

**Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann**

**MECHANISMEN DES SPEZIFISCHEN KERNTTRANSPORTS
UND POSTTRANSLATIONALER MODIFIKATIONEN
IN DER SAUERSTOFF-SENSORIK**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Amrei Steinhoff
aus Stade

Lübeck 2008

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer

Tag der mündlichen Prüfung:

08.06.09

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

08.06.09

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

„Meine Forschung heilt keine Krankheiten, aber sie heilt vielleicht ein wenig unsere Unwissenheit über die biologischen Abläufe unserer Zellen. Wenn wir die großen Krankheiten heilen wollen, müssen wir noch viel mehr über die Grundlagen wissen. Sie sind die treibende Kraft, der Katalysator zum Verständnis.“

Günter Blobel

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
DIAGRAMMVERZEICHNIS	VII
 1. EINLEITUNG	 1
1.1 DIE MOLEKULARE SAUERSTOFF-SENSORIK	1
1.1.1 DIE BEDEUTUNG VON SAUERSTOFF	1
1.1.2 DIE FAMILIE DER HYPOXIE-INDUZIERBAREN FAKTOREN–STRUKTUR UND ZIELGENE	2
1.1.3 DIE REGULATION DER HYPOXIE-INDUZIERBAREN FAKTOREN	4
1.1.4 BEDEUTUNG UND LOKALISATION VON PHDs.....	6
1.2 NUCLEOZYTOPASMATISCHER TRANSPORT VON PROTEINEN	8
1.2.1 KERNIMPORT UND KERNEXPORT	9
1.2.3 BEDEUTUNG FÜR DAS HIF-SYSTEM	12
1.3 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN VON PROTEINEN	13
1.3.1 MODIFIKATION MIT SUMO	13
1.3.2 FUNKTIONEN VON SUMOYLIERUNG.....	15
1.3.4 SUMO UND HIF	16
1.4 ZIELSETZUNG	18
 2. MATERIAL UND METHODEN	 19
2.1 MATERIALIEN.....	19
2.1.1 CHEMIKALIEN.....	19
2.1.2 ARBEITSMATERIAL.....	21
2.1.3 KITS.....	22
2.1.4 GERÄTE	22
2.1.5 PLASMIDE.....	23
2.1.6 ENZYME	24
2.1.7 PRIMER.....	24
2.1.8 ZELLINIEN	26
2.1.9 BAKTERIENSTÄMME.....	26

2.1.10 HEFESTÄMME	26
2.1.11 ANTIKÖRPER.....	26
2.1.12 ALGORITHMEN ZUR VORHERSAGE VON NLS, NES UND SUMOAKZEPTORLYSINEN	27
2.1.13 LÖSUNGEN, PUFFER, MEDIEN	27
2.2 METHODEN	29
2.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
2.2.1.1 ANZUCHT VON BAKTERIEN	29
2.2.1.2 HERSTELLUNG CHEMISCH-KOMPETENTER ZELLEN.....	29
2.2.1.3 TRANSFORMATION	30
2.2.1.4 PLASMIDPRÄPARATION	30
2.2.1.5 KOLONIERUNGEN UND RESTRIKTIONEN	30
2.2.1.6 AGAROSEGELE	31
2.2.1.7 AMPLIFIKATION VON DNA-FRAGMENTEN MITTELS PCR.....	31
2.2.1.8 REINIGUNG UND AUFKONZENTRIERUNG VON DNA	31
2.2.1.9 ORTSGERICHTETE MUTAGENESE.....	32
2.2.1.10 DNA SEQUENZIERUNG	32
2.2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	32
2.2.2.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN	32
2.2.2.2 TRANSFEKTION	33
2.2.2.3 ZELLAUFSCHLUSS	33
2.2.2.4 LOKALISATIONSSTUDIEN MIT FLUORESCENZ-MARKIERTEN PROTEINEN	33
2.2.2.5 KERNEXPORTBLOCK MIT LMB	34
2.2.2.6 IMMUNFLUORESCENZ	34
2.2.2.7 IMMUNPRÄZIPITATION	34
2.2.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	35
2.2.3.1 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	35
2.2.3.2 SDS-PAGE	35
2.2.3.3 COOMASSIE FÄRBUNG.....	35
2.2.3.4 WESTERN BLOT	36
2.2.3.5 PROTEIN ÜBEREXPRESSION	36
2.2.3.6 AUFREINIGUNG VON GST-FUSIONSPROTEINEN.....	37
2.2.3.7 AUFREINIGUNG VON HIS-FUSIONSPROTEINEN	38
2.2.3.8 <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION UND TRANSLATION	38

2.2.3.9 GST-PULL-DOWN ASSAY	39
2.2.3.10 SUMOYLIERUNGSASSAY VON [³⁵ S]-MARKIERTEM ZIELPROTEIN	40
2.2.3.11 SUMOYLIERUNGSASSAY MIT REKOMBINANTEM PROTEIN	40
2.2.4 YEAST TWO HYBRID ASSAY	40
2.2.4.1 TRANSFORMATION VON HEFE.....	40
2.2.4.2 MATCHMAKER™ GAL4 Two-HYBRID SYSTEM 3 (CLONTECH)	41
2.2.4.3 FLÜSSIGER ONPG-TEST VON POSITIVEN YEAST TWO HYBRID KLONEN	41
2.2.5 RICHTLINIEN ZUR VERSUCHSVVALIDIERUNG.....	42
3. ERGEBNISSE.....	44
3.1 UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER PAS-B-DOMÄNE VON HIF-1α AUF DIE INTERAKTION MIT DEN IMPORTINEN	44
3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUM KERNTTRANSPORT DER PHDs	45
3.2.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR BINDUNG VON PHD1 AN DIE IMPORTINE	45
3.2.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DER BINDUNG VON PHD1 AN DIE IMPORTINE.....	47
3.2.3 CHARAKTERISIERUNG DER NLS VON PHD1	48
3.2.4 CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNG VON PHD1 AN IMPORTIN α5	50
3.2.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR TEILUNGSABHÄNGIGKEIT DER KERNLOKALISATION VON PHD1 K118A	52
3.2.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHEN <i>BIPARTITE</i> NLS VON PHD1	53
3.2.7 BINDUNG VON PHD2 AN VERSCHIEDENE IMPORTINE	55
3.2.8 UNTERSUCHUNGEN ZUM KERNTTRANSPORT VON PHD2	56
3.2.9 PHD2 BINDET DAS EXPORTIN CRM1.....	58
3.2.10 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT DER VORHERGESAGTEN NES VON PHD2	58
3.2.11 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT DER VORHERGESAGTEN NLS VON PHD2	60
3.2.12 UNTERSUCHUNGEN ZUM MÖGLICHEN GEKOPPELTEN KERNIMPORT VON PHD2	61
3.3 SUMOYLIERUNG VON HIF-1α UND HIF-2α.....	64
3.3.1 CO-LOKALISATION VON HIF-1α UND HIF-2α MIT SUMO1	64
3.3.2 SUMOYLIERUNG VON HIF-1α <i>IN VITRO</i>	66
3.3.3 SUMOYLIERUNG VON REKOMBINANTEM HIF-1α.....	66
3.3.4 SUMOYLIERUNG VON HIF-1α MUTANTEN	67

3.3.5 SUMOYLIERUNG VON HIF-2 α <i>IN VITRO</i>	69
3.3.6 SUMOYLIERUNG VON REKOMBINANTEM HIF-2 α	70
3.3.7 SUMOYLIERUNG VON HIF-2 α MUTANTEN	71
3.3.8 NACHWEIS EINER BINDUNG VON HIF-1 α UND HIF-2 α AN DAS SUMOYLIERENDE ENZYM UBC9	72
3.3.9 FLÜSSIGER ONPG-TEST MIT HIF-1 α UND HIF-2 α	74
4. DISKUSSION	76
4.1 DIE ROLLE DES KERNIMPORTS IN DER MOLEKULAREN SAUERSTOFF- SENSORIK.....	76
4.2 SUMOYLIERUNG VON HIF-1 α UND HIF-2 α	87
5. ZUSAMMENFASSUNG	91
6. ABSTRACT.....	93
7. LITERATURVERZEICHNIS	94
8. ANHANG.....	117
8.1 ABKÜRZUNGEN	117
8.2 LEBENSLAUF	120
8.3 VERÖFFENTLICHUNGEN UND ABSTRACTS.....	121
8.4 VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN	122
8.5 DANKSAGUNG	124
8.6 EIDESSTATISCHE ERKLÄRUNG.....	126

