe Signalmoleküle, wie Steroidhormone, Schilddrüsenhormone, Derivate von Vitamin A (Retinoide) und Vitamin D (Schulman *et al.*, 2004). HNF-4 α wurde ursprünglich als Orphan-Rezeptor bezeichnet, da die Identität eines Liganden lange Zeit unbekannt war. Neueste Erkenntnisse scheinen auf eine Fettsäure (Linolsäure (LA), C18:2) zu deuten, die an HNF-4 α in reversibler Form binden kann. Jedoch scheint die Bindung von LA die Transaktivierungsfunktion von HNF-4 α nicht zu beeinflussen (Yuan *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu ist mit Retinsäure der Ligand für einen weiteren *nuclear hormone receptor* RXR (*retinoic X receptor alpha*), der bei der neuronalen EPO-Expression eine Rolle spielt, bekannt.

1.2.3 Der nukleäre Hormon-Rezeptor RXR α

Viele *nuclear hormone receptors* (NHR) agieren als Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren, die sowohl exogene als auch endogene Liganden binden (Schulman *et al.*, 2004). Der *retinoic X receptor alpha* (RXR α , Abb. 1-5) gehört zu der Familie der NHR und wird der Subfamilie II zugeordnet, zu denen auch Retinsäure-, Thyreoideahormon-, und Vitamin D-Rezeptoren sowie Ecdysone zählen. Von *retinoic acid receptors* (RARs) und RXRs sind die Isoformen α , β und γ bekannt (Leid *et al.*, 1992). Das Modell einer Liganden-abhängigen Aktivierung basiert auf einer Konformationsänderung zwischen Liganden-freier (Apo) und Liganden-gebundener (holo) Form des Rezeptors. Als Liganden dienen all-*trans*-Retinsäure (at-RA) und 9-*cis*-Retinsäure (9cRA). Sie gehören zu der Gruppe der Retinoide. Diese aktiven Metaboliten werden über Retinoldehydrogenase und Retinaldehydrogenase

durch Oxidation von Retinol (Vitamin A, bzw. Provitamin A) hergestellt. Die so entstehende *at*-RA kann neben RARs und nach Isomerisierung zu *9cis*-RA auch RXRs aktivieren (Allenby *et al.*, 1993; Urbach und Rando, 1994). RXRs bilden in erster Linie Heterodimere mit RAR und den Rezeptoren von Thyreoideahormonen und Vitamin D aus (Kurokawa *et al.*, 1993).

RXR α spielt eine wichtige Rolle in vielen fundamentalen biologischen Prozessen wie zelluläre Differenzierung, Knochenentwicklung, Hämatopoese und Entwicklungsprozessen während der Embryogenese (Kessel, 1992).

HNF-4 α und RXR α weisen eine hohe Übereinstimmung in der DNA-Bindungsspezifität und ihrer Aminosäuresequenz auf (Abb. 1-5, Bogan *et al.*, 2000). Vermutlich stellt das DR-2 (*direct repeat of two hexanucleotides separated by two base pairs*) Element im EPO 3' Enhancer eine Erkennungssequenz für HNF-4 α und RXR α dar. (Kambe *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurden die Effekte, die *all-trans*-Retinsäure über RXR α auf das Zielgen EPO ausübt, untersucht.

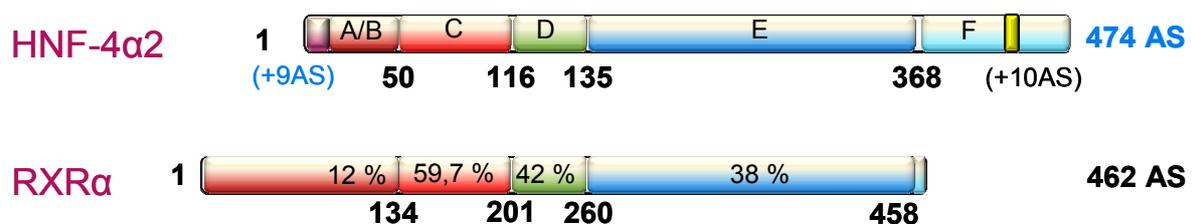


Abb. 1-5: Schematische Darstellung von RXR α im Sequenzvergleich zu HNF-4 α 1.

Beide nukleären Hormon-Rezeptoren zeigen die klassische Domänenaufteilung (vgl. Abb. 1-4). Die prozentuale Übereinstimmung der einzelnen Domänen von RXR α ist zu HNF-4 α schematisch dargestellt (modifiziert nach Bogan *et al.*, 2000).

1.2.4 Der transkriptionelle Ko-Aktivator CBP

Der Koaktivator *cAMP response element binding protein* (CBP) ist in multiple Signal-Transduktionswege mit unterschiedlichen Aktivatoren involviert, zu denen auch Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie wie TATA-Bindungs-Protein, TFIIB und RNA-Helicase gehören. CBP besitzt eine starke intrinsische Histon-Acetylase (HAT) Aktivität, die eine Veränderung der lokalen Chromatinstruktur bewirkt und somit die DNA für andere Regulatoren zugänglich macht. Es wird vermutet, dass besonders die Nuklear Rezeptor (NR) Box, ein kurzes Leucin-reiches Motiv (LXXLL), für die Interaktion von CBP mit NRs notwendig ist. Es sind drei dieser Leucin-Motive in CBP bei den Aminosäuren 65, 356 und 2964 lokalisiert (Abb. 1-6) (Dell *et al.* 1999, Arany *et al.*, 1996).



Abb. 1-6: Schematische Darstellung des Koaktivators CBP.

Die schematische Darstellung des *cAMP response element binding protein* (CBP) zeigt die Domänen RID (*receptor interacting domain*, 1-100 AS) und KIX (*kinase-inducible interaction domain*, 576-679 AS). Cystein / Histidin-reiche Bereiche sind die CH1- (362-429 AS), CH2- (1200-1488 AS), CH3- (1676-1849AS) Domänen. Außerdem gibt es eine glutaminreiche Domäne (Q, 1892-2260 AS), eine Bromodomäne (Br, 1107-1171 AS). Die Lage der drei Leucin-Motive ist durch Pfeile gekennzeichnet (modifiziert nach Dell *et al.*, 1999).

Der Transkriptionskofaktor CBP (*cAMP response element binding protein*) ist ein essentieller transkriptioneller Koaktivator der Hypoxie-induzierbaren EPO-Genexpression, wozu die CH1 (Cystein / Histidin-reiche) Domäne von CBP an die *C-terminal transactivation domain* (C-TAD) von HIF α bindet und die transkriptionelle HIF-Aktivität vermittelt (Ruas *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die CH3-Domäne mit der N-TAD von HIF-1 α interagiert und zur transkriptionellen Aktivität von HIF beiträgt. Dell *et al.* konnten 1999 zeigen, dass HNF-4 α im Gegensatz zu anderen NHRs Liganden-unabhängig CBP rekrutieren kann. Sie zeigten, dass HNF-4 α mit der C-terminalen Region von CBP (1812-2441 AS), die auch die CH1-Domäne beinhaltet, interagiert. Außerdem wird eine Interaktion von HNF-4 α mit der N-terminalen Region von CBP (1-771 AS), in der nur die glutaminreiche Domäne (Q-reich) enthalten ist, beschrieben. Da CBP sowohl HIF als auch HNF-4 α binden kann, liegt nahe, dass CBP als transkriptionelles Brückenprotein bei der EPO-Genexpression fungiert.

1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Rolle der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α , HIF-2 α , HNF-4 α und RXR α bei der gewebespezifischen Induktion des EPO-Gens in unterschiedlichen Zellmodellen untersucht werden. Dazu sollte der Einfluss von HIF-1 α versus HIF-2 α im Heterodimer mit ARNT bei der hypoxischen Induktion in Neuroblastomzellen der Linie SY5Y und in dem neuem physiologischen Modell für eine renale EPO-Expression (Nierenzellen der Linie HK120) erarbeitet werden. Es sollte festgestellt werden, ob HIF-1 α oder HIF-2 α verstärkt an der EPO-Expression in diesen Zellen beteiligt ist. Außerdem sollte ermittelt werden, ob HIF-2 α ein Zielgen von HIF-1 α ist.

Aus Vorarbeiten ging hervor, dass zwei Neuroblastomzelllinien (Kelly und SY5Y) als Modell für die neuronale EPO-Expression dienen können. In den Neuroblastomzellen ist HNF-4 α nicht exprimiert und es wird – wie während der Fetalzeit – die Beteiligung eines Retinsäure-Rezeptors (RXR α) vermutet. Es sollte gezeigt werden, ob es in den Neuroblastomzellen durch den Liganden (at-RA) von RXR α zu einer Steigerung der EPO-mRNA kommt. Außerdem sollte die exogene Expression von HNF-4 α in den Kelly-Zellen bezüglich der Induzierbarkeit der EPO-mRNA getestet werden. Zu den Nierenzellen HK120 gab es bislang keine Erkenntnisse; deshalb sollte der Einfluss der beiden gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren – HNF-4 α oder RXR α – auf die EPO-Expression analysiert werden. Zusätzlich sollte in den Nierenzellen untersucht werden, ob die EPO-Expression von at-RA beeinflusst wird.

Mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie sollte die Protein-Protein-Interaktionen der bei der EPO-Expression beteiligter Transkriptionsfaktoren in lebenden Zellen mittels FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) analysiert werden. Zunächst sollte ein effizientes Klonierungssystem etabliert werden, da die zu untersuchenden Proteine für die FRET-Messungen an die Fluorophore CFP (*cyan fluorescence protein*) oder YFP (*yellow fluorescence protein*) gekoppelt vorliegen müssen. Die Protein-Protein-Interaktion zwischen HIF-1 α mit ARNT versus HIF-2 α mit ARNT sollten mittels FRET verglichen werden. Mit Hilfe bHLH-Deletionsmutanten von HIF-1 α und HIF-2 α sollte die Notwendigkeit der Bindung an die DNA für die HIF-Komplexbildung geklärt werden. Weiterhin sollte eine Interaktion des HIF-Komplexes mit dem gewebespezifischen Transkriptionsfaktor HNF-4 α und dem Adaptorprotein CBP untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Proteinbiochemische Methoden

Herstellung von Zelllysaten

Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50-60 % in einer 35 mm Kulturschale kultiviert und dann in den jeweiligen Versuch eingesetzt. Zur Gewinnung eines Gesamt-Zelllysates wurden nach dem Versuch die Kulturschalen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und sofort mit 50 µl Lysis-Puffer (50 µl Igepal (NP40 0,1 %), 30 ml 0,5 M Natriumchlorid, 500 µl 1 M Tris pH 7,9, 100 µl 0,5 µl EDTA, 18,9 ml 1x PBS), der 10 % ige Protease Inhibitor-Lösung enthielt, lysiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden gelöst und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach 20 min auf Eis wurde der Überstand von Zellresten durch Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C getrennt. Der Überstand wurde bei -20 °C bis zur Proteinbestimmung und anschließender Analyse gelagert.

Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinmenge im Gesamt-Zelllysate erfolgte mit dem DC Protein Assay Kit (BioRad). Es wurden 5 µl des Lysates mit Wasser auf ein Volumen von 50 µl gebracht. Je 20 µl davon wurden für die Doppelbestimmung auf eine 96-well Platte pipettiert. Pro Vertiefung wurden 10 µl Reagenz A und 75 µl Reagenz B hinzugegeben. Die zugehörige Albumin-Standardreihe (25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1 mg / ml) und eine Wasserprobe wurden nach gleichem Verfahren aufgetragen. Nach 5 min wurde bei 700 nm im ELISA Reader die Emission bestimmt und mit dem Programm I-Smart ausgewertet.

SDS-Page und Western-Blot

Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-Page. Die Probenvorbereitung fand unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) statt. Dazu wurden die Proben (40-70 µg Protein) mit 4x SDS-Probenpuffer (0,4 ml *a.dest.*, 1,6 ml 0,5 M Tris pH 6,8, 1,6 ml Glycerin, 3,2 ml 10 % SDS, 0,8 ml β-Mercaptoethanol, 0,4 ml 0,5 % (w / v) Bromphenolblau) versetzt. Unter hitzedenaturierenden Bedingungen (5 min bei 95°C) wurden die Proteine auf ihre Primärstruktur reduziert und mit SDS (*sodium dodecyl sulfat*) wurde die Eigenladung der Proteine mit ca. 1,4 g SDS pro g Protein überdeckt. Das Gel wurde aus einem 5 % igen Sammelgel (2,9 ml *a.dest.*, 0,83 ml Acrylamid / Bisacrylamid, 1,25 ml 0,5M Tris pH 6,8, 50 µl 10 % SDS, 25 µl 10 % APS, 5 µl TEMED) und einem 7,5 % igen Trenngel (4,9 ml *a.dest.*, 2,5 ml Acrylamid / Bisacrylamid, 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 100 µl 10 % SDS, 50 µl 10 %

APS, 5 µl TEMED) hergestellt. Die Puffer setzten sich folgendermaßen zusammen: 0,5 M Tris pH 6,8: 91 g Tris wurde in 400 ml *a.dest.* gelöst, mit 32 % iger HCl wurde der pH Wert eingestellt und auf ein Gesamtvolumen von 500 ml mit *a.dest.* aufgefüllt. 1,5 M Tris pH 8,8: Es wurden 30,3 g Tris in 400 ml *a.dest.* gelöst, mit 32 % iger HCl wurde der pH Wert eingestellt, und anschließend die Lösung mit *a.dest.* auf 500 ml aufgefüllt. Die Proben und ein Standard für die Mol Masse (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas) konnten auf das Gel aufgetragen werden, wobei die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes während der Wanderung durch das Gel in Richtung Anode getrennt wurden. Diese Auftrennung erfolgte für 90 min bei 120 V. Danach wurden die Proben in einem Tank-Blot System (BioRad) mit 1x Blotpuffer (5 g Tris, 72 g Glycin, 1 l Methanol, *a.dest.* ad 5 l) und einem Kühlakku für 90 min bei 120 V auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Mit Ponceau S-Lösung (Sigma) wurde überprüft, ob der Transfer erfolgreich war. Die Membran wurde mit TBS-T Puffer (50 ml 10 x TBS-Puffer, 250 µl Tween 20 (Sigma), *a.dest.* ad 500 ml) gewaschen. Der 10x TBS-Puffer wurde aus 121 g Tris und 400 g Natriumchlorid hergestellt, wobei der pH-Wert auf 7,6 mit 37 % iger HCl eingestellt wurde und die Lösung auf ein Endvolumen von 5 l mit *a.dest.* gebracht wurde.

Für die spezifische Untersuchung der Membran wurde diese in 5 % iger Magermilchlösung (Magermilchpulver in TBS-T gelöst) über Nacht mit dem 1. Antikörper inkubiert (Tabelle 2-1). Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde der entsprechende 2. Antikörper (gelöst in 5 % iger Magermilch) hinzugegeben.

Tabelle 2-1 Antikörper für die Western-Blot Analyse

Antikörper	Beschreibung	erzeugt in	Verdünnung	Hersteller
anti-rabbit	HRP-konjugiert	Ziege	1:10000	Sigma-Aldrich
anti-mouse	HRP-konjugiert	Ziege	1:10000	Sigma-Aldrich
anti- α -Tubulin	monoklonal	Maus	1:200	Santa CruzBiotechnology
anti- β -Aktin	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Abcam
anti-GFP	polyklonal	Kaninchen	1:200	Clontech
anti-HIF1 α	monoklonal	Maus	1:500	BD TransductionLaboratories
anti-HIF2 α	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Novus Biologicals
anti-HNF4	monoklonal	Kaninchen	1:1000	Abcam

Die Detektion erfolgte mit dem Luminol / ρ -Coumarinsäure- oder ECL-System (Amersham ECL Advance Western-Blotting Detection Kit, GE Healthcare). Luminol / ρ -Coumarinsäure wird aus 3 µl 30 % H₂O₂, 50 µl 250 mM Luminol (500 mg Luminol, 11,3 ml DMSO), 25 µl

90 mM ρ -Coumarinsäure (10 mg ρ -Coumarinsäure in 667 μ l DMSO), 10 ml 100 mM Tris pH 8,5 (24,2 g Tris wurde in 1 l *a.dest.* gelöst und mit HCL (rauchend) auf einen pH Wert von 8,5 gebracht, das Gesamtvolumen betrug 2 l) hergestellt. Für die Visualisierung auf einen Röntgenfilm wurde die Membran 1 min mit frisch angesetzter Luminol / ρ -Coumarinsäure-Lösung oder 5 min mit je 250 μ l Reagenz A und B des ECL-Kits inkubiert. In der Dunkelkammer konnte der Röntgenfilm für 1-10 min exponiert werden. Der Film wurde in Roentgen Liquid (Tetenal) bis zur gewünschten Signalintensität entwickelt. Anschließend wurde in Wasser mit einem geringen Prozentsatz Essigsäure gewaschen, in Roentgen Superfix (Tetenal) fixiert und abschließend wieder in Wasser gewaschen.

2.2 RNA Methoden

Isolierung von RNA aus Zellen

Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50-60 % in 6-well Platten kultiviert und in den jeweiligen Versuch eingesetzt. Der Versuch wurde als Dreifach-Bestimmung angesetzt. Zur Isolierung der RNA aus den Zellen wurde nach dem Versuch das Medium auf Eis abgesaugt, 700 μ l 4 M GTC (236,4 g Guanidiumthiocyanat 4,18 ml 3 M NaOAc pH 5,2, DEPC-H₂O ad 500 ml, filtrieren, 3,75 ml β -Mercaptoethanol) hinzugefügt und die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert. DEPC-H₂O wurde folgendermaßen angesetzt: 500 μ l Diethylpyrocarbonat (DEPC), wurde 40 min in 500 ml *a.dest.* gerührt und danach 40 min autoklaviert. Am nächsten Tag wurden 70 μ l 2M NaAc (16,41 g Natrium Acetat in 100 ml *a.dest.*, pH 4,0 mit Eisessig eingestellt) in 1,5 ml Eppendorfgefäßen vorgelegt und die aufgetauten Proben hinzugefügt. Unter dem Abzug wurde 560 μ l Phenol (AppliChem) und 280 μ l Phenol-Chloroform-Isoamyl (AppliChem) hinzugegeben. Die Proben sollten sich nach dem Mischen milchig trüben. 20-60 min blieben die Proben auf Eis stehen und wurden danach für 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. In die neuen 1,5 ml Eppendorfgefäße wurde der Überstand überführt und mit 500 μ l Isopropanol versetzt. In dem Überstand sollte die RNA gelöst vorliegen. Die Interphase enthielt DNA und in der organischen Phase waren die Proteine gelöst. Jetzt mussten die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert werden. Am nächsten Tag wurde für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Unter dem Abzug wurde danach der Überstand vorsichtig abgossen. Die Pellets in den 1,5 ml Eppendorfgefäße wurden auf dem Kopf stehend getrocknet. Anschließend wurden 300 μ l GTC und 300 μ l Isopropanol hinzugegeben. Ab diesem Schritt mussten gestopfte Pipettenspitzen benutzt werden, um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Nach dem Vortexen wurden die Proben wieder über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben für 30 min

bei 13000 rpm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes und kurzem Trocknen wurde 500 µl 75 % Ethanol (100 % Ethanol in DEPC-H₂O verdünnt) zu den Proben gegeben. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Proben kurz gemischt und für 30 min 13000 rpm gekühlt zentrifugiert. Der Überstand musste sehr vorsichtig abgegossen werden, und die Pellets wurden ca. 45 min getrocknet. Durch diesen Schritt sollten Lösungsmittelreste entfernt werden. Erst danach konnte die gewonnene mRNA in 10-20 µl DEPC-Wasser gelöst werden. Die Ausbeute und Reinheit der gewonnen mRNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm ermittelt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription (RT) wurde die RNA mittels Oligo-(dT), dNTPs und dem Enzym Reverse Transkriptase (MMLV-RT, Promega) in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die RT wurde 1 µg RNA eingesetzt, mit 2,5 µl Oligo dT versetzt und auf ein Volumen von 12 µl mit DEPC-H₂O gebracht. Dieser Ansatz wurde 10 min auf 68 °C geheizt, wobei Oligo dT an den Poly A-Schwanz der RNA band. Nach Abkühlung auf Eis wurden 13 µl eines RT-Mix hinzugefügt (Tabelle 2-2). In der anschließenden RT wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Die entstandene cDNA war stabiler als RNA und konnte als Matrize für PCR-basierte Experimente genutzt werden.

Tabelle 2-2 RT-Einzelansatz und RT Programm

Reagenz	µl	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (t)
5x Puffer	5	1x	45	90min
dNTPs	5	1x	52	30min
RT MMLV	0,5	1x	96	15min
H ₂ O	2,5			

PCR

Mit Hilfe einer qualitativen PCR (*polymerase chain reaction*) wurde der Erfolg der RT überprüft. Die GoTaq DNA Polymerase (Promega) diente hier der Amplifikation der zu untersuchenden Gene. Primer wurden so gewählt, dass sie zusätzlich für die qRT (*quantitative real time*) geeignet waren und ein ca. 100-150 bp großes PCR-Produkt entsteht. 24,5 µl Mix (Tabelle 2-3) wurden mit 0,5 µl der cDNA aus der vorherigen RT versetzt. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines 2 % igen Ethidiumbromid-Agarosegels kontrolliert und nach Anregung des Ethidiumbromids mit UV-Licht dokumentiert (vgl. Abschnitt *Horizontale*

Gelelektrophorese von DNA). β -Aktin (60 °C 27 Zyklen) dienten als Kontrollgen (Tabelle 2-4). Die Annealing-Temperatur wurde entsprechend den zur Verfügung stehenden genspezifischen Primern angepasst. EPO (62 °C 30 Zyklen) und weitere Gene wurden im Hinblick auf Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Versuchsbedingungen untersucht.

Tabelle 2-3 PCR Einzelansatz und PCR Programm (Bsp. β -Aktin)

Reagenz	μ l	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (t)
5x Puffer	5	1x	96	3min
dNTPs	2	27x	96	1min
Primer s	0,5		60	90sec
Primer a	0,5		72	3min
H ₂ O	16,5	1x	72	10min
Taq Pol	0,05			

Quantitative *real time*-PCR

Für die quantitative Analyse der cDNA wurde eine *real time*-PCR mit Hilfe des Mesa Green qPCR MasterMix Plus für SYBR[®] Assay (Eurogentec) durchgeführt. Genspezifische Primer und β -Aktin-Primer kamen zum Einsatz (Tabelle 2-4)

Tabelle 2-4 Quantifizierungsprimer (Invitrogen)

Gen	Name	Sequenz 5' → 3'	Programm
Aktin	hAktin-TAQ 3'	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	60 °C 35 Zyklen
	hAktin-TAQ 5'	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	
EPO	hEpo-TAQ 3'	GGTCATCTGTCCCCTGTCCT	60 °C 45 Zyklen
	hEpo-TAQ 5'	CTCCGAACAATCACTGCT	
ADM	hADM-TAQ 3'	GACACCAGAGTCCGACCCGG	60 °C 45 Zyklen
	hADM TAQ 5'	GGATGCCGCCCGCATCCGAG	
HIF-1 α	hHIF1 α -TAQ 3'	TCACTGGGACTATTAGGCTCAGGT	60 °C 35 Zyklen
	hHIF1 α -TAQ 5'	CTCCATTACCCACCGCTGAA	
HIF-2 α	hHIF2 α -TAQ 3'	CCTTGCAGGAGCCTGGAG	60 °C 35 Zyklen
	hHIF2 α -TAQ 5'	AGGACTACAGCCTGTCGTCAGC	
RXR α	hRXR α -TAQ 3'	GAGCTGATGACCGAGAAAGG	60 °C 45 Zyklen
	hRXR α -TAQ 5'	TTCTCCACCCAGGTGAACTC	

Es wurde eine Standardreihe von 100 fg, 10 fg, 1 fg, 0,1 fg, 0,01 fg und 0,001 fg verwendet. Dafür wurde von den Standardproben eine Dreifachbestimmung und für die Proben eine Zweifachbestimmung durchgeführt. Der PCR Mix setzte sich wie in Tabelle 2-5 aufgeführt zusammen:

Tabelle 2-5 qRT PCR-Einzelansatz

Reagenz	Mix	Mix
	je 2fach Bestimmung	je 3fach Bestimmung
2x PCR Puffer	25	40
H ₂ O	22	35,2
Primer 3'	1	1,6
Primer 5'	1	1,6

Für die Gesamtzahl der Proben wurde dann ein Mastermix angefertigt, wobei für eine Zweifachbestimmung 49 µl Mastermix mit 1 µl cDNA und für eine Dreifachbestimmung 78,4 µl Mastermix mit 1,6 µl Standard-cDNA versetzt wurde. Dieser Mix wurde mit je 20 µl auf die 96-well Platte verteilt, um die qRT-PCR durchzuführen. Das PCR-Programm (Tabelle 2-6) wurde durch die Wahl der Primer bestimmt.

Tabelle 2-6 qRT PCR-Programm (Bsp. β-Aktin)

Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (t)
1x	95	10min
35x	95	15sec
	60	1min

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des Programms Excel ausgewertet. Die Mittelwerte \pm SD stammen von wenigstens drei unabhängigen Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt wurde meistens ein repräsentativer Versuch in n-facher Induktion bezogen auf einen Kontrollversuch. Für die Statistikauswertungen wurde GraphPad Inst von GraphPad Software mit dem Turkey-Cramer Test benutzt. Die Signifikanzen wurden als Sternchen dargestellt, wobei *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$ und ***: $P < 0,001$ bedeuten.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Gateway®-Klonierungen (Destination Vektor)

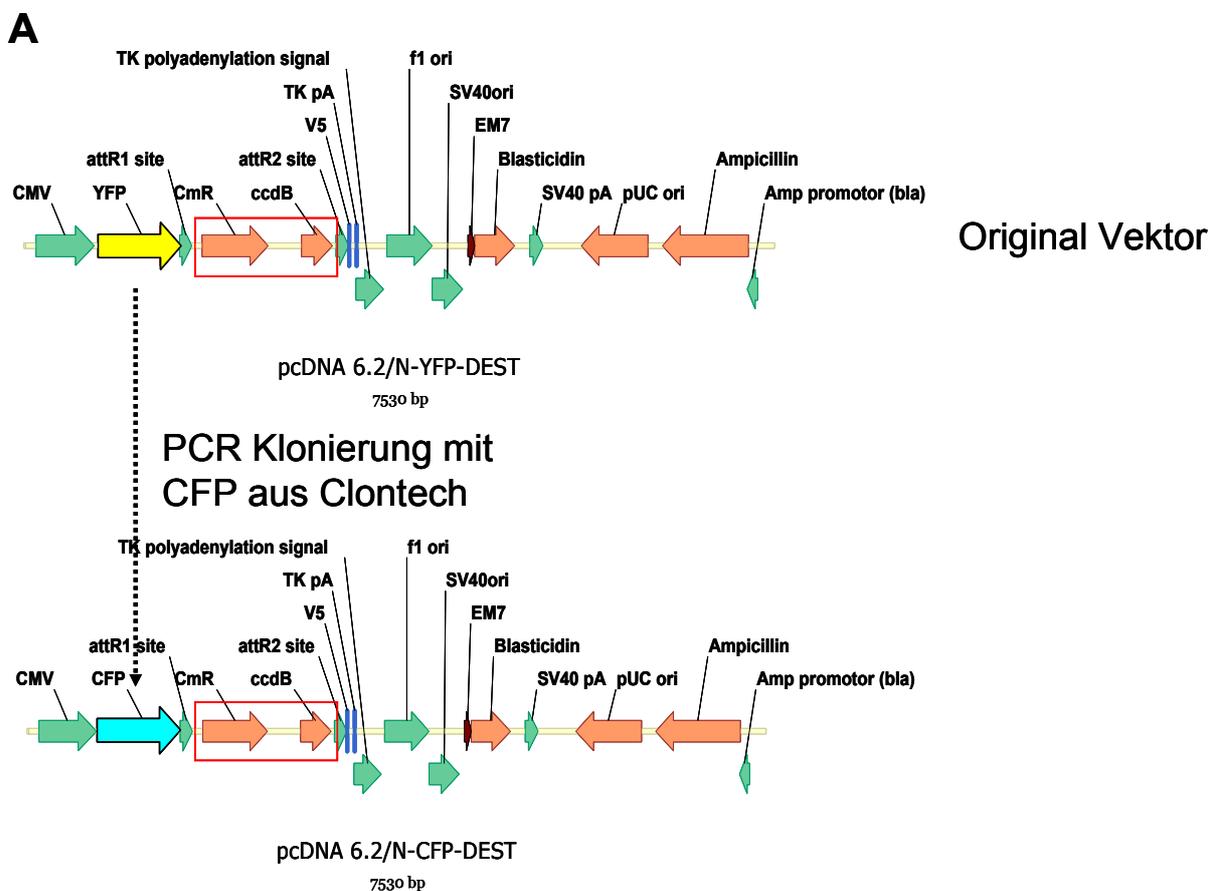
Für die Gateway®-Klonierungen wurden in den YFP-Leervektoren (hier den sogenannten Destinationsvektoren) YFP (*yellow fluorescence protein*) durch CFP (*cyan fluorescence protein*) ersetzt. Dafür wurden PCR-Klonierungen durchgeführt. Für die Erzeugung des pcDNA/6.2 N-CFP-Dest Vektors wurde folgende Klonierungsstrategie verfolgt: CFP wurde aus dem ECFP-C1 mit Hilfe des Primerpaares XhoI-ECFP-for und XhoI-ECFP-rev amplifiziert (Tabelle 2-7 und 2-9).

Tabelle 2-7 PCR Einzelansatz und PCR-Programm Destination Vektor

Reagenz	µl	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (t)
10x Puffer	5			
dNTPs	4	1x	95	2min
XhoI-ECFP-for	1,25	30x	95	30sec
XhoI-ECFP- rev	1,25		55	30sec
Pfu Turbo	1		72	1min
H ₂ O	32,5	1x	72	10min
Template	5		15	halten

Nach Amplifikation wurde das CFP-PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese überprüft und mit Hilfe von Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) aus dem Gel aufgereinigt. Die verwendete PfuTurbo-DNA-Polymerase (Stratagene) produzierte aufgrund ihrer Exonucleaseaktivität nur blunt-end Fragmente. Das Insert musste nach erfolgreicher PCR zuerst adenyliert werden, da ein 3' A-Überhang für die richtige Orientierung im TOPO-TA-Vektor essentiell war. Das PCR-Produkt wurde mit dATP Überhängen nach folgendem Ansatz versehen: Die gesamten 6 µl aufgereinigter DNA-Lösung wurden mit 1 µl 1 M dATP-Lösung, 2,5 µl 10 x TaqPol-Puffer, 0,75 µl MgCl₂-Lösung, 14,25 µl Wasser und 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) versetzt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 72 °C inkubiert, kurz auf Eis gestellt. 4 µl PCR Produkt wurden mit 1 µl Salt Solution und 1 µl pCR2.1/TOPO-TA Vektor (Invitrogen) laut Herstellerangaben zur Reaktion gebracht. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 µl der Klonierungs-Lösung in TOP 10 *E.coli*-Zellen transformiert und anschließend auf Kanamycin-selektiven LB-Platten ausgestrichen. Die entstandenen TOPO-CFP-Plasmidklone wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese

überprüft, und ein positiver Klon nach Sequenzierung für die weitere Klonierung verwendet. Die geeigneten Schnittstellen um YFP aus dem N-terminalen Konstrukt (pcDNA6.2/N-YFP-Dest) zu entfernen wurden mit Hilfe der Software Vector NTI (Invitrogen) bestimmt. XhoI schneidete sowohl N- (805bp) als auch C-terminal (1533bp) von YFP (813-1529bp). TOPO-CFP als auch pcDNA6.2/N-YFP-Dest wurden mit XhoI geschnitten. Die Dephosphorylierung durch Antarticphosphorylase (NEB) des Vektors pcDNA6.2/N-YFP-Dest erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Gelelektrophorese erfolgte eine Aufreinigung der gewünschten Banden aus dem Gel mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Danach wurde das CFP-Produkt mit dem Vektor pcDNA6.2/N-ΔYFP-Dest über Nacht bei 16 °C durch eine T4-Ligase (NEB) laut Herstellerangaben ligiert. Die entstandenen Klone pcDNA6.2/N-CFP-Dest (Abbildung 2-1A) wurden mit Hilfe einer XhoI-Restriktion überprüft und anschließend sequenziert. Die Klonierung des pcDNA6.2/C-CFP-Dest Vektors (Abbildung 2-1B) wurde mit Hilfe des pECFP-N1-Vektors und den Primern CFP-HpaI-s und CFP-PmeI-a (Tabelle 2-9), wie oben für die N-terminale Variante beschrieben, unter meiner Anleitung erzeugt (siehe Diplomarbeit Anna König).



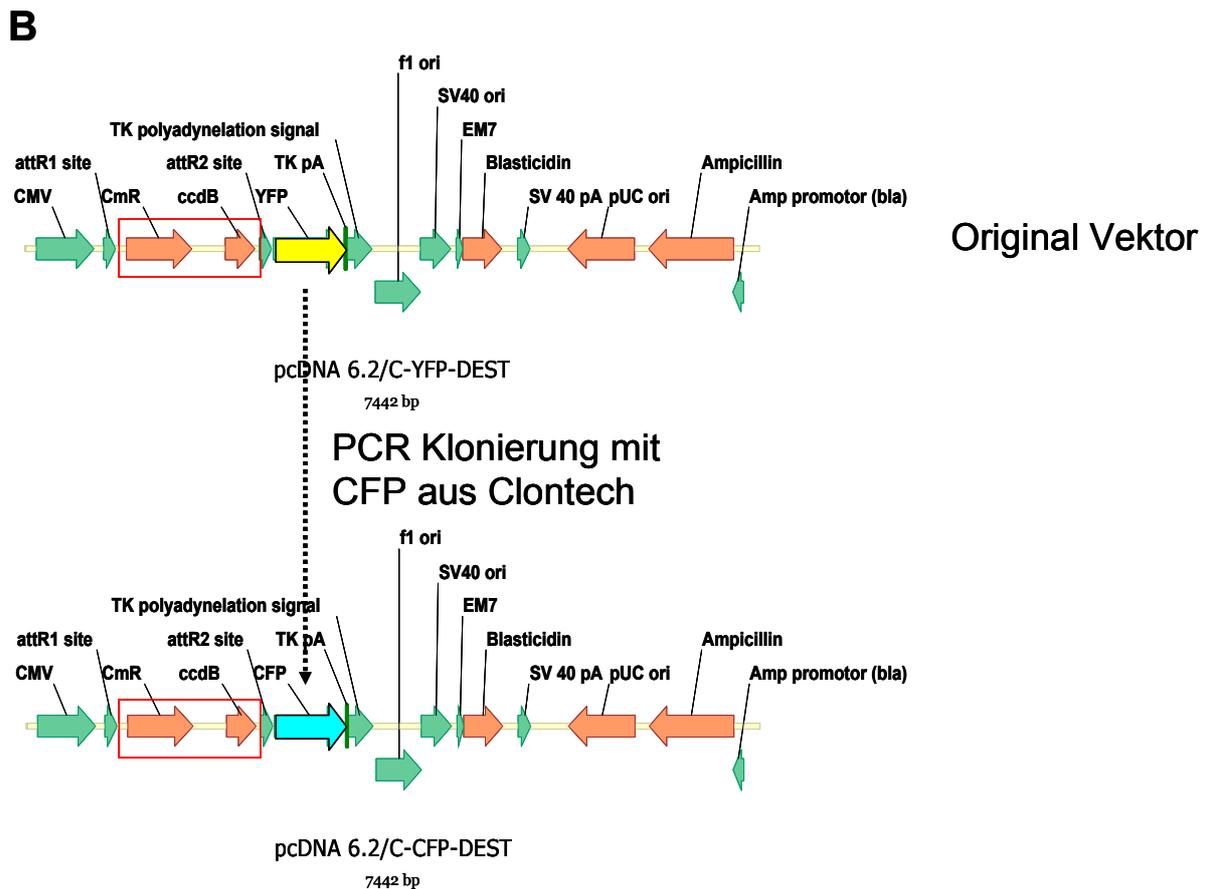


Abb. 2-1: Plasmidkarten der Leervektoren.

Schematische Darstellung der CFP-Destination-Vektoren aus den Plasmiden pcDNA6.2/N-YFP-Dest und pcDNA6.2/C-YFP-Dest des Gateway[®] System von Invitrogen mit Hilfe von PCR-Klonierungen. Gekennzeichnet ist die Austauschcassette (roter Kasten) in den Destination-Vektoren, die es ermöglichte über Rekombination Expressionsplasmide herzustellen. Als Fusionsprotein im Leserahmen zu CFP oder YFP (entweder N- oder C-terminal) konnten dann beliebige Proteine exprimiert werden.

Gateway[®]-Klonierungen (pENTR/D-TOPO Vektor)

Für die so genannte LR Reaktion wurden pENTR Vektoren benötigt, die für die gewünschte Proteinsequenz kodieren. Folgende proteinkodierenden Sequenzen dienten als Ausgangsprodukt: HIF-1 α (ORF Klon (Biosystems, Clone ID 6151)), ARNT (ORF Klon (Invitrogen, Clone ID IOH36815)), HIF-2 α (Bruick *et al.*, 2005) und FRmHNF-4 α 2 und FRmHNF-4 α 2-C106R (Prof. Ryffel, Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie, Universitätsklinikum Essen). Für die N-terminalen Klonierungen wurden pENTR Vektoren mit Stop-Codon und für die C-terminalen Klonierungen (Diplomarbeit Anna König) ohne Stop-Codon benötigt (siehe Anhang 7.4). Die fehlenden pENTR Vektoren wurden jeweils mit einer PCR-Klonierung hergestellt (Tabelle 2-8).

Tabelle 2-8 PCR-Programm pENTR/D-TOPO Vektor

Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (t)
1x	95	2min
30x	95	45sec
	Primer T _m -5	30sec
	72	1min / kb
1x	72	10min

Die Umklonierung einer gesamten proteinkodierenden Sequenz in den pENTR/D-TOPO-TA (pENTR Directional TOPO Cloning Kit, Invitrogen) setzte voraus, dass die verwendeten Sense-Primer am 5'-Ende zusätzlich die Basen CACC enthielten (Tabelle 2-9). Die gerichtete Klonierung wurde durch einen 3' GTGG-Überhang im pENTR/D-TOPO-TA-Vektor (Kanamycin-Resistenz) sichergestellt. Es wurde ein 3:1 Verhältnis von PCR-Produkt zu Vektor für die Klonierung eingesetzt. 0,5 µl (= 9 ng) pENTR/D-TOPO-TA Vektor wurden mit 0,5 µl D-TOPO Salt Solution und der berechneten Menge Insert gemischt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 3 µl gebracht. Nach 30 min Inkubation erfolgte die Transformation laut Herstellerangaben in TOP 10 *E.coli*-Zellen mit 2 µl Reaktions-Lösung.

Tabelle 2-9 Klonierungsprimersequenzen

Klonierungsprimer	Sequenz 5' → -3'
XhoI-ECFP reverse	CTTGTTGATGGGCTCGAGCCCTTGACAGCTCGTCCATGCCGAG
XhoI-ECFP forward	ACCGGTGATATCCTCGAGACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
CFP-HpaI-s	GCTGTAAACATGGTGAGCAAGGGCGAGG
CFP-PmeI-a	CGTTTAAACTTATCATTACTTGACAGCTCGTCCATGC
hARNT-s	CACCATGGCGGGCGACTACTG
hARNT-a	TTCTGAAAAGGGGGAAACATAGTTAGATC
hHIF1-alpha-s	CACCATGGAGGGCGCCGG
hHIF1a (FL) -a (stop)	TCAGTTAACTTGATCCAAAGCTCTGAGTAATTC
hHIF2-alpha-s	CACCATGACAGCTGACAAGGAGAAGAAA
hHIF2-alpha-a	GGTGGCCTGGTCCAGGGC
hHIF2-alpha-a+STOP	TCAGGTGGCCTGGTCCAGG
hHNF4-s	CACCATGCGACTCTCCAAAACCCTC
hHNF4-a	GATAACTTCCTGCTTGGTGATGGTC
hHNF4-a+STOP	CTAGATAACTTCCTGCTTGGTGATGG
HIF1α-ΔbHLH-HindIII-a	CTGAGAAAAAAGCTTCGCTGTGTG
HIF1α-ΔbHLH-intern-s	GTTCTGAAAAACTTCTGGATGCTGG
HIF1α-ΔbHLH-intern-a	CCAGAAGTTTTTCAGAACTTATCTTTTTCT
HIF1α-ΔbHLH-KasI-s	ACGACGGCCAGTCTTAAGCTC
HIF1α-Stop-s	AGCTTTGGATCAAGTAACTGAACCCAGCT

HIF1 α -Stop-a	AGCTGGGTTCAGTTAACTTGATCCAAAGCT
HIF2 α -AccI-a	CAGGGGGATGTCCATGTGGGATGGGTGCT
HIF2 α -intern-s	AGTAGCTCGGAGAGGCTCCTCTCCTCAGTTTGC
HIF2 α -intern-a	GCAAAGTGGAGAGGAGCCTCTCCGAGCTACTC
HIF2 α -SacII-s	CCGCTCCCGGCGGATTTGTCCTACTCAG
pDONOR223-HIF1 α FL-5158bp-s	CCACAGCTGACCAGTTATGATTGTGAAG
pDONOR223-HIF1 α FL-141bp-a	CGGGCCAGAGCTGCCAGGAA
HNF4 α 2 Δ 469-474AS-a no stop	GATGGTCGGCTGGGGGATGG
HNF4 α 2 Δ 469-474AS-a + stop	CTGATGGTCGGCTGGGGGAT

Oligonukleotide wurden ausschließlich von Invitrogen bezogen.

Gateway[®]-Klonierungen (LR-Reaktion)

Ausgehend von den vier Leervektoren (Destination-Vektor) und den pENTR-Vektoren (Entry-Vektor) konnte nach dem Gateway[®] Systems kloniert werden. Das Reaktionsprinzip der LR-Reaktion beruhte auf einer DNA-sequenzspezifischen Rekombination von attR- und attL-sites. Dieser Mechanismus wurde dem λ -Phagen abgeschaut, der seine DNA in das Genom von *E.coli*-Zellen integrieren kann. Die LR-Reaktion wurde mit dem LR-Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) laut Herstellerangaben durchgeführt (Abbildung 2-2). Dazu wurden vom Entry-Klon und Destination-Vektor jeweils 75 ng in einem Volumen von 4 μ l TE-Puffer angesetzt und mit 1 μ l LR-Clonase 1 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 μ l Proteinkinase K Solution für 10 min bei 37 °C inkubiert und 1 μ l davon in *One Shot ccdB Survival T1 Phage-Resistant Cells* transformiert und über Nacht auf Ampicillin LB-Platten selektioniert. Die erhaltenen Klone waren Expressionsvektoren (pExp-Vektor), die die zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine zu dem jeweiligem Fluorophore N- oder C-terminal exprimierten (Tabelle 2-10). Alle *in silico* Klonierungen, sowie Sequenzvergleiche wurden mit der Software Vector NTI Advance Version 10 und 11 (Invitrogen) durchgeführt.

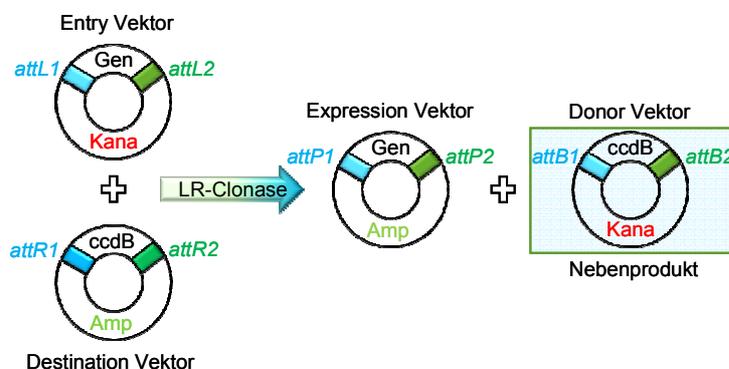
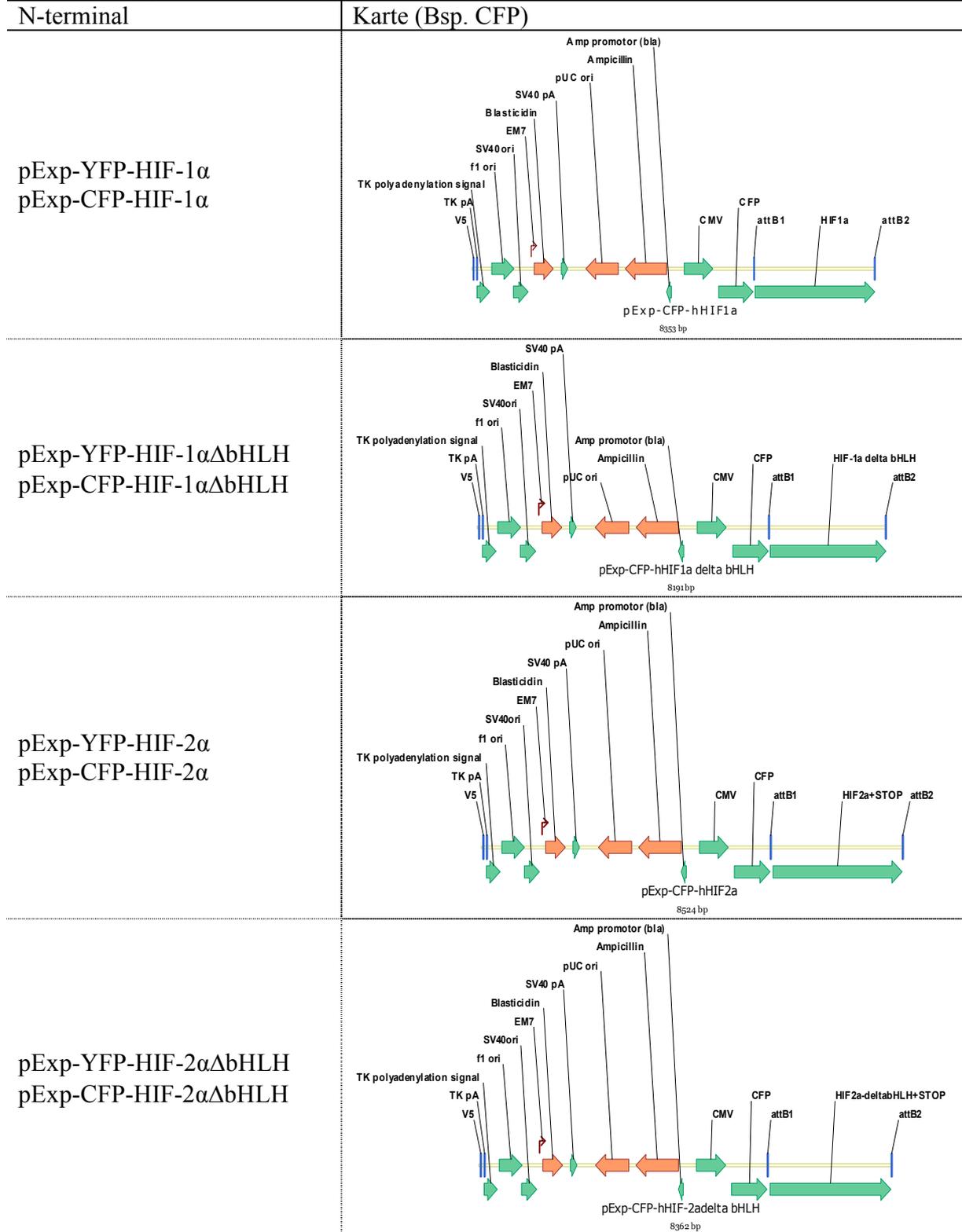
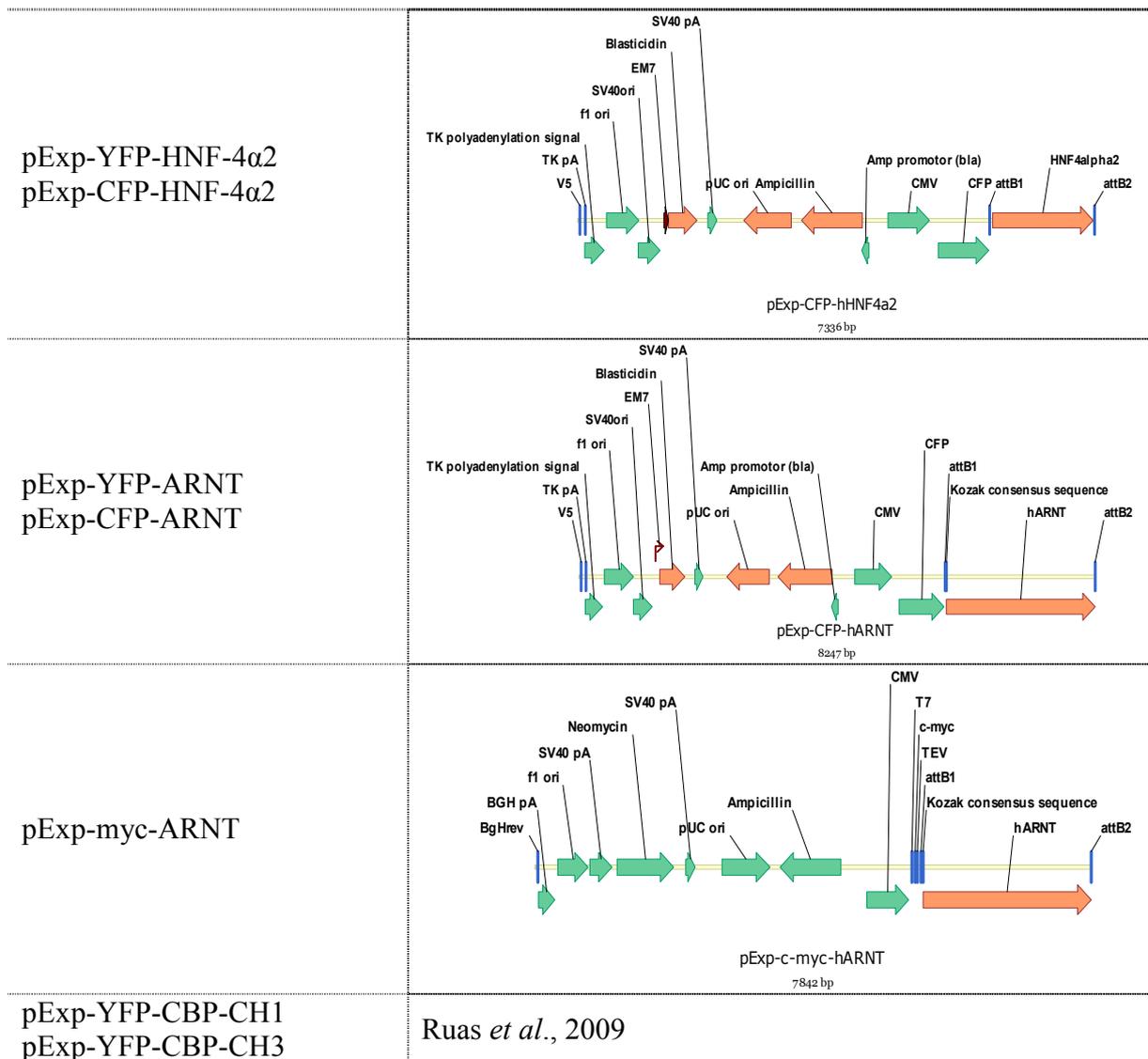


Abb. 2-2: LR Reaktion eines Entry-Vektors mit einem Destination-Vektor.

Schematische Darstellung der LR-Reaktion. Der Entry-Vektor enthielt das zu untersuchende Gen und wurde durch Rekombination über die attL- und attR-Seiten mit Hilfe der LR-Clonase in den Destination-Vektor integriert. Durch negative Selektion über das ccdB-Gen starben nicht resistente Bakterien ab und es entstanden nur positive Klone.

Tabelle 2-10 Expressionsvektoren (Bsp. N-terminal)





Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalteten die Phosphodiesterbindungen der DNA hydrolytisch. Die Enzyme unterschieden sich durch Ursprungsorganismus, die Erkennungssequenz und die entstehenden Schnittstellen. Die Restriktion von DNA erfolgte in den enzymespezifischen Puffern nach Angaben des Herstellers bei der optimalen Katalysetemperatur der Enzyme. Eine Kombination mehrerer Restriktionsenzyme in einem DNA-Restriktionsansatz war bei geeigneten Versuchsbedingungen möglich. Alle Restriktionsendonukleasen und Puffer wurden von NEB bezogen.

Horizontale Gelelektrophorese von DNA

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook *et al.* (1989) diente zur Auftrennung von DNA. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste der DNA wanderte diese im elektrischen Feld zur Anode. Lineare DNA-Fragmente wurden proportional zu ihrer Masse aufgetrennt. Für die Gelelektrophorese wurde 0,8-2 % (w / v) Agarose in 1 x TRIS-

Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50 x TAE (242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, *a.dest.* ad 1 l in H₂O verdünnen) aufgekocht. Die warme Lösung wurde mit 50 µg / ml 0,07 % iger Ethidiumbromid-Lösung (AppliChem) versetzt und in eine Gelkammer mit Probenaschenkamm gegossen. Ethidiumbromid konnte aufgrund seiner planaren Eigenschaften über Interaktion seiner aromatischen Ringe mit den heteroaromatischen Ringen der Nukleinsäurebasen in eine DNA-Helix interkalieren. Nach Polymerisation wurden die trockenen Taschen mit einem Größenmarker (1 kb plus ladder, 1 kb ladder und 100 bp ladder, NEB und Invitrogen) und Proben geladen. Der Puffer wurde bis zur Oberkante des Gels in die Kammer eingefüllt und ein Strom von 6,25 V / cm angelegt. Waren die Proben ausreichend ins Gel eingewandert wurde die Kammer mit Probenpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 5 V / cm Elektodenabstand für 40-60 min durchgeführt. Die Detektion der DNA erfolgte unter UV-Licht bei einer Anregungswellenlänge des Ethidiumbromids von 304 nm.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die DNA-Bande, die der erwarteten Fragmentgröße entsprach, wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) laut Herstellerangaben aus der Agarose isoliert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4-Ligase (NEB) nach Angaben des Herstellers.

Transformation

Zur Transformation von Bakterien wurde das Hitzeschock-Verfahren nach Sambrook *et al.*, (1989) verwendet. Es wurde mit diesen beiden *E.coli*-Stämmen gearbeitet (Tabelle 2-11).

Tabelle 2-11 Bakterienstämme

Name	Eigenschaften	Firma
TOP 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
One Shot <i>ccdB</i> Survival T1 Phage- Resistant Cells	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 D(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG tonA::P_{trc}-ccdA</i>	Invitrogen

Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen für analytische und präparative Zwecke (Tabelle 2-12) erfolgte mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas), dem Plasmid Purification Midi Kit (Qiagen) und dem PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega) nach Angaben der Hersteller.

Tabelle 2-12 Medien für die Bakterienkultur

Name	Rezept
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Natriumchlorid 5 g Hefeextrakt (IcN Biomedicals) <i>a.dest.</i> ad 1 l
LB-Festagar	3,5 g Difco Antibiotic Medium 3 (BD Transduction Laboratories) 3 g Select Agar (Life Technologies) <i>a.dest.</i> ad 200 ml autoklavieren ist die Lösung auf < 50 °C abgekühlt: 200 µl Antibiotikum- Lösung (10 mg / ml) verteilen: 20 ml / 94 mm Kulturschale
Ampicillin	Calbiochem
Kanamycin	Calbiochem
Spectinomycin	Calbiochem
Chloramphenicol	Sigma

Quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Ausbeute und Reinheit der gewonnenen Plasmid DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm ermittelt.

Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Um eine gesamte proteinkodierende Sequenz zu sequenzieren wurden Primer (Tabelle 2-13) in 250 bp-500 bp Abstand ausgewählt und 700 bp lange Sequenzierungen in Auftrag gegeben.

Tabelle 2-13 Sequenzierungsprimersequenzen

Sequenzierungsprimer	Sequenz 5' → 3'
TK PolyA rev	CTTCCGTGTTTCAGTTAGC
T7 rev	GGGGTTATGCTAGTTATTGC
T7 seq	TAATACGACTCACTATAG
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
M 13 forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
M 13 reverse	CAGGAAACAGCTATG
EGFP-C forward	AGCACCCAGTCCGCCCTGAGC
EGFP-N reverse	CGTCGCCGTCCAGCTC
SV40-pA reverse	GAAATTTGTGATGCTATTGC
CMV-Pro forward	AAATGGGCGGTAGGCGTG
HIF-1 α N1 bp 500	GTACACTTCATTCTGAGAAAAA
HIF-1 α N1 bp 1100	GCTGAGTCATTTTCATATCTG
HIF-1 α N1 bp 1700	CTGGAAGTCATCATCCATTG
HIF-1 α N1 bp 2300	TTAAAATAATTGTCTTTTGCTCC
HIF-1 α C1 bp 500	TTTTTCTCAGAATGAAGTGTAC
HIF-1 α C1 bp 1100	CAGATATGAAAATGACTCAGC
HIF-1 α C1 bp 1700	CAATGGATGATGACTTCCAG
HIF-1 α C1 bp 2300	GGAGCAAAAGACAATTATTTTAA
HIF-1 β N1 bp 500	TCTGCTGCCTCCAAGATCA
HIF-1 β N1 bp 1100	TGAAGATACCCTCAATGTTGT
HIF-1 β N1 bp 1700	GGAGATGCCTTTACTCTGAT
HIF-1 β N1 bp 2300	GGAGTCTGAAAGCTGCCCA
HIF-1 β C1 bp 500	TGATCTTGGAGGCAGCAGA
HIF-1 β C1 bp 1100	ACAACATTGAGGGTATCTTCA
HIF-1 β C1 bp 1700	ATCAGAGTAAAGGCATCTCC
HIF-1 β C1 bp 2300	TGGGCAGCTTTCAGACTCC
HNF4 α 2-250bp-s	TGTGTGCCATCTGCGGGGAC
HNF4 α 2-500bp-s	CAATGCGCTCCTGCAGGCG
HNF4 α 2-750bp-s	ACATTGTCCCTCGGCACTGC
HNF4 α 2-1000bp-s	AGCATCACGTGGCAGATGATC
HNF4 α 2-1250bp-s	GTCTGAGCCCTATAAGCTCC

2.4 Zytologische Methoden

Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Zelllinie U2OS (Tabelle 2-14) wurde in 20 ml DMEM (Gibco) mit 10 % FCS, 100 U / ml Penicillin und 100 U / ml Streptomycinsulfat (Gibco) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert. Die übrigen Zelllinien (SY5Y, Kelly und HK120) wurden mit gleichen Zusätzen und Bedingungen in RPMI (Gibco) Medium passagiert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 5 ml PBS (Cambrex) gewaschen und mit 2 ml 0,5 % iger Trypsin-Lösung (Gibco) vom Kulturflaschenboden abgelöst. In neuem Medium wurden die Zellen dann je nach Bedarf weiterkultiviert.

Tabelle 2-14 Zelllinien

Name	Zuordnung	Herkunft/Charakteristika
U2OS ATCC no. HTB-96	Osteosarkom-Zelllinie	- stammt ursprünglich aus der Tibia eines 15-jährigen Mädchens (1964) - Viren konnten nicht nachgewiesen werden - adhären, Monolayer
HK120 AG Fandrey	Nieren- Zelllinie	- stammt ursprünglich aus einem männlichem Nierenkarzinom-Patienten (1991) isoliert - aus tumorfreiem Gewebeanteil isoliert - adhären, Monolayer
Kelly DSMZ no.: ACC 355	Neuroblastom- Zelllinie	- stammt ursprünglich aus Neuroblastom erkranktem Patienten -NMYC wird stark exprimiert - adhären, Monolayer
SH-SY5Y DSMZ no.: ACC 209	Neuroblastom- Zelllinie	- stammt ursprünglich aus dem Knochenmark (metastasiertem Neuroblastom) eines 4-jährigen Mädchens (1970) - adhären, Monolayer

Hypoxie-Versuch

Da das zu untersuchende EPO-Gen hypoxisch induzierbar war, wurden Zellkulturversuche unter Hypoxie durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C und 90 % Luftfeuchtigkeit) diente als Kontrolle. Hypoxische Bedingungen wurden meistens in BBL GasPak-Gläsern mit Hilfe von GasPak Plus Anaerobic System Envelopes with Palladium catalyst® (BD BBL) erzeugt. Die Zellen wurden in diesen GasPak-Gläsern 6-20 h bei ca. < 0,1 % O₂ inkubiert. Außerdem wurden Hypoxie Versuche unter 3 % O₂, 5 % CO₂, 72% N₂, 37 °C und 90 % Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

Retinsäure-Versuch

Bei der Verwendung von at-RA war besonders auf die Photosensibilität des Reagenz zu achten. At-RA isomerisierte infolge von Lichteinwirkung in die deutlich toxischere 13-*cis*-Retinsäure und zum Teil in 9-*cis*-Retinsäure. Deshalb wurden sämtliche Untersuchungen, bei denen at-RA eingesetzt wurde, in abgedunkelter Umgebung angesetzt. At-RA wurde als Stammlösung von 100 mM, im Antioxidant DMSO im Dunkeln bei -80°C aufbewahrt. DMSO (in der hier verwendeten Verdünnung von 1:100.000) hatte keinerlei Effekt auf die Zelllinie und wurde in einer Vergleichsstudie mit at-RA bereits in der Vergangenheit getestet.

Transiente Transfektion

Die Zellen wurden für eine Transfektion mit einer Konfluenz von 50-60 % ausgesät. Es wurde 1-2 µg Plasmid und die 3-fache Menge von FuGENE 6 Reagenz (Roche) laut Herstellerangaben eingesetzt. 24 h nach der Transfektion wurde das FuGENE-haltige Medium gegen frisches Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion für die FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Untersuchungen genutzt.

Transfektion mit siRNA

Für die Transfektion der Neuroblastomzellen wurde eine 75 cm²-Kulturflasche (80 % Konfluenz) pro Ansatz benötigt. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin abgelöst und in 8 ml Medium aufgenommen. Danach wurden die Zellen bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert und in Medium (ohne Zusätze) aufgenommen, so dass nach Zugabe von siRNA ein Gesamtvolumen von 400 µl in die Elektroporationsküvetten (BioRad) eingefüllt werden konnte. Die Endkonzentration der siRNA im Medium (ohne Zusätze) betrug 10 mM. Danach erfolgte eine Elektroporation bei 200 V und 975 µF in einer 4 mm Elektroporationsküvette (BioRad). Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in

frischen Medium aufgenommen und auf die entsprechende Menge an 6-well Platten verteilt. Am nächsten Tag konnte der entsprechende sechsstündige Hypoxieversuch mit und ohne 1 μ M Retinsäure (steril in DMSO gelöst, Sigma) durchgeführt werden.

Für die Transfektion der HK120-Zellen wurde Oligofectamin (Invitrogen) verwendet. Am ersten Tag wurden die Zellen auf 6-well Platten verteilt und über Nacht inkubiert. Bei einer Zellkonfluenz von ca. 50 % wurde dann eine Transfektion mit siRNA (Tabelle 2-15) durchgeführt, wobei für einen Ansatz 180 μ l Medium (ohne Zusätze) mit 10 μ l 20 mM siRNA und 10 μ l Oligofectamin versetzt wurde; die Endkonzentration der siRNA betrug hier 10 μ M. Dieser Ansatz ruhte für 15 min bei Raumtemperatur. In dieser Zeit wurde das Medium von den Zellen durch 800 μ l frisches Medium (ohne Zusätze) ersetzt. Dann wurden 200 μ l des Transfektionsansatzes zu den Zellen gegeben und erst nach 4-6 h wurde das Medium (Penicillin / Streptomycinsulfat (P / S) und 10 % FCS) erneuert. Es folgte der Versuch unter Hypoxie und Normoxie für 20 h. Bei den Doppel-siRNA-Versuchen wurde eine zweite Transfektion mit siRNA am nächsten Tag wiederholt, erst danach erfolgte die 20 h Inkubationszeit unter Normoxie oder Hypoxie.

Tabelle 2-15 siRNA Sequenz

Name	Zielsequenz 5' → 3'	Firma
siRNA HIF-1 α	GGACACAGAUUUAGACUUGUU	Dharmacon
siRNA HIF-2 α	GCAAAUGUACCCAAUGAUG	Thermo Scientific
siRNA HNF-4 α	GAAGGAAGCCGUCCAGAAU	Dharmacon
siRNA RXRa	Human RXRA ON-TARGETplus SMARTpool ORF L-003443-00	Dharmacon

Reportergen Assay

Für die Analyse der HIF-Aktivität in den Neuroblastomzellen wurden diese mit einem Reportergenplasmid (pH3SVL, Abb. 2-3) transfiziert und den jeweiligen Versuchsbedingungen ausgesetzt. Das pH3SVL-Plasmid wurde von Prof. R. Wenger, Zürich (Rolfs *et al.*, 1997), zur Verfügung gestellt. Das Luciferasereportergen befand sich unter der Kontrolle eines SV 40 Promotors und dreier HREs (*hypoxia-responsive elements*) aus dem 5' Enhancer des Transferringens. HREs des Transferrin-Gens bestanden aus jeweils zwei HBSs (*HIF binding sites*). Mit Hilfe des *Firefly* Luciferase Assay Kits (Biotium) wurde die Luciferase-Aktivität im Luminometer laut Herstellerangaben bestimmt. In Bezug auf die Proteinmenge konnte somit das Maß der HIF-Aktivität festgestellt werden. Der Versuch wurde als Sechsfachbestimmung angesetzt.

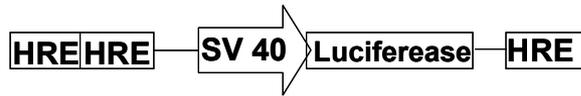


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des pH3SVL-Plasmides.

Das Reporterplasmid pH3SVL exprimiert Luciferase unter der Kontrolle eines SV40-Promotors und dreier HREs (*hypoxia-responsive elements*) aus dem Transferrin-Gen.

Tabelle 2-16 Medien und Puffer für die Zellkultur

Name	Firma
Penicillin / Streptomycinsulfat-Lsg (P / S)	Gibco
DMEM	Gibco
RPMI	Gibco
FCS	Biochem
PBS	Cambrex
Trypsinlösung	Gibco
All- <i>trans</i> -Retinsäure (L1376)	Sigma
FuGENE 6 Reagenz	Roche

2.5 Konfokale Lasermikroskopie (*Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*)

Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels FRET

Eine elegante Methode zur Untersuchung der Protein-Protein Interaktion in lebenden Zellen ist die FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)-Technik. Diese Technik ist unter anderem abhängig vom Abstand der interagierenden Partner und wurde erstmals von Theodor Förster 1948 beschrieben. Die Übertragung von Energie von einem angeregten Fluorophor (Donor) auf Akzeptor-Fluorophore findet über Dipol-Dipol-Kopplung statt. Da kein intermediäres Photon auftritt, handelt es sich um eine strahlungslose Energieübertragung. Die Effizienz der übertragenen Energie ist vom intermolekularen Protein-Protein-Abstand R zwischen den beiden Fluorophoren abhängig (Abb. 2-4A). Die Emission- und Absorptionsspektren von CFP (*cyan fluorescence protein*) und YFP (*yellow fluorescence protein*) überlappen (Abb. 2-4B). Somit wird für CFP und YFP ein konstanter Wert, R_0 (Förster-Radius) von 4,92 nm bestimmt (Patterson *et al.*, 2000). R_0 bezeichnet hierbei den Abstand, bei dem 50 % der Energie, die von dem Donor absorbiert wird, auf den Akzeptor übergeht (Abb. 2-4C). R_0 ist abhängig vom Brechungsindex, der Donor-Quanteneffizienz, dem spektralen Überlappungsintegral und der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente von Akzeptor und Donor (Lakowics, 2006).

Um diese Methode anwenden zu können, mussten die zu untersuchenden Proteine in Fusion mit YFP oder CFP exprimiert werden (Tabelle 2-10). Wurde der Donor (CFP) mit der entsprechenden Absorptionswellenlänge (444 nm) angeregt, kam es zu Fluoreszenz mit einer Emissionswellenlänge von 480 nm spezifisch für CFP (Abb. 2-4B). Verringerte sich der Abstand zwischen den beiden Fusionsproteinen unter 10 nm kam eine Energieübertragung von CFP zu YFP stattfinden (Abb. 2-4E). Die Emission von CFP wurde schwächer (gequencht), da ein Teil der Energie auf den Akzeptor (YFP) übertragen wurde. Dieser Akzeptor-Farbstoff emittierte Licht bei einer Wellenlänge von 535 nm.