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB.1:	DOMÄNENSTRUKTUR DER HYPOXIE-INDUZIERBAREN FAKTOREN.	3
ABB.2:	REGULATION DER STABILITÄT UND AKTIVITÄT VON HIF- α DURCH PHDs UND FIH1.	6
ABB.3:	SCHEMATISCHER ABLAUF DES KERNIMPORTS UND KERNEXPORTS.	11
ABB.4:	DER ZYKLUS DER SUMOYLIERUNG VON ZIELPROTEINEN.	15
ABB.5:	LOKALISATION VON HIF-1 α Δ PAS B UND HIF-1 α Δ PAS B K719A.	45
ABB.6:	PULL-DOWN ASSAY VON PHD1 MIT IMPORTINEN.	46
ABB.7:	SPEZIFITÄTSTEST DER BINDUNG VON PHD1 AN DIE IMPORTINE.	48
ABB.8:	PULL-DOWN ASSAY VON PHD1 K118A MIT IMPORTINEN.	49
ABB.9:	LOKALISATION VON PHD1 UND PHD1 K118A IN DER ZELLE.	50
ABB.10:	PULL-DOWN ASSAY VON PHD1 MIT IMPORTIN α 5 ARM-MUTANTEN.	51
ABB.11:	LOKALISATION VON PHD1 K118A IN DER ZELLE 14 STUNDEN NACH TRANSFEKTION UND NACH ZELLZYKLUSARREST.	53
ABB.12:	LOKALISATION VON POTENTIELLEN <i>BIPARTITE</i> MUTANTEN.	54
ABB.13:	PULL-DOWN ASSAY VON PHD2 MIT IMPORTINEN.	55
ABB.14:	EINFLUSS VON LEPTOMYCIN B AUF DIE LOKALISATION VON PHD2-GFP.	57
ABB.15:	IMMUNPRÄZIPITATION VON CRM1 MIT PHD2.	58
ABB.16:	LOKALISATION VON PHD1-NES-GFP UND PHD2 Δ NES-GFP.	59
ABB.17:	EINFLUSS VON LEPTOMYCIN B AUF DIE LOKALISATION VON PHD2 K111A-GFP.	60
ABB.18:	PULL-DOWN ASSAY VON OS9 MIT IMPORTINEN.	61
ABB.19:	LOKALISATION VON OS9 MIT UND OHNE LEPTOMYCIN B.	62
ABB.20:	PULL-DOWN ASSAY VON ING4 MIT IMPORTINEN.	63

ABB.21:	Co-LOKALISATION VON HIF-1 α UND HIF-2 α MIT SUMO1-GFP UNTER HYPOXIE.	65
ABB.22:	<i>IN VITRO</i> SUMOYLIERUNG VON HIF-1 α .	66
ABB.23:	SUMOYLIERUNG VON REKOMBINANTEM HIF-1 α .	67
ABB.24:	POTENTIELLE SUMOYLIERUNGSSTELLEN VON HIF-1 α .	68
ABB.25:	SUMOYLIERUNG VON HIF-1 α MUTANTEN.	69
ABB.26:	<i>IN VITRO</i> SUMOYLIERUNG VON HIF-2 α .	69
ABB.27:	SUMOYLIERUNG VON REKOMBINANTEN HIF-2 α .	70
ABB.28:	POTENTIELLE SUMOYLIERUNGSSTELLEN VON HIF-2 α .	71
ABB.29:	SUMOYLIERUNG VON HIF-2 α MUTANTEN.	71
ABB.30:	WACHSTUM VON CO-TRANSFORMIERTER HEFE AUF VIERFACHEM SELEKTIONSMEDIUM.	72
ABB.31:	WACHSTUM VON CO-TRANSFORMIERTER HEFE AUF VIERFACHEM SELEKTIONSMEDIUM.	73
ABB.32:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BEDEUTUNG DES KERNIMPORTS FÜR DIE MOLEKULARE SAUERSTOFF-SENSORIK.	86

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1:	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN PLASMIDE.	23
TABELLE 2:	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN PRIMER.	24
TABELLE 3:	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN ZELLINIEN.	26
TABELLE 4:	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN BAKTERIENSTÄMME.	26
TABELLE 5:	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN HEFESTÄMME.	26
TABELLE 6:	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER.	26
TABELLE 7:	ZUSAMMENSETZUNG VON GELLÖSUNGEN.	28
TABELLE 8:	TRANSFEKTIONSANSÄTZE FÜR TRANSFEKTION MIT FUGENE HD.	33

DIAGRAMMVERZEICHNIS

DIAGRAMM 1:	MILLER-UNITS BEI CO-EXPRESSION VON HIF-1 α UND HIF-2 α MIT UBC9.	75
-------------	--	----

1. EINLEITUNG

1.1 DIE MOLEKULARE SAUERSTOFF-SENSORIK

1.1.1 DIE BEDEUTUNG VON SAUERSTOFF

Sauerstoff ist eines der wichtigsten Elemente, um das Leben auf der Erde möglich zu machen. Höher entwickelte Lebewesen sind von der Aufnahme von Sauerstoff in den Organismus abhängig. Alle Prozesse im aeroben Organismus sind nur mit Beteiligung von Sauerstoff möglich, so verarbeitet z.B. das menschliche Gehirn mit Hilfe von Sauerstoff Milliarden von Informationen pro Sekunde. Die Zellen eines Organismus sind auf Adenosintriphosphat (ATP) als Energielieferant angewiesen, das bei dem Ablauf der Atmungskette in den Mitochondrien durch die Reduktion von Sauerstoff in großen Mengen gebildet wird.

Um die Versorgung des gesamten Körpers mit Sauerstoff zu gewährleisten, haben höhere Organismen ein komplexes System entwickelt, bei dem eingeatmeter Sauerstoff in den Lungen in die Blutgefäße übertritt. Hier bindet der molekulare Sauerstoff das Hämoglobin in den roten Blutkörperchen und wird über die Blutbahn in den gesamten Körper transportiert. Dies gewährleistet eine optimale Versorgung der Organe und Gewebe mit Sauerstoff und daraus resultierender Energie.

Ist das Angebot an Sauerstoff niedriger als der Bedarf der Zellen spricht man von Sauerstoffmangel oder Hypoxie. Als Auslöser von Hypoxien kommen Faktoren oder Krankheiten in Frage, die die Sauerstoffversorgung beeinträchtigen, wie Gefäßverengungen oder -blockierungen durch Thrombose oder Embolien, Lungenkrankheiten, Störungen der Sauerstoffverwertung, Anämien sowie schnelles Tumorwachstum, Wunden oder Entzündungen.

Einer Hypoxie wirken verschiedene physiologische Prozesse entgegen. Der Blutfluss und die Atemfrequenz werden erhöht, der Stoffwechsel der Zellen wird auf anaerobe Energiegewinnung durch gesteigerte Glykolyse umgestellt, die Sauerstoffkapazität des Blutes wird durch Initiierung der Erythropoiese erhöht. Diese Prozesse tragen dazu bei, die Oxygenierung der hypoxischen Areale wiederherzustellen. Geregelt werden diese Prozesse auf transkriptioneller Ebene durch Aktivierung von spezifischen Genen.

1.1.2 DIE FAMILIE DER HYPOXIE-INDUZIERBAREN FAKTOREN–STRUKTUR UND ZIELGENE

Die Aufrechterhaltung der Sauerstoff Homöostase bedarf der regulierten Aktivierung Hypoxie-abhängiger Gene. Diese Gene stehen unter der Kontrolle von speziellen Transkriptionsfaktoren, den Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs). Übersteigt der Sauerstoff-Verbrauch das Sauerstoff-Angebot in der Zelle, so wird durch HIFs die Transkription einer Bandbreite von Genen induziert. HIFs sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Am besten charakterisiert ist das Heterodimer aus HIF-1 α und HIF-1 β , bei dem HIF-1 α den Sauerstoff-sensitiven Teil des Komplexes bildet. Trotz konstitutiver Expression wird HIF-1 α unter physiologischen Sauerstoff-Konzentrationen direkt abgebaut, während HIF-1 β (auch: Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT)) beständig in der Zelle vorkommt.

Entdeckt wurde der Faktor HIF-1 α als Regulator des Hormons Erythropoietin (EPO). Schon im 19. Jahrhundert konnte ein Zusammenhang von Höhen-aufenthalt und der damit verbundenen ansteigenden Anzahl von roten Blutkörperchen festgestellt werden [Viault, 1890]. 1992 konnte dann HIF-1 als der Transkriptionsfaktor ermittelt werden, der unter Hypoxie aktiviert wird und die Transkription des EPO-Gens regelt [Semenza und Wang, 1992]. Neben HIF-1 α existieren beim Menschen und bei der Maus zwei weitere Isoformen der α -Untereinheit. 1997 wurde das als HIF-2 α bezeichnete EPAS1 als Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor entdeckt [Ema et al., 1997]. Es zeigt im Gegensatz zu HIF-1 α ein begrenztes Expressionsmuster aber ähnliche funktionelle Charakteristiken [Wiesener et al., 1998]. Des Weiteren existiert HIF-3 α [Gu et al., 1998], sowie weitere Splicevarianten. Eine verkürzte Splicevariante des HIF-3 α , die als IPAS bezeichnet wird, ist als Gegenspieler der hypoxischen Antwort bekannt. Durch Dimerisierung mit HIF-1 β zu einem Komplex, der nicht transkriptionell aktiv ist, ist der dominant negative Effekt des IPAS zu erklären [Makino et al., 2001; Maynard et al., 2007]. Die Mitglieder der HIF-Familie gehören zu der Gruppe der „basic Helix-Loop-Helix PER-ARNT-SIM“ (bHLH PAS) Transkriptionsfaktoren [Kewley et al., 2004]. HIF-2 α und HIF-1 α stimmen zu 48% überein, jedoch zeigt sich eine weit höhere Homologie aller α -Untereinheiten in den funktionellen Regionen (siehe Abb.1)

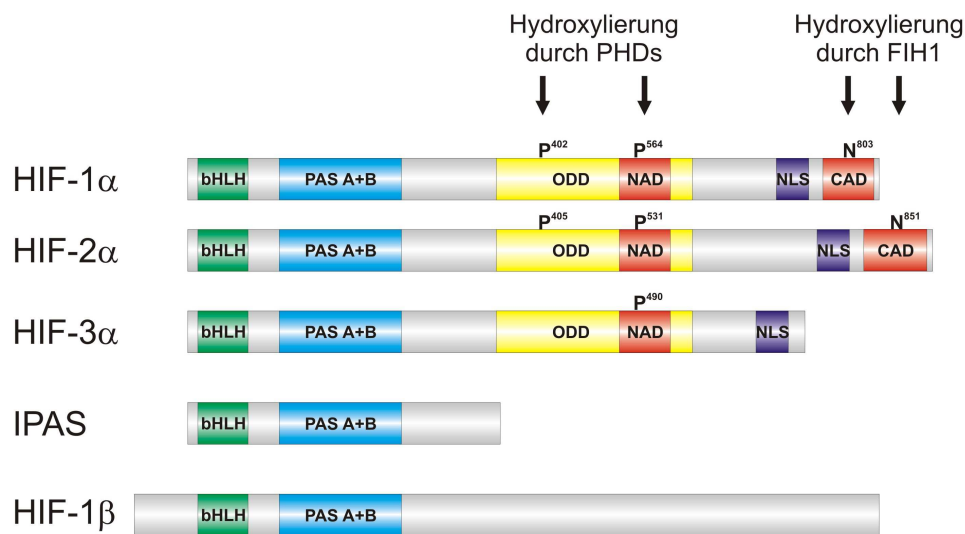


Abb.1: Domänenstruktur der Hypoxie-induzierbaren Faktoren.

Im N-terminalen Bereich liegt die bHLH Domäne, die verantwortlich für die Bindung an die DNA ist. Zwei PAS-Domänen (PAS A und PAS B) dienen der Dimerisierung der Untereinheiten und der Bindung an andere Proteine, wie der Bindung des Chaperons HSP90 [Katschinski et al., 2004]. Auf die PAS-Domänen folgt die Sauerstoff-abhängige Degradierungsdomäne („oxygen dependent degradation domain“; ODDD). Posttranslationale Modifikationen in diesem Bereich der Proteine beeinflussen die Stabilität und die Abbaurate des Proteins. Während HIF-1 α und HIF-2 α eine N-terminale und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (NAD; CAD) besitzen, findet man in HIF-3 α nur die NAD. Die NAD überlappt mit der ODD-Domäne, die CAD ist im C-Terminus des Proteins zu finden. Beide Domänen sind essentiell für die Rekrutierung der transkriptionellen Co-Faktoren CBP (CREB Bindung Protein) und p300, durch die eine Aktivierung des Transkriptionskomplexes initiiert wird [Übersicht in: Semenza et al., 1997; Fandrey, 2007; Lisy und Peet, 2008]. Zusätzlich findet man in allen drei HIF- α Isoformen ein Kernlokalisierungssignal („nuclear localization signal“; NLS) im C-terminalen Bereich [Luo und Shibuya, 2001], sowie eine zweite putative NLS im N-terminalen Bereich von HIF-1 α [Kallio et al., 1998]. Es konnte gezeigt werden, dass HIF1 α und HIF-2 α über die Bindung der C-terminalen NLS durch Importin α und Importin β in den Kern transportiert werden [Depping et al., 2008].

Nach Translokation in den Zellkern und Dimerisierung der α -Untereinheit mit HIF-1 β bindet HIF an Hypoxie-responsive Elemente (HRE), die in Promoter oder Enhancer Regionen der Zielgene vorkommen, um deren Transkription zu aktivieren. HREs sind hoch konservierte Sequenzen ((A/G)CGTG). Entdeckt wurden diese Sequenzen zunächst in der Enhancer Region des EPO-Gens. Sie sind bei allen HIF-Zielgenen zu finden [Kvietikova et al., 1995; Kvietikova et al., 1997; Wenger et al., 1998].

Die Hypoxie-abhängigen Zielgene lassen sich im Wesentlichen in zwei Gruppen einteilen. Zum einen gibt es Gene, die den Transport von Sauerstoff in das hypoxische Gewebe verbessern, zum anderen Gene, die den anaeroben Stoffwechsel der Zelle steigern. Zur ersten Gruppe gehören neben dem EPO auch Faktoren des Eisenstoffwechsels wie das Transferrin und der Transferrin-Rezeptor, Faktoren der Gefäßneubildung (Angiogenese), wie VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) und der VEGF-Rezeptor oder Faktoren wie iNOS, die den Gefäßtonus regulieren [Übersicht in: Semenza, 2003]. Zur zweiten Gruppe von Zielgenen gehören die membranständigen Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3, sowie die Mehrzahl der glykolytischen Enzyme [Ebert et al., 1996].

1.1.3 DIE REGULATION DER HYPOXIE-INDUZIERBAREN FAKTOREN

Bei der Regulation Hypoxie-abhängiger Gene werden die α -Untereinheiten der HIF-Isoformen abhängig vom Sauerstoffvorkommen in ihrer Stabilität und Aktivität durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Während HIF-1 β konstitutiv in der Zelle exprimiert wird und seine Konzentration von Schwankungen der Sauerstoff-Konzentration nicht beeinflusst wird [Huang et al., 1996], ist die Stabilität der α -Untereinheit durch Prolyl-4-Hydroxylasen, den PHDs („prolyl hydroxylase domain containing proteins“), reguliert. PHDs sind Enzyme, die die α -Untereinheiten an konservierten Prolinen innerhalb der ODD-Domäne hydroxylieren. HIF-1 α wird an Prolin P402 und P564, HIF-2 α an P405 und P531, HIF-3 α nur an einem Prolin, dem P490, hydroxyliert (siehe Abb.1) [Jaakkola et al., 2001; Ivan et al., 2001; Bruick und McKnight, 2001]. Generell hydroxylieren alle PHDs vorzugsweise das jeweils C-terminale Prolin, während das N-terminale mit geringerer Häufigkeit bzw. bei HIF-3 α überhaupt nicht hydroxyliert wird [Epstein et al., 2001; Huang et al., 2002; Chan et al., 2005]. Hydroxyliertes HIF- α wird von dem von Hippel-Lindau-Protein (pVHL) gebunden, einem Teil eines E3 Ubiquitin-

Ligase Komplexes. HIF- α wird poly-ubiquitinyliert und damit zum Abbau über das 26S Proteasom markiert [Maxwell et al., 1999]. Drei PHDs (PHD1-3) konnten als hydroxylierende Enzyme identifiziert werden [Epstein et al., 2001]. Mittels Sequenzanalysen konnte eine weitere Hydroxylase gefunden werden (PH-4), deren Rolle als HIF-Prolylhydroxylase jedoch nicht geklärt ist [Oehme et al., 2002]. PHD1-3 gehören zur Familie der Eisen(II) und 2-Oxoglutarat (2-OG) abhängigen Dioxygenasen. Dioxygenasen metabolisieren molekularen Sauerstoff, von dem beide Atome in die Produkte der katalysierten Reaktion eingebaut werden. Die Hydroxylierung von HIF- α ist demnach abhängig von Sauerstoff, wobei ein Atom des Sauerstoffmoleküls in die Hydroxyl-Gruppe am Prolin eingebaut wird, das andere Atom für die Reaktion von 2-OG zu Succinat gebraucht wird. In Zellkulturen können alle drei Isoformen HIF- α hydroxylieren, wobei PHD2 der wichtigste Sauerstoff-Sensor für HIF-1 α zu sein scheint. Eine Minderung der PHD2-Konzentration durch RNA-Interferenz führt in der Zellkultur zu einer Akkumulation von HIF-1 α [Wu et al., 2008]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass PHD1 und PHD3 bei Langzeit- oder chronischer Hypoxie zum Abbau von HIF beitragen [Ginouvès et al., 2008]. Die PHDs zeigen unterschiedliche Substrat-Präferenzen. So hat PHD2 eine hohe Affinität zu HIF-1 α , während PHD1 und PHD3 HIF-2 α vorzuziehen scheinen [Appelhoff et al., 2004].

Die Transkription von PHD2 und PHD3 ist wiederum durch Hypoxie und der damit verbundenen Transkriptionsaktivierung durch HIF-1 geregelt [Marxsen et al., 2004]. Da erhöhte Konzentrationen der PHDs eine verringerte Konzentration an Sauerstoff teilweise kompensieren können [Stiehl et al., 2006], ist eine Überexpression der PHDs Teil einer auto-regulatorischen Schleife, die das HIF-System reguliert.