In den Versuchen kam es darauf an, E (FRET Effizienz) zu bestimmen, um die Distanz zwischen zwei Proteinen berechnen zu können (Abb. 2-4A). Dafür mussten mehrere Zellen analysiert werden. Jeder Zellkern wies eine eigene gemittelte FRET-Effizienz auf, die einem spezifischem Akzeptor / Donor-Verhältnis zugeordnet werden konnte. Somit führte die Untersuchung mehrerer Zellen zu einer sigmoidalen Kurve (Ergebnisse 3.2). Wenn das Plateau der FRET-Effizienz erreicht war, beeinflusste das Akzeptor / Donor-Verhältnis die FRET-Effizienz nicht mehr. Es konnte für eine solche gesättigte Akzeptor-Situation die

Distanz zwischen den beiden Partnern mit Hilfe der Formel (Abb. 2-4A) berechnet werden (für Originalreferenzen siehe Wotzlaw *et al.*, 2007)

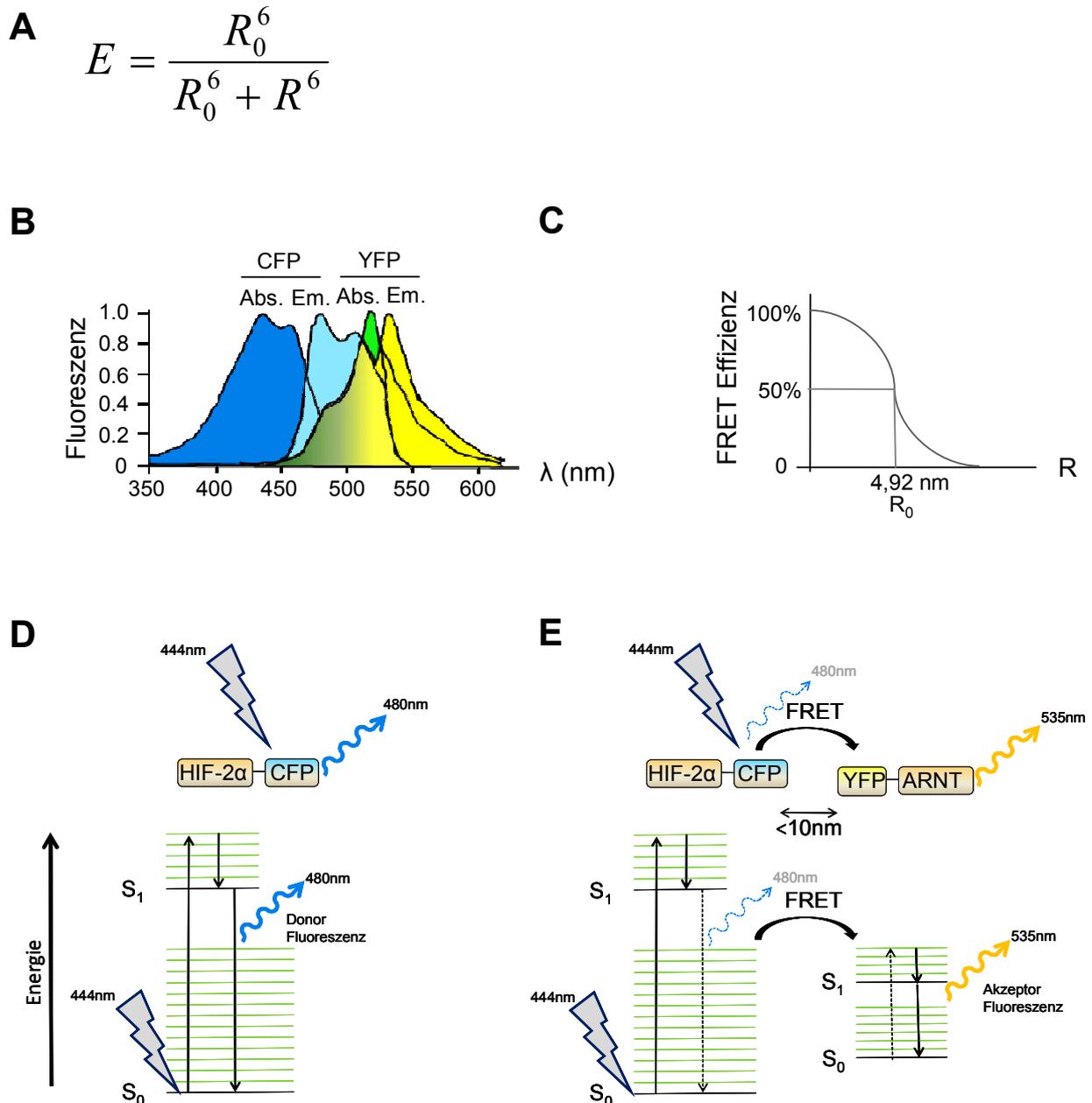


Abb. 2-4: Schematische Darstellungen zur FRET (fluorescence resonance energy transfer)-Technik.

(A) Der Abstand zwischen zwei Interaktionspartnern ließ sich mit Hilfe der dargestellten Formel berechnen. Die FRET-Effizienz E war abhängig von dem Abstand R der beiden Fluorophore und dem spezifischen Förster Radius R_0 . (B) Die überlappenden Emissions- (Em.) und Absorptionsspektren (Abs.) von CFP (*cyan fluorescence protein*) und YFP (*yellow fluorescence protein*) garantierten die Möglichkeit der Energieübertragung. (C) Bei einer FRET-Effizienz von 50 % konnte der spezifische Abstand ($R_0 = 4,92 \text{ nm}$) zwischen zwei Fluorophoren (hier CFP und YFP) bestimmt werden. (D) Wurde CFP angeregt, kam es zu einer Emission des Donor (480 nm). Physikalisch entspricht dies einer Anhebung des Elektrons aus dem S_0 in den S_1 Zustand, wobei beim Zurückfallen in den Grundzustand Energie als Emission freigesetzt wird. Wurde CFP angeregt und es befand sich ein Interaktionspartner innerhalb $< 10 \text{ nm}$, kam es zu FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Bei dieser strahlenlosen Energieübertragung von CFP zum YFP wird ein Elektron von S_0 in den S_1 Zustand befördert. Beim Zurückfallen in den Grundzustand emittiert das derart angeregte YFP bei einer größeren Wellenlänge von 535nm (E).

Hardware

Protein-Protein-Interaktionen wurden mit der FRET-Methode untersucht. Hierfür wurde ein inverses Mikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Deutschland) mit einem Nipkow Disc System (QLC100, Visitech International Ltd., USA) gekoppelt. Zwei diodengepumpte Festkörperlaser (444 nm und 532 nm, Crystallaser, USA) dienten der spezifischen Anregung der Fluorophore CFP und YFP. Das Laserlicht war über ein Glasfaserkabel in das System eingekoppelt und wurde auf die Probe fokussiert. Emissionslicht gelangte über die Nipkow Disc Einheit und einen Multispec Microimager DualView (Optical Insights, USA) zur CCD Kamera (Orca ERG, Hamamatsu, Japan). Dieser Multispec Microimager DualView diente der simultanen Detektion zweier Emissionsbilder (CFP und YFP-Kanal) während der Messungen. Eine spezielle Zellbeobachtungskammer (Luigs&Neumann GmbH, Deutschland) wurde verwendet, die die Temperatur konstant hielt. Die Gaskonzentrationen konnten gezielt in dieser Kammer von Normoxie auf Hypoxie geändert werden.

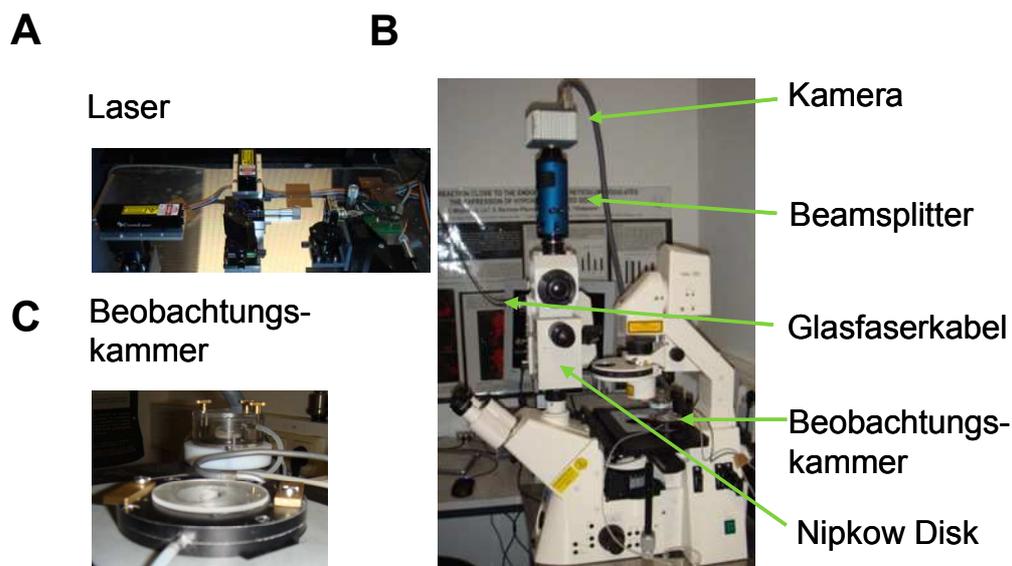


Abb. 2-5: Mikroskopsystem für das *in vivo*-Imaging unter Hypoxie.

(A) Zwei diodengepumpte Festkörperlaser waren über ein Glasfaserkabel in das konfokale Mikroskopsystem eingekoppelt. (B) Das Mikroskopsystem umfasste außerdem eine Kamera, einen Beamsplitter und eine Nipkow Disk. (C) In der Zellbeobachtungskammer konnte bei konstanter Temperatur die Gaskonzentration geändert werden, so dass Zellen live unter Hypoxie beobachtet werden konnten.

Software

Für die Auswertung der FRET Ergebnisse wurde ausschließlich die gerätespezifische Software Version 1.8 (A. Bernadini und C. Wotzlaw, 2009, Institut für Physiologie, UDE) mit einem internen Schwellenwert von 1000 benutzt (Abb. 2-5). Die graphische Darstellung der Messergebnisse erfolgt mit SigmaPlot 2001 (SPSS Inc.).

Interne Kontrolle bei FRET-Experimenten

Zu internen Kontrollen wurden die beiden Leervektoren pcDNA 6.2/N-CFP-Dest und pcDNA 6.2/N-YFP-Dest in den jeweiligen Zelllinien kotransfiziert. Unterhalb eines Software-intern festgelegten Schwellenwerts von 1000 wird das FRET-Signal nicht als Interaktion zwischen den beiden Fluorophoren gewertet (Abb. 2-6). Bei jeder Messung wurden die systemspezifischen SBT (*spectral bleed through*)-Werte mit Hilfe von Einzeltransfektionen der Leervektoren bestimmt, um diese für die Berechnungen der realen FRET-Werte berücksichtigen zu können (Berney *et al.*, 2003).

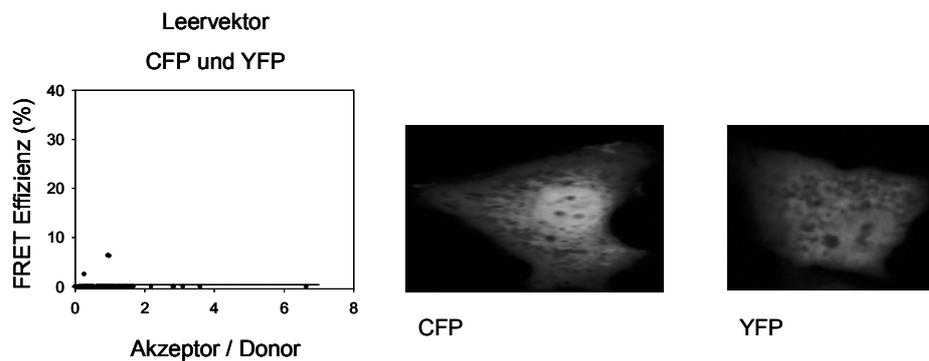


Abb. 2-6: Expression und Interaktionsanalyse mit FRET von CFP- und YFP-Protein.

Zellen wurden mit Leervektoren kotransfiziert, die nur CFP oder YFP exprimieren. Dieses Verfahren diente der internen Kontrolle bei den FRET-Experimenten. Die FRET-Effizienzen der Fluorophore CFP und YFP betrug durchschnittlich 0% und war unbeeinflusst von der Sauerstoffkonzentration. CFP und YFP wurden im Zellkern und im Cytoplasma exprimiert. Dargestellt sind die Mikroskopieaufnahmen von Einzeltransfektionen (CFP oder YF) in HK120-Zellen.

2.6 Laborgeräte

Tabelle 2-17 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav, Varioklav	H + P Labortechnik GmbH
Analysewaage SAE 200	Bosch
Brutschrank, Hera cell	Heraeus Instruments
Elektrophoresesystem	BioRad / hausinterne Werkstatt
ELISA-Reader, Spectra Count	Packard
Flockeneisbereiter AF 10	Scotsman
Gel-Dokumentation, Photo-Print IP-115.SD	LTF Labortechnik
Heizblöcke 60°C: HLC TM 130-6,95°C: HLC HTM 130	Oehmen
Hypoxie-Brutschrank, BB 6220 CUO2, Invivo ₂ 400, Hypoxia Workstation	Heraeus Instruments
Kühlzentrifugen	Eppendorf
Centrifuge 5415 R, Biofuge fresco, Labofuge 400 R function line	Heraeus Instruments
Küvette Quarz Spectrophotometer Cell Micro, 16.50-Q-10 / 8,5mm	Bio-Rad
Lichtmikroskop, CK40	Olympus
Luminometer, TD 20 20	Turner Designs Instruments
pH-Meter	Precisa
Photometer, SmartSpec 3000	Bio-Rad
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Schüttler, Polymax 1040	Heidolph Instruments
Sterilwerkbank, Hera safe	Heraeus Instruments
Tischzentrifugen	Eppendorf
Mastercycler personal, Tpersonal, Tprofessional	Biometra
Thermostat, Thermostat 2761	Eppendorf
Vortexer, Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasseraufbereitungssystem	Köttermann
Wasserbad, GFL	Öhmen
Western-Blot, Mini Protean 3	Bio-Rad

2.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Roth und Riedel-de Haën verwendet.

Tabelle 2-18 Reagenzsysteme

Name	Firma
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega
Plasmid Purification Midi Kit	Qiagen
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Fermentas
ZymoClean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research
pENTR Directional TOPO Cloning Kit	Invitrogen
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen
<i>Firefly</i> Luciferase Assay Kit	Biotium
GasPakPlus Anaerobic System Envelopes with palladium Catalyst	BD

Tabelle 2-19 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
Zellkulturflaschen	Greiner
Mikroskopieschalen	Willcowells, Amsterdam
Plastikwaren	Sarstedt, Eppendorf, Greiner
Filterpapier GB003	Whatmann

3 Ergebnisse

Die Untersuchung der hypoxisch-induzierbaren Expression des Erythropoietin (EPO)-Gens umfasste neben einer Analyse der gewebespezifischen Regulationsmechanismen in Zellkulturmodellen die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion der beteiligten Transkriptionsfaktoren am 3' Enhancer des EPO-Gens mittels FRET (*fluorescence resonance energy transfer*).

3.1 Gewebespezifische Erythropoietin-Genexpression

Die Expression des Erythropoietin (EPO)-Gens wird neben der Regulation durch O₂ über die HIF (*hypoxia-inducible factor*) Bindestelle von gewebespezifischen Faktoren beeinflusst. Einer dieser gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren ist HNF-4 α (*hepatocyte nuclear factor-4 α*). Es ist bekannt, dass die humane Hepatomzelle HepG2 Hypoxie- und HNF-4 α -abhängig EPO sezerniert.

Die HNF-4 α Proteinexpression wurde in den Neuroblastomzellen der Linie Kelly und SY5Y, in der neuen Nierenzelle HK120 und zusätzlich in den HepG2 als Positivkontrolle untersucht. Die Western-Blot Analyse ergab, dass die Nierenzellen HK120, wie die HepG2-Zellen, HNF-4 α Protein exprimierten (Abb. 3-1). Jedoch war weder das Protein HNF-4 α noch die zugehörige mRNA in den Neuroblastomzellen Kelly und SY5Y nachweisbar (Abb. 3-1).

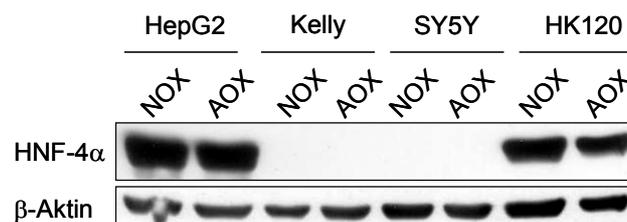


Abb. 3-1: Zellspezifische Expression von HNF-4 α .

Humane Hepatomzellen (HepG2), Neuroblastomzellen (Kelly, SY5Y) und Nierenzellen (HK120) wurden für 6 h unter 21 % (NOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) inkubiert. Gesamtzelllysate (60 μ g) wurden nach dem Western-Blot-Verfahren mit dem Antikörper anti-HNF4 α ausgewertet. β -Aktin diente als Ladekontrolle

Da jedoch diese neuronalen Zellen EPO synthetisierten, wurde nach weiteren gewebespezifischen Faktoren, deren Effekten und nach Besonderheiten in der O₂-geregelten EPO-Expression in den Zellen der Linie Kelly, SY5Y und HK120 gesucht.

3.1.1 Einfluss von all-trans-Retinsäure auf die EPO-Expression in Neuroblastomzellen

Die pO_2 -abhängige Regulation der EPO-Expression erfolgt in Neuroblastomzellen unabhängig von HNF-4 α . Jedoch vermuteten wir, dass in diesen Zellen RXR α (*retinoic X receptor alpha*) für eine gewebespezifische Expression von EPO zuständig ist. Um dies zu untersuchen, wurde der bekannte Ligand des Rezeptors at-RA (*all-trans-retinoic-acid*) eingesetzt. Da EPO-mRNA nicht gespeichert werden konnte, korreliert eine Induktion der EPO-mRNA mit einer gesteigerten Aktivität des 3' Enhancers auf die Transkription. Zunächst konnte eine gesteigerte EPO-mRNA-Expression in den Kelly-Zellen (3-fach) und in den SY5Y-Zellen (7,8-fach) nach Stimulation mit Hypoxie festgestellt werden (Abb. 3-2A und Abb. 3-2B). Die Induktion des Zielgens EPO war auf die Stabilisation der Proteine HIF-1 α / 2 α bei O_2 -Mangel zurückzuführen.

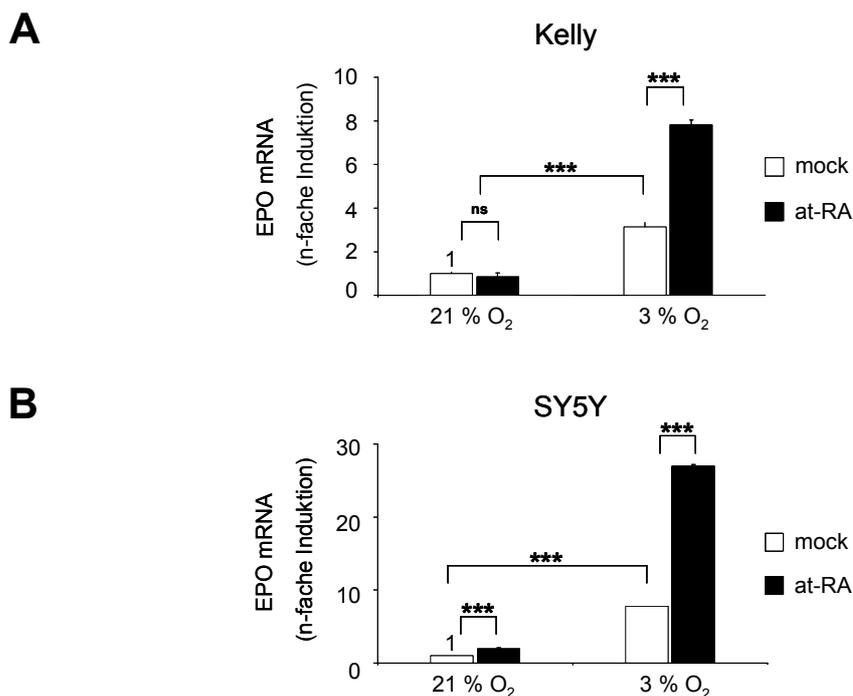


Abb. 3-2: Gesteigerte EPO-Expression durch Hypoxia und at-RA in SY5Y- und Kelly-Zellen.

Neuroblastomzellen der Linie Kelly (A) und der Linie SY5Y (B) wurden mit 1 μ M all-trans-Retinsäure (at-RA) für 6 h unter 21 % (NOX) oder 3 % O_2 (HOX) inkubiert. Die EPO-mRNA-Expression wurde mit quantitativer *real time*-PCR nachgewiesen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Versuches von n=3 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle.

Wurde unter gleichen Versuchsbedingungen at-RA hinzugegeben, kam es in beiden Zelllinien zu einer weiteren Induktion der EPO-mRNA-Expression. Diese Zugabe von at-RA wirkte sich insbesondere in hypoxischen Kelly- (2,5-fach) und SY5Y-Zellen (3,5-fach) aus (Abb. 3-

2A und Abb. 3-2B). Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die Zugabe von at-RA nur über direkte Bindung des Liganden an RXR α und den Enhancer wirkte oder ob at-RA unter diesen Bedingungen Einfluss auf die Proteine HIF-1 α / 2 α nahm.

Die Western-Blot Analyse der HIF-1 α / 2 α Proteine ließ eine Akkumulation der Transkriptionsfaktoren unter Hypoxie erkennen. Jedoch waren deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien in der Reaktion auf at-RA erkennbar. Obwohl beide als Neuroblastomzellen ähnlichen Phänotyps bekannt sind, war bei der Western-Blot Analyse zu sehen, dass es zu keiner vermehrten Akkumulation von HIF-1 α oder HIF-2 α in den Kelly-Zellen unter at-RA-Gabe kam (Abb. 3-3A). Hingegen führte die Gabe von at-RA in den SY5Y-Zellen zu einer Steigerung der Proteinmenge von HIF-1 α und HIF-2 α unter Hypoxie (Abb. 3-3B). Des Weiteren wurde in den SY5Y-Zellen HIF-1 α durch at-RA unter Normoxie induziert.

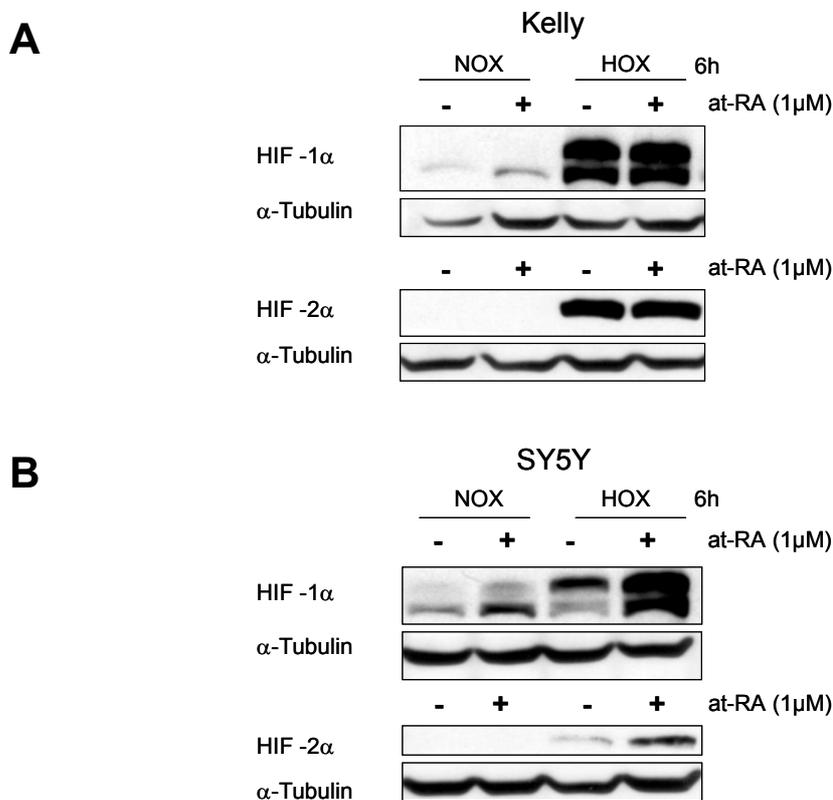


Abb. 3-3: At-RA induzierte HIF-1 α und HIF-2 α in SY5Y-, jedoch nicht in Kelly-Zellen.

Neuroblastomzellen der Linie Kelly (A) und SY5Y (B) wurden mit 1 μ M all-*trans*-Retinsäure (at-RA) für 6 h unter 21 % (NOX) oder 3 % O₂ (HOX) inkubiert. Gesamtzelllysate (70 μ g) wurde nach dem Western-Blot-Verfahren mit den Antikörpern anti-HIF-1 α und anti-HIF-2 α ausgewertet. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Um zu überprüfen, ob sich at-RA auf die Aktivität des HIF-Komplexes auswirkte, wurde ein HIF-induzierbares Reportergenplasmid (pH3SVL) verwendet. Dieses exprimierte Luciferase unter Kontrolle dreier HREs, die aus dem 5' Enhancer des Transferringens stammten. In beiden Zelllinien war eine gesteigerte Luciferase-Aktivität mit sinkendem O₂-Gehalt

verbunden. In den Kelly-Zellen führte die Zugabe von at-RA zu keiner Induktion – auch nicht unter Hypoxie – der relativen Luciferase-Aktivität (Abb. 3-4A). Jedoch kam es zu einem signifikanten Anstieg der Luciferase-Aktivität unter at-RA in den SY5Y-Zellen (Abb. 3-4B).

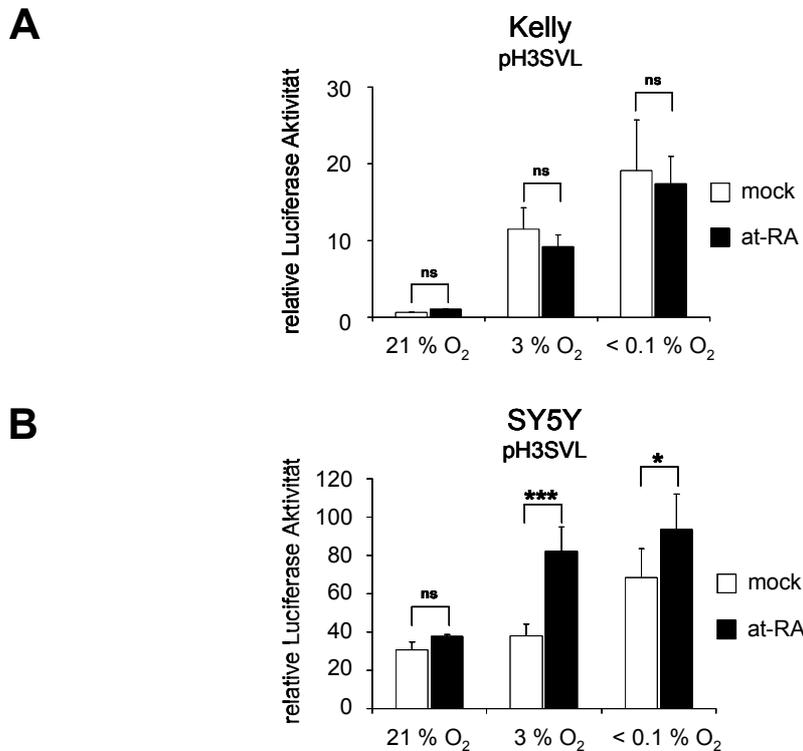


Abb. 3-4: Die HIF-Aktivität wird durch at-RA in SY5Y-Zellen gesteigert, jedoch nicht in Kelly-Zellen. Neuroblastomzellen Kelly (A) und SY5Y (B) wurden transient mit einem HIF-gesteuerten Luciferase Reporterplasmid pH3SVL transfiziert. Nach 18 h wurden die transfizierten Zellen mit 1 μ M all-*trans*-Retinsäure (at-RA) für 6 h unter 21 % O₂, 3 % O₂ oder < 0,1 % O₂ inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferaseaktivität wurde im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Versuches von n=3 Experimenten, jedes in Sechsfachbestimmung gemessen.

Um die Abhängigkeit der EPO-mRNA von Hypoxie-induzierbaren Faktoren zu überprüfen, wurde eine Transfektion mit siRNA, die gegen HIF-1 α bzw. HIF-2 α gerichtet war, durchgeführt. Die Gabe von at-RA sollte in diesem Zusammenhang nur in den SY5Y-Zellen untersucht werden (Abb. 3-5). Die Western-Blot Analyse zeigte, dass sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α erfolgreich mit siRNA vermindert werden konnte (Abb. 3-5A). Zusätzlich konnte keine Induktion der Proteinmenge durch at-RA Zugabe nachgewiesen werden, wenn siRNA gegen HIF-1 α bzw. HIF-2 α eingesetzt wurde. Auf mRNA-Ebene ist eine Induktion der EPO-mRNA nach Stimulation mit Hypoxie erkennbar. EPO-mRNA konnte des Weiteren, wie in Abb. 3-2B gezeigt, signifikant (12-fach) durch at-RA bei < 0,1 % O₂ gesteigert werden. In den Proben, die mit siHIF-1 α oder siHIF-2 α behandelt wurden, kommt es zu einer Reduktion der EPO-Expression und die Stimulation durch at-RA blieb aus. (Abb. 3-5B). Die HIF-1 α -mRNA konnte um 36 % (mock) und 29 % (+at-RA) durch den Einsatz von siHIF-1 α reduziert

werden. Die HIF-2 α -mRNA konnte um 15 % (mock) und 22 % (+at-RA) durch den Einsatz von siHIF-2 α reduziert werden. Jedoch ist auffällig, dass durch die Verwendung der siHIF-1 α die HIF-2 α -mRNA um 31 % (mock) reduziert wurde. Dieser Effekt wurde durch die at-RA-Gabe aufgehoben. Der Einsatz von siHIF-2 α beeinflusste im Gegensatz dazu die HIF-1 α -mRNA nicht (Abb. 3-5C).

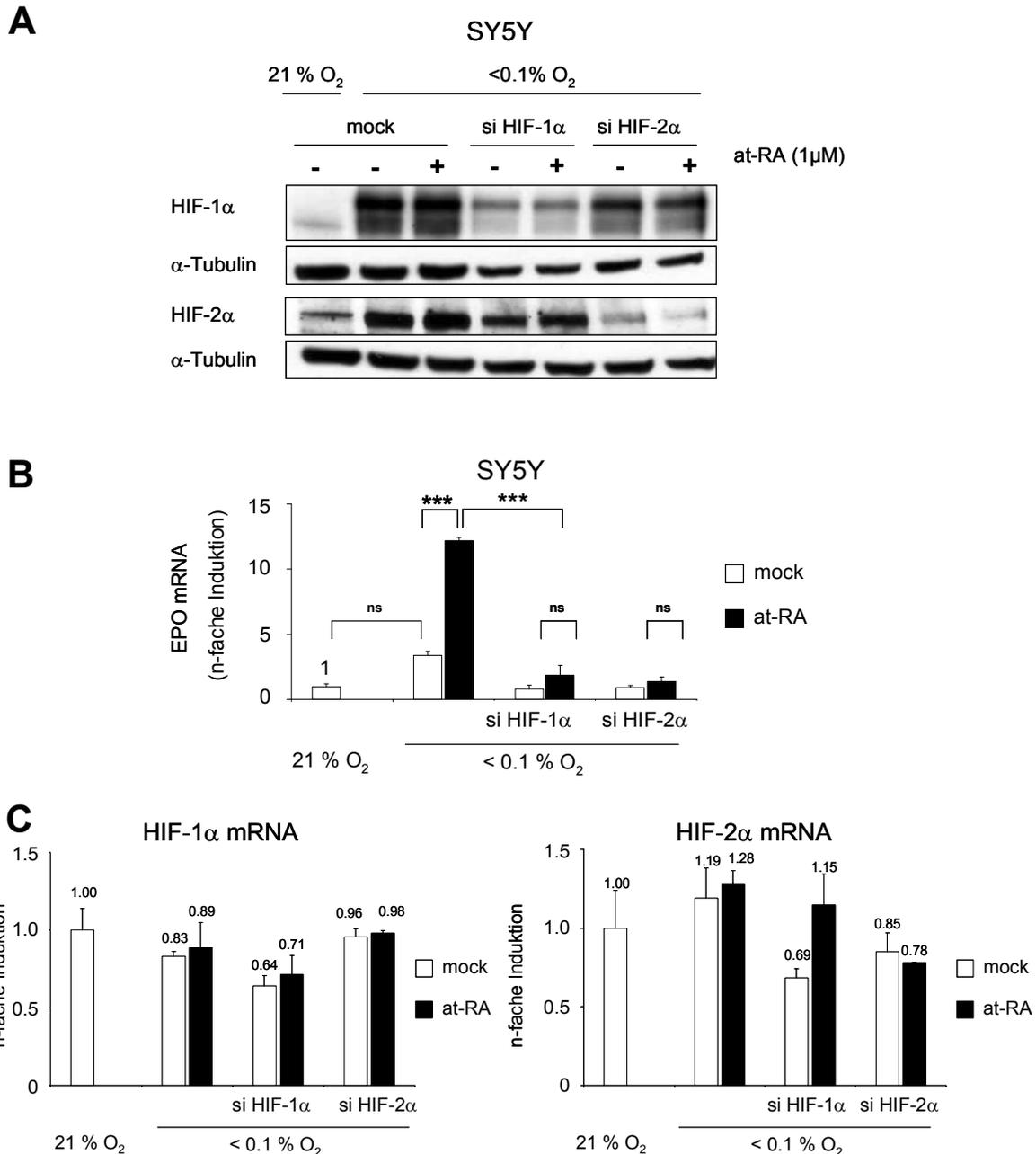


Abb. 3-5: Knock down von HIF-1 α oder HIF-2 α führt zu einer verminderten EPO-mRNA-Expression.

Neuroblastomzellen (SY5Y) wurden mit siRNA, die gegen HIF-1 α oder HIF-2 α gerichtet ist, transfiziert. Nach 20 h wurden die transfizierten Zellen mit 1 μ M all-*trans*-Retinsäure (at-RA) für 6 h unter 21 % (NOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) inkubiert. (A) Gesamtzelllysate (40 μ g) wurde nach dem Western-Blot-Verfahren mit den Antikörpern anti-HIF-1 α und anti-HIF-2 α ausgewertet. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) EPO-mRNA-Expression wurde mit quantitativer *real time* PCR nachgewiesen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle. Als Kontrolle (mock) dienten elektroporierte SY5Y-Zellen. (C) Durch Bestimmung des Gehalts an HIF-1 α -mRNA und HIF-2 α -mRNA wurde die Effizienz der jeweiligen siRNA überprüft. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Versuches von n=3 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle.

Zusätzlich wurde die Expression von ADM (*adrenomedullin*) nach at-RA-Gabe Behandlung nachgewiesen. Dieses Gen ist sowohl als HIF-1 α als auch HIF-2 α Zielgen bekannt, wobei HIF-1 α die weitaus größere Rolle für die Expression der ADM-mRNA spielt. Die ADM-mRNA-Expression wurde durch Hypoxie induziert (Abb. 3-6). Nach Einsatz von siHIF-1 α oder siHIF-2 α konnte diese unterdrückt werden. Auffällig war, dass siHIF-1 α im Gegensatz zu siHIF-2 α eine größere Reduktion der ADM-mRNA bewirkte. Die Zugabe von at-RA führte bei keiner Probe zu einer Induktion der ADM-mRNA.

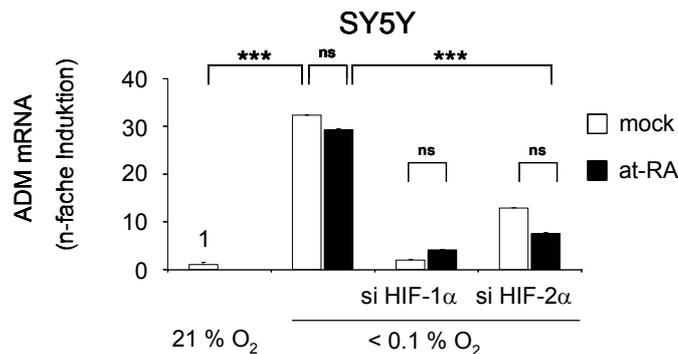


Abb. 3-6: Die hypoxische Induktion der ADM-mRNA-Expression wird nicht durch at-RA stimuliert.

Neuroblastomzellen (SY5Y) wurden mit siRNA, die gegen HIF-1 α oder HIF-2 α gerichtet ist, transfiziert. Nach 20 h wurden die transfizierten Zellen mit 1 μ M all-*trans*-Retinsäure (at-RA) für 6 h unter 21 % (NOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) inkubiert. Als Kontrolle (mock) dienten elektroporierte SY5Y-Zellen. ADM-mRNA-Expression wurde mit quantitativer *real time* PCR nachgewiesen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Versuches von n=3 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle.

Es sollte überprüft werden, ob der Retinsäure-Rezeptor RXR α ein direktes Zielgen von HIF oder der Retinsäure war. Es konnte gezeigt werden, dass die RXR α -mRNA nicht durch Hypoxie oder at-RA-Gabe unter Hypoxie in den SY5Y-Zellen beeinflusst wurde. Das Ausschalten von HIF-1 α oder HIF-2 α reduzierte die mRNA-Expression des Rezeptors (Abb. 3-7).

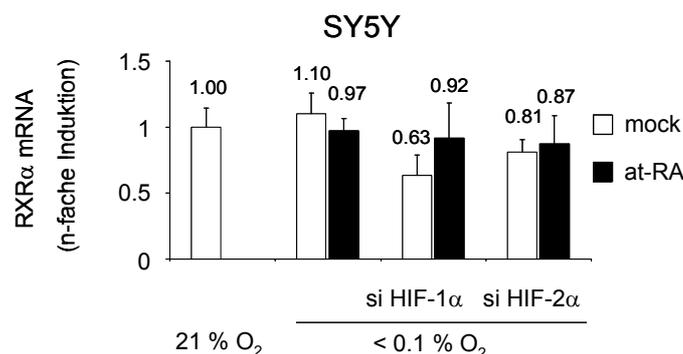


Abb. 3-7: Die Expression des Retinsäure-Rezeptors wird nicht von Hypoxie oder at-RA beeinflusst.

Neuroblastomzellen (SY5Y) wurden mit siRNA, die gegen HIF-1 α oder HIF-2 α gerichtet ist, transfiziert. Nach 20 h wurden die transfizierten Zellen mit 1 μ M all-*trans*-Retinsäure (at-RA) für 6 h unter 21 % (NOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) inkubiert. Als Kontrolle (mock) dienten elektroporierte SY5Y-Zellen. RXR α -mRNA-Expression wurde mit der Software ImageJ ausgewertet. Die Menge der mRNA wurde jeweils auf Menge an Aktin-mRNA bezogen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Versuches von n=3 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle.

At-RA wirkte vermutlich über RXR α . Um dies zu zeigen, wurde eine siRNA eingesetzt, die gegen RXR α gerichtet war. Als Kontrolle diente Luciferase siRNA. Unter Hypoxie ist der at-RA vermittelte Effekt im Western-Blot auf die Proteine HIF-1 α und HIF-2 α erkennbar. Sogar wenn RXR α -siRNA verwendet wurde, kam es zu einer Induktion der Proteinmenge bei at-RA-Gabe (Abb. 3-8A). Dies zeigte, dass der stimulierte Effekt auf HIF-1 α und HIF-2 α vom Rezeptor unabhängig war. Die EPO-mRNA-Expression konnte unter Hypoxie durch at-RA-Gabe induziert (7,4-fach) werden (Abb. 3-8B). Der siRXR α -Ansatz zeigte keine Stimulation der EPO-mRNA durch at-RA. Daraus ließ sich schließen, dass an der Stimulation der EPO-mRNA-Expression durch at-RA der Retinsäure-Rezeptor selbst beteiligt war.

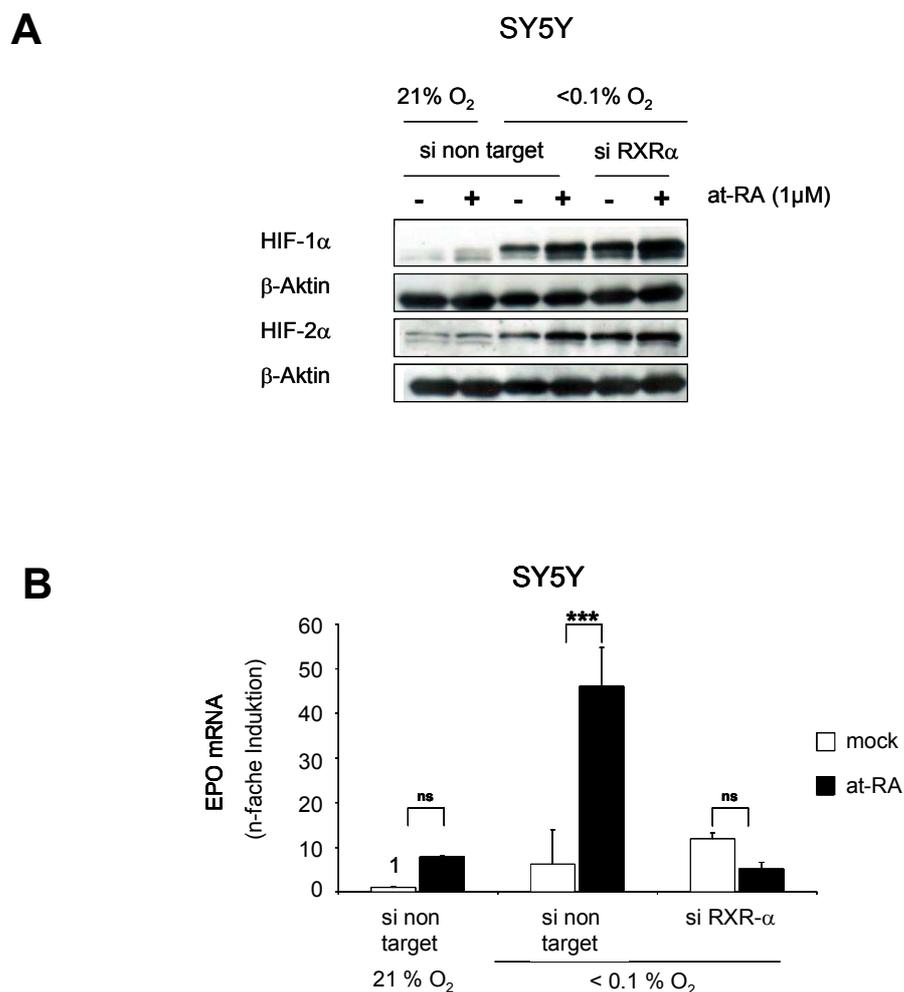


Abb. 3-8: Knock down von RXR α führt zu verminderter EPO-mRNA in SY5Y-Zellen.

Neuroblastomzellen (SY5Y) wurden mit siRNA, die gegen RXR α gerichtet ist, transfiziert. Nach 20 h wurden die transfizierten Zellen mit 1 μ M all-*trans*-Retinsäure (at-RA) für 6 h unter 21 % (NOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) inkubiert. (A) Gesamtzelllysate (40 μ g) wurden nach dem Western-Blot-Verfahren mit den Antikörpern anti-HIF-1 α und anti-HIF-2 α ausgewertet. β -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) EPO-mRNA-Expression wurde mit quantitativer *real time* PCR nachgewiesen und auf Aktin bezogen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Versuches von n=3 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es in den Kelly- und den SY5Y-Zellen zu einer hypoxischen Induktion von EPO kommt. Bei beiden Zellen geschieht dies über die Stabilisation der HIF α -Untereinheit. Für die SY5Y-Zellen kann zusätzlich gezeigt werden, dass es zu einer Stimulation von HIF-1 α als auch HIF-2 α unter Hypoxie bei at-RA-Gabe kommt. Dies führt zu einer Induktion von EPO-mRNA. Transfektionen mit siRNA gegen HIF-1 α , oder HIF-2 α oder RXR α zeigt eindeutig, dass der at-RA Effekt ein Zusammenspiel aus der α -Untereinheit und RXR α ist.

3.1.2 HNF-4 α -Expression in Neuroblastomzellen der Linie Kelly

Die Neuroblastomzellen Kelly wiesen, wie die SY5Y-Zellen, kein endogenes HNF-4 α auf (Abb. 3-1). In den Kelly-Zellen war der at-RA Effekt nicht so deutlich wie in den SY5Y-Zellen (siehe Abb. 3-2). Es stellte sich die Frage, ob die EPO-mRNA-Expression in diesen Zellen mittels exogener Expression von HNF-4 α beeinflusst werden konnte. Nach Transfektion des Expressionsplasmids pExp-CFP-HNF-4 α 2 in den Kelly-Zellen, konnte mittels Western-Blot gezeigt werden, dass es unter Hypoxie zu einer Akkumulation von HIF-1 α und HIF-2 α kam, die unter < 0,1 % O₂ signifikant höher war als unter 3 % O₂. Exogenes HNF-4 α führte zu einer leichten Reduktion von HIF-1 α und HIF-2 α (Abb. 3-9A). Eine deutliche Induktion der EPO-mRNA konnte unter Hypoxie ermittelt werden, diese war unter < 0,1 % O₂ stärker als unter 3 % O₂. Das Ergebnis des Western-Blots spiegelte sich in der mRNA des Zielgens wider, denn überexprimiertes HNF-4 α bewirkte eine Reduktion des Zielgens EPO (Abb. 3-9B).

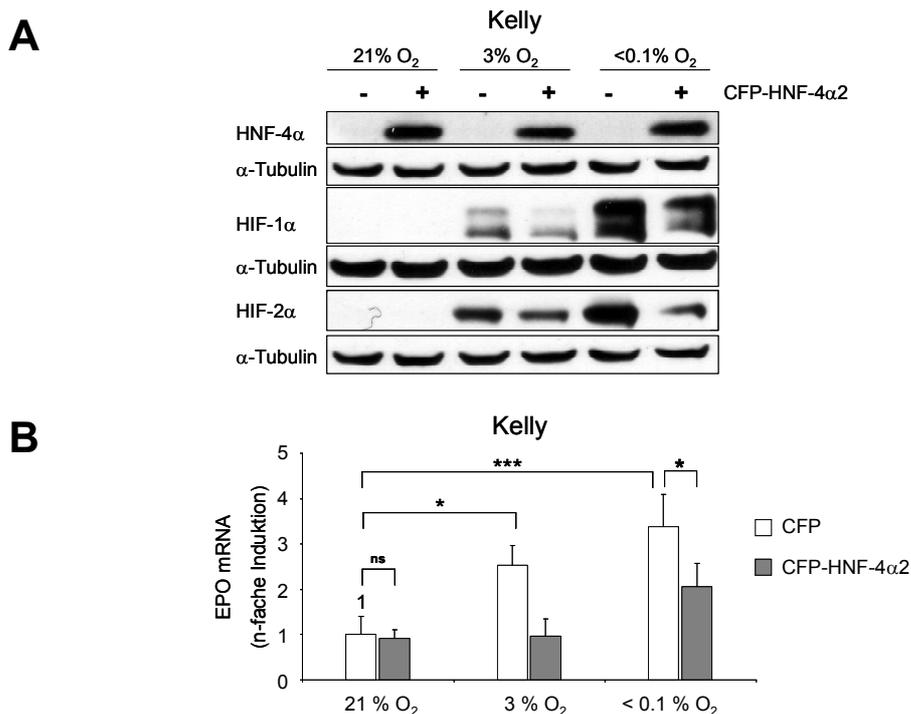


Abb. 3-9: Expression von HNF-4 α verminderte die EPO-mRNA Menge in Kelly-Zellen.

Neuroblastomzellen (Kelly) wurden mit pcDNA 6.2 N-CFP-DEST (-) und pExp-CFP-HNF-4 α 2 transfiziert. (A) Nach 20 h unter 21 % O₂ (NOX) oder 3 % O₂ (HOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) wurde das Gesamtzelllysat (50 μ g) im Western-Blot-Verfahren mit den Antikörpern anti-HNF-4 α , anti-HIF-1 α und anti-HIF-2 α ausgewertet. α -Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) EPO-mRNA-Expression wurde mit quantitativer *real time* PCR nachgewiesen und auf Aktin bezogen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Versuches von n=3 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die Gabe von HNF-4 α eine negative Auswirkung auf die EPO-mRNA unter Hypoxie in den Neuroblastomzellen Kelly hatte.

3.1.3 Einfluss von Hypoxie auf die EPO-mRNA-Expression in Nierenzellen

Die neue Nierenzelle der Linie HK120 wurde bezüglich der hypoxisch induzierbaren EPO-Expression charakterisiert. Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF-4 α wurde mittels Western-Blot (Abb. 3-1) und mittels PCR in den HK120-Zellen nachgewiesen. Da es sechs Isoformen von HNF-4 α gibt (Abb. 1-4), sollte nachgewiesen werden, welche in den HK120-Zellen exprimiert werden. Die Sequenzierungen eines genauen PCR Produktes zeigten eindeutig die Isoform HNF-4 α 2 (Abb. 3-10).

A

HNF-4 α 2

1	MRLSKTLVDM	DMADYSAALD	PAYTTLEFEN	VQVLTHGNDT	SPSEGTNLNA
51	PNSLGVSALC	AICGDRATGK	HYGASSCDGC	KGFFRRSVRK	NHMYSRFSR
101	QCVVDKDKRN	QCRYCRLKCC	FRAGMKKEAV	QNERDRISTR	RSSYEDSSLP
151	SINALLQAEV	LSRQITSPVS	GINGDIRAKK	IASIADVCS	MKEQLLVLE
201	WAKYIPAFCE	LPLDDQVALL	RAHAGEHLLL	GATKRSMVFK	DVLLLGNDYI
251	VPRHCPALAE	MSRVSIRILD	ELVLPFQELQ	IDDNEYAYLK	AIIFFDPAK
301	GLSDPGKIKR	LRSQVQVSLE	DYINDROYDS	RGRFGELLLL	LPTLQOSITWQ
351	MIEQIQFIKL	FGMAKIDNLL	QEMLLGGSPS	DAPHAHHPLH	PHLMQEHMGT
401	NVIVANTMPT	HLSNGQMCEW	PRPRGQAATP	ETPQPSPPGG	SGSEPYKLLP
451	GA VATIVKPL	SAIQPTITK	QEVI*		

B

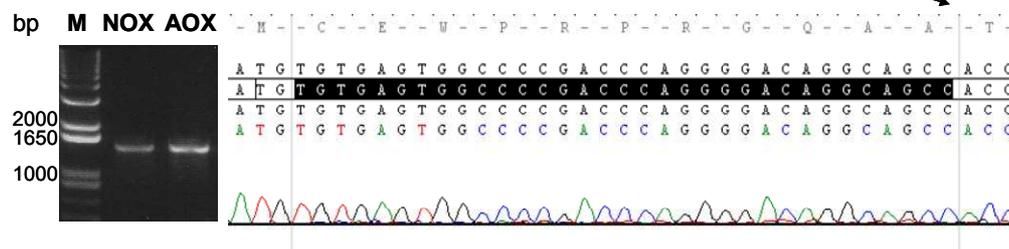


Abb. 3-10: HNF-4 α 2 Sequenz und Ausschnitt (418-428AS) der Sequenzierung.

(A) Aminosäuresequenz von HNF-4 α 2. Nierenzellen (HK120) wurden unter 21 % (NOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) inkubiert. HNF-4-mRNA-Expression wurde mit einer qualitativen PCR nachgewiesen. Die gereinigten PCR Produkte wurden sequenziert. (B) Dargestellt ist das Gelelektrophoresebild der entstandenen PCR-Produkte (1422 bp), der Marker (M) und der Bereich der Sequenzierung, der HNF-4 α unter anderem als Isoform HNF-4 α 2 festlegt.

Da die Zellen jedoch RXR α -mRNA aufwiesen, sollte die Reaktion auf at-RA-Gabe getestet werden. Der Western-Blot zeigte, dass in HK120-Zellen HIF-1 α und HIF-2 α unter < 0,1 % O₂ induziert wurden (Abb. 3-11A). Die Gabe von at-RA hatte keinen Einfluss auf HIF-1 α oder HIF-2 α , weder unter Normoxie, noch unter Hypoxie. Unter Hypoxie war eine Induktion der EPO-mRNA unter Hypoxie um das 26-fache erkennbar. Die Gabe von at-RA hatte nach 6 h keine signifikante Auswirkung auf die EPO-mRNA-Expression bei den gewählten Bedingungen (Abb. 3-11B).

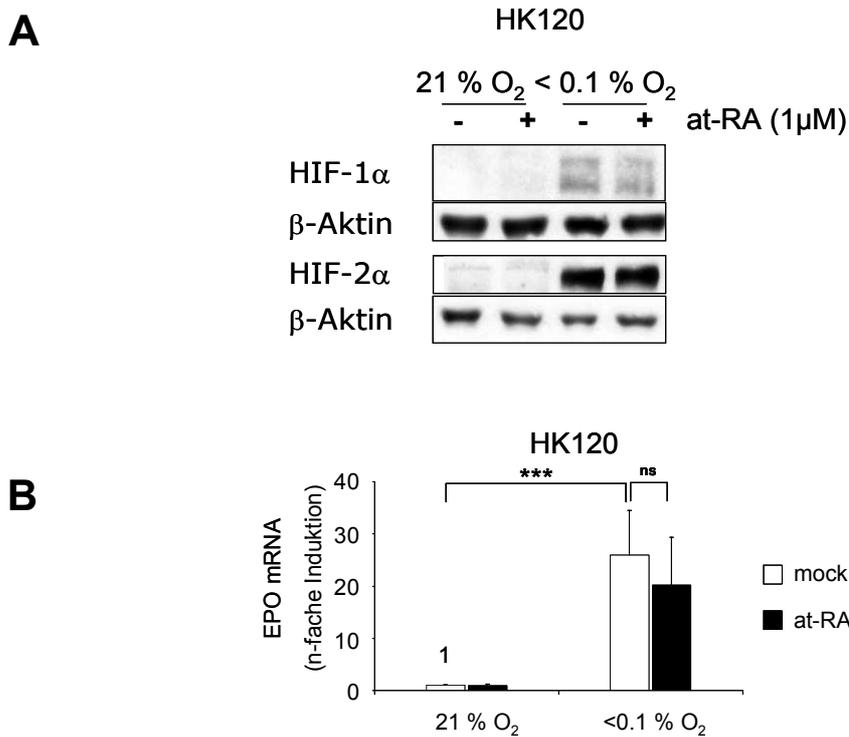
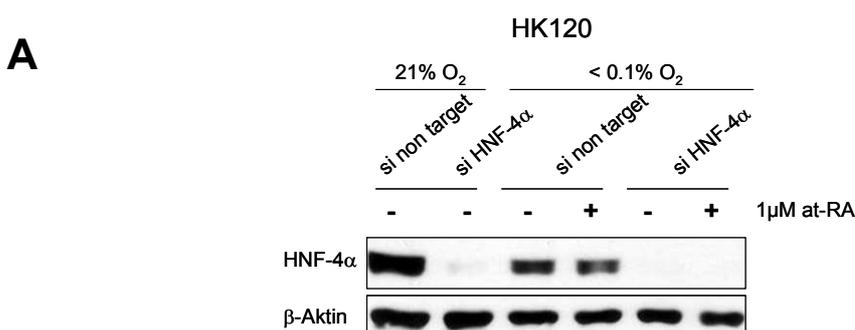


Abb. 3-11: At-RA hat nach 6 h keinen Einfluss auf die hypoxisch induzierbare EPO-mRNA-Expression. Nierenzellen (HK120) wurden mit 1 µM all-*trans*-Retinsäure (at-RA) für 6 h unter 21 % (NOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) inkubiert. (A) Das Gesamtzelllysate (50 µg) wurde im Western-Blot-Verfahren mit den Antikörpern anti-HIF-1α und anti-HIF-2α ausgewertet. β-Aktin diente als Ladekontrolle. (B) EPO-mRNA-Expression wurde mit quantitativer *real time* PCR nachgewiesen und auf Aktin bezogen. Die Werte sind Mittelwerte ± SD eines repräsentativen Versuches von n=6 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle.

Es stellte sich die Frage, was für einen Einfluss at-RA hatte, wenn HNF-4α mittels siRNA reduziert würde. Der Western-Blot zeigte eindeutig, dass HNF-4α-Protein mittels siHNF-4α erfolgreich unter Normoxie und Hypoxie unterdrückt werden konnte. Die HNF-4α-Expression wurde unter Hypoxie und weiter durch at-RA-Gabe leicht reduziert (Abb. 3-12A). Die HNF-4α-mRNA Menge, wurde durch die Verwendung von siHNF-4α deutlich reduziert. Eine Reduktion um 50 % war bei Kontrollbedingungen durch Hypoxie zu beobachten. Die Reduktion durch at-RA-Gabe war unter Normoxie deutlich und unter Hypoxie angedeutet (Abb. 3-12B). Interessanterweise wirkte sich die Gabe von at-RA negativ auf die mRNA von RXRα unter den gewählten Bedingungen aus. Wenn siHNF-4α eingesetzt wurde schien RXRα-mRNA unter Normoxie vermindert und unter Hypoxie erhöht zu sein (Abb. 3-12C).



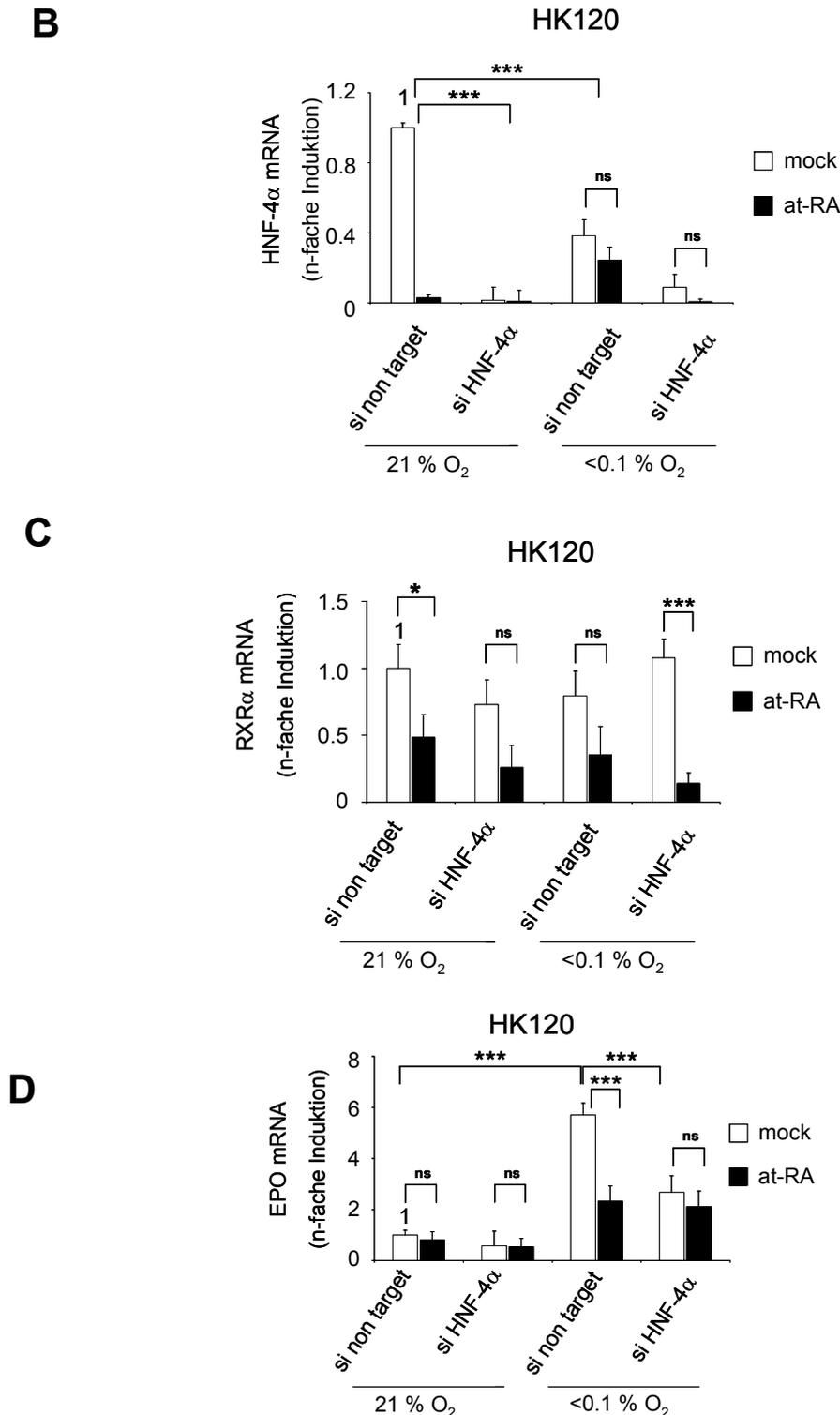
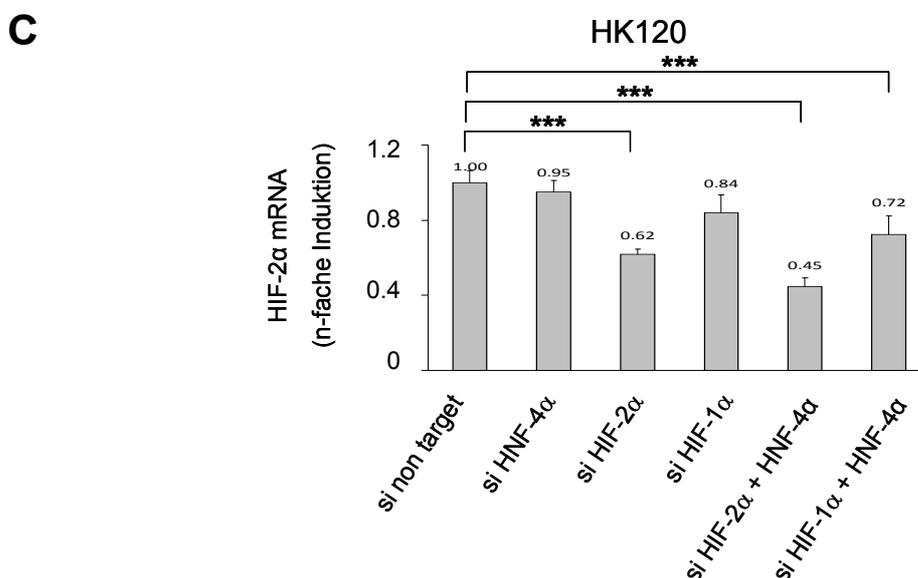
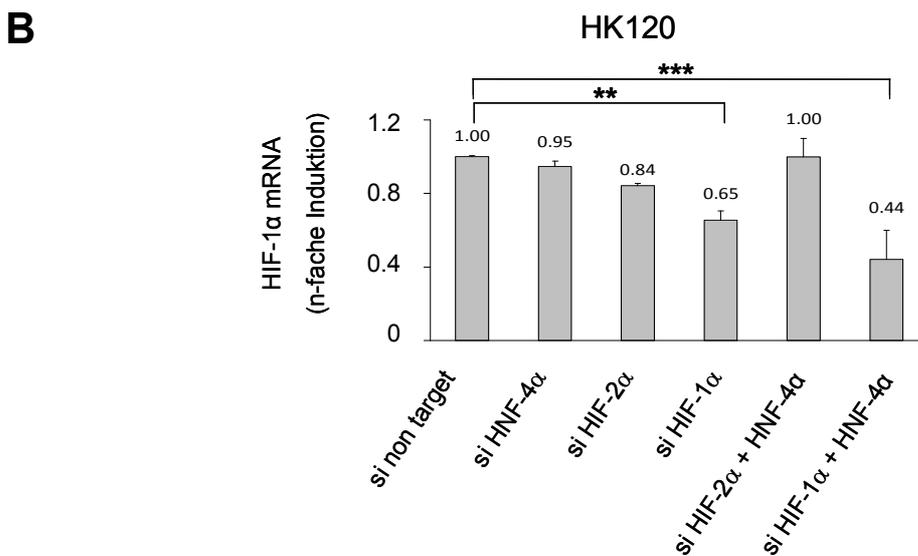
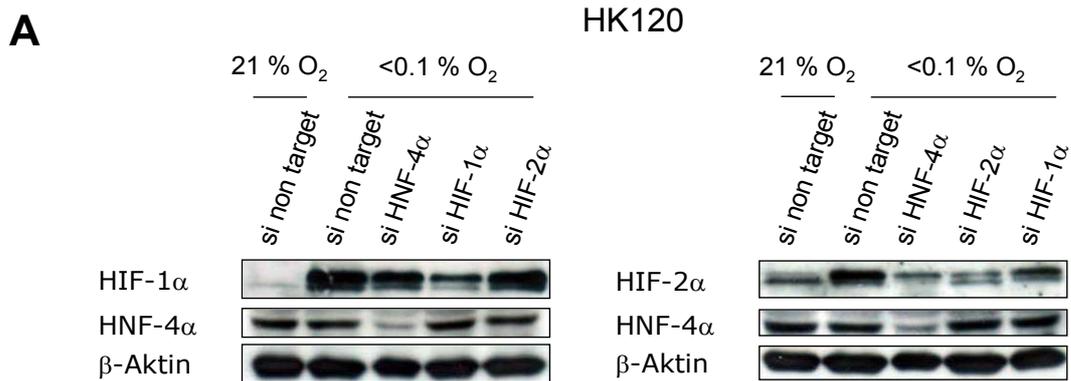


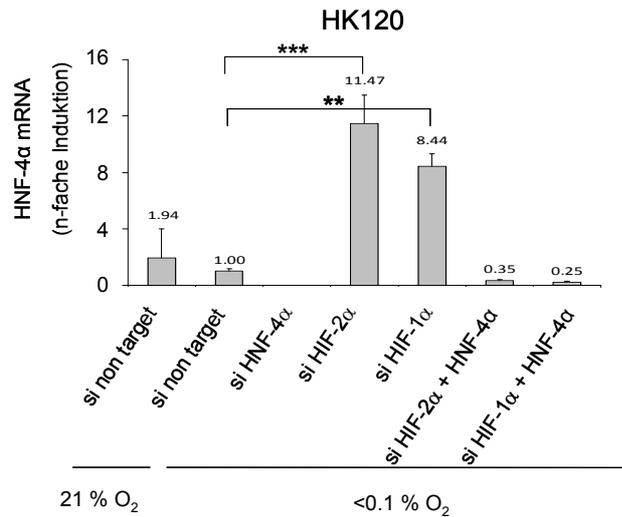
Abb. 3-12: Knock down von HNF-4 α führt zu verminderter EPO-Expression in HK120-Zellen.

Nierenzellen (HK120) wurden mit siRNA, die gegen HNF-4 α gerichtet ist, transfiziert. Nach 4 h wurde das Medium der transfizierten Zellen mit oder ohne 1 μ M all-*trans*-Retinsäure (at-RA) versetztem Medium ersetzt. Für 20 h wurden die Zellen unter 21 % (NOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) inkubiert. (A) Das Gesamtzelllysate (50 μ g) wurde im Western-Blot-Verfahren mit den Antikörpern anti-HNF-4 α ausgewertet. β -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) HNF-4 α -mRNA und (C) RXR α -mRNA-Expression wurde mit der Software ImageJ ausgewertet. Die mRNA wurde jeweils auf Aktin-mRNA bezogen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Versuches von n=3 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle. (D) EPO-mRNA-Expression wurde mit quantitativer *real time* PCR nachgewiesen und auf Aktin bezogen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle.

Unter Normoxie wirkte sich die Anwendung von siHNF-4 α nicht signifikant auf die EPO-mRNA aus. Auch die Zugabe von at-RA zeigte unter Normoxie keinen Einfluss auf die EPO-mRNA. Unter Hypoxie wurde deutlich, dass der Einsatz von siHNF-4 α zu einer Verminderung der EPO-mRNA-Expression auf 1/3 führte. Die Gabe von at-RA schien in dem Kontrollversuch (si non target) unter Hypoxie die EPO-mRNA auf 1/3 zu vermindern. Der Vergleich zu der mit siHNF-4 α behandelten Probe zeigte, dass die EPO-mRNA-Expression unter at-RA gleich stark war (Abb. 3-12D).



D



E

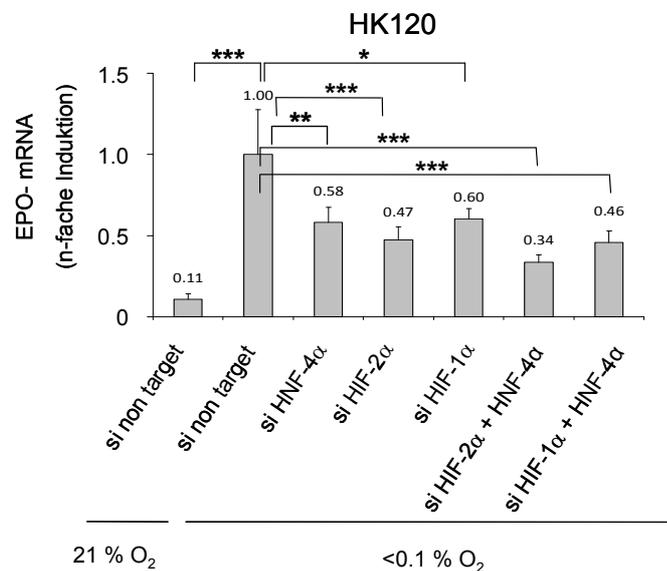


Abb. 3-13: siHNF-4α, siHIF-1α und siHIF-2α verminderten die EPO-Expression in HK120-Zellen.

Nierenzellen (HK120) wurden mit siRNA, die gegen HIF-1α oder HNF-4α oder HIF-2α gerichtet ist, transfiziert. Nach 6 h wurde das Medium der transfizierten Zellen ersetzt am nächsten Tag erfolgte eine weitere siRNA Transfektion für 6 h. Danach wurden die Zellen unter 21 % (NOX) oder < 0,1 % O₂ (AOX) für 20 h inkubiert. (A) Das Gesamtzelllysate (50 µg) wurde im Western-Blot-Verfahren mit den Antikörpern anti-HIF-1α, anti-HNF-4α und anti-HIF-2α ausgewertet. β-Aktin diente als Ladekontrolle. (B) HIF-1α-mRNA, (C) HIF-2α-mRNA und (D) HNF-4α-mRNA-Expression wurden mit der Software ImageJ ausgewertet. Die mRNA wurde jeweils auf Aktin-mRNA bezogen. Die Werte sind Mittelwerte ± SD eines repräsentativen Versuches von n=3 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Hypoxiekontrolle. (E) EPO-mRNA-Expression wurde mit quantitativer *real time* PCR nachgewiesen und auf Aktin bezogen. Dargestellt ist die n-fache Induktion bezogen auf die Normoxiekontrolle.