Eine weitere Dioxygenase, das FIH1 (factor inhibiting HIF 1), reguliert die transkriptionelle Aktivität des HIF-Dimers aus HIF-1 α oder HIF-2 α mit HIF-1 β [Lando et al., 2002b]. FIH1 katalysiert die Hydroxylierung eines konservierten Asparagins in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (N851 bei HIF-2 α und N803 bei HIF-1 α ; siehe Abb.1). Über die CAD wird die Rekrutierung der Transkriptions-initialisierenden Faktoren p300 und CBP vermittelt. Durch die Hydroxylierung wird die Rekrutierung verhindert und somit die Aktivität von HIF stark abgeschwächt. Hypoxie verringert die Aktivität von FIH1 und aktiviert somit die Transkription der HIF-Zielgene [Lando et al., 2002a]. Die Regulation der

Stabilität und Aktivität durch PHD1, PHD2, PHD3 und FIH1 ist in Abbildung 2 zusammengefasst.

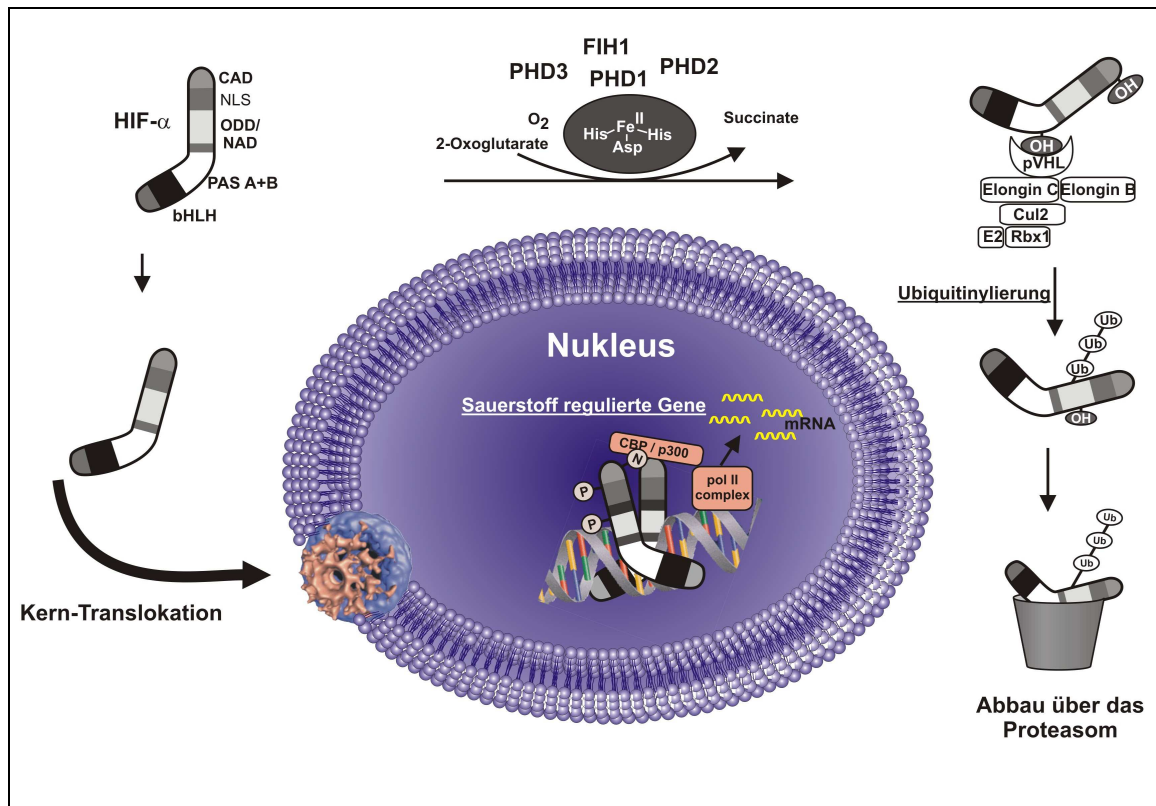


Abb.2: Regulation der Stabilität und Aktivität von HIF- α durch PHDs und FIH1. HIF- α wird in Gegenwart von Sauerstoff von den PHDs im Bereich der ODD-Domäne hydroxyliert, wodurch ein pVHL vermittelter Abbau im Proteasom gefördert wird. Zusätzlich wird die Aktivierung von HIF- α durch Hydroxylierung eines Asparagins in der CAD durch FIH unterbunden. Bei Sauerstoffmangel finden die Hydroxylierungen nicht statt, so dass HIF- α stabilisiert wird und die Transkription der Zielgene aktivieren kann.

1.1.4 BEDEUTUNG UND LOKALISATION VON PHDS

Die wichtige physiologische Bedeutung der PHDs für die Entwicklung und die Gesundheit konnte in verschiedenen Studien mit Knock-out Mäusen gezeigt werden, in denen das Gen je eines PHDs ausgeschaltet wurde. Das Ausschalten von PHD2 führt bei Mäusen schon während der Embryogenese zum Tod. Grund dafür sind Defekte in der Plazenta [Takeda et al., 2006]. Über einen konditionalen Knock-out in ausgewachsenen Tieren zeigte sich die Bedeutung von PHD2 in Bezug auf die Angiogenese und die Bildung roter Blutkörperchen. Mäuse, denen PHD2 fehlt, zeigen eine Neigung zu gesteigerter Erythropoiese und Gefäßbildung [Takeda et al., 2007] und sterben zudem vor Erreichen der Geschlechtsreife an

Blutstau und Kardiomyopathie [Minamishima et al., 2008]. Knock-outs von PHD1 oder PHD3 zeigen zunächst keinen veränderten Phänotyp, es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Verlust von PHD1 zu einer Senkung des Sauerstoff-Verbrauchs im Skelettmuskel führt, was durch eine Steigerung der anaeroben ATP-Gewinnung ausgelöst wird [Aragonés et al., 2008]. PHD3 scheint eine Rolle in der sympathoadrenalen Entwicklung zu übernehmen, was sich u.a. durch eine Hypotonie in Knock-out Tieren zeigt [Bishop et al., 2008]. Ein doppelter Knock-out von PHD1 verbunden mit PHD3 macht deutlich, dass auch diese Hydroxylasen eine Rolle bei der EPO-Bildung übernehmen. Tiere mit dem Genotyp PHD1(-/-) / PHD3(-/-) zeigen eine gesteigerte Erythropoiese durch Aktivierung der renalen EPO-Bildung [Takeda et al., 2008].

Die Verteilung der PHDs in der Zelle variiert zwischen den Isoformen. Erste Untersuchungen zur Lokalisation der PHDs wurden mit Fusionsproteinen in Zellkultur durchgeführt. Versuche mit *flag*-Fusionsproteinen in Nierenzellen von Primaten zeigten eine Lokalisation von PHD1 vorwiegend im Zellkern und von PHD2 und PHD3 vorwiegend im Zytoplasma [Huang et al., 2002]. Versuche mit GFP-Fusionsproteinen bestätigten diese Ergebnisse weitestgehend. In menschlichen Osteosarkom-Zellen konnte PHD1 ebenfalls als kernlokalisiertes Protein charakterisiert werden, PHD2 wurde fast ausschließlich im Zytoplasma gefunden und im Gegensatz zu der vorherigen Studie trat für PHD3 eine Gleichverteilung zwischen Kern und Zytoplasma auf [Metzen et al., 2003]. Mit der Entwicklung neuer Antikörper wurde es mit der Zeit möglich, auch endogene PHDs nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass das Lokalisationsmuster der PHDs variiert und vom Gewebetyp abhängig ist. Alle drei PHDs zeigten sich in Epithel-Zellen, Bindegewebszellen oder Leukozyten hauptsächlich zytoplasmatisch und das in Zellkultur zytoplasmatische PHD2 zeigt sich in den Leydig-Zellen des Hodengewebes ausgeglichen zwischen Zytoplasma und Kern [Soilleux et al., 2005]. Besonders in Tumoren und Karzinomen variiert die Verteilung der PHDs. Es wurde gezeigt, dass mit steigender Malignität eines Kopf- und Hals-Plattenepithel-Karzinoms steigende Konzentrationen von PHD2 im Zellkern gefunden werden können [Jokilehto et al., 2006]. In Lungentumoren wurden die PHDs vorwiegend im Zytoplasma detektiert, wobei ein Großteil der Patienten eine Überexpression der PHDs und HIF zeigten [Giatromanolaki et al., 2008]. In endokrinen Bauchspeicheldrüsenkarzinomen wurden alle PHDs

überexprimiert und sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern gefunden. Ein starkes nukleäres Vorkommen aller PHDs geht dabei einher mit schlechten Prognosen und Metastasenbildung [Couvelard et al., 2008].

Kürzlich konnte auch in Zellkultur endogenes PHD2 detektiert werden, dessen Lokalisation sich unter physiologischen Sauerstoff-Konzentrationen von der Lokalisation der PHD2-Fusionsproteine unterscheidet. Es konnte gezeigt werden, dass PHD2 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma endogen vorkommt und dass das nukleäre PHD2 das hauptsächlich aktive PHD2 ist [Berchner-Pfannschmidt et al., 2008].