Des Weiteren wurde der Einsatz von siHIF-1α und siHIF-2α im Vergleich zu siHNF-4α auf die EPO-mRNA-Expression betrachtet. Alle Effekte werden im Vergleich zur Kontrolle (si *non target*) beschrieben. Zunächst zeigte der Western-Blot, dass der Einsatz von siHIF-1α zu einer erfolgreichen Verminderung der HIF-1α-Proteinmenge führte (Abb. 3-13A). Die Proteinmenge von HIF-1α wurde unter siHNF-4α und siHIF-2α nicht signifikant beeinflusst. HIF-2α wurde erfolgreich mit siHIF-2α reduziert. Ein geringfügiger Effekt von siHIF-1α auf

die Proteinmenge von HIF-2 α war außerdem zu sehen. Die Verwendung von siHNF-4 α führte zu einer spezifischen Verminderung von HNF-4 α Protein.

Die HIF-1 α -mRNA konnte erfolgreich durch den Einsatz von siHIF-1 α um 35 % und bei zusätzlichem Einsatz von siHNF-4 α um 56 % vermindert werden. Unter siHNF-4 α alleine und HIF-2 α blieb die HIF-1 α -mRNA stabil (Abb. 3-13B). Im Gegensatz dazu ergab sich folgende Situation für die HIF-2 α -mRNA: Durch den Einsatz von siHIF-2 α kam es zu einer 38 % igen Reduktion und mit siHNF-4 α in Kombination zu einer Verminderung der HIF-2 α -mRNA um 55 %. SiHNF-4 α alleine beeinflusste die HIF-2 α -mRNA nicht. Im Gegensatz dazu kam es zu einer Reduktion der HIF-2 α -mRNA bei dem Einsatz von siHIF-1 α , sowohl einzeln (16 %) als auch in Kombination mit siHNF-4 α (28 %) (Abb. 3-13C). Die HNF-4 α -mRNA wurde durch Hypoxie um 50 % reduziert. Nach Verwendung von siHNF-4 α fiel die Menge an HNF-4 α -mRNA unter die Nachweisgrenze. Die folgenden Ergebnisbeschreibungen beziehen sich auf die Hypoxiekontrolle (si *non target* unter < 0,1 % O₂), wenn diese auf 1 normalisiert wurde. Bei den Doppel-siRNA-Versuchen mit siHNF-4 α / siHIF-2 α (65 %) oder siHNF-4 α / siHIF-1 α (75 %) war eine deutliche Reduktion der HNF-4 α -mRNA zu sehen. Im Gegensatz dazu stieg die HNF-4 α -mRNA signifikant unter Hypoxie an, wenn mit siHIF-2 α (11,5-fach) oder siHIF-1 α (8,4-fach) die entsprechende HIF α -Untereinheit ausgeschaltet wurde. Unter Hypoxie wurde die EPO-mRNA auf das 9-fache induziert (Abb. 3-13 E). Die folgenden Ergebnisbeschreibungen beziehen sich auf die Hypoxiekontrolle (si *non target* unter < 0,1 % O₂), wenn diese auf 1 normalisiert wurde. Der Einsatz von siHNF-4 α führte zu einer Verminderung der EPO-mRNA um 42 %, der von siHIF-2 α um 53 % und der von siHIF-1 α um 40 %. Die Doppel-siRNA-Versuche zeigten, dass die EPO-mRNA-Expression weiter reduziert werden konnte. Dabei stellte sich heraus, dass die Kombination aus siHIF-2 α und siHNF-4 α (66 %) effektiver war als siHIF-1 α und siHNF-4 α (54 %).

Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass HIF-1 α , HIF-2 α und HNF-4 α die entscheidenden Transkriptionsfaktoren zur Regulation des EPO-Gens in den HK120-Zellen waren. Es wurden siRNAs, die gegen HIF-1 α , HIF-2 α und HNF-4 α gerichtet sind, eingesetzt und die Effizienz mittels Western-Blot und spezifischen PCRs überprüft (Abb. 3-12A und 3-13A-D). Es konnte gezeigt werden, dass die hypoxische Induktion der EPO-mRNA durch siHNF-4 α und / oder siHIF-1 α oder siHIF-2 α vermindert werden konnte (Abb. 3-12D und 3-13E). Doppel-siRNA-Versuche zeigten, dass die EPO-mRNA-Expression weiter vermindert werden konnten (Abb. 3-13E), wobei siHIF-2 α stärker reduzierend auf die EPO-mRNA wirkte als siHIF-1 α . Die Gabe von at-RA wirkte sich negativ auf die RXR α -mRNA bei den

gewählten Bedingungen aus (Abb. 3-12C). Unter Normoxie kam es zu einer deutlichen Reduktion der HNF-4 α -mRNA nach at-RA-Gabe. Eine leichte Reduktion der HNF-4 α -Expression schien at-RA unter Hypoxie zu bewirken, was wiederum zu einer Reduktion der EPO-mRNA unter diesen Bedingungen führte (Abb. 3-12D). Außerdem bewirkte Hypoxie eine Reduktion der HNF-4 α -mRNA (Abb. 3-12B), die aufgehoben werden konnte, wenn durch siHIF-1 α oder siHIF-2 α die HIF α -Untereinheit reduziert wurden (Abb. 3-13D). Die mRNA von HIF-1 α und HIF-2 α schienen von dem Einsatz der siHNF-4 α unbeeinflusst zu sein (Abb. 3-13B und 3-13C). Im Gegensatz dazu wurden die HIF-2 α -mRNA durch siHIF-1 α leicht reduziert (Abb. 3-13C).

3.2 Nachweis der Protein-Protein-Interaktion am 3' Enhancer des Erythropoietin-Gens mittels FRET

Zur Untersuchung der EPO 3' Enhancer bindenden Transkriptionsfaktoren wurde die FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Methode gewählt. Die zu untersuchenden Proteine sollten in Fusion mit Fluorophoren exprimiert werden. Des Weiteren wurde ein Fluorophorenpaar benötigt, dass sich als Donor-Akzeptorpaar für die FRET Messungen eignete.

3.2.1 Klonierung der Fusionsproteine

Zur Vorbereitung für die FRET Messungen wurden alle benötigten Plasmide kloniert. Um diese Menge an Plasmiden zu generieren, wurde das Gateway® Klonierungssystem etabliert. Kommerziell erhältlich waren lediglich der N-YFP-Dest- und der C-YFP-Dest-Vektor. Um aber vergleichbare Fusionsproteine zu erzeugen, wurde YFP (*yellow fluorescence protein*) jeweils durch CFP (*cyan fluorescence protein*) ersetzt (vgl. Abb. 2-1). Somit standen 4 Leervektoren, pcDNA6.2/N-YFP-Dest, pcDNA6.2/N-CFP-Dest, pcDNA6.2/C-YFP-Dest und pcDNA6.2/C-CFP-Dest für Klonierungen zur Verfügung. Darauffolgend wurden alle weiteren Expressionsplasmide (N-terminal als auch C-terminal) basierend auf einer rekombinanten Reaktion, der sogenannten LR-Reaktion, kloniert. Die generierten Expressionsplasmide sind in Tabelle 3-1 aufgelistet.

Tabelle 3-1 Expressionsplasmide

N-terminal	C-terminal
pExp-YFP-HIF-1 α	pExp-HIF-1 α -YFP
pExp-CFP-HIF-1 α	pExp-HIF-1 α -CFP
pExp-YFP-HIF-1 α Δ bHLH	pExp-HIF-1 α Δ bHLH -YFP
pExp-CFP-HIF-1 α Δ bHLH	pExp-HIF-1 α Δ bHLH -CFP
pExp-YFP-HIF-2 α	pExp-HIF-2 α -YFP
pExp-CFP-HIF-2 α	pExp-HIF-2 α -CFP
pExp-YFP-HIF-2 α Δ bHLH	pExp-HIF-2 α Δ bHLH -YFP
pExp-CFP-HIF-2 α Δ bHLH	pExp-HIF-2 α Δ bHLH -CFP
pExp-YFP-HNF-4 α 2	pExp-HNF-4 α 2-YFP
pExp-CFP-HNF-4 α 2	pExp-HNF-4 α 2-CFP
pExp-YFP-ARNT	pExp-ARNT-YFP
pExp-CFP-ARNT	pExp-ARNT-CFP
pExp-myc-ARNT	
pExp-YFP-CBP-CH1	
pExp-YFP-CBP-CH3 (Ruas <i>et al.</i> , 2009)	

Alle Plasmide wurden sequenziert, um Mutationen auszuschließen. Die Expression der Proteine wurde in Osteosarcoma-Zellen (U2OS) mittels Western-Blot-Verfahren überprüft. Diese Zellen eignen sich besonders, da sie leicht zu transfizieren waren. Exemplarisch wird die Expression der N-terminalen Konstrukte dargestellt (Abb. 3-14)

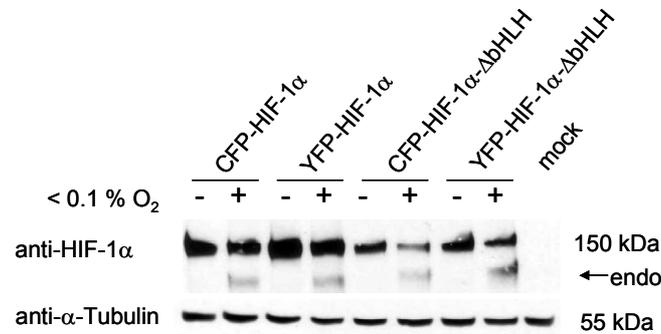
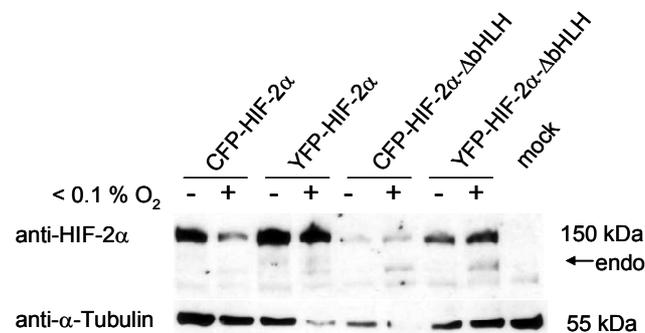
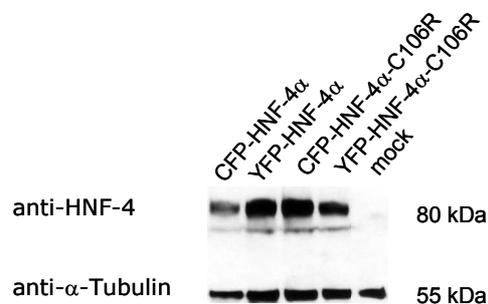
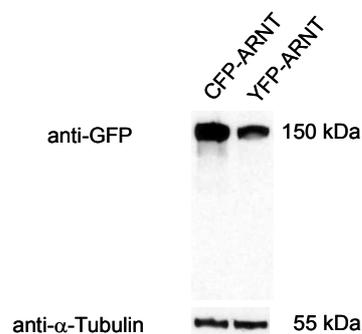
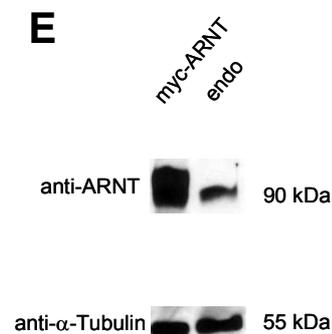
A**B****C****D****E**

Abb. 3-14: Expression der generierten Fusionsproteine.

U2OS-Zellen wurden mit Plasmiden (2 μ g und 5 μ g bei den HIF α -Konstrukten) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert. Das Gesamtzelllysate (40 μ g) wurde nach dem Western-Blot-Verfahren mit den spezifischen Antikörpern untersucht. Die Western-Blots zeigen: (A) HIF-1 α und HIF-1 α Δ bHLH HIF-2 α und (B) HIF-2 α Δ bHLH (C) HNF-4 α und HNF-4 α -C106R und (D, E) ARNT mit dem jeweiligen Anhang. Exemplarisch sind hier die N-terminalen Expressionsplasmide aufgeführt.

Um zu zeigen, dass die Fusionsproteine aus den Transkriptionsfaktor-Untereinheiten und einem Fluorophor (CFP oder YFP) transkriptionelle Aktivität aufwiesen, sollten diese mit dem bereits verwendeten HIF-gesteuerten Luciferase Reporterplasmid pH3SVL (vgl. Abb. 3-4) getestet werden. Exemplarisch wurden hier CFP-HIF-2 α , CFP-HIF-1 α mit und ohne Kombination mit YFP-ARNT getestet. Als Negativkontrolle dienten CFP- und YFP-Leervektoren. Um die Gesamtanzahl der verwendeten Plasmide konstant zu halten, wurde bei den Einzeltransfektionen jeweils das fehlende Fluorophor als Leervektor transfiziert (Abb. 3-15).

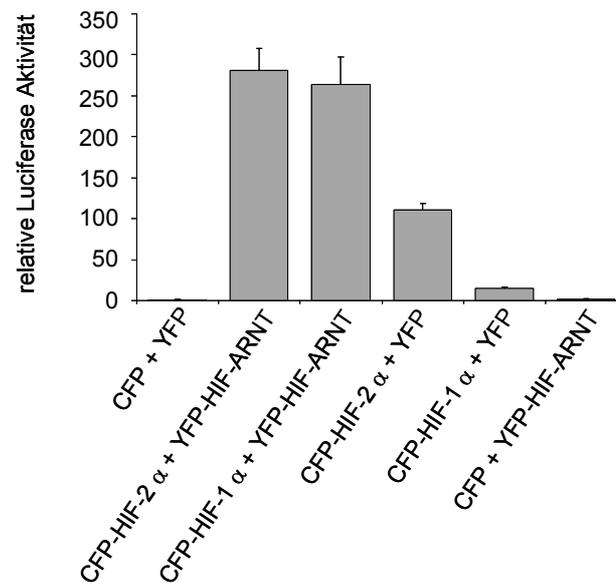


Abb. 3-15: Transkriptionelle Aktivität des exogenen HIF-Komplexes.

U2OS-Zellen wurden transient mit einem HIF-gesteuerten Luciferase Reporterplasmid pH3SVL transfiziert. Zusätzlich wurden die entsprechenden Expressionsplasmide transfiziert. Die Leervektoren für YFP und CFP dienten der Kontrolle. Nach 24 h unter Normoxie wurden die transfizierten Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität wurde im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge bestimmt. Dargestellt ist die n-fache Induktion der Luciferase-Aktivität eines repräsentativen Ergebnisses aus n=3 Versuchen jeder in Sechsfachbestimmung gemessen.

Die Messung der relativen Luciferase-Aktivität ergab, dass CFP und YFP alleine nicht fähig waren die HIF-gesteuerte Luciferase zu exprimieren. Wurde der aktive exogene HIF Komplex aus der Untereinheit HIF-2 α und ARNT gebildet, kam es zu einer 280-fachen Steigerung. HIF-1 α und ARNT in Kombination führten zu einer 264-fachen Induktion. Die Einzeltransfektionen zeigten, dass HIF-2 α zu einer 111-fachen, HIF-1 α zu einer 15-fachen und ARNT nur zu einer 2-fachen Verstärkung führten. Somit konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α und HIF-2 α und ARNT auch als Fusionsprotein mit CFP oder YFP transkriptionell aktiv waren.

3.2.2 Interaktionsstudie der HIF-Untereinheiten in U2OS-Zellen

Die direkte molekulare Interaktion zweier Proteine konnte mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) gezeigt werden. Die zu untersuchenden Proteine wurden dafür mit Fluorophoren fusioniert. Bei den Fluorophoren handelt es sich um die Varianten von GFP (*green fluorescence protein*), namentlich das so genannte YFP (*yellow fluorescence protein*) und CFP (*cyan fluorescence protein*). Die FRET-Untersuchungen wurden an lebenden Zellen in einer speziellen Zellbeobachtungskammer durchgeführt (vgl. Abschnitt 2-5).

HIF-1 α und HIF-2 α sind bekannte Isoformen, die einen aktiven Heterodimerkomplex mit ARNT bilden. Da es spezifische HIF-Zielgene sowohl für HIF-1 α als auch HIF-2 α gibt, sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Heterodimerbildung von HIF-2 α / ARNT und HIF-1 α / ARNT gibt. Die nukleäre Verteilung von CFP-HIF-2 α (nach Anregung mit dem 444 nm Laser) und YFP-ARNT (nach Anregung mit dem 532 nm Laser), ist in Abbildung 3-16 dargestellt. HIF-2 α - und ARNT-Fusionsproteine wiesen im Zellkern eine heterogene Verteilung auf. Entsprechend der heterogenen Verteilung war auch die FRET-Effizienz (FRET eff.) in den Zellkernen heterogen lokalisiert. Diese heterogene Verteilung könnte eventuell auch auf eine unterschiedlich starke Interaktion zwischen dem Donor CFP-HIF-2 α und dem Akzeptor YFP-ARNT hindeuten. Jedoch ist für dieses Verfahren bekannt, dass die FRET-Effizienz stark von dem spezifischen Verhältnis von Akzeptor zu Donor abhängig ist (Wotzlaw *et al.*, 2007)

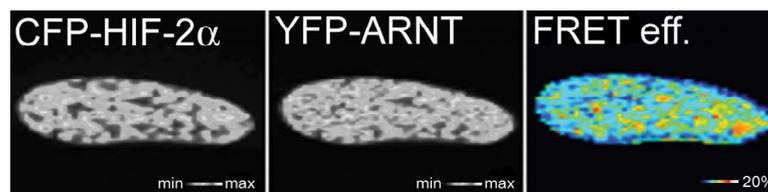


Abb. 3-16: Koexpression von CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT.

Osteosarcoma-Zellen (U2OS) wurden mit CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT transfiziert und unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂) für 48 h exprimiert. Danach erfolgte die Untersuchung mittels konfokaler Laser Mikroskopie. Die subnukleäre Lokalisation der Fluorophor-markierten HIF-Untereinheiten und das resultierende FRET-Effizienz-Signal war heterogen im Zellnukleus verteilt.

Um die Distanz zwischen zwei Proteinen zu berechnen, müssen daher mehrerer Zellen analysiert werden. Jeder Zellkern wies dabei eine eigene, gemittelte FRET-Effizienz auf, die einem spezifischem Akzeptor / Donor-Verhältnis zugeordnet wurde. Somit führte die Untersuchung mehrere Zellen zu einer meist sigmoidalen Kurve (Abb. 3-17). Aus dieser Kurve ließen sich wichtige Erkenntnisse über den Abstand der Interaktionspartner ziehen. Das

Plateau der Kurve spiegelte eine Situation wider, bei der zusätzliche Akzeptor Moleküle (hier YFP-markiertes ARNT) zu keinem weiteren strahlenlosen Energie-Transfer führten (vgl. Methodenteil 2-5). Deshalb hing die durchschnittliche FRET-Effizienz der CFP-HIF-2 α / YFP-ARNT-Interaktion von der relativen Expression dieser beiden Interaktionspartner innerhalb des Zellkerns ab. Wenn das Plateau der FRET-Effizienz erreicht war, beeinflusste das Akzeptor / Donor-Verhältnis die FRET-Effizienz nicht mehr. Es konnte für eine solche gesättigte Akzeptor-Situation die Distanz zwischen den beiden Partnern kalkuliert werden (vgl. Abb. 2-4A).

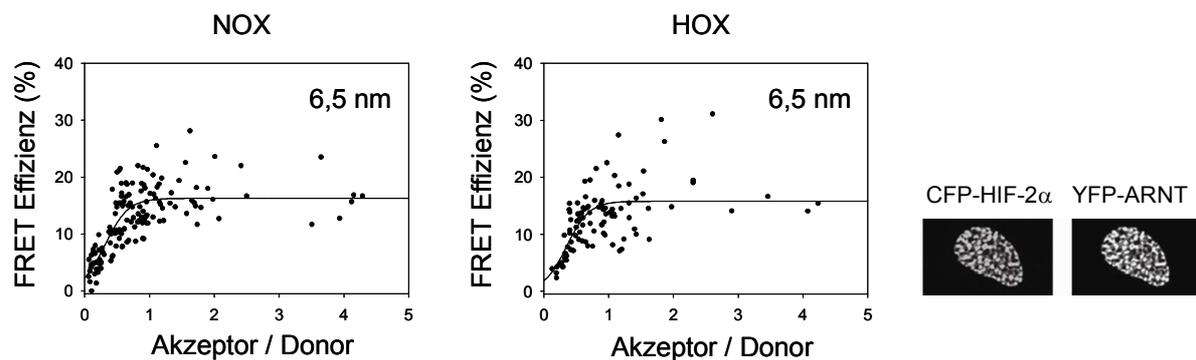


Abb. 3-17: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-2 α mit YFP-ARNT mittels FRET.

Osteosarcoma-Zellen (U2OS) wurden mit CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT transfiziert und unter normoxischen (NOX) oder hypoxischen (HOX) Bedingungen für 48 h inkubiert. Mit konfokaler Lasermikroskopie wurde die FRET-Effizienz und die Akzeptor / Donor-Fluoreszenz für jeden einzelnen Zellkern unter Normoxie (NOX) als auch Hypoxie (HOX) analysiert und als einzelner Messpunkt grafisch dargestellt. Zusätzlich wurde per sigmoidaler Regression die zugehörige FRET-Kurve bestimmt. Die Distanz zwischen zwei Interaktionspartnern wurde aus dem FRET-Effizienz Wert beim Erreichen des Plateaus der Kurve errechnet. Die stark heterogene Verteilung der Fusionsproteine war bei Koexpression (NOX) deutlich im Zellkern zu sehen.

Die FRET Untersuchungen nach CFP-HIF-2 α / YFP-ARNT Transfektion ergaben sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie den gleichen Kurvenverlauf. Es konnte aus dem erreichten Wert von 16 % FRET-Effizienz ein Abstand von 6,5 nm zwischen den Interaktionspartnern kalkuliert werden.

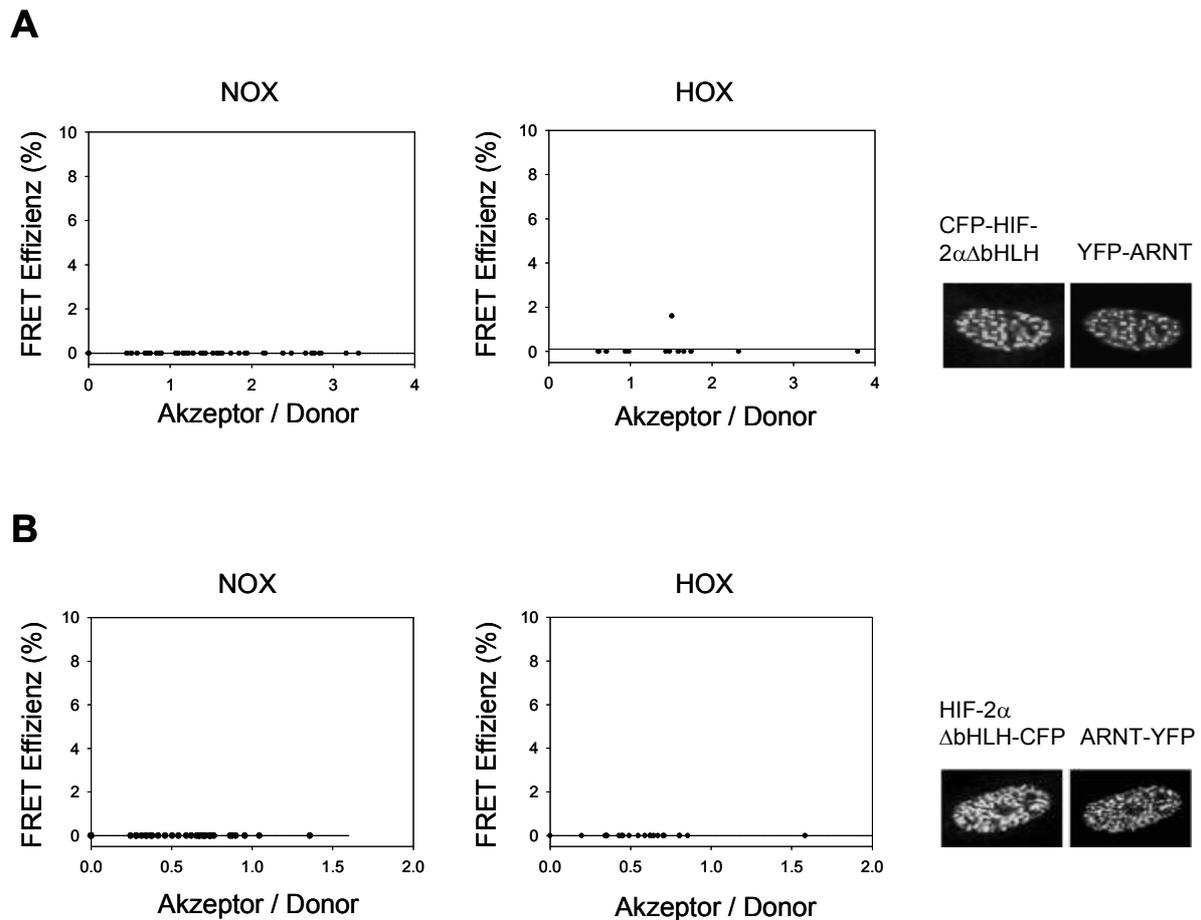


Abb. 3-18: Interaktionsanalyse von HIF-2αΔbHLH mit ARNT mittels FRET.

Osteosarcoma-Zellen (U2OS) wurden mit (A) CFP-HIF-2αΔbHLH und YFP-ARNT und mit (B) HIF-2αΔbHLH-CFP mit ARNT-YFP transfiziert und für 48 h unter normoxischen Bedingungen exprimiert. Nach 4 h Hypoxie konnte kein Unterschied zu normoxischen Bedingungen festgestellt werden. Die stark heterogene Verteilung von HIF-2αΔbHLH und ARNT war bei Koexpression deutlich in den Zellkern zu sehen.

Um zu überprüfen, ob die Interaktion nach Bindung an die DNA stattfindet, wurde eine Deletionsmutante von HIF-2α generiert, die durch die fehlende bHLH (*basic helix-loop-helix*) Domäne nicht mehr an die DNA binden kann (vgl. Abb. 1-2). Es wurden wie zuvor unter gleichen Bedingungen FRET-Experimente durchgeführt, und diesmal die Interaktion von CFP-HIF-2αΔbHLH mit YFP-ARNT untersucht. Wie in Abbildung 3-18A dargestellt kam es zu keiner Interaktion. Fraglich war die Orientierung der Fluorophore, die möglicherweise hier zu einer Behinderung der Interaktion führten. Um dies auszuschließen wurde HIF-2αΔbHLH-CFP mit ARNT-YFP untersucht (Abb. 3-18B). Wiederum kam es zu keinerlei Interaktion, und die FRET-Effizienz lag bei 0 %. Die Verteilung im Zellkern war ähnlich der Situation in den Zellen mit Wildtyp-Fusionsproteinen (vgl. Abb. 3-17).

Um den Vergleich zwischen den beiden HIF-2α / ARNT und HIF-1α / ARNT Heterodimerkomplexen zu ziehen, wurden CFP-HIF-1α mit YFP-ARNT in Koexpression untersucht. Es wurde kein Unterschied zwischen den beiden gewählten Bedingungen

Normoxie und Hypoxie festgestellt (Abb. 3-19). Unter Normoxie und Hypoxie wurde durch das Erreichen des Plateaus aus der FRET-Effizienz eine Entfernung zwischen HIF-1 α mit ARNT von 6,2 nm kalkuliert. Die Verteilung der beiden Fusionsproteine im Kern konnte als heterogen bezeichnet werden, war jedoch deutlich homogener im Vergleich zu HIF-2 α / ARNT.

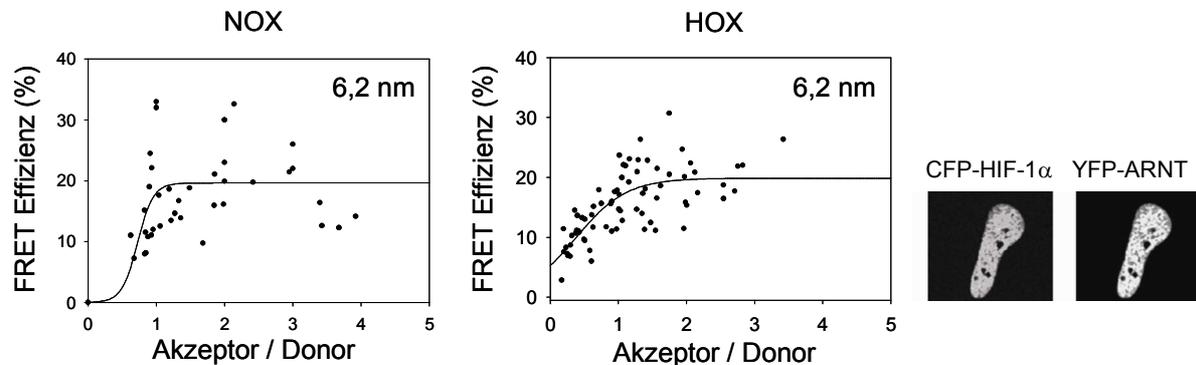


Abb. 3-19: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α mit YFP-ARNT mittels FRET.

Osteosarcoma-Zellen (U2OS) wurden mit CFP-HIF-1 α und YFP-ARNT transfiziert und unter normoxischen Bedingungen für 48 h exprimiert. Nach FRET Untersuchungen unter Normoxie (NOX) oder Hypoxie (HOX) wurde ein Abstand von 6,2 nm zwischen CFP-HIF-1 α und YFP-ARNT kalkuliert. Die heterogene Verteilung von CFP-HIF-1 α und YFP-ARNT war bei Koexpression deutlich im Zellnucleus zu sehen.

Analog zu der HIF-2 α Mutante wurde von HIF-1 α eine Deletionsmutante kloniert, die keine bHLH-Domäne mehr besaß. Diese wurde unter gleichen Bedingungen wie zuvor analysiert (Abb. 3-20). Interessanterweise ergab sich hier eine FRET-Effizienz von 10,5 % und es ließ sich ein Abstand von 7,0 nm kalkulieren.

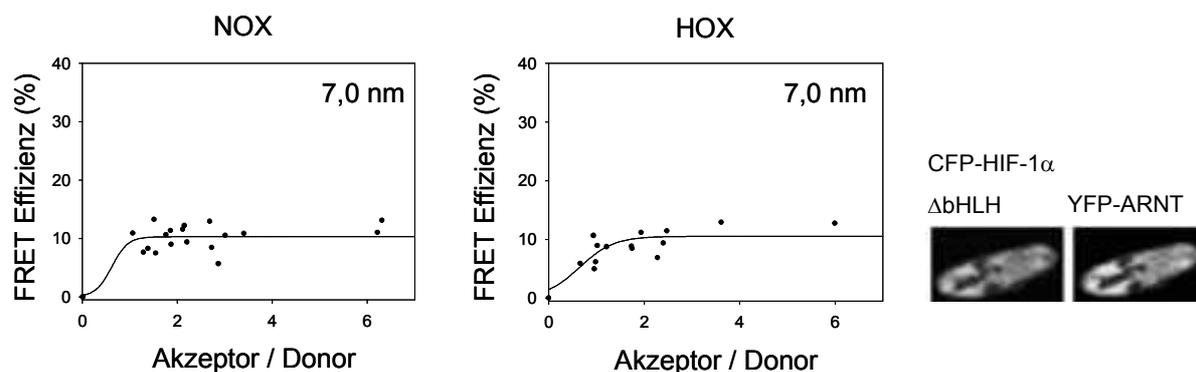


Abb. 3-20: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α Δ bHLH mit YFP-ARNT mittels FRET

Osteosarcoma-Zellen (U2OS) wurden mit CFP-HIF-1 α Δ bHLH und YFP-ARNT transfiziert und unter normoxischen Bedingungen für 48 h exprimiert. Nach 4 h Hypoxie (HOX) konnte kein Unterschied zu normoxischen Bedingungen (NOX) festgestellt werden und es kann ein Abstand von 7,0 nm zwischen CFP-HIF-1 α Δ bHLH und YFP-ARNT kalkuliert werden. Die stark heterogene Verteilung von CFP-HIF-1 α Δ bHLH und YFP-ARNT war bei Koexpression deutlich im Zellnucleus zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die HIF-1 α -Untereinheit als auch die HIF-2 α -Untereinheit einen stabilen Heterodimerkomplex mit der β -Untereinheit (ARNT) bildete. Es ergab sich aber ein deutlicher Unterschied in der Interaktion von HIF-1 α oder HIF-

2 α mit ARNT. Erstens war der Abstand zwischen HIF-1 α / ARNT kleiner als HIF-2 α / ARNT und zweitens war im Unterschied zur Kombination HIF-2 α Δ bHLH / ARNT eine Interaktion zwischen der HIF-1 α Δ bHLH-Mutante mit ARNT möglich. Eine Bindung der HIF-2 α -Untereinheit an die DNA war für die Ausbildung des HIF-2-Komplexes essentiell.

3.2.3 Interaktionsstudie von HNF-4 α mit HIF-Untereinheiten in U2OS-Zellen

Der Transkriptionsfaktor HNF-4 α sollte mittels FRET auf eine Interaktion mit ARNT oder HIF-2 α oder HIF-1 α hin untersucht werden. Zuerst wurde untersucht, ob CFP-HNF-4 α mit YFP-ARNT interagiert (Abb. 3-21A). Es konnte keine Interaktion zwischen den beiden Fusionsproteinen mittels FRET nachgewiesen werden. Die C-terminal mit CFP oder YFP fusionierten Proteine lieferten ebenfalls keine FRET Ergebnisse (Abb. 3-21B). Im Unterschied zu den HIF-Fusionsproteinen wiesen die HNF-4 α Fusionsproteine in Koexpression mit ARNT eine sehr homogene nukleäre Verteilung auf (Abb. 3-20)

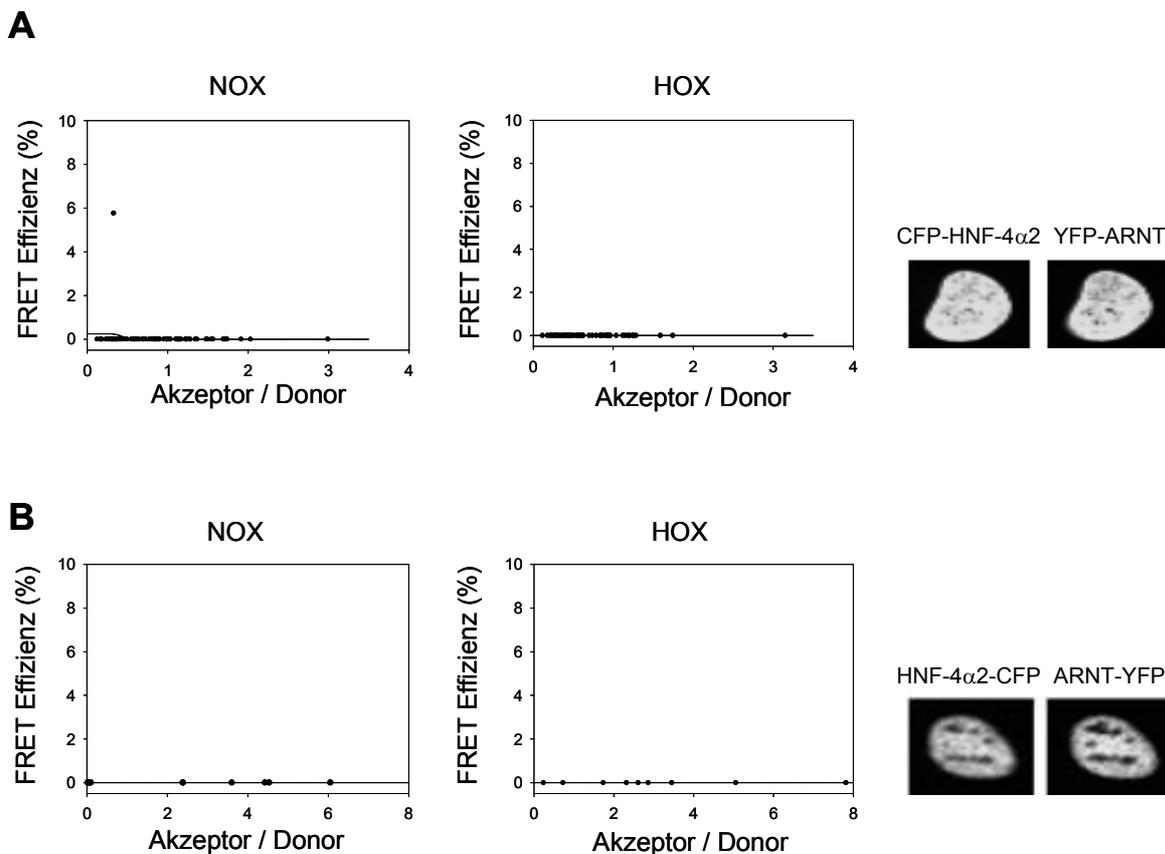


Abb. 3-21: Interaktionsanalyse von HNF-4 α 2 mit ARNT mittels FRET.

In Osteosarcoma-Zellen (U2OS) wurde (A) CFP-HNF-4 α 2 mit YFP-ARNT und (B) HNF-4 α 2-CFP mit ARNT-YFP unter normoxischen Bedingungen für 48 h exprimiert. Die homogene Verteilung von HNF-4 α 2 und ARNT war bei beiden Koexpressionen deutlich im Zellkern zu sehen.

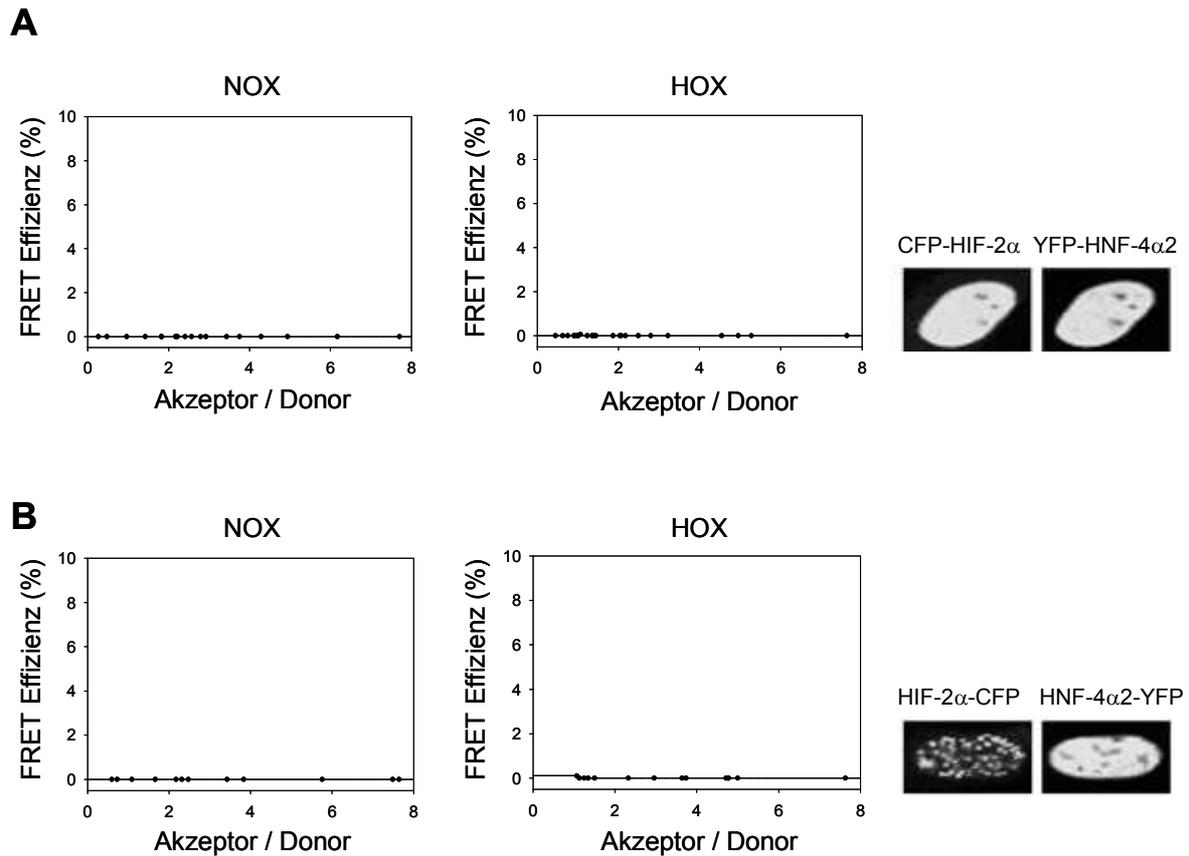


Abb. 3-22: Interaktionsanalyse von HIF-2 α mit HNF-4 α 2 mittels FRET.

In Osteosarcoma-Zellen (U2OS) wurde nukleäres HIF-2 α und HNF-4 α 2, (A) N- oder (B) C-terminal markiert, unter normoxischen Bedingungen für 48 h exprimiert. Auffällig waren die heterogene Verteilung von HIF-2 α -CFP und die homogene Verteilung von HNF4 α 2-YFP.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Interaktion von HIF-2 α mit HNF-4 α . Dafür wurde CFP-HIF-2 α und YFP-HNF-4 α koexprimiert. Die Analyse mittels FRET gab keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion (Abb. 3-22A). Die Änderung der Orientierung der Fluorophore führte ebenfalls zu keinem positiven FRET-Ergebnis (Abb. 3-22B). In den Zellkernen wies HIF-2 α das heterogene Erscheinungsbild einer Einzeltransfektion auf, während im Gegensatz dazu HNF-4 α sehr homogen im Zellkern verteilt war. Die anschließende Analyse von HIF-1 α mit HNF-4 α ergab mittels FRET keine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Partnern. Sowohl die N-terminalen als auch die C-terminalen Fusionsproteine ergaben keine FRET-Signale. Die nukleäre Verteilung aller Fusionsproteine war sehr homogen (Abb. 3-23A und B).

Zusammengefasst lässt sich aus den FRET-Experimenten schließen, dass HNF-4 α weder mit ARNT noch mit HIF-1 α oder HIF-2 α direkt interagieren kann. Bei diesen Versuchen konnte jeweils immer nur eine der beiden HIF-Untereinheiten mit HNF-4 α kotransfiziert werden.

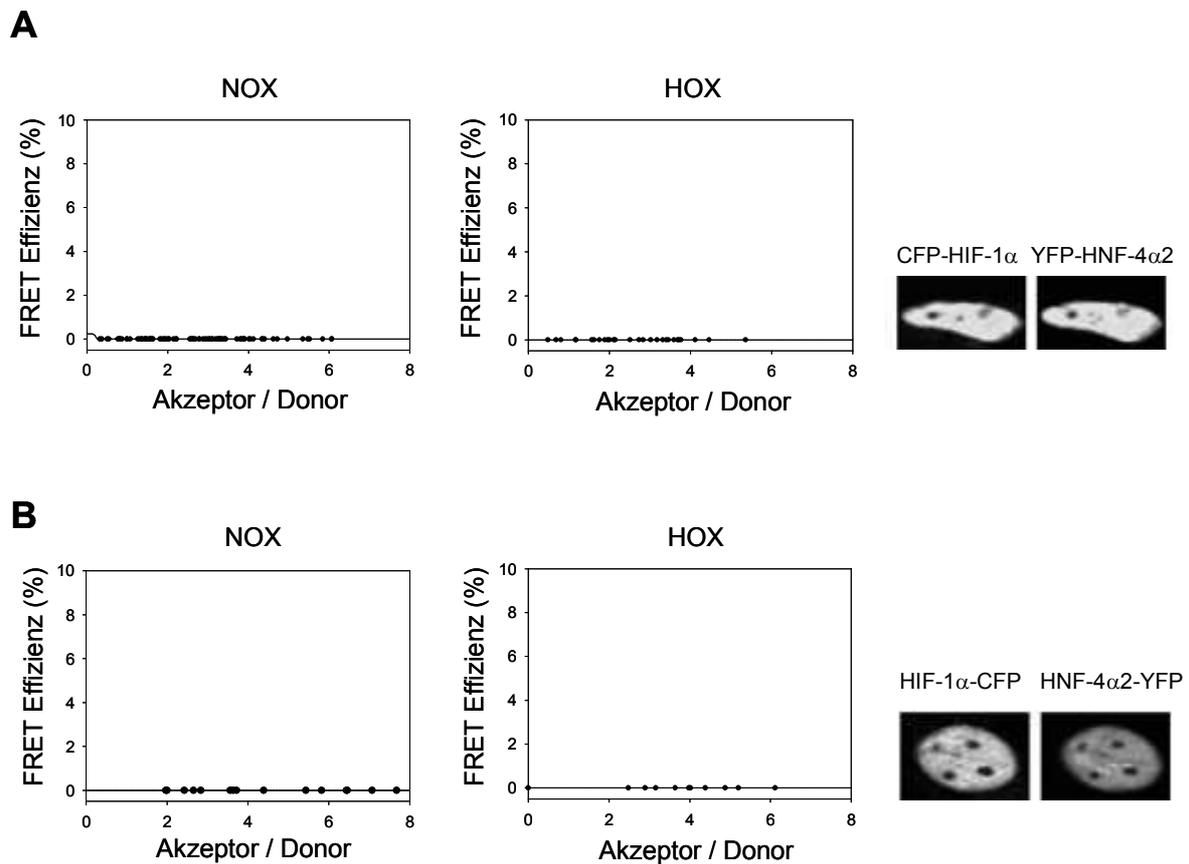


Abb. 3-23: Interaktionsanalyse von HIF-1 α mit HNF-4 α 2 mittels FRET.

Osteosarcoma-Zellen (U2OS) wurden mit HIF-1 α und HNF-4 α 2, (A) N- oder (B) C-terminal, transfiziert und unter normoxischen Bedingungen für 48 h exprimiert. Es wurde kein Unterschied zwischen normoxischen und hypoxischen (4 h) Bedingungen festgestellt. Die homogene Verteilung von CFP-HIF-1 α mit YFP-HNF-4 α 2 als auch HIF-1 α -CFP mit HNF-4 α 2-YFP war deutlich im Zellkern zu sehen.

3.2.4 Interaktionsstudie von HNF-4 α mit dem intakten HIF-1-Komplex in U2OS-Zellen

Bei den vorherigen FRET Untersuchungen von HNF-4 α mit den HIF-Untereinheiten wurde jeweils nur eine Untereinheit kotransfiziert. Denkbar wäre, dass jedoch ein HIF-Heterodimer für die Interaktion mit HNF-4 α benötigt wurde. Da zu der Zeit kein Tripel-FRET mit drei unterschiedlichen Fluorophoren möglich war, musste eine Alternative gefunden werden. Es wurde somit ein Expressionsplasmid benötigt, das einen der beiden Heterodimerpartner mit einem Anhang markiert, der nicht fluoresziert. Die Wahl fiel auf ARNT, da dieses effizienter und stabiler als die HIF α -Untereinheiten transfiziert werden konnte. HIF-1 α und ARNT wiesen die höchste FRET-Effizienz auf, deshalb wurde die Interaktion des HIF-1-Komplexes mit HNF-4 α untersucht. Da myc-ARNT während des Experimentes nicht sichtbar war, konnte die Untersuchung nur durch die hohe Anzahl von untersuchten Zellen sichergestellt werden. Es konnte jedoch keine Verbesserung in der Interaktion zu HNF-4 α festgestellt werden (Abb.

3-24). Auffällig war dennoch die heterogene Verteilung der Fusionsproteine im Zellkern, die möglicherweise durch die Interaktion von HIF-1 α mit ARNT zustande kam.

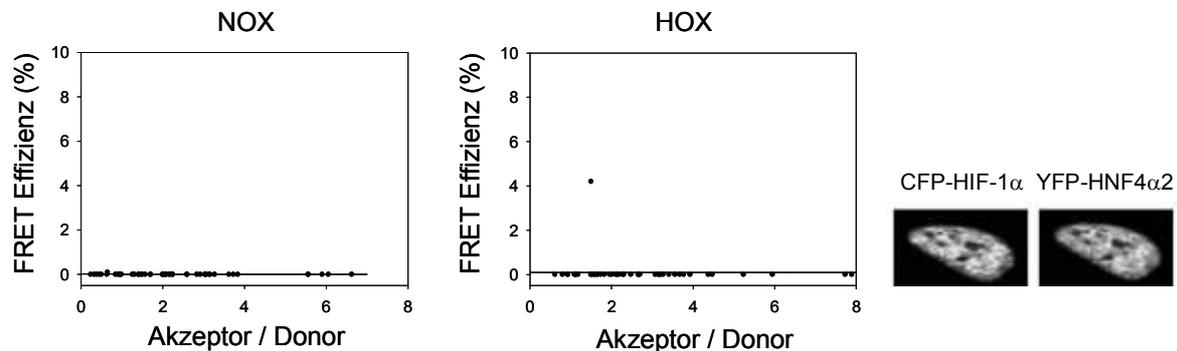


Abb. 3-24: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α / myc-ARNT mit YFP-HNF-4 α 2 mittels FRET. Osteosarcoma-Zellen (U2OS) wurden mit CFP-HIF-1 α / myc-ARNT und YFP-HNF-4 α 2 transfiziert und unter normoxischen Bedingungen für 48 h exprimiert. Es kam zu keiner Interaktion zwischen HNF-4 α 2 und den HIF-Untereinheiten. Für normoxische (NOX) und hypoxische (HOX) Bedingungen war eine heterogene Verteilung von CFP-HIF-1 α / myc-ARNT und YFP-HNF-4 α 2 bei Koexpression im Zellnukleus zu sehen.

3.2.5 Interaktionsstudie der HIF-Untereinheiten und von HNF-4 α mit den HIF-Untereinheiten in HK120-Zellen

Es sollte geklärt werden, ob die fehlende Interaktion der in den U2OS-Zellen exprimierten Fusionsproteine durch zellspezifische Faktoren, z.B. durch die fehlende endogene HNF-4 α -Expression, begründet sein könnte. Daher wurden die FRET-Experimente in den weiter oben beschriebenen HK120-Zellen unter Normoxie wiederholt (vgl. Abschnitt 3.1.3). Die FRET-Untersuchung der HIF-Heterodimer-Untereinheiten mit HNF-4 α in HK120-Zellen lieferte keine direkte Interaktion (Abb. 3-25). HIF-1 α (Abb. 3-25A) und ARNT (Abb. 3-25C) zeigten bei Koexpression mit HNF-4 α eine deutlich homogene Verteilung im Zellkern. Jedoch wies HIF-2 α (Abb. 3-25B) mit HNF-4 α deutlich heterogenere Strukturen auf als in den U2OS-Zellen (vgl. Abb. 3-22).

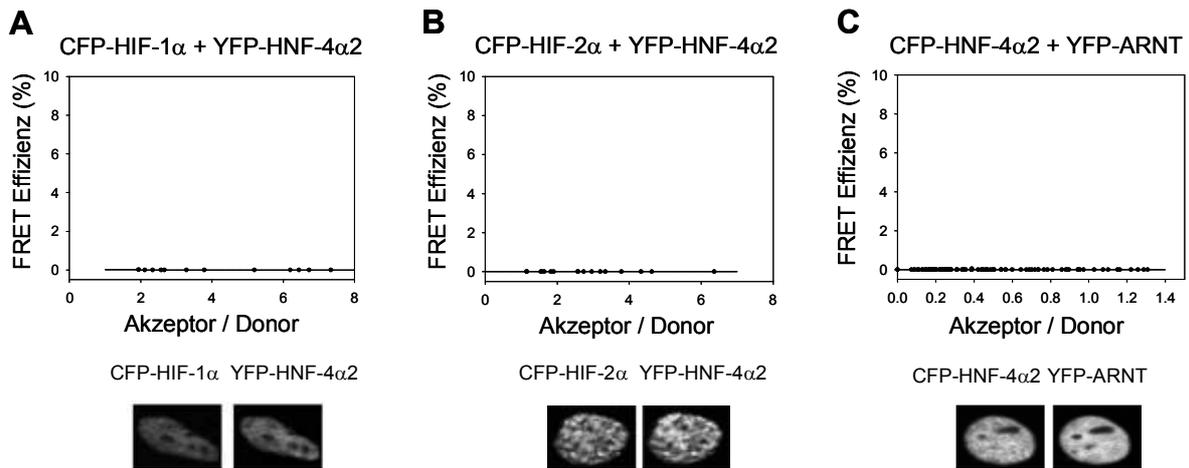


Abb. 3-25: Interaktionsanalyse von HIF-1 α oder HIF-2 α oder ARNT mit HNF-4 α 2.

HK120-Zellen wurde entweder mit (A) CFP-HIF-1 α oder (B) CFP-HIF-2 α oder (C) YFP-ARNT und HNF-4 α 2 transfiziert und unter normoxischen Bedingungen für 48 h inkubiert. Die FRET Versuche wurden unter Normoxie durchgeführt. Die homogene Verteilung von CFP-HIF-1 α oder YFP-ARNT mit HNF-4 α 2 war bei Koexpression deutlich im Zellnukleus zu sehen.

Nach diesen negativen FRET Ergebnissen musste überprüft werden, ob in den HK120-Zellen HIF-Heterodimere gebildet werden. Dabei zeigte sich, dass in den HK120-Zellen HIF-1 α bzw. HIF-2 α einen Heterodimer Komplex mit ARNT bildete. Die Distanz zwischen HIF-1 α und ARNT betrug 5,9 nm und zwischen HIF-2 α und ARNT 6,0 nm. Wie auch in den U2OS Zellkernen ist die Verteilung der Fusionsproteine im HK120-Zellkern heterogen (Abb. 3-26). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass HNF-4 α nicht mit den HIF-Untereinheiten direkt interagiert. Dies wurde mittels FRET-Technik sowohl in den U2OS als auch in den HK120-Zellen bestätigt. Jedoch interagierten die HIF-Untereinheiten α und β in beiden Zellen. In den gebildeten Komplexen war HIF-1 α näher zu ARNT als HIF-2 α zu ARNT.

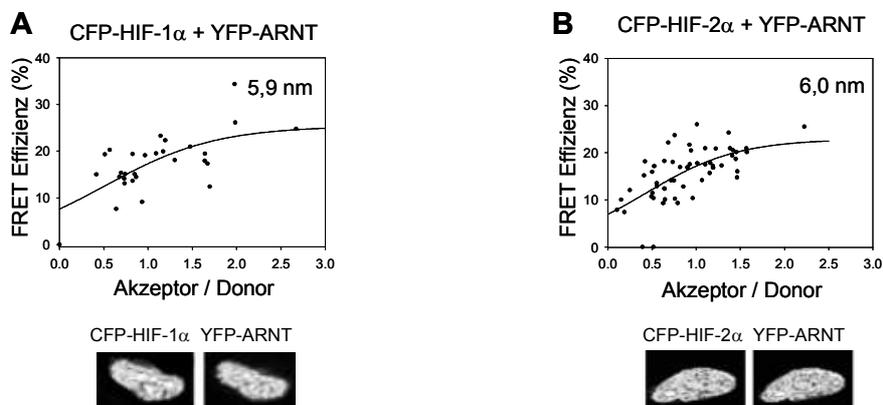


Abb. 3-26: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α oder CFP-HIF-2 α mit YFP-ARNT mittels FRET.

HK120-Zellen wurden mit (A) CFP-HIF-1 α oder (B) CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT transfiziert und unter normoxischen Bedingungen für 48 h exprimiert. Die FRET Versuche wurden unter Normoxie durchgeführt. Es kann ein Abstand von 5,9 nm zwischen CFP-HIF-1 α / YFP-ARNT und 6,0 nm zwischen CFP-HIF-2 α / YFP-ARNT kalkuliert werden. Die Verteilung der Fusionsproteine im Zellkern war heterogen.

3.2.6 Interaktionsstudie von HNF-4 α mit CBP

Möglicherweise interagiert HNF-4 α indirekt mit dem HIF-Komplex über das transkriptionelle Adaptorprotein CBP (*cAMP response element binding protein*) / p300. Die Interaktion von HNF-4 α mit den CBP-Domänen CH3 und CH1 sollte untersucht werden. Sowohl YFP-CBP-CH1 als auch YFP-CBP-CH3 wurden für FRET-Experimente mit CFP-HNF-4 α koexprimiert. CBP-CH1 interagiert nicht mit HNF-4 α (Abb. 3-27A). Das Plateau für CFP-HNF-4 α und YFP-CH3 wurde bei 21,1 % FRET-Effizienz erreicht und es ließ sich ein Abstand von 6,1 nm berechnen (Abb. 3-27B).

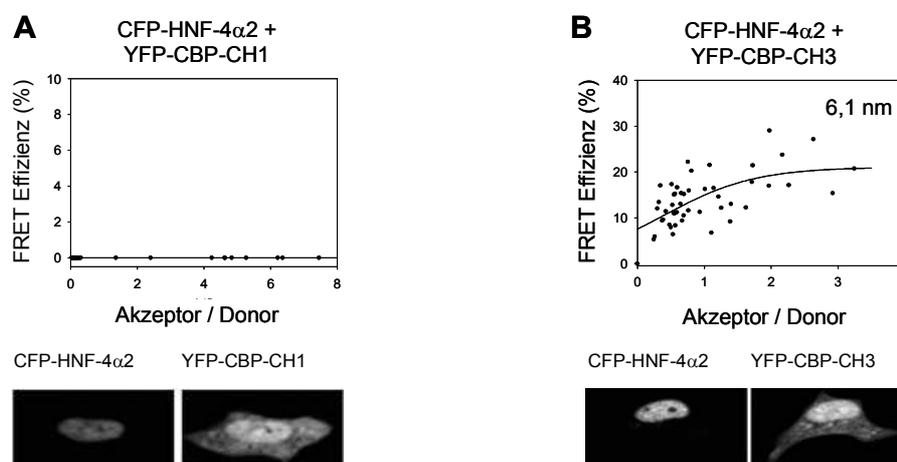


Abb. 3-27: Interaktionsanalyse von HNF-4 α 2 mit dem transkriptionellen Koaktivator CBP.

In HK120-Zellen wurde CFP-HNF-4 α 2 mit (A) YFP-CBP-CH1 oder (B) YFP-CBP-CH3 unter normoxischen Bedingungen für 48 h exprimiert. Die FRET Versuche wurden unter Normoxie durchgeführt. Es kann ein Abstand von 6,1 nm zwischen CFP-HNF-4 α 2 und YFP-CBP-CH3 kalkuliert werden. Die homogene Verteilung von CFP-HNF-4 α 2 mit YFP-CBP-CH1 oder YFP-CBP-CH3 ist bei Koexpression deutlich im Zellnukleus zu sehen. YFP-CBP-CH1 und YFP-CBP-CH3 waren zudem im Cytoplasma und den Nucleoli detektierbar.

Außerdem sollte getestet werden, ob für die Interaktion zwischen HNF-4 α und der CH3-Domäne, HNF-4 α an die DNA gebunden sein musste. Für diese Analysen mittels FRET konnte eine Mutante von HNF-4 α 2 verwendet werden, die eine Mutation in einer der beiden Zinkfinger-Domänen aufwies (C106R) und dadurch nicht mehr fähig war, an die DNA zu binden. Das Plateau für CFP-HNF-4 α -C106R und YFP-CH3 wurde bei 28,4 % FRET-Effizienz erreicht und es ließ sich ein Abstand von 5,8 nm berechnen (Abb. 3-28).

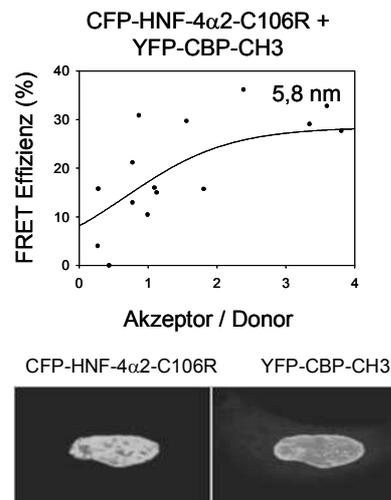


Abb. 3-28: Interaktionsanalyse von HNF-4 α 2 Mutante mit der CH3-Domäne.

In HK120-Zellen wurde CFP-HNF-4 α 2-C106R (Mutante die nicht an die DNA binden kann) mit YFP-CBP-CH3 unter normoxischen Bedingungen für 48 h exprimiert. Die FRET Versuche wurden unter Normoxie durchgeführt. Es kann ein Abstand von 5,8 nm zwischen CFP-HNF-4 α 2-C106R und YFP-CBP-CH3 kalkuliert werden. Die homogene Verteilung von CFP-HNF-4 α 2 mit YFP-CBP-CH3 ist bei Koexpression deutlich im Zellnukleus zu sehen. YFP-CBP-CH3 waren zudem im Cytoplasma und den Nucleoli detektierbar.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass HNF-4 α mit der CH3-Domäne von CBP interagieren kann, unabhängig, ob eine Bindung von HNF-4 α an die DNA vorliegt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die regulatorischen Funktionen der gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren und des HIF (*hypoxia-inducible factor*)-Komplexes am 3' Enhancer des Erythropoietin (EPO)-Gens untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Zelllinien ausgewählt, die nicht hepatischen Ursprungs sind und EPO hypoxisch induzieren. Außerdem wurden die Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinuntereinheiten am 3' Enhancer mit Hilfe der *fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-Methode untersucht.

4.1 Gewebespezifische Erythropoietin-Genexpression

4.1.1 Gesteigerte hypoxische EPO-Expression unter at-RA-Gabe in Neuroblastomzellen

Aus der Anwendung in der Klinischen Medizin ist bekannt, dass bei Neuroblastom-Patienten mit einer zusätzlichen 13-*cis*-Retinsäure-Therapie nach Knochenmark- oder Stammzell-Transplantation eine signifikante Steigerung der Überlebensrate erreicht werden kann. Allerdings ist die Bedeutung der Bildung von EPO in Neuroblastomen klinisch noch nicht untersucht worden. Auch Neuroblastomzellen in Kultur reagieren auf Retinsäure-Derivate. So konnte in Langzeit-Beobachtungen unter Einfluss von Retinsäure-Derivaten eine Verlangsamung des Zellwachstums beobachtet werden. Kurzzeitige Effekte innerhalb weniger Stunden sind bisher wenig untersucht. Aufbauend auf Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe, durch die eine Bildung von EPO in Neuroblastomzellen gezeigt werden konnte (Stolze *et al*, 2002), sollten jetzt kurzfristige Einflüsse von all-*trans*-Retinsäure (at-RA) untersucht werden, da die Aktivierung des Retinsäure-Rezeptors durch Bindung an regulatorische DNA-Abschnitte des EPO-Gens zur gewebespezifischen Bildung von EPO im neuronalen Gewebe beitragen könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass es in den Neuroblastom-Zelllinien Kelly und SY5Y zu einer Erhöhung von EPO-mRNA unter Hypoxie kommt (Abb. 3-2). Für beide Zelllinien konnte dieser Effekt eindeutig auf eine größere Menge von HIF-1 α und HIF-2 α Protein unter Hypoxie zurückgeführt werden (Abb. 3-5). Die hier gewonnen

Ergebnisse bestätigten die hypoxische Induktion der EPO-Expression durch HIF-1 α und stimmen somit mit Stolze *et al.*, 2002 und Rössler *et al.*, 2004 überein. Durch siHIF-2 α Experimente konnte zusätzlich in dieser Arbeit die Beteiligung von HIF-2 α in den SY5Y-Zellen und Kelly-Zellen gezeigt werden (Abb. 3-5B). Damit deuten die Ergebnisse hier auf eine komplexere Regulation der EPO-Expression hin als 2004 von Warnecke *et al.* beschrieben, die nach Anwendung von siHIF-2 α in den Hep3B und Kelly-Zellen eine ausschließlich HIF-2 α abhängige Regulation der EPO-Bildung beschrieben.

Die Gabe von at-RA führte in den Kelly-Zellen zusätzlich zu einer 3-fachen und in den SY5Y-Zellen zusätzlich zu einer 7,8-fachen Induktion der EPO-mRNA unter Hypoxie (Abb. 3-2). Diese Induktion könnte in den SY5Y-Zellen, im Gegensatz zu den Kelly-Zellen, auf eine größere Menge an HIF α -Untereinheiten durch at-RA-Gabe erklärt werden (Abb. 3-3). Mit einem HIF-induzierbaren Reportergenplasmid (pH3SVL) wurde zudem eine gesteigerte HIF-Aktivität in den SY5Y-Zellen unter at-RA-Gabe gefunden, die in den Kelly-Zellen nicht zu beobachten war (Abb. 3-4).

Da direkte Effekte von at-RA auf die Proteinmengen von HIF-1 α und HIF-2 α nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, ob die Induktion der EPO-mRNA durch at-RA in den SY5Y-Zellen ausschließlich auf diese Induktion von HIF-1 α - oder HIF-2 α zurückzuführen war. Nach Behandlung mit siHIF-1 α und siHIF-2 α war die EPO-Bildung nicht mehr durch at-RA induzierbar, allerdings waren auch die hypoxische Induktion von HIF-1 α und HIF-2 α stark reduziert (Abb. 3-5). Die Reduktion der EPO-mRNA auf ein 1/12 war nicht nur auf eine Verminderung von HIF-1 α , sondern auch auf verringertes HIF-2 α zurückzuführen (Abb. 3-5B). Zudem war mit siHIF-1 α auch HIF-2 α auf ca. 65-70 % reduziert worden. Aus diesem inhibitorischen Einfluss von siHIF-1 α auf HIF-2 α -mRNA kann gefolgert werden, dass HIF-2 α ein Zielgen von HIF-1 α ist. Andererseits war die HIF-1 α -mRNA unter siHIF-2 α unbeeinflusst. Obwohl HIF-2 α nur um 15 % reduziert werden konnte, wurde die EPO-mRNA dramatisch reduziert. Ein vollständiger knockdown der beiden Proteine konnte nicht erreicht werden (Abb. 3-5C), jedoch sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Induktion des EPO-Gens über den 3' Enhancer als Antwort auf Hypoxie eher durch HIF-2 α als durch HIF-1 α in den SY5Y-Zellen vermittelt wird. Warnecke *et al.*, 2004 konnten diese HIF-2 α Spezifität des EPO-Gens in Hep3B- und Kelly-Zellen zeigen. Durch die Ergebnisse der siHIF-1 α - und siHIF-2 α -Experimente sind erste Hinweise gefunden worden, dass ein aktiver HIF Komplex benötigt wird, um mit at-RA EPO-mRNA stimulieren zu können. Das Zielgen EPO kann, wenn eine der HIF α -Untereinheiten durch siRNA reduziert wurde, nicht mehr durch at-RA stimuliert werden.

Des Weiteren konnte für ein anderes HIF-abhängiges Zielgen, ADM (*adrenomedullin*), gezeigt werden, dass durch die Verwendung von siHIF-1 α und siHIF-2 α die mRNA von ADM vermindert werden konnte (Abb. 3-6). Der Einsatz von siHIF-1 α hat dabei signifikant stärkere Auswirkungen auf den Gehalt der ADM-mRNA als siHIF-2 α . ADM-mRNA konnte nicht mit at-RA induziert werden. Daraus lässt sich schließen, dass bei der Stimulation der hypoxischen Induktion des EPO-Gens durch at-RA zusätzlich zu HIF-2 α und HIF-1 α andere regulatorische DNA-Elemente beteiligt sind.

Ein gewebespezifischer Transkriptionsfaktor, der an das DR-2 (*direct repeat of two hexanucleotides separated by two base pairs*) Element binden könnte war bisher in Neuroblastomzellen nicht nachweisbar (Stolze *et al.*, 2002). Der aus HepG2-Zellen bekannte gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF-4 α (*hepatocyte nuclear factor-4alpha*) ist in Kelly- und SY5Y-Zellen nicht detektierbar (Abb. 3-1). Um zu überprüfen, ob die EPO-mRNA über den Rezeptor RXR α (*retinoic X receptor alpha*) in den SY5Y-Zellen gesteuert wird, wurden siRXR α Experimente unter Hypoxie durchgeführt. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass EPO-mRNA nicht mehr durch at-RA gesteigert werden kann, obwohl die HIF α -Untereinheiten vorhanden waren. Besonders interessant ist an dieser Stelle, dass es trotzdem zu einer Erhöhung von HIF-1 α und HIF-2 α durch at-RA-Gabe kommt (Abb. 3-8). Außerdem konnte festgestellt werden, dass RXR α kein Zielgen von at-RA ist. Jedoch war ein geringer Einfluss von siHIF-1 α oder siHIF-2 α auf RXR α in den SY5Y-Zellen zu sehen (Abb. 3-7). Eine Beteiligung von RXR α an der Induktion der EPO-mRNA unter at-RA ist somit eindeutig. Unklar bleibt, ob RXR α als Hetero- oder Homodimer an den 3' EPO Enhancer bindet und welcher *nuclear hormone receptor* hier als Interaktionspartner fungieren könnte. Otto und Fandrey (2008) konnten zeigen, dass T₃ (*thyroid hormone*) die Menge an HIF-1 α in unterschiedlichen Zelltypen steigert. Sie zeigten, dass dieser Effekt von den nukleären Hormon-Rezeptoren TR β (*thyroid hormone receptor*) und RXR α über HLF (*hepatic leukemia factor*) direkt auf HIF-1 α vermittelt wird. Die Stimulation durch at-RA von HIF-1 α und HIF-2 α (Abb. 3-3B), könnte durch RXR α mit einem unbekanntem Hormon-Rezeptor als Heterodimer (vielleicht sogar indirekt über HLF) zustande kommen. Falls dies nicht der Fall ist, könnten die Stimulation von at-RA auf HIF-1 α - und HIF-2 α -Protein eventuell über einen verminderten Abbau der Proteine zustande kommen.