Die Lokalisation der PHDs scheint in Bezug auf die hypoxische Antwort von Zellen und Geweben von entscheidender Bedeutung zu sein. Ein Transportmechanismus für die nukleären PHDs ist jedoch bisher nicht bekannt.

1.2 NUCLEOZYTOPLASMATISCHER TRANSPORT VON PROTEINEN

Ein wichtiges Merkmal von eukaryotischen Zellen ist das Vorhandensein von Membran-umschlossenen Zellorganellen. Die wichtigste Funktion hat dabei der Zellkern, in dem das Erbgut von dem Rest der Zelle abgetrennt wird. Wichtige Prozesse wie DNA-Replikation, Transkription, Splicing von RNA oder der Zusammenbau ribosomaler Untereinheiten finden hier statt. Proteine, die an diesen Vorgängen beteiligt sind, müssen von ihrem Ort der Synthese im Zytoplasma zum Ort ihres Wirkens gelangen. Eine Barriere bei der Translokation in den Zellkern stellt die Kernmembran dar. Diese Doppelmembran trennt das Nukleoplasma vom Rest der Zelle und ist mit Kernporen durchzogen, die einen Stoffaustausch zwischen beiden Kompartimenten gewährleisten. Ebenso wie der Import in den Zellkern muss auch der Export von Proteinen über diese Poren stattfinden. Die Kernporen sind Proteinkomplexe (NPC, „nuclear pore complex“), die aus bis zu 30 Proteinen, den Nukleoporinen, bestehen und eine Größe von ca. 120MDa erreichen. Von den Nukleoporinen ragen Filamente in das Zytoplasma, den Kern und in die gebildete Pore. So entsteht eine netzartige Struktur, die hochselektiv ist. Sie lässt Ionen und kleinere Moleküle bis ~40kDa passiv diffundieren, größere Proteine müssen aktiv über Transportproteine, so genannte Importine oder Exportine transportiert werden [Übersicht in: Lim und Fahrenkrog, 2006].

1.2.1 KERNIMPORT UND KERNEXPORT

Als erste Transportproteine wurden die Importine Importin α und Importin β identifiziert und ihre Transportfunktion für andere Proteine nachgewiesen [Görlich et al., 1994]. Während es nur eine bekannte Isoform von Importin β gibt, existieren sechs humane Importin α s (Importin $\alpha 1$ und $\alpha 3-7$). Bis auf Importin $\alpha 6$, das nur im Hoden exprimiert wird, werden die Importin α s ubiquitär exprimiert [Köhler et al., 1997; Hogarth et al., 2006]. Während es Proteine gibt, die über alle Importin α s transportiert werden, dienen anderen Proteinen spezifische Importin α s als Transportprotein [Köhler et al., 1999].

Ein Heterodimer aus Importin α und β bindet das Substrat, wobei Importin α als eigentlicher Adapter das Substrat erkennt. Importin β bindet über die C-terminale Importin β -Bindedomäne (IBB-Domäne) von Importin α an den Importin α -Substrat-Komplex und vermittelt die Bindung an die Kernpore und die nukleäre Translokation des Komplexes (siehe Abb.3) [Görlich et al., 1996; Görlich und Kutay, 1999]. Eine wichtige Rolle in der Regulation des Kerntransports spielt die GTPase Ran. Die GTP-gebundene Form von Ran (RanGTP) ist im Zellkern lokalisiert, im Zytoplasma findet sich die hydrolysierte Form (RanGDP). Im Zellkern bindet RanGTP das Importin β in den trimeren Transportkomplexen, was zu einer Dissoziation des Komplexes führt. Das importierte Substrat wird bei der Dissoziation des Komplexes im Kern freigesetzt und die Importine ins Zytoplasma recycelt. Der Komplex aus RanGTP und Importin β kann den Zellkern direkt verlassen, Importin α wird über die Bindung an das Exportin CAS und an RanGTP exportiert. Bei Export Prozessen fördert RanGTP die Bildung von Exportkomplexen aus Exportin und Substrat [Übersicht in: Görlich und Kutay, 1999; Macara, 2001].

Als wichtigstes Exportin konnte CRM1 („Chromosome Region Maintenance 1“) identifiziert werden [Yoshida und Horinouchi, 1999]. CRM1 bindet das zu exportierende Substrat, der Aufbau des Komplexes wird durch die Bindung von RanGTP gefördert. Über den RanGTP-Gradienten wird der Export-Komplex aus dem Kern transportiert, wo durch Hydrolyse des RanGTP zu RanGDP der Komplex dissoziiert und das Substrat im Zytoplasma freigesetzt wird (siehe Abb.3). Zur Aufrechterhaltung des RanGTP-Gradienten dienen zytoplasmatisch das Ran-aktivierende Protein RanGAP1, sowie das Chromatin gebundene RCC1, das den

Übergang von RanGDP zu RanGTP katalysiert [Übersicht in: Görlich und Kutay, 1999; Macara, 2001].

Das Proteinspektrum der über den beschriebenen „klassischen“ Import und Export transportierten Proteine ist breit gefächert. Ihnen gemein sind jedoch spezifische Sequenzen, die für die Bindung an die Importine ausschlaggebend sind, sog. NLS („nuclear localisation signals“) und NESs („nuclear export signals“) [Übersicht in: Moroianu, 1998]. NLS sind Abfolgen von basischen Aminosäuren, insbesondere Lysinen, die entweder aus einem einzelnen oder einem zweigeteilten Signal bestehen (*monopartite* oder *bipartite*). Bei der klassischen *bipartite* NLS sind beide Teile durch einen Linker aus 10-15 Aminosäuren verbunden. Das erste Muster einer *monopartite* NLS wurde im großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) identifiziert. Der Prototyp der *bipartite* NLS wurde in Nucleoplasmin gefunden [Kalderon et al., 1984; Dingwall und Laskey, 1991]. Importin α besitzt zwei Bindedomänen, über die eine NLS gebunden werden kann. Gebildet werden diese Bindungstaschen durch eine Abfolge von Armadillo- (ARM-) Motiven. Diese Motive sind Strukturelemente und bestehen aus ungefähr 40 Aminosäuren. Ihren Namen erhielten sie von dem Protein Armadillo der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) in dem sie zuerst charakterisiert wurden. Die ARM-Motive sind gestapelt und bilden dadurch zwei flache Bindungsstellen, von denen die N-terminale aus ARM1-4 und die kleinere C-terminale von ARM5-10 gebildet wird [Conti et al., 1998; Fontes et al., 2000]. Generell binden *monopartite* NLS die N-terminale Bindungstasche. *Bipartite* NLS binden beide Taschen, wobei der Hauptteil an die C-terminale Bindungstasche bindet [Conti und Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2003a; Fontes et al., 2003b].

Neben dem klassischen Kernimport über das Importin α/β -System gibt es weitere Transport-Systeme, die durch Proteine vermittelt werden, die strukturell dem Importin β ähnlich sind. Sie binden ihre Substrate direkt, ohne einen Adapter wie Importin α zu benötigen. Sie erkennen NLS, die von den klassischen NLS verschieden sind. Bisher sind über 20 solcher Proteine, die auch „ β -like proteins“ genannt werden, bekannt, die sowohl Kernimport als auch Kernexport vermitteln [Palmeri und Malim, 1999; Fried und Kutay, 2003; Harel und Forbes, 2004].

Signale für den Kernexport von Proteinen sind im Gegensatz zu NLS kurze Leucin-reiche Sequenzen. Diese werden von dem Exportin CRM1, einem

„ β -like“ Transportfaktor, gebunden und über Komplexbildung mit RanGTP aus dem Kern transportiert (siehe Abb.3) [Fornerod et al., 1997; Stade et al., 1997]. Die Bindungsstelle für das RanGTP ähnelt der von Importin β und liegt im N-terminalen Bereich des Proteins, die Bindestelle für NESs liegt im Zentrum des Proteins [Ossareh-Nazari und Dargemont, 1999]. Als potente Blocker des CRM1-vermittelten Kernexports wurden Leptomycin B und Ratjadon A identifiziert. Durch Bindung eines Cysteinrestes in der Nähe der Substratbindestelle ändert sich die Konformation von CRM1, so dass eine NES-Bindung nicht mehr stattfinden kann und somit der Kernexport blockiert ist [Meissner et al., 2004].

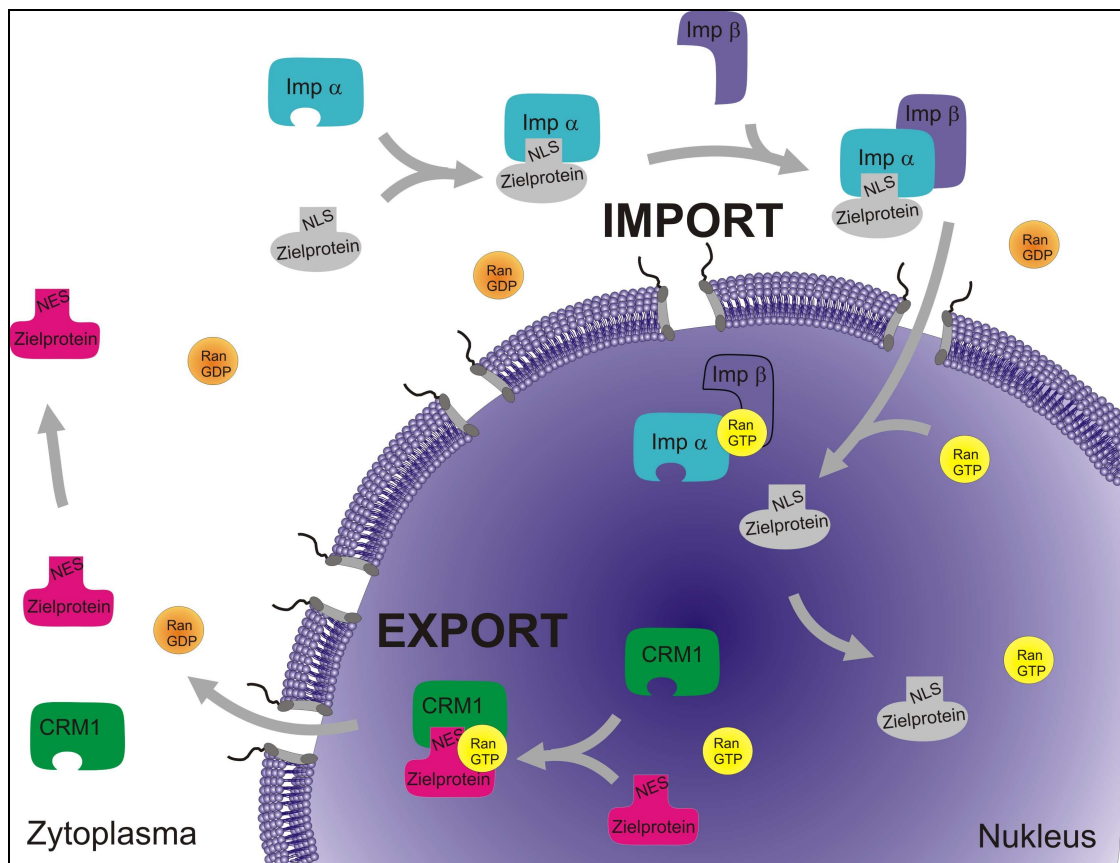


Abb.3: Schematischer Ablauf des Kernimports und Kernexports. Dargestellt ist der Kernimport über das klassische Importin α/β -System, sowie der CRM1 vermittelte Kernexport von Zielproteinen.

Viele Proteine werden unabhängig vom Zustand der Zelle ständig in und aus dem Kern transportiert. Andere Proteine benötigen einen Stimulus um transportiert zu werden. Regulationen des Kerntransports können u.a. über posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder SUMOylierungen, Maskierung bzw. Demaskierung von NLS, Eintritt in oder Austritt aus dem Zellzyklus sowie äußere Stimulationen durch Zytokine oder Stresssituationen, wie oxidativen Stress, erfolgen [Boulikas, 1995; Reich, 2002; Kodiha et al., 2004; Miyamoto et al., 2004; Ziegler und Ghosh, 2005].

1.2.3 BEDEUTUNG FÜR DAS HIF-SYSTEM

Um ihre Funktion bei der zellulären Antwort auf eine Erniedrigung der Sauerstoffkonzentration auszuüben, müssen die Mitglieder der Familie der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren in den Zellkern translozieren, wo sie die Expression Hypoxie-abhängiger Gene initialisieren. Bisherige Arbeiten konnten zeigen, dass sowohl HIF-1 α und HIF-2 α als auch HIF-1 β über den klassischen Importin α/β vermittelten Weg in den Kern transportiert werden. Dabei binden sie ubiquitär an alle Importin α s, was einen Kerntransport unabhängig von äußeren Einflüssen sicherstellt. Bindestelle für die Importin α s ist eine NLS-Sequenz im C-terminalen Bereich des Proteins [Depping et al., 2008]. Nicht klar hingegen ist der Ort des Sauerstoff-abhängigen Proteinabbaus der HIF- α -Untereinheiten. Eine Arbeit von Groulx und Lee legt einen Kernimport gefolgt von einer durch Hydroxylierung vermittelter Bindung an kernlokalisiertes pVHL mit CRM1-abhängigen Kernexport des Komplexes nahe [Groulx und Lee, 2002]. Dieses Modell wird durch Studien unterstützt, die CRM1 als Transportprotein für HIF-1 α zeigen. Zur Stabilität des Proteins trägt eine Phosphorylierung innerhalb einer untypischen NES durch MAP-Kinasen bei, die den Kernexport durch CRM1 verhindern [Mylonis et al., 2006; Mylonis et al., 2008]. Der Einfluss des Kerntransports auf die Mitglieder der HIF-Familie ist ein wichtiger Punkt bei der Regulation der hypoxischen Antwort der Zelle. Noch unbekannt ist die Bedeutung des Kerntransportes für die Mitglieder der HIF-Prolylhydroxylasen.

1.3 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN VON PROTEINEN

Posttranslationale Modifikationen sind Veränderungen eines Proteins nach der Translation an den Ribosomen. Sie haben Einfluss auf die Proteinstruktur und sind die wichtigsten Mechanismen in eukaryotischen Zellen um die Funktion, Aktivität oder Lokalisation von Proteinen zu regulieren oder zu verändern. Am besten untersucht sind Modifikationen, bei denen niedermolekulare Substanzen an verschiedene Aminosäureseitenketten des Zielproteins angehängt werden wie Phosphorylierungen, Hydroxylierungen, Glykosylierungen, Acetylierungen, Methylierungen, Carboxylierungen und anderen, aber auch das Abspalten von Signalpeptiden. Solche Veränderungen von Proteinen können direkten Einfluss auf die Funktionalität und Lokalisation haben oder die Interaktion mit co-regulierenden Faktoren beeinflussen. Eine Sonderstellung unter den posttranslationalen Modifikationen hat die Verknüpfung von Ubiquitin und seinen Verwandten an das Zielprotein, da es sich bei ihnen selber um kleine Proteine handelt. Im Verlauf des letzten Jahrzehnts zeigte sich die immense regulatorische Bedeutung der Modifikation mit einem Ubiquitin-ähnlichen Protein, dem „Small Ubiquitin-like Modifier“ (SUMO). Dessen Bindung an seine Zielproteine reguliert eine große Bandbreite von Prozessen in eukaryotischen Zellen.

1.3.1 MODIFIKATION MIT SUMO

SUMO-Proteine sind Proteine mit kurzer Geschichte. Erst 1996 wurde SUMOylierung entdeckt und zunächst als eine Modifikation des RanGAP1 charakterisiert, die die Bindung an den NPC vermittelt [Shen et al., 1996; Boddy et al., 1996; Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997].

Die SUMO-Familie umfasst in Wirbeltieren 4 Mitglieder. SUMO1, SUMO2 und SUMO3 werden ubiquitär exprimiert, während das 2004 entdeckte SUMO4 fast ausschließlich in der Niere zu finden ist [Kamitani et al., 1998; Bohren et al., 2004]. SUMO hat eine Größe von ca. 11kDa, wodurch sich die Größe des Zielproteins mit jeder SUMOylierung merklich verändert. Zwar ergibt sich eine geringe Übereinstimmung mit Ubiquitin in der Primärsequenz, jedoch konnten Strukturanalysen des SUMOs eine für Ubiquitin charakteristische Tertiärstruktur aus β -Faltblättern, die über α -Helices verknüpft sind ($\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$), zeigen [Bayer et al., 1998]. SUMO1 und SUMO4 sind zu ca. 90% identisch. SUMO2 und SUMO3 weisen eine 97%ige Homologie auf und sind nur zu ca. 50% identisch mit SUMO1

und SUMO4, woraus sich zwei Untergruppen der SUMO-Familie ergeben [Saitoh und Hinchey, 2000; Bohren et al., 2004].