Weitere Indizien für einen Einfluss von at-RA auf die EPO-Expression unter Hypoxie lieferten Mutationsanalysen des 3'-Enhancer des EPO-Gens in SY5Y-Zellen (Ma und Konietzny *et al.*, in Vorbereitung). Es konnte gezeigt werden, dass die HIF-Bindestelle (HBS) für die Antwort auf at-RA wichtig bei der hypoxischen Induktion des EPO-Gens ist (Abb. 4-

1A). Außerdem konnte gezeigt werden, dass von den drei bekannten möglichen Bindestellen – DR-2 und DR-4 im Promotorbereich und eine DR-2 im 3' Enhancer Bereich – die DR-2 Bindestelle wichtig für Induktion durch at-RA ist (Abb. 4-1B).

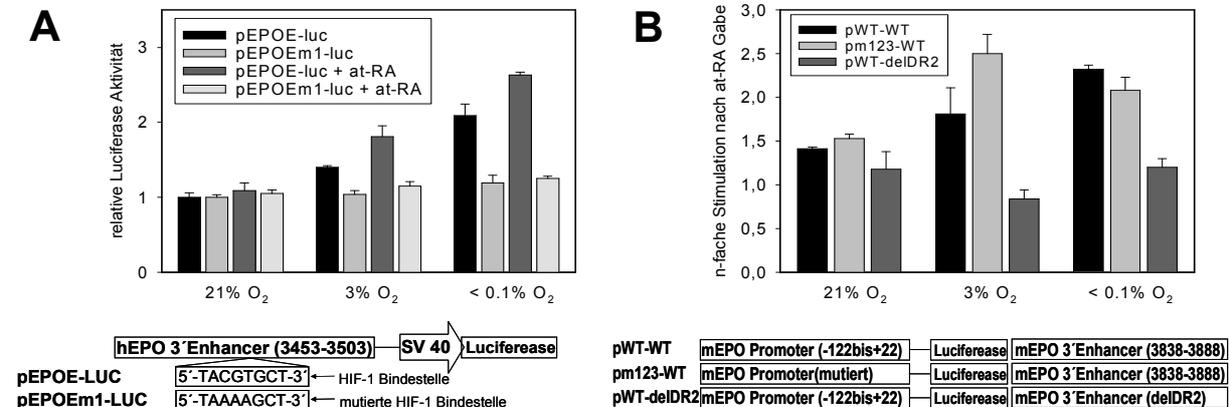


Abb. 4-1: Mutationsanalysen des 3' EPO-Enhancer in SY5Y-Zellen.

SY5Y-Zellen wurden mit den Luciferase Reporter Konstrukten (A) pEPO-Luc und pEPOEm1-Luc (mit mutierter HBS-Bindestelle (*HIF binding site*)) oder mit (B) pWT-WT, pm123-WT (mit mutierter DR2 und DR4 im Promotor, aber Wildtyp HRE) und pWT-DR2-del (mit Wildtyp Promotor aber deletierter DR2 im HRE) transfiziert. Nach 18h wurden die Zellen mit oder ohne 1 μ M at-RA für 6 h unter 21 %, 3 % oder < 0,1 % O₂ gehalten. Die Luciferase-Aktivität wurde gemessen und auf die Proteinmenge normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD eines repräsentativen Versuches von 3 unabhängigen Experimenten (Ma und Konietzny *et al.*, in Vorbereitung).

Es konnte gezeigt werden, dass in den SY5Y-Zellen sowohl eine intakte HBS (*HIF binding site*) mit aktivem HIF-Komplex als auch eine intakte DR-2 Bindestelle mit aktivem RXR α benötigt wird, damit at-RA spezifisch auf EPO wirken kann. Demnach spielen zwei verschiedene Mechanismen bei der Induktion der EPO-mRNA eine Rolle: Die EPO-mRNA wird durch at-RA RXR α -abhängig gesteigert; gleichzeitig kommt es zu einer Steigerung der HIF-1 α - und HIF-2 α -Proteinmenge, die jedoch RXR α -unabhängig ist. Ungeklärt bleibt, wie at-RA den Gehalt an HIF α -Untereinheiten auf Proteinebene steigert (Abb. 4-2).

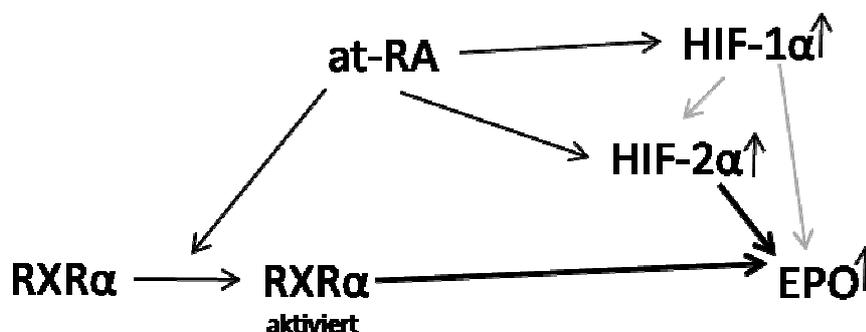


Abb. 4-2: Schematische Darstellung der EPO 3' Enhancer Regulation unter Hypoxie in SY5Y-Zellen.

At-RA wirkt als Ligand über RXR α und stimuliert gleichzeitig die Proteinmenge von HIF-1 α und HIF-2 α , so dass es zu einer Induktion des EPO-Genes kommt. HIF-2 α scheint für das EPO-Gen wichtiger zu sein und ist eventuell ein Zielgen von HIF-1 α .

4.1.2 Verminderte EPO-Expression in Kelly-Zellen durch endogenes HNF-4 α

Da die Kelly-Zellen nicht mit einer Induktion der HIF α -Untereinheiten auf at-RA reagierten, sollte der Einsatz eines HNF-4 α 2 Expressionsplasmids getestet werden. Die Neuroblastomzellen der Linie Kelly zeigten bei exogener Überexpression von HNF-4 α 2 eine Reduktion der HIF-1 α und HIF-2 α Proteinmengen (Abb. 3-9). Die Reduktion der EPO-mRNA unter exogenem HNF-4 α 2 könnte zum einem auf eine geringere HIF α Menge und zum anderem auf einen kompensatorischen Effekt zwischen exogenem HNF-4 α 2 und endogenem RXR α am DR-2 Element im 3' Enhancer zurückzuführen sein (Magee *et al.*, 1998; Makita *et al.*, 2001).

4.1.3 Gewebespezifische Induktion der hypoxischen EPO-Expression in HK120-Zellen durch den Faktor HNF-4 α

Zur weiteren Untersuchung der Vorgänge am 3' Enhancer stand eine neue Nierenzelllinie HK120 zur Verfügung, die in Abhängigkeit von Hypoxie vermehrt EPO bildet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HIF-1 α - und HIF-2 α -Protein unter Hypoxie in den HK120-Zellen stabilisiert werden (Abb. 3-11A) und eine gesteigerte EPO-Expression unter Hypoxie induzieren (Abb. 3-11B).

Jedoch war unbekannt, welcher gewebespezifische Faktor am 3' Enhancer aktiv ist. Die HNF-4 α Proteinmengen, die bei vier Zelllinien verglichen wurden – HepG2, HK120, Kelly, SY5Y – waren vergleichbar zu den detektierbaren Mengen in den HepG2-Zellen (Abb. 3-1). Nach erfolgreicher Sequenzierung des Gesamtlängen-HNF-4 α -PCR-Produkts konnte gezeigt werden, dass es sich um die HNF-4 α Isoform 2 in den HK120-Zellen handelte (Abb. 3-10). Diese Isoform wird vom P1 Promotor des HNF-4 α -Gens gesteuert, der vor allem in der adulten Niere aktiv ist (Sladek *et al.*, 2009).

Außerdem konnte eine Verringerung des HNF-4 α -Proteins und der HNF-4 α -mRNA unter Hypoxie beobachtet werden (Abb. 3-12A und B). Gleiche Erkenntnisse gewannen Mazure *et al.*, 2001 in HepG2-Zellen. Sie zeigten, dass HNF-4 α -mRNA nach 24 h unter Hypoxie abnahm. Sequenzanalysen des HNF-4 α -Gens ließen sie mutmaßen, dass HNF-4 α ein Zielgen für HIF sei. HNF-4 α wäre dann eines der wenigen Gene, welches durch HIF unter Hypoxie vermindert würde. Hier konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Menge an HNF-4 α -mRNA ansteigt, wenn durch siHIF-2 α oder siHIF-1 α die HIF α -Proteine vermindert wurden. Somit ist

deutlich, das HNF-4 α negativ von den HIF α -Untereinheiten reguliert werden kann. Weitere Faktoren, die die HNF-4 α -mRNA-Expression vermindern sind unter anderem LPS und IL-1 β . Wang *et al.* zeigten 2001, dass in HepG2-Zellen durch LPS-Stimulation Interleukin-1 β (IL-1 β) gesteigert und HNF-4 α -mRNA erniedrigt wird. IL-1 β als Negativregulator der HNF-4 α -mRNA wurde von Krajewski *et al.* (2007) postuliert. Jedoch stimuliert IL-1 β zusätzlich die Stabilität von HIF-1 α unter Normoxie, wie von Frede *et al.* 2005 gezeigt wurde. Sowohl LPS als auch IL-1 β führen somit zu einer erhöhten Proteinmenge an HIF α -Untereinheit, die dann direkt negativ auf das Zielgen HNF-4 α wirken könnte. Ein Einfluss von LPS und IL-1 β müsste auf die HNF-4 α -mRNA in den HK120-Zellen noch getestet werden.

Da HK120-Zellen sowohl HNF-4 α als auch RXR α besitzen, sollte der Einfluss von all-*trans*-Retinsäure untersucht werden. Im Gegensatz zu den SY5Y-Zellen war ein Einfluss von at-RA auf die HIF-1 α und HIF-2 α Proteine in den HK120-Zellen nicht zu sehen. Die EPO-mRNA wird unter at-RA-Gabe in den HK120-Zellen geringer (Abb. 3-11).

Um dies weiter zu untersuchen wurde die mRNA von RXR α und HNF-4 α betrachtet. Es stellte sich heraus, dass die Verwendung von at-RA zu einer geringeren Menge von RXR α bei allen gewählten Versuchsbedingungen führte (Abb. 3-12C). Es kommt zu einer deutlichen Reduktion der HNF-4 α -mRNA durch at-RA-Gabe unter Normoxie. Diese durch at-RA verursachte Reduktion sehen wir ebenfalls unter Hypoxie, jedoch nicht mehr so deutlich, da HNF-4 α -mRNA bereits unter Hypoxie deutlich verringert wird (Abb. 3-12B). Die Reduktion durch at-RA, die wir bei der EPO-mRNA gesehen haben, lässt sich somit nur über die verringerte Proteinmenge von HNF-4 α erklären, da HIF unter at-RA unbeeinflusst war (Abb. 3-12D und Abb.4-3).

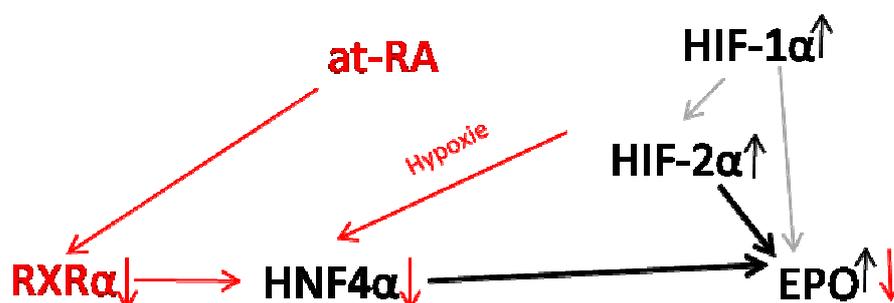


Abb. 4-3: Schematische Darstellung der EPO 3' Enhancer Regulation unter Hypoxie in HK120-Zellen. Hypoxie reduziert die Menge an HNF-4 α -mRNA wahrscheinlich über Negativregulation von HIF-1 α oder HIF-2 α . Trotzdem reicht die Menge aus, um mit dem aktiven HIF-Komplex die EPO-mRNA unter Hypoxie zu induzieren. At-RA reduziert hingegen die RXR α -mRNA und dadurch die HNF-4 α -mRNA, was sich zusätzlich negativ auf die EPO-mRNA auswirkt. HIF-2 α scheint eventuell ein Zielgen von HIF-1 α zu sein. Schwarz dargestellt ist der Weg der Stimulation, rot der hemmende Weg.

Es könnte sich somit in den HK120-Zellen um einen ähnlichen Regulationsmechanismus handeln, wie in den Hep3B-Zellen von Qian beschrieben. Qian *et al.* zeigte 2000, dass das HNF-4 α -Gen (-2418--2399 bp) ein Retinsäure responsives Element (RXRE) aufweist (DR-1, GAGTCAAGGGTCA), und *in vitro* mit einer Induktion von HNF-4 α -mRNA spezifisch auf RXR α und Retinsäure reagiert. In Hep3B-Zellen zeigten sie jedoch, dass Retinsäure die mRNA von RXR α reduziert und dadurch HNF-4 α -mRNA reduziert wird.

Weitere Versuche zeigten (Abb. 3-13), dass die Verwendung von siHIF-1 α zu einer Reduktion der EPO-mRNA (40 %) führte, die auf eine reduzierte Menge an HIF-1 α -mRNA zurückzuführen ist (Abb. 3-13A und B). Außerdem wird die HIF-2 α -mRNA Menge unter siHIF-1 α geringer (Abb. 4-3). Wie in den SY5Y-Zellen angedeutet, könnte HIF-2 α ein Zielgen von HIF-1 α sein. Die Verwendung von siHIF-2 α scheint spezifisch nur HIF-2 α -mRNA zu reduzieren (Abb. 3-13C) und dadurch ebenfalls die EPO-mRNA (53 %) (Abb. 3-13E). Durch die Anwendung von siHNF-4 α bleibt sowohl die HIF-1 α -, als auch die HIF-2 α -mRNA konstant. Da die Effizienz der siHIF-1 α und siHIF-2 α nicht sehr hoch war, sind hier Restaktivitäten vorhanden, die anscheinend zusammen mit HNF-4 α EPO-mRNA induzieren können, jedoch schlechter als unter Kontrollbedingungen.

Die Reduktion von EPO-mRNA bei Verwendung von siHNF-4 α unter Hypoxie macht deutlich, dass HNF-4 α in dieser Zelllinie an der Regulation des 3' Enhancers beteiligt ist. Die EPO-mRNA konnte hier um 50 % reduziert werden (Abb. 3-12D).

Die HNF-4 α -mRNA wird sehr deutlich und effizient durch siHNF-4 α reduziert, dadurch kommt es zu einer Reduktion der EPO-mRNA um 42 %. Da unter diesen Bedingungen HIF-1 α und HIF-2 α nach wie vor aktiv sind, kommt es weiterhin zu einer Induktion von EPO-mRNA, die jedoch geringer als unter Kontrollbedingungen ausfällt. Bei siHIF-1 α - und siHIF-2 α -Anwendung erhöht sich zwar die HNF-4 α -mRNA unter Hypoxie, jedoch kann keine Induktion der EPO-mRNA beobachtet werden, da nicht genügend HIF α zur Induktion des EPO-Gens unter diesen Bedingungen zur Verfügung stehen. (Abb. 3-13D).

Interessant ist auch, dass trotz der starken Expression der HNF-4 α -mRNA unter Normoxie die EPO-mRNA lediglich in geringen Mengen vorhanden ist (Abb. 3-12B und Abb. 3-13D). Daraus wird deutlich, dass eine eventuelle Bindung von HNF-4 α am 3' Enhancer nicht genügt um EPO-mRNA unter Normoxie zu induzieren. Erst unter Hypoxie in Interaktion mit einem aktiven HIF-Komplex kann trotz geringerer HNF-4 α -mRNA die Transkription der EPO-mRNA verstärkt werden. Weitere Versuche müssten klären, wie der zeitliche Verlauf der HNF-4 α -mRNA Reduktion unter Hypoxie und damit unter der Kontrolle von HIF-1 α und HIF-2 α in dieser Zelllinie ist. Außerdem sollte der Einfluss von at-RA unter Normoxie und Hypoxie über verschiedene Zeitpunkte auf RXR α und HNF-4 α -mRNA untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass nur unter Hypoxie, wenn ein aktiver HIF-Komplex gebildet wird, HNF-4 α über den 3' Enhancer die EPO-mRNA in HK120-Zellen induzieren kann.

Es hat sich gezeigt, dass die Bindung von HIF zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Induktion der Transkription von EPO sowohl in den Neuroblastom-Zellen als auch in den HK120-Zellen ist. So finden sich in den HREs von Hypoxie-induzierbaren Genen immer Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren. Obwohl diese Transkriptionsfaktoren selbst meist nicht durch Hypoxie reguliert werden, kann durch sie die Hypoxieantwort amplifiziert oder gewebespezifisch reguliert werden. Weitere Beispiele für benötigte Transkriptionsfaktoren bei einer hypoxischen Antwort sind Interaktionen von HIF mit ATF-1 / CREB-1 am Laktat-Dehydrogenase A-Gen (Firth 1995; Ebert 1998) und mit AP1 am Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Gen (Damert 1997). Zusätzlich können zwei oder mehr HBS ein funktionelles HRE bilden, zum Beispiel im Transferrin-Gen (Rolfs 1997). Eine Ausnahme der hypoxischen Regulation zeigte hier der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF-4 α , der unter Hypoxie in den HK120-Zellen reduziert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die hypoxische Antwort des EPO-Gens in Neuroblastom-Zellen RXR α und in HK120-Zellen HNF-4 α benötigt wird.

4.2 Nachweis der Protein-Protein-Interaktion am 3' Enhancer des Erythropoietin-Gens mittels FRET

4.2.1 Kompaktere Komplexbildung von HIF-1 α als von HIF-2 α mit ARNT

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Gateway[®] Klonierungssystem ermöglichte die schnelle Klonierung von mehreren Expressionsplasmiden. Es konnte gezeigt werden, dass alle Proteine in Fusion mit dem jeweiligen Fluorophor exprimiert werden (Abb. 3-14). Die fehlende hypoxische Induzierbarkeit der HIF α -Untereinheiten könnte durch eine zu hohe Plasmidmenge – für den Western-Blot wurden 5 μ g der HIF α -Konstrukte in der Transfektion benutzt – erklärt werden, da die O₂-abhängige Abbaumaschinerie der Zellen möglicherweise überlastet wurde. Jedoch konnte mit einem HIF-induzierbaren Luciferase-Reporter-Gen Plasmid bewiesen werden, dass die HIF-Fusionsprodukte transkriptionell aktiv sind (Abb. 3-15). Die 3 HREs in diesem Plasmid stammen aus dem Transferrin-Gen, welches als HIF-2 α Zielgen angesehen wird. Eine deutliche Induktion der Luciferase, jedoch nicht signifikant verschieden, war bei der Verwendung von HIF-2 α / ARNT (280-fach) und HIF-1 α / ARNT (264-fach) zu sehen. Eine deutlichere Spezifität des Transferrin-Gens für HIF-2 α zeigte sich bei den Einzeltransfektionen. So führte HIF-2 α (111-fach) zu einer besseren Induktion als HIF-1 α (15-fach). Vermutlich reicht für diese Reaktion die Menge an endogenem ARNT aus, um einen aktiven HIF-Komplex zu bilden. Im Gegensatz dazu zeigte die Einzeltransfektion von ARNT deutlich, dass es ohne endogene HIF α -Untereinheit (die Versuche wurden unter Normoxie durchgeführt) zu keiner Transkription der Luciferase kam.

Zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen sollten die Vorgänge am 3' Enhancer mittels FRET charakterisiert werden. In U2OS-Zellen wurde zunächst der HIF-Komplex untersucht. Es wurde zum ersten Mal die Interaktion von HIF-2 α mit ARNT mittels FRET nachgewiesen (Konietzny *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass der Abstand zwischen den beiden Untereinheiten 6,5 nm beträgt (Abb. 3-17). Für diese Interaktion ist es von besonderer Bedeutung, dass HIF-2 α an die DNA binden kann, was durch die FRET Untersuchung von ARNT mit einer *basic helix-loop-helix* Deletionsmutante von HIF-2 α bewiesen wurde (Abb. 3-18).

Des Weiteren konnte im Vergleich dazu gezeigt werden, dass die Interaktion von HIF-1 α mit ARNT enger ist (6,2 nm) als für HIF-2 α mit ARNT (Abb. 3-19). Die hier gewonnenen Daten zu

dem HIF-1 Komplex sind vergleichbar mit den Daten des HIF-1 α / ARNT Komplexes, der in der Arbeit von Wotzlaw *et al.* (2007) verwendeten Konstrukte (Clontech: CFP-h-HIF-1 α und YFP-m-ARNT). Und obwohl Wotzlaw *et al.* ein humanes HIF-1 α mit einem murinen ARNT benutzten und die Linker im Gegensatz zu den hier genutzten unterschiedlich lang sind, konnte auch dort ein Abstand zwischen HIF-1 α und ARNT von 6,2 nm kalkuliert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass HIF-1 α ohne Bindung zur DNA mit ARNT interagieren kann. Jedoch ist diese Bindung nicht so eng (7,0 nm) im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-20).

Es ist bekannt, dass HIF-1 α und HIF-2 α unterschiedliche Zielgene über die gleiche HRE steuern. Eine unterschiedliche Komplexbildung mit ARNT könnte diese Spezifität erklären. Scheuermann *et al.* 2009 beschrieben die Bindung eines kleinen Liganden, der an die PAS-B-Domäne in HIF-2 α , aber nicht HIF-1 α binden kann. Solche Unterschiede könnten sich auf die Komplexbildung zwischen ARNT und den HIF α -Untereinheiten auswirken. Außerdem wurde eine Zielgen-Spezifität über die unterschiedlichen N-TADs (*N-terminal transactivation domains*) von HIF-1 α und HIF-2 α von Hu *et al.* 2007 beschrieben.

Ein weiteres Indiz für die unterschiedliche Funktion der HIF α -Untereinheiten sind die veröffentlichten Ergebnisse zur Letalität und Entwicklungsreife von embryonalen Knockout-Mäusen. Der Knock-out von HIF-1 α (HIF-1 α ^{-/-}-Mäuse) führt zu einem Entwicklungsstopp ab Embryonaltag E 8,5 und dem Tod der Embryos an E 11. Der gefundene Phänotyp zeigt Neuralrohrdefekte, kardiovaskuläre Fehlbildungen, eine reduzierte Anzahl von Ursegmenten, ein völliges Fehlen der Schädelvaskularisation mit ausgeprägtem Zelltod im Schädelmesenchym und eine deutliche Gewebhypoxie (Iyer *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998). HIF-2 α ^{-/-}-Mäuse hingegen zeigten einen anderen Phänotyp: Die Mäuse sterben zwischen E 9,5 und E 13,5, wobei neben anderen phänotypischen Merkmalen kein funktioneller Blutkreislauf ausgebildet wird. Dies ließ Peng *et al.* 2000 vermuten, dass HIF-2 α im Gegensatz zu HIF-1 α bei dem Umbau des ersten vaskulären Netzwerks eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang konnte außerdem festgestellt werden, dass in einem konditionellen HIF-2 α -Knockout bei der Maus die Erythropoietin-Produktion HIF-2 α -abhängig reguliert ist (Patel und Simon, 2008).

4.2.2 Interaktion von HNF-4 α mit dem HIF-Komplex am 3'-Enhancer über CBP

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Untereinheiten des HIF-Komplexes alleine nicht mit HNF-4 α interagieren können. Möglicherweise reichten die endogenen Proteine nicht aus, um einen aktiven HIF-Komplex zu bilden. Es könnten bei der Heterodimerbildung der HIF-Untereinheiten bestimmte Strukturmerkmale ausgebildet werden, die erst nach Ausbildung des HIF-Komplexes die Interaktion mit HNF-4 α erlauben. Jedoch auch durch den Versuch, einen aktiven exogenen HIF-Komplex mit Hilfe von kotransfiziertem myc-ARNT in ausreichender Menge für eine Interaktion in den Zellen zur Verfügung zu stellen, ließ sich keine direkte Interaktion mit HNF-4 α zeigen. Es gibt jedoch Hinweise aus der Coimmunpräzipitation (CoIP), die zeigten, dass sowohl HIF-1 α als auch ARNT mit HNF-4 α interagieren kann (Tsuchiya *et al.*, 2002). Daher musste ein weiterer Interaktionspartner vorhanden sein, der zwischen diesen Proteinen die Interaktion vermittelt. Diese Situation könnte somit zu einem positivem Ergebnis in einer CoIP führen, jedoch ein negatives FRET Ergebnis mit einer indirekten Interaktion > 10 nm erklären. Somit bietet die Interaktionsanalyse mit Hilfe von FRET einen enormen Vorteil gegenüber anderen Methoden wie z.B. der Coimmunopräzipitation, da die Interaktion in lebenden Zellen untersucht wird.

Ein neues Nierenzellmodell HK120 bestätigte die Erkenntnisse der FRET Untersuchungen aus den U2OS-Zellen. Die Interaktion von HIF-1 α / ARNT (5,9 nm) ist enger als bei HIF-2 α / ARNT (6,0 nm). Es gab keine Interaktion von HNF-4 α zu einer der HIF-Untereinheiten. Eine Interaktion der CH1-Domäne von CBP (*cAMP response element binding protein*) mit HNF-4 α konnte nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass HNF-4 α mit der CH3-Domäne von CBP interagieren kann (6,1 nm). Bei dieser Interaktion ist die Bindung von HNF-4 α an die DNA nicht zwingend notwendig, wie die Verwendung der HNF-4 α -C106R Mutante deutlich machte (5,8 nm). Da es sich um eine Domäne von CBP handelt, kann es sein, dass jedoch das CBP-Wildtypprotein für die Interaktion zu HNF-4 α eine Bindung von HNF-4 α zur DNA benötigt. Dell *et al.* zeigten 1999 *in vitro*, dass DNA-gebundenes HNF-4 α CBP Liganden-unabhängig rekrutieren kann. Außerdem zeigten sie, dass eine dominant negative Form von HNF-4 α CBP nicht rekrutieren kann. Ruas *et al.* zeigten 2009 eine Interaktion von CBP-CH1 mit HIF-1 α -C-TAD und CBP-CH3 mit HIF-1 α -N-TAD mittels FRET. Somit könnte CBP ein Brückenprotein zwischen dem HIF-Heterodimer und dem HNF-4 α -Homodimer darstellen.

5 Zusammenfassung

Die Expression des Gens für Erythropoietin (EPO) wird über die gewebespezifische Zusammensetzung des Transkriptionsfaktorkomplexes HIF (*hypoxia-inducible factor*) reguliert. In der Arbeit wurde untersucht welche Rolle HIF-1 α , HIF-2 α , HNF-4 α (*hepatocyte nuclear factor-4alpha*) und RXR α (*retinoic X receptor alpha*) bei der EPO-Expression in den unterschiedlichen Zelltypen spielt. Aus der Arbeit geht hervor, dass für eine hypoxische Induktion des Erythropoietin (EPO)-Gens ein aktiver HIF-Komplex vorhanden sein muss. Die β -Untereinheit (ARNT, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) alleine ist nicht transkriptionell aktiv am EPO-Gen. Durch siHIF-1 α - und siHIF-2 α -Experimente zeigte sich, dass sowohl in den Neuroblastomzellen der Linie SY5Y als auch in den Nierenzellen der Linie HK120 die EPO-mRNA stärker durch HIF-2 α als HIF-1 α kontrolliert wird. Des Weiteren fanden sich in beiden Zelltypen Hinweise darauf, dass HIF-2 α ein Zielgen von HIF-1 α ist.

Ein aktiver HIF-Komplex allein ist jedoch nicht ausreichend für eine hypoxische Aktivierung des EPO-Gens. Innerhalb des *hypoxia-responsive element* (HRE) im 3' Enhancer des EPO-Gens befinden sich außer der *HIF binding site* (HBS) auch ein DR-2 (*direct repeat of two hexanucleotides separated by two base pairs*)-Element, an das spezifisch *nuclear hormone receptors* (NHRs) binden können. Es hat sich gezeigt, dass diese NHRs meist gewebespezifisch vorliegen. Die Neuroblastomzellen der Linie SY5Y scheint unter anderem der RXR α mit *all-trans-retinoic-acid* (at-RA) als stimulierendem Liganden für die EPO-mRNA Induktion zu rekrutieren. Noch ungeklärt ist, ob RXR α als Homodimer oder als Heterodimer mit unbekanntem Partner bindet. Für die Nierenzellen der Linie HK120 konnte HNF-4 α , das in der Regel als Homodimer bindet, als genregulierender NHR identifiziert werden. Obwohl die HK120-Zellen RXR α enthalten, konnte durch at-RA keine Stimulation der EPO-mRNA-Expression erreicht werden. Im Gegensatz zu den Neuroblastom-Zellen zeigte sich in den HK120-Zellen sogar, dass durch at-RA die RXR α -mRNA und HNF-4 α -mRNA und in Folge die EPO-mRNA reduziert wurden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HNF-4 α ein Zielgen von HIF-2 α und HIF-1 α ist, da die HNF-4 α -mRNA unter Hypoxie vermindert war. Dieser Effekt ließ sich durch den Einsatz von siHIF-2 α und HIF-1 α wieder aufheben. Die Transfektion von Kelly Zellen mit HNF-4 α verminderte die Hypoxie-induzierte EPO-Expression.

Mit Hilfe der FRET-Technik konnte bewiesen werden, dass HIF-1 α einen Komplex mit ARNT bildet, der jedoch einen kürzeren Abstand zueinander aufweist als für HIF-2 α mit

ARNT. Dabei musste HIF-2 α im Gegensatz zu HIF-1 α für diese Komplexbildung an die DNA gebunden sein, was sich mit Hilfe von Deletionsmutanten der DNA-bindenden Domäne von HIF-2 α und HIF-1 α nachweisen ließ. Eine direkte Interaktion von HNF-4 α mit den einzelnen HIF-Untereinheiten (HIF-2 α , -1 α und ARNT) konnte nicht festgestellt werden, auch nicht, wenn ein aktiver endogener HIF-Komplex zwischen HIF-1 α und ARNT bestand.

Eine Interaktion muss somit über ein Adaptorprotein wie CBP zustande kommen, wobei die Interaktion des gesamten CBP mit HNF-4 α offen bleibt, weil nur zwei Domänen von CBP, die CBP-CH1- und die CBP-CH3-Domäne, für die Messungen zur Verfügung standen. Es stellte sich heraus, dass nur die CH3-Domäne direkt mit HNF-4 α interagieren kann. Verwendet man eine Mutante von HNF-4 α (HNF-4 α -C106R), die nicht an DNA binden kann, war ein engerer Komplex zur CH3-Domäne möglich.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das EPO-Gen durch den HIF-Komplex mit HNF-4 α über das CBP-Adaptorprotein in Nierenzellen hypoxisch induziert werden kann. Gewebespezifisch bedingt kann RXR α statt HNF-4 α in neuronalen Zellen agieren. Eine Interaktion von RXR α mit CBP müsste mittels FRET noch untersucht werden.

6 Literatur

- Allenby G., Bocquel MT., Saunders M., Kazmer S., Speck J., Rosenberger M., Lovey A., Kastner P., Grippo JF., Chambon P., Levin AA. (1993).** Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 30-34
- Arany Z., Huang LE., Eckner R., Bhattacharya S., Jiang C., Goldberg MA., Bunn HF. (1996).** *An essential role for p300 / CBP in the cellular response to hypoxia.* Livingston DM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 12969-73
- Bachmann S., Le Hir M., Eckardt KU. (1993).** *Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin.* *J. Histochem. Cytochem.* 41: 335-41
- Barth S., Nesper J., Hasgall PA., Wirthner R., Nytko KJ., Edlich F., Katschinski DM., Stiehl DP., Wenger RH., Camenisch G. (2007).** *The peptidyl prolyl cis / trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability.* *Mol Cell Biol.* 27: 3758-68
- Bernardini A., Wotzlaw C., Lipinski HG., Fandrey J. (2009).** *An automated real time system for FRET based protein-protein interaction analysis [abstract].* Presented at World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Munich, Germany, Sept 7-12
- Berney C, Danuser G. (2003),** *FRET or No FRET: A Quantitative Comparison.* *Biophys. J.* 84: 3992-4010
- Bogan AA., Dallas-Yang Q., Ruse MD., Maeda Y., Jiang G., Nepomuceno L., Scanlan TS., Cohen FE., Sladek FM. (2000).** *Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4alpha.* *J. Mol. Biol.* 302: 831-51
- Boj SF., Parrizas M., Maestro MA., Ferrer J. (2001).** *A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 14481-6
- Bruick RK., McKnight SL. (2001).** *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF.* *Science.* 294: 1337-40

- Buemi M.**, Lacquaniti A., Bolignano D., Cernaro V., Campo S., Grasso G., Buemi A., Donato V., Sturiale A. (2009). *Down with the erythropoietin. Long live the erythropoietin!* Curr. Drug Targets. 10: 1028-32
- Damert A.**, Ikeda E., Risau W. (1997). *Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells.* Biochem. J. 327: 419-23
- Delorme E.**, Lorenzini T., Griffin J., Martin F., Jacobsen F., Boone T., Elliott S. (1992). *Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin.* Biochemistry. 31: 9871–9872
- Dell H.**, Hadzopoulou-Cladaras M. (1999). *CREB-binding protein is a transcriptional coactivator for hepatocyte nuclear factor-4 and enhances apolipoprotein gene expression.* J. Biol. Chem. 274: 9013-21
- Drewes T.**, Senkel S., Holewa B., Ryffel GU. (1996). *Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes.* Mol. Cell. Biol. 16: 925-31
- Ebert BL.** und Bunn HF. (1998). *Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300 / CREB binding protein.* Mol. Cell. Biol. 18: 4089-96
- Elliott S.** (2008). *Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport.* Br. J. Pharmacol. 154: 529-41
- Fandrey J.** (2004). *Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression.* Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 286: R977-88
- Fandrey J.**, Gorr TA., Gassmann M. (2006). *Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation.* Cardiovasc. Res. 71: 642-51
- Faquin WC.**, Schneider TJ., Goldberg MA. (1992). *Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production.* Blood. 79: 1987-1994
- Firth JD.**, Ebert BL., Ratcliffe PJ. (1995). *Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements.* J. Biol. Chem. 270: 21021-7

- Förster**, VT. (1948). *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann. Phys. 6: 54-75
- Frede S.**, Freitag P., Otto T., Heilmaier C., Fandrey J. (2005). *The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia-inducible factor 1 activation*. Cancer Res. 65: 4690-7
- Gabrilove JL.**, Cleeland CS., Livingston RB., Sarokhan B., Winer E., Einhorn LH. (2001). *Clinical evaluation of once-weekly dosing of epoetin alfa in chemotherapy patients: improvements in hemoglobin and quality of life are similar to three-times-weekly dosing*. J. Clin. Oncol. 19: 2875-82
- Galson DL.**, Tsuchiya T., Tendler DS., Huang LE., Ren Y., Ogura T., Bunn HF. (1995). *The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TFI*. Mol. Cell. Biol. 15: 2135-44
- Gonzalez FJ.** (2008). *Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription*. Drug Metab. Pharmacokinet. 23: 2-7. Review
- Gu YZ.**, Moran SM., Hogenesch JB., Wartman L., Bradfield CA. (1998). *Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia-inducible factor subunit, HIF3alpha*. Gene Expr. 7: 205-13
- Gu YZ.**, Hogenesch JB., Bradfield CA. (2000). *The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40: 519-61. Review
- Higuchi M.**, Oh-eda M., Kuboniwa H., Tomonoh K., Shimonoka Y., Ochi N. (1992). *Role of sugar chains in the expression of the biological activity of human erythropoietin*. J. Biol. Chem. 267: 7703–7709
- Hoffman EC.**, Reyes H., Chu FF., Sander F., Conley LH., Brooks BA., Hankinson O. (1991). *Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor*. Science. 252: 954-8
- Hu CJ.**, Sataur A., Wang L., Chen H., Simon MC. (2007). *The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha*. Mol. Biol. Cell. 18: 4528-42

- Huang** LE., Gu J., Schau M., Bunn HF. (1998). *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 7987-92
- Ivan** M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara JM., Lane WS., Kaelin WG. (2001). *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing*. Jr. Science. 292: 464-8
- Iyer** NV., Kotch LE., Agani F., Leung SW., Laughner E., Wenger RH., Gassmann M., Gearhart JD., Lawler AM., Yu AY., Semenza GL. (1998). *Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Genes Dev. 12: 149-62
- Jaakkola** P., Mole DR., Tian YM., Wilson MI., Gielbert J., Gaskell SJ., Kriegsheim Av., Hebestreit HF., Mukherji M., Schofield CJ., Maxwell PH., Pugh CW., Ratcliffe PJ. (2001). *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau protein ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science. 292: 468-72
- Jacobson** LO., Goldwasser E., Fried W., Plzak L. (1957). *Role of the kidney in erythropoiesis*. Nature. 179: 633-634
- Jiang** G., Nepomuceno L., Hopkins K., Sladek FM. (1995). *Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors*. Mol. Cell. Biol. 15: 5131-43
- Jourdanet** D. (1863). *De l'anemie des altitudes et de l'anemie en general dans ses rapports avec la pression del l'atmosphere*. Balliere, Paris
- Kambe** T., Tada-Kambe J., Kuge Y., Yamaguchi-Iwai Y., Nagao M., Sasaki R. (2000). *Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonal carcinoma cells through the direct repeat of a steroid / thyroid hormone receptor response element half-site in the hypoxia-response enhancer*. Blood. 96: 3265-71
- Kessel** M. (1992). *Respecification of vertebral identities by retinoic acid*. Development. 115: 487-501
- König** A. (2008). *Konstruktion von Fusionsproteinen des HIF-Signalweges und deren Einsatz für Interaktionsstudien mittels Fluorescence Resonance Energy Transfer*. (Diplomarbeit)

- Konietzny R., König A., Wotzlaw C., Bernadini A., Berchner-Pfannschmidt U., Fandrey J.** (2009). *Molecular imaging: into in vivo interaction of HIF-1alpha and HIF-2alpha with ARNT*. Ann. NY Acad. Sci. 1177: 74-81
- Koury MJ., Bondurant MC.** (1990). *Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells*. Science. 248: 378-381
- Krajewski J., Batmunkh C., Jelkmann W., Hellwig-Bürgel T.** (2007). *Interleukin-1beta inhibits the hypoxic inducibility of the erythropoietin enhancer by suppressing hepatocyte nuclear factor-4alpha*. Cell Mol. Life Sci. 64: 989-98
- Kurokawa R., Yu VC., Näär A., Kyakumoto S., Han Z., Silverman S., Rosenfeld MG., Glass CK.** (1993). *Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers*. Genes Dev. 7: 1423-35
- Lakowicz JR.** (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. Springer, Berlin
- Lee DW., Andersen JK.** (2006). *Role of HIF-1 in iron regulation: potential therapeutic strategy for neurodegenerative disorders*. Curr. Mol. Med. 6: 883-93
- Leid M., Kastner P., Chambon P.** (1992). *Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways*. Trends Biochem. Sci. 17:427-33
- Li K., Zhang H., Wang Y., Wang Y., Feng M.** (2006). *Differential expression of HNF4alpha isoforms in liver stem cells and hepatocytes*. J. Cell Biochem. 99: 558-64
- Magee T., Cai Y., Locker J., Wan YJ.** (1998). *Retinoic acid mediates down-regulation of the alpha-fetoprotein gene through decreased expression of hepatocyte nuclear factors*, J. Biol. Chem. 273: 30024-32
- Makita T., Hernandez-Hoyos G., Chen TH., Wu H., Rothenberg EV., Sucov HM.** (2001). *A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4*. Genes Dev. 15: 889-901
- Maxwell PH., Osmond MK., Pugh CW., Heryet A., Nicholls LG., Tan CC., Doe BG., Ferguson DJ., Johnson MH., Ratcliffe PJ.** (1993). *Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice*. Kidney Int. 44: 1149-62

- Mazure** NM., Nguyen TL., Danan JL. (2001). *Severe hypoxia specifically downregulates hepatocyte nuclear factor-4 gene expression in HepG2 human hepatoma cells*. *Tumour Biol.* 22: 310-7
- Means** RT., Krantz SB. (1992). *Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease*. *Blood.* 80: 1639-1647
- Muñoz** M., Villar I., García-Erce JA. (2009). *An update on iron physiology*. *World J. Gastroenterol.* 15: 4617-26
- Nakhei** H., Lingott A., Lemm I., Ryffel GU. (1998). *An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4alpha predominates in undifferentiated murine cell types*. *Nucleic Acids Res.* 26: 497-504
- Nemeth** E. (2008). *Iron regulation and erythropoiesis*. *Curr. Opin. Hematol.* 15: 169-75
- Otto** T., Fandrey J. (2008). *Thyroid hormone induces hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression through thyroid hormone receptor beta/retinoid x receptor alpha-dependent activation of hepatic leukemia factor*. *Endocrinology.* 149: 2241-50
- Patel** SA., Simon MC. (2008). *Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease*. *Cell Death Differ.* 15: 628-34
- Patterson** GH., Piston DW., Barisas BG. (2000). *Förster distances between green fluorescent protein pairs*. *Anal. Biochem.* 284: 438-40
- Peng** J., Zhang L., Drysdale L., Fong GH. (2000). *The transcription factor EPAS-1 / hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97: 8386-91
- Pugh** CW., Tan CC., Jones RW., Ratcliffe PJ. (1991). *Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 10553-7
- Qian** A., Cai Y., Magee TR., Wan YJ. (2000). *Identification of retinoic acid-responsive elements on the HNF1alpha and HNF4alpha genes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276: 837-42

- Rössler J.**, Stolze I., Frede S., Freitag P., Schweigerer L., Havers W., Fandrey J. (2004). *Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site.* J. Cell Biochem. 93: 153-61
- Rolfs A.**, Kvietikova I., Gassmann M., Wenger RH. (1997). *Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1.* J. Biol. Chem. 272: 20055-62
- Ronda L.**, Bruno S., Abbruzzetti S., Viappiani C., Bettati S. (2008). *Ligand reactivity and allosteric regulation of hemoglobin-based oxygen carriers.* Biochim. Biophys. Acta. 1784: 1365-77
- Ruas JL.**, Berchner-Pfannschmidt U., Malik S., Gradin K., Fandrey J., Roeder RG., Pereira T., Poellinger L. (2009). *Complex regulation of the transactivation function of hypoxia-inducible factor-1alpha by direct interaction with two distinct domains of the creb-binding protein / p300.* J. Biol. Chem. 285: 2601-9
- Ruse MD.**, Privalsky ML., Sladek FM. (2002). *Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1: modulation by the F domain.* Mol. Cell Biol. 22: 1626-38
- Ryan HE.**, Lo J., Johnson RS. (1998). *HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization.* EMBO J. 17: 3005-15
- Ryffel GU.** (2001). *Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences.* J. Mol. Endocrinol. 27: 11-29. Review
- Salceda S.**, Caro J. (1997). *Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes.* J. Biol. Chem. 272: 22642-7
- Scheuermann TH.**, Tomchick DR., Machius M., Guo Y., Bruick RK., Gardner KH. (2009). *Artificial ligand binding within the HIF2alpha PAS-B domain of the HIF2 transcription factor.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 450-5
- Schulman IG.**, Heyman RA. (2004). *The flip side: Identifying small molecule regulators of nuclear receptors.* Chem. Biol. 11: 639-46

- Semenza** GL., Wang GL. (1992). *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.* Mol. Cell Biol. 12: 5447-54
- Semenza** GL., Nejfelt MK., Chi SM., Antonarakis SE. (1991). *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 5680-4
- Shoemaker** CB., Mitsock LD. (1986). *Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology.* Mol. Cell Biol. 6: 849-858
- Sladek** FM., Zhong WM., Lai E., Darnell JE. (1990). *Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily.* Jr. Genes Dev. 4: 2353-65
- Sladek** FM., Ruse MD., Nepomuceno L., Huang SM., Stallcup MR. (1999). *Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1.* Mol. Cell Biol. 19: 6509-22
- Sladek** FM., Seidel SD. (2001). *Hepatocyte nuclear factor 4alpha.* Buch "Nuclear Receptors and Genetic Disease" Seiten 309-361
- Sladek** FM., Bolotin E., Schnabl JM. (2009). *Transcription Factor Encyclopedia*
<http://www.cisreg.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=140>
- Stolze** I., Berchner-Pfannschmidt U., Freitag P., Wotzlaw C., Rössler J., Frede S., Acker H., Fandrey J. (2002). *Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells.* Blood. 100: 2623-8
- Storz** JF., Moriyama H. (2008). *Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia.* High Alt Med Biol. 9: 148-57
- Suaud** L., Formstecher P., Laine B. (1999). *The activity of the activation function 2 of the human hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4alpha) is differently modulated by F domains from various origins.* Biochem. J. 340: 161-169
- Thomas** H., Jaschkowitz K., Bulman M., Frayling TM., Mitchell SM., Roosen S., Lingott-Frieg A., Tack CJ., Ellard S., Ryffel GU., Hattersley AT. (2001). *A distant upstream*

- promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young.* Hum. Mol. Genet. 10: 2089-97
- Torres-Padilla ME.**, Fougere-Deschatrette C., Weiss MC. (2001). *Expression of HNF4alpha isoforms in mouse liver development is regulated by sequential Promotor usage and constitutive 3' end splicing.* Mech. Dev. 109: 183-193
- Tsiftoglou AS.**, Vizirianakis IS., Strouboulis J. (2009). *Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs.* IUBMB Life. 61: 800-30
- Tsuchiya T.**, Kominato Y., Ueda M. (2002). *Human hypoxic signal transduction through a signature motif in hepatocyte nuclear factor 4.* J. Biochem. 132: 37-44
- Urbach J.**, Rando RR. (1994). *Thiol dependent isomerization of all-trans retinoic acid to 9-cis-retinoic acid.* FEBS Lett. 351: 429-32
- Wang GL.**, Semenza GL. (1993). *Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia.* J. Biol Chem. 268: 21513-8
- Wang GL.**, Jiang BH., Rue EA., Semenza GL. (1995). *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 92: 5510-4
- Wang B.**, Cai SR., Gao C., Sladek FM., Ponder KP. (2001). *Lipopolysaccharide results in a marked decrease in hepatocyte nuclear factor 4 alpha in rat liver.* Hepatology. 34: 979-89
- Warnecke C.**, Zaborowska Z., Kurreck J., Erdmann VA., Frei U., Wiesener M., Eckardt KU. (2004). *Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells.* FASEB J. 18: 1462-4
- Weidemann A.**, Johnson RS. (2009). *Nonrenal regulation of EPO synthesis.* Kidney Int. 75: 682-8
- Wen TC.**, Sadamoto Y., Tanaka J., Zhu PX., Nakata K., Ma YJ., Hata R., Sakanaka MJ. (2002). *Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression.* Neurosci Res. 67: 795-803

-
- Wenger** RH., Stiehl DP., Camenisch G. (2005). *Integration of oxygen signaling at the consensus HRE*. Sci STKE. 306: re12. Review
- Wilber** RL. (2001). *Current trends in altitude training*. Sports Med. 31: 249-65
- Wotzlaw** C., Otto T., Berchner-Pfannschmidt U., Metzen E., Acker H., Fandrey J. (2007). *Optical analysis of the HIF-1 complex in living cells by FRET and FRAP*. FASEB J. 21: 700-7
- Yu** X., Shacka JJ., Eells JB., Suarez-Quian C., Przygodzki RM., Beleslin-Cokic B., Lin CS., Nikodem VM., Hempstead B., Flanders KC., Costantini F., Noguchi CT. (2002). *Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development*. Development. 129: 505-16
- Yuan** X., Ta TC., Lin M., Evans JR., Dong Y., Bolotin E., Sherman MA., Forman BM., Sladek FM. (2009). *Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor*. PLoS One. 4: e5609

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 7-1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
Abb.	Abbildung
A / D	Akzeptor-Donor-Verhältnis
AHR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
AS	Aminosäure
at-RA	<i>all-trans-retinoic-acid</i> , all-trans-Retinsäure
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
CBP	<i>cAMP response element binding protein</i>
CFP	<i>cyan fluorescence protein</i>
C-TAD	<i>C-terminal transactivation domain</i>
DR-2	<i>direct repeat of two hexanucleotides separated by two base pairs</i>
EPO	<i>erythropoietin</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
HBS	<i>HIF binding site</i>
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HRE	<i>hypoxia-responsive element</i>
HNF-4 α	<i>hepatocyte nuclear factor-4alpha</i>
kDA / kb	kilo Dalton / kilo base pairs
LA	<i>linoic acid</i>
NHR	<i>nuclear hormone receptor</i>
N-TAD	<i>N-terminal transactivation domain</i>
ODD	<i>oxygen-dependent degradation domain</i>
PAS	<i>Period / ARNT / Single minded</i>
PHD	<i>prolyl hydroxylase domain containing enzymes</i>
pVHL	<i>von Hippel-Lindau protein</i>
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>
RXR	<i>retinoic X receptor</i>
YFP	<i>yellow fluorescence protein</i>

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Erythropoietin reguliert die Erythropoese.	1
Abb. 1-2: Schematische Darstellung der HIF-Untereinheiten.	5
Abb. 1-3: Aufbau des Erythropoietin-Gens und HIF-1 α Regulation.	6
Abb. 1-4: Schematische Darstellung des HNF-4 α -Gens und seiner Splicevarianten.	7
Abb. 1-5: Schematische Darstellung von RXR α im Sequenzvergleich zu HNF-4 α 1.	9
Abb. 1-6: Schematische Darstellung des Koaktivators CBP.	10
Abb. 2-1: Plasmidkarten der Leervektoren.	20
Abb. 2-2: LR Reaktion eines Entry-Vektors mit einem Destination-Vektor.	22
Abb. 2-3: Schematische Darstellung des pH3SVL-Plasmides.	31
Abb. 2-4: Schematische Darstellungen zur FRET (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)-Technik.	33
Abb. 2-5: Mikroskopsystem für das <i>in vivo</i> -Imaging unter Hypoxie.	34
Abb. 2-6: Expression und Interaktionsanalyse mit FRET von CFP- und YFP-Protein.	35
Abb. 3-1: Zellspezifische Expression von HNF-4 α .	38
Abb. 3-2: Gesteigerte EPO-Expression durch Hypoxia und at-RA in SY5Y- und Kelly-Zellen.	39
Abb. 3-3: At-RA induzierte HIF-1 α und HIF-2 α in SY5Y-, jedoch nicht in Kelly-Zellen.	40
Abb. 3-4: Die HIF-Aktivität wird durch at-RA in SY5Y-Zellen gesteigert, jedoch nicht in Kelly-Zellen.	41
Abb. 3-5: Knock down von HIF-1 α oder HIF-2 α führt zu einer verminderten EPO-mRNA-Expression.	42
Abb. 3-6: Die hypoxische Induktion der ADM-mRNA-Expression wird nicht durch at-RA stimuliert.	43
Abb. 3-7: Die Expression des Retinsäure-Rezeptors wird nicht von Hypoxie oder at-RA beeinflusst.	43
Abb. 3-8: Knock down von RXR α führt zu verminderter EPO-mRNA in SY5Y-Zellen.	44
Abb. 3-9: Expression von HNF-4 α verminderte die EPO-mRNA Menge in Kelly-Zellen.	46
Abb. 3-10: HNF-4 α 2 Sequenz und Ausschnitt (418-428AS) der Sequenzierung.	47
Abb. 3-11: At-RA hat nach 6 h keinen Einfluss auf die hypoxisch induzierbare EPO-mRNA-Expression.	48
Abb. 3-12: Knock down von HNF-4 α führt zu verminderter EPO-Expression in HK120-Zellen.	49
Abb. 3-13: siHNF-4 α , siHIF-1 α und siHIF-2 α verminderten die EPO-Expression in HK120-Zellen.	51
Abb. 3-14: Expression der generierten Fusionsproteine.	55
Abb. 3-15: Transkriptionelle Aktivität des exogenen HIF-Komplexes.	56
Abb. 3-16: Koexpression von CFP-HIF-2 α und YFP-ARNT.	57
Abb. 3-17: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-2 α mit YFP-ARNT mittels FRET.	58
Abb. 3-18: Interaktionsanalyse von HIF-2 α Δ bHLH mit ARNT mittels FRET.	59
Abb. 3-19: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α mit YFP-ARNT mittels FRET.	60
Abb. 3-20: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α Δ bHLH mit YFP-ARNT mittels FRET	60
Abb. 3-21: Interaktionsanalyse von HNF-4 α 2 mit ARNT mittels FRET.	61
Abb. 3-22: Interaktionsanalyse von HIF-2 α mit HNF-4 α 2 mittels FRET.	62
Abb. 3-23: Interaktionsanalyse von HIF-1 α mit HNF-4 α 2 mittels FRET.	63
Abb. 3-24: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α / myc-ARNT mit YFP-HNF-4 α 2 mittels FRET.	64
Abb. 3-25: Interaktionsanalyse von HIF-1 α oder HIF-2 α oder ARNT mit HNF-4 α 2.	65
Abb. 3-26: Interaktionsanalyse von CFP-HIF-1 α oder CFP-HIF-2 α mit YFP-ARNT mittels FRET.	65
Abb. 3-27: Interaktionsanalyse von HNF-4 α 2 mit dem transkriptionellen Koaktivator CBP.	66
Abb. 3-28: Interaktionsanalyse von HNF-4 α 2 Mutante mit der CH3-Domäne.	67
Abb. 4-1: Mutationsanalysen des 3' EPO-Enhancer in SY5Y-Zellen.	71
Abb. 4-2: Schematische Darstellung der EPO 3' Enhancer Regulation unter Hypoxie in SY5Y-Zellen.	71
Abb. 4-3: Schematische Darstellung der EPO 3' Enhancer Regulation unter Hypoxie in HK120-Zellen.	73

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Antikörper für die Western-Blot Analyse	13
Tabelle 2-2 RT-Einzelansatz und RT Programm	15
Tabelle 2-3 PCR Einzelansatz und PCR Programm (Bsp. β -Aktin)	16
Tabelle 2-4 Quantifizierungsprimer (Invitrogen)	16
Tabelle 2-5 pRT PCR-Einzelansatz	17
Tabelle 2-6 qRT PCR-Programm (Bsp. β -Aktin)	17
Tabelle 2-7 PCR Einzelansatz und PCR-Programm Destination Vektor	18
Tabelle 2-8 PCR-Programm pENTR/D-TOPO Vektor	21
Tabelle 2-9 Klonierungsprimersequenzen	21
Tabelle 2-10 Expressionsvektoren (Bsp. N-terminal)	23
Tabelle 2-11 Bakterienstämme	25

Tabelle 2-12 Medien für die Bakterienkultur	26
Tabelle 2-13 Sequenzierungsprimersequenzen	27
Tabelle 2-14 Zelllinien	28
Tabelle 2-15 siRNA Sequenz	30
Tabelle 2-16 Medien und Puffer für die Zellkultur	31
Tabelle 2-17 Geräte	36
Tabelle 2-18 Reagenzsysteme	37
Tabelle 2-19 Verbrauchsmaterialien	37
Tabelle 3-1 Expressionsplasmide	54
Tabelle 7-1 Abkürzungsverzeichnis	91
Tabelle 7-2 Ausgangsplasmid	93
Tabelle 7-3 Plasmide für die LR-Reaktion mit pcDNA6.2/N-CFP-Dest oder pcDNA6.2/N-YFP-Dest	93
Tabelle 7-4 Plasmide für die LR-Reaktion mit pcDNA6.2/C-CFP-Dest oder pcDNA6.2/C-YFP-Dest	95

7.4 Klonierungsplasmide

Die Klonierungen sind im Methodenteil Abschnitt 2.3 beschrieben.

Tabelle 7-2 Ausgangsplasmid

pENTR	verwendete Primer	Plasmidkarte
pENTR/D-TOPO	Original Invitrogen	<p>pENTR/D-TOPO 2580 bp</p>

Tabelle 7-3 Plasmide für die LR-Reaktion mit pcDNA6.2/N-CFP-Dest oder pcDNA6.2/N-YFP-Dest

pENTR/ORF/cDNA (+Stop Codon)	verwendete Primer	Plasmidkarte
pENTR/D-TOPO-HIF-1 α	Diplomarbeit Anna König	<p>ORF-hHIF1a + STOP Biosystems 5268 bp</p>
pENTR/D-TOPO-HIF-1 α ΔbHLH	Diplomarbeit Anna König	<p>ORF-hHIF1a delta bHLH+STOP 5106 bp</p>

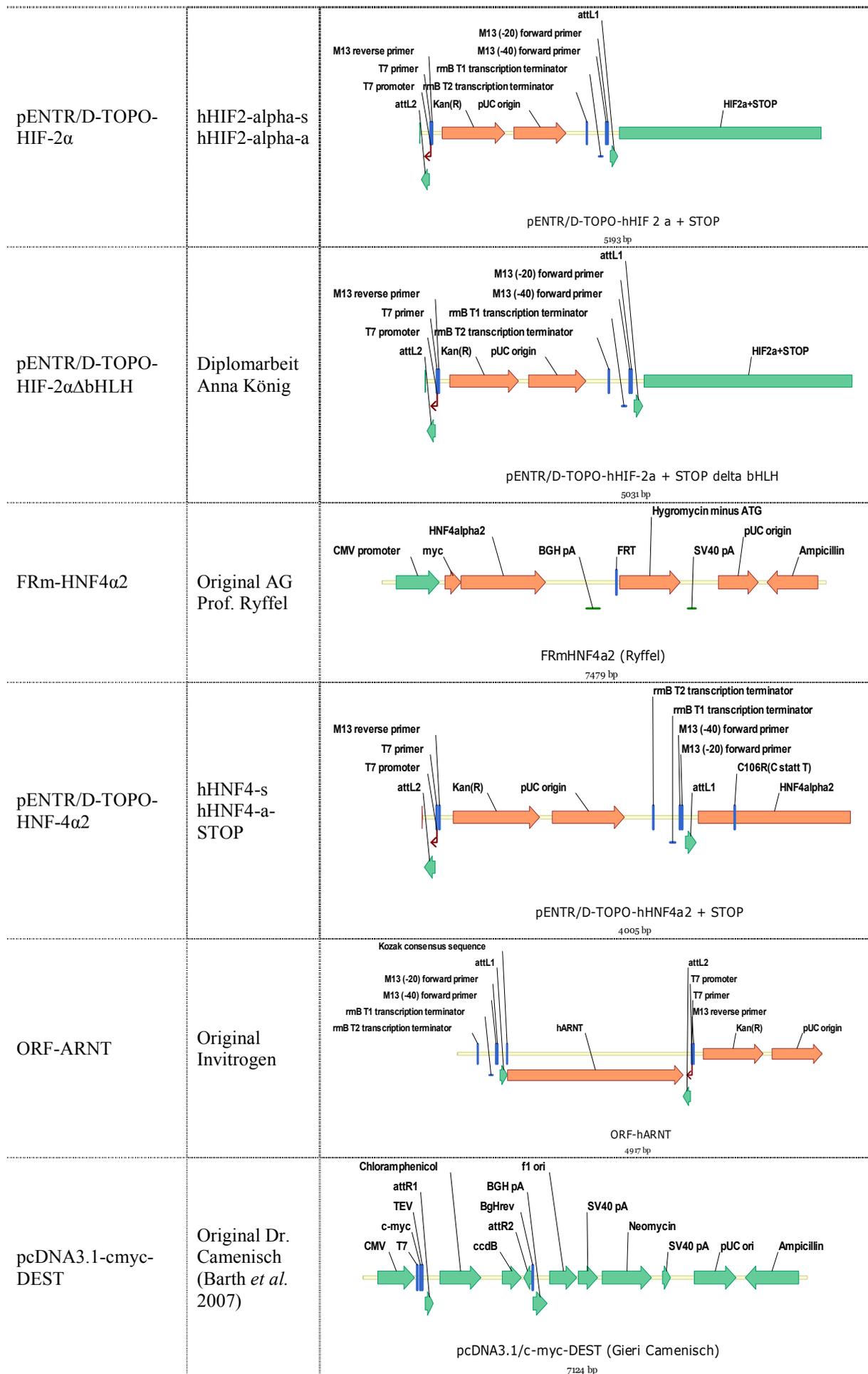
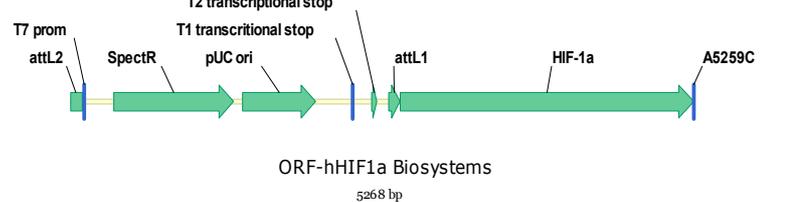
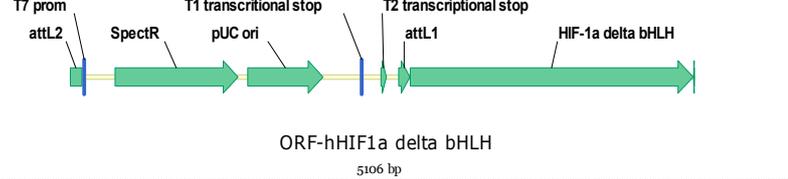
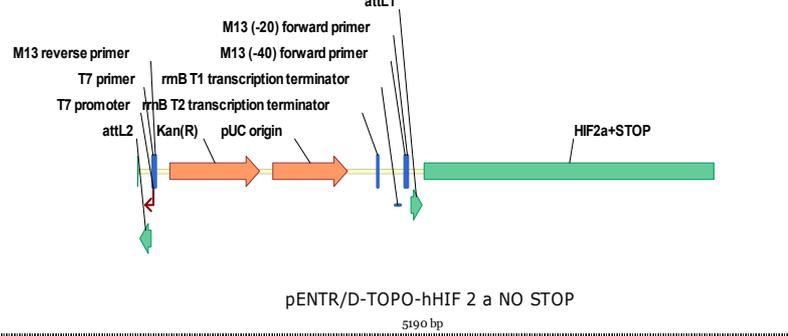
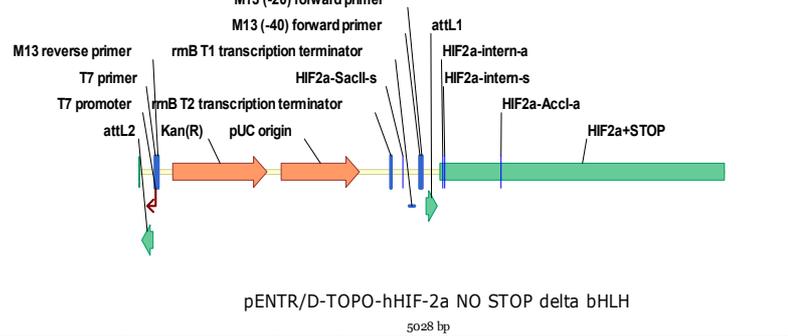
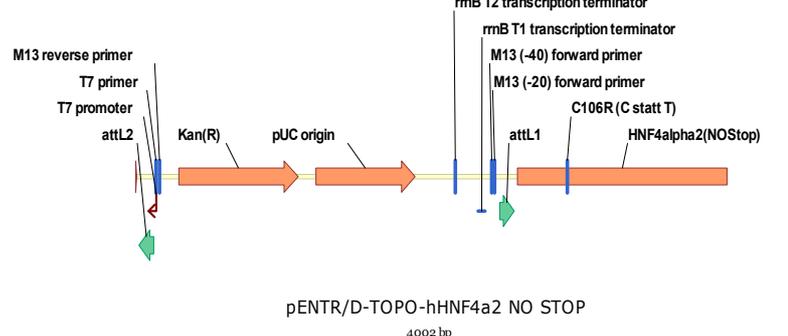
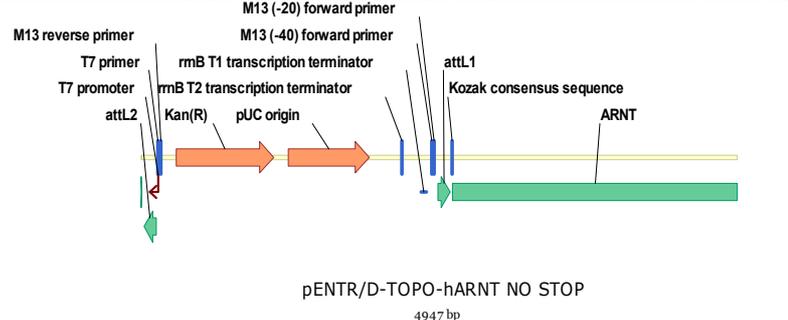


Tabelle 7-4 Plasmide für die LR-Reaktion mit pcDNA6.2/C-CFP-Dest oder pcDNA6.2/C-YFP-Dest

pENTR/ORF/cDNA (ohne Stop Codon)	verwendete Primer	Plasmidkarte
pENTR/D-TOPO- HIF-1 α	Original Biosystems (basierend auf pDONOR223)	 <p>ORF-hHIF1a Biosystems 5268 bp</p>
pENTR/D-TOPO- HIF-1 α Δ bHLH	Diplomarbeit Anna König	 <p>ORF-hHIF1a delta bHLH 5106 bp</p>
pENTR/D-TOPO- HIF-2 α	hHIF2-alpha-s hHIF2-alpha- a+STOP	 <p>pENTR/D-TOPO-hHIF 2 a NO STOP 5190 bp</p>
pENTR/D-TOPO- HIF-2 α Δ bHLH	Diplomarbeit Anna König	 <p>pENTR/D-TOPO-hHIF-2a NO STOP delta bHLH 5028 bp</p>
pENTR/D-TOPO- HNF-4 α 2	hHNF4-s hHNF4-a	 <p>pENTR/D-TOPO-hHNF4a2 NO STOP 4002 bp</p>
pENTR/D-TOPO- ARNT	hARNTs hARNTa	 <p>pENTR/D-TOPO-hARNT NO STOP 4947 bp</p>

7.5 Lebenslauf

Name: Rebecca Konietzny

Geburtsdatum: 30.09.1979

Geburtsort: Duisburg

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Werdegang:

- 01. November 2009-31. Dezember 2009

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologie (AG Prof. Fandrey) der Universität Duisburg-Essen

- 01. November 2006-31. Oktober 2009

Doktorandin am Institut für Physiologie (AG Prof. Fandrey) der Universität Duisburg-Essen im Rahmen des DFG *Graduate Training Programme "Transcription, Chromatin Structure and DNA Repair in Development and Differentiation"* (1431/1)

- September 1999-August 2005

Studium an der Ruhr-Universität-Bochum

Abschluss: Diplom-Biochemikerin

Konstruktion und Charakterisierung RRE-defizienter lentiviraler Vektoren auf der Basis des Affen Immundefizienzvirus.

- August 1990-Juli 1999

Sophie-Scholl-Gymnasium in Oberhausen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

- 1986-1990

Katholische Grundschule (Dunkelschlagschule) in Oberhausen

7.6 Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Analyse der gewebespezifischen Zusammensetzung des Transkriptionsfaktorkomplexes Hypoxie-induzierbarer Faktor zur Erythropoietin-Genexpression mit Hilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Rebecca Konietzny* befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in (Rebecca Konietzny)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in (Rebecca Konietzny)

7.7 Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Fandrey, der mein interessantes Thema durch entscheidende Fragen und durch sein Gespür immer vorantrieb. Ich danke ihm für die gewährte Freiheit, über die mit dem Stipendium verbundenen Sach- und Reisemittel zu verfügen. Dieser Luxus hat zum Erfolg der Arbeit beigetragen!

Meiner Betreuerin Dr. Utta Berchner-Pfannschmidt, die mich bei der Durchführung sowie bei der Korrektur dieser Arbeit betreute, bin ich besonders für ihre wissenschaftliche Anregung, fruchtbaren Diskussionen und ihren Hilfestellungen bei Problemen dankbar.

Ich danke meinem Promotionskomitee, Prof. Dr. Andrea Vortkamp und Prof. Dr. Gerhart Ryffel für die interessanten Diskussionen während unserer Treffen. Bei Prof. Dr. Perihan Nalbant möchte ich mich für die FRET-Diskussionen am Leica-System bedanken.

Dem *DFG Graduate Training Programme "Transcription, Chromatin Structure and DNA Repair in Development and Differentiation"* (1431/1) danke ich für die Finanzierung des Projektes.

Allen Mitarbeitern am Institute für Physiologie danke ich für die sehr gute, nicht nur wissenschaftliche Zusammenarbeit. Mein Dank gilt der Mikroskopie-Arbeitsgruppe, Dr. Christoph Wotzlaw, André Bernadini und Silke Gneuss. Die Bereitstellung der HK-120 Zellen im Jahr 2009 verdanke ich Dr. Stilla Frede. Ich danke unseren beiden Laborengeln Buena Delos Reyes und Patricia Freitag, die mich in ihr umfangreiches Wissen über die hypoxischen Zellkulturexperimente und die Erfahrung in der Durchführung von Western-Blot- und PCR-Experimenten eingearbeitet haben. Auch möchte ich mich bei unserer Sekretärin Gundula Endemann für ihre große Hilfsbereitschaft rund ums Organisatorische bedanken. Für die Analyse jeglicher Ergebnisse, geistiger Verfassung und Gemütslage danke ich jetzigen und ehemaligen Mitstreitern im Labor: Dr. Carmen Müller, Helene Nicknig, Dr. Teresa Otto, Frank Splettstoesser, Dr. Sandra Swoboda, Dr. Suzan Tug und Sandra Winning.

Ohne die ausdauernde und vielseitige Unterstützung meiner Familie und Freunde, die immer wieder viel Verständnis für meine ergebnisbedingten Launen zeigten, wäre dieses berufliche Ziel nicht möglich gewesen. Besonders Euch danke ich von Herzen!