Der Mechanismus der Konjugation von SUMO an die Zielproteine ähnelt im Ablauf der Konjugation von Ubiquitin. Er läuft prinzipiell in einer dreistufigen Kaskade ab: Reifung und Bindung an das aktivierende Enzym (E1), Übergang auf das konjugierende Enzym (E2) UBC9 („Ubiquitin-conjugating enzyme 9“) und die über eine E3-Ligase vermittelte Ligation an das Zielprotein. Nach der Translation von SUMO erfolgt die Reifung durch spezifische Cysteinproteinasen im C-terminalen Bereich. Im Anschluss daran wird SUMO über eine Thioesterbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe und einem Cystein des Enzyms an den E1-Enzymkomplex aus SAE1 und SAE2 („sumo activating enzyme“; bekannt als Aos1 und Uba2 in Hefen) gebunden. Im zweiten Schritt der Reaktion wird SUMO auf die spezifische E2-Ligase UBC9 übertragen. Auch hier wird über einen Cysteinrest in UBC9 eine Thioester-Bindung gebildet. UBC9 ist für SUMOylierungen mit SUMO1, SUMO2 und SUMO3 spezifisch, bildet jedoch keine Komplexe mit Ubiquitin oder anderen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen [Desterro et al., 1997]. Von UBC9 geht das SUMO im dritten Schritt der Reaktion auf das Substrat-Protein über, indem eine Isopeptid-Bindung aus der C-terminalen Carboxylgruppe und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins gebildet wird. Die Ziellysine liegen zumeist in einer Konsensussequenz vor (Ψ KxE, wobei Ψ eine hydrophobe Aminosäure und x eine beliebige Aminosäure darstellt) [Rodriguez et al., 2001]. UBC9 kann direkt mit dieser Sequenz der Zielproteine interagieren, was in *in vitro* Versuchen ausreicht, um das Substrat zu SUMOylieren. *In vivo* ist eine SUMOylierung allein über UBC9 ineffizient, so dass eine Interaktion mit einer E3-Ligase nötig ist, um die Ausbildung der Isopeptidbindung zu katalysieren [Übersicht in: Gill, 2004; Tang et al., 2008]. Während die E1 und E2 Enzyme einzigartig sind, sind eine Bandbreite Substrat-spezifischer E3 Ligasen bekannt. Beispiele sind Mitglieder der PIAS-Familie oder Kernporenproteine wie das RanBP2 [Pichler et al., 2002; Takahashi, 2004; Palvimo, 2007]. SUMOylierungen sind hochdynamische Vorgänge, bei denen eine Dekonjugation durch spezifische Proteasen stattfindet. Diese sind auch für die Reifung des SUMOs verantwortlich und sind Mitglieder der SENP-Familie. Sie zeigen verschiedene Lokalisationen, was eine DeSUMOylierung in der ganzen Zelle möglich macht [Übersicht in: Mukhopadhyay und Dasso, 2007]. Der Ablauf der SUMOylierung und DeSUMOylierung ist in Abbildung 4 dargestellt.

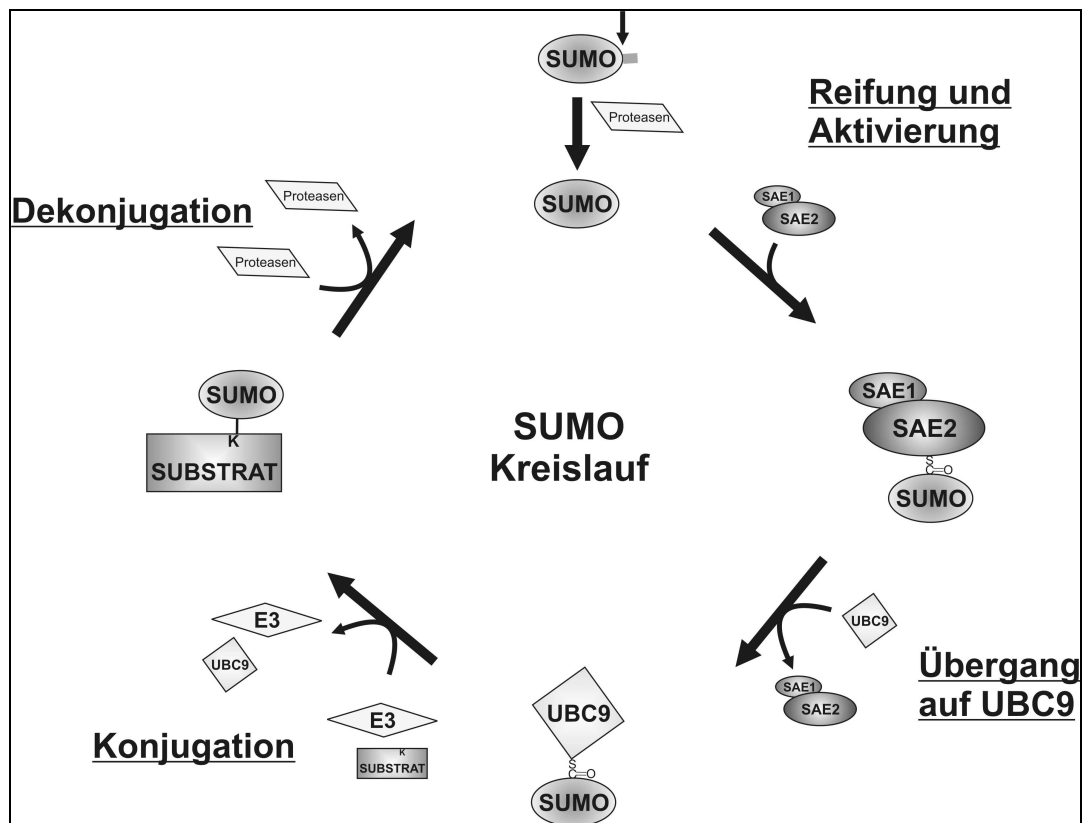


Abb.4: Der Zyklus der SUMOylierung von Zielproteinen. Nach der Reifung des Proteins wird SUMO auf den aktivierenden Komplex aus SAE1 und SAE2 („SUMO activating enzyme 1 und 2“) übertragen. Von dort wird SUMO über eine Thioesterbindung an die E2 Ligase UBC9 gekoppelt, von wo aus es auf das Ziellysin eines Substrates übertragen wird. *In vivo* sind dafür E3 Ligasen als Katalysatoren notwendig. Spezifische Proteasen vermitteln die Dekonjugation von SUMO und setzen dieses wieder frei.

1.3.2 FUNKTIONEN VON SUMOYLIERUNG

SUMO ist bekannt geworden als eine posttranslationale Modifikation, die zahlreiche Proteine betrifft und somit deren Eigenschaften beeinflusst. Dadurch greift SUMO in eine Vielzahl von Abläufen in der Zelle ein, und die Funktionen sind dabei so vielfältig wie die Zielproteine. Studien konnten zeigen, dass eine SUMOylierung die Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen kann. So fördert eine SUMOylierung des RanGTP aktivierenden Enzyms RanGAP1 dessen Bindung an den Kernporenkomplex über das Nucleoporin 358 [Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1998]. Einen wichtigen Einfluss hat SUMO auch auf die Stabilität von Proteinen. Als Gegenspieler der Poly-Ubiquitylierung kann eine Modifikation mit SUMO den proteasomalen Abbau des Proteins verhindern und

die Proteine dadurch stabilisieren [Desterro et al., 1998]. Die Hauptkomponenten von PML Kernkörperchen sind SUMOyliert und SUMO scheint eine wichtige Rolle bei der Funktionalität und strukturellen Intaktheit der Körperchen beizutragen, so kann SUMO nicht nur für die Stabilität einzelner Proteine von Bedeutung sein, sondern es reguliert auch die Stabilität ganzer Proteinkomplexe [Seeler und Dejean, 2001]. Desweiteren kann SUMOylierung die DNA-Bindung von Proteinen beeinflussen oder auf die enzymatische Aktivität der Proteine wirken [Goodson et al., 2001; Hong et al., 2001; Hardeland et al., 2002], sowie in die Regulation des Zellzyklus eingreifen [Hay, 2005]. Durch Modifikation von verschiedenen Proteinen der Kernporenkomplexe wird SUMO ein Mitwirken beim Kerntransport zugeschrieben [Pichler et al., 2002; Pichler und Melchior, 2002].

Die wohl wichtigste Rolle von SUMO ist die Regulation der Transkription über die Modifikation von Transkriptionsfaktoren. Die Effekte auf diese Faktoren können sowohl die Aktivität fördern als auch hemmen, wobei eine Hemmung der Aktivität die Regel ist und Aktivierungen meist Ausnahmen bilden [Übersicht in: Verger et al., 2003; Lyst und Stancheva, 2007].

Die meisten Zielproteine werden an spezifischen Ziellysinen mono-SUMOyliert, jedoch sind alle SUMO-Isoformen in der Lage, wie ihr Verwandter Ubiquitin [Li und Ye, 2008] Ketten zu bilden. Deren Funktion ist jedoch unklar. Eine sterische Hinderung der Interaktion mit anderen Proteinen ist dabei am wahrscheinlichsten [Knipscheer et al., 2007; Vertegaal, 2007].

1.3.4 SUMO UND HIF

Eine SUMOylierung kann durch äußere Einflüsse reguliert werden. Verschiedene Stresssituationen wie z.B. osmotischer Stress, Hitzeshock, oxidativer Stress u.a. verursachen eine Induktion oder Inhibierung der SUMOylierung. Dabei können einzelne Proteine oder der globale SUMOylierungs-Mechanismus beeinflusst sein [Übersicht in: Tempé et al., 2008].

Auch Hypoxie kann ein solcher globaler Regulator der SUMOylierung sein. Es konnte gezeigt werden, dass Hypoxie und auch cerebrale Ischämie zu einem globalen Anstieg der SUMOylierung führen kann und zusätzlich eine Erhöhung der SUMO-Genexpression auslöst [Comerford et al., 2003; Shao et al., 2004; Yang et al., 2008; Cimarosti et al., 2008].

In Verbindung mit Hypoxie konnte die SUMOylierung von HIF-1 α mehrfach gezeigt werden. Für HIF-1 α werden zwei spezifische Akzeptorlysine angegeben, die im Bereich der ODD-Domäne liegen. Eine Funktion der SUMOylierung wird allerdings kontrovers diskutiert. Zum einen wird eine Stabilisierung des Proteins sowie ein Anstieg der Transkriptionsaktivität durch SUMOylierung beobachtet [Bae et al., 2004], zum anderen konnte eine Reduktion der Aktivität von HIF-1 α durch die Konjugation mit SUMO gezeigt werden [Berta et al., 2007]. Eine Regulation der SUMOylierung scheint dabei über die SUMO-spezifische Protease SENP1 zu funktionieren. DeSUMOylierung von HIF-1 α ist für die Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung. SUMOyliertes HIF-1 α wird in Embryonen schnell abgebaut und eine Unterbindung der DeSUMOylierung führt zum frühen Tod der Embryonen aufgrund von Anämie. Daher wird ein Modell angenommen, in dem die SUMOylierung von HIF-1 α den Ubiquitin vermittelten Abbau des Proteins unterstützt [Cheng et al., 2007]. Neben HIF-1 α wird auch HIF-1 β innerhalb der PAS B-Domäne SUMOyliert. Diese SUMOylierung hemmt die Transkriptionsaktivität von HIF-1 β durch eine Minderung der Interaktionen mit anderen Proteinen [Tojo et al., 2002].

Aktuell ist die Rolle der SUMOylierung bei der molekularen Sauerstoff-Sensorik durch kontroverse Ergebnisse unklar und weitere Untersuchungen müssen zeigen, welchen Einfluss die SUMOylierung auf das HIF-System hat.

1.4 ZIELSETZUNG

Vor Beginn dieser Arbeit konnten Versuche am hiesigen Institut zeigen, dass das Importin α/β System eine entscheidende Rolle bei dem Kerntransport von HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-1 β spielt. Die dafür funktionelle NLS konnte im C-Terminus des Proteins gefunden werden [Depping et al., 2005]. In einer Weiterführung dieser Experimente sollte der Einfluss der PAS B-Domäne von HIF-1 α auf eine mögliche Funktionalität einer vorhergesagten N-terminalen NLS untersucht werden. Außerdem sollte der Transportmechanismus für das kernlokalisierte PHD1, sowie für das teilweise kernlokalisierte PHD2 untersucht werden, um die Bedeutung der Lokalisation der PHDs für die molekulare Sauerstoff-Sensorik herauszustellen.

In einem zweiten Teilprojekt sollte die zuvor veröffentlichte SUMOylierung von HIF-1 α [Bae et al., 2004] genauer untersucht werden und SUMOylierungs-Versuche auf HIF-2 α ausgedehnt werden, um die Rolle von SUMO bei der zellulären Antwort auf Hypoxie genauer aufzuklären.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 CHEMIKALIEN

[³⁵ S]-Methionin	HARTMANN ANALYTIC
30% Acryl- Bisacrylamidmix	CARL ROTH GmbH
Agar Agar	AppliChem GmbH
Agarose LE GP	Biozym Scientific GmbH
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Aluminiumsulfat-Hydrat	AppliChem GmbH
Ammoniumperoxidsulfat	Merck KG
Ampicillin (Natriumsalz)	BIOMOL GmbH
ATP	BIOMOL GmbH
Baktotrypton	AppliChem GmbH
Bromphenolblau	Merck KG
BSA	Merck KG
Calciumchlorid	Merck KG
Coomassie Brilliantblue G250	SERVA Electrophoresis
Deoxycholat	AppliChem GmbH
Dextrose	AppliChem GmbH
DMEM	Invitrogen GmbH
DNA-Ladder 100bp	New England Biolabs
DNA-Ladder 1kb	New England Biolabs
DO supplement Mix	Clontech
EDTA	Merck KG
EGTA	CARL ROTH GmbH
Essigsäure	CARL ROTH GmbH
Ethanol	CARL ROTH GmbH
Ethidiumbromid	Invitrogen GmbH
Fish skin gelatine	Inst. f. Biologie, Lübeck
FKS	Invitrogen GmbH
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Inc.
Fugene HD	Roche

Glucose	AppliChem GmbH
GlutathionSepharose 4B	GE Healthcare
Glycerin	CARL ROTH GmbH
Glycin	SERVA Electrophoresis
Hefeextrakt	AppliChem GmbH
HEPES	CARL ROTH GmbH
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Inc.
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, Inc.
Imidazol	AppliChem GmbH
IPTG	AppliChem GmbH
Kaliumacetat	Merck KG
Kaliumchlorid	Merck KG
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KG
Kanamycin-Sulfat	CARL ROTH GmbH
Lachssperma DNA	Sigma-Aldrich, Inc.
Leptomycin B	Calbiochem
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich, Inc.
Lysozym	Sigma-Aldrich, Inc.
Magnesiumacetat	Merck KG
Magnesiumchlorid	Merck KG
Magnesiumsulfat	Merck KG
Methanol	CARL ROTH GmbH
MOPS	Gerbu Biotechnik GmbH
Natriumacetat	Merck KG
Natriumcarbonat	Merck KG
Natriumchlorid	CARL ROTH GmbH
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KG
Natriumhydrogenphosphat	Merck KG
ONPG	Sigma-Aldrich, Inc.
OPTIMEM	Invitrogen GmbH
Ortho-Phosphorsäure	CARL ROTH GmbH
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences
PEG 400	Sigma-Aldrich, Inc.
PenicillinG	PAA Laboratories

Pepton	AppliChem GmbH
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich, Inc.
ProLong® Gold antifade reagent with DAPI	Molecular Probes Inc.
Proteaseinhibitorcocktail	Novagen
ProteinG Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare
Reduziertes L-Glutathion	Sigma-Aldrich, Inc.
Röntgenfilmentwickler LX24	Kodak
Röntgenfixierbad AL4	Kodak
Saccharose	AppliChem GmbH
SDS	SERVA Electrophoresis
Streptomycin-Sulfat	PAA Laboratories
Talon metal affinity resin	BD Biosciences
TEMED	Sigma-Aldrich, Inc.
Tris	SERVA Electrophoresis
Tris-HCL	CARL ROTH GmbH
TritonX100	Merck KG
Trockenmilchpulver	Töpfer Allgäu
Trypsin	Invitrogen GmbH
Tween20	Sigma-Aldrich, Inc.
Visualizer™ Spray & Glow™	
ECL Western Blotting Detection System	Millipore
yeast nitrogen base w/o aminoacids	BD Biosciences
β-Mercaptoethanol	BIOMOL GmbH

2.1.2 ARBEITSMATERIAL

Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare
Centriprep® Ultracel YM-50	Millipore
Dialyseschlauch (Dialysis-Membrane Type20)	BIOMOL GmbH
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham Biosciences
Polypropylen-Säulen – 5ml	Qiagen

2.1.3 KITS

NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL
Phusion® Site-Directed <i>Mutagenesis</i> Kit	Finnzymes Oy
PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen GmbH
PureLink™ Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen GmbH
QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	STRATAGENE
QuickChange® lightning	STRATAGENE
SUMOylierungskit	BIOMOL GmbH
SUMOylierungskit	Boston Biochem
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega GmbH

2.1.4 GERÄTE

Centrifuge5415R	Eppendorf Deutschland
ELISA-Reader SLT Rainbow	SLT Labinstruments GmbH
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan	Carl Zeiss AG
Fotometer SmartSpec™ 300	Bio-Rad Laboratories
Invivo ₂ Hypoxia workstation 400	Ruskin Technology Limited
Nanodrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie
Phosphoimager Fujifilm BAS-1000	Raytest
SonoPlus HD3100	BANDELIN GmbH & Co. KG
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	DuPont Instruments
Thermocycler Primus96 ^{plus}	MWG BIOTECH AG
<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf Deutschland
Thermo-Schüttler	Gallenkamp
Thermoshake	Gerhardt

2.1.5 PLASMIDE

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Plasmide.

Insert	Vektor	Herkunft
HIF-1 α	pCDNA3	Laborsammlung
HIF-1 α Δ PAS B	pCDNA3	Laborsammlung
HIF-1 α Δ PAS B K719A	pCDNA3	Laborsammlung
HIF-1 α K214A	pCDNA3	Mutagenese von HIF-1 α
HIF-1 α K310A	pCDNA3	Mutagenese von HIF-1 α
HIF-1 α K392A	pCDNA3	Mutagenese von HIF-1 α
HIF-1 α K477A	pCDNA3	Mutagenese von HIF-1 α
HIF-1 α K538A	pCDNA3	Mutagenese von HIF-1 α
HIF-1 α K547A	pCDNA3	Mutagenese von HIF-1 α
HIF-1 α K721A	pCDNA3	Mutagenese von HIF-1 α
HIF-1 α -DBD	pGBKT7	eigene Klonierung
HIF-1 α -HIS	pQE80	Gabe von Prof. G. Simos, Thessaloniki
HIF-2 α	pCDNA3	Laborsammlung
HIF-2 α K394A	pCDNA3	Mutagenese von HIF-2 α
HIF-2 α K497A	pCDNA3	Mutagenese von HIF-2 α
HIF-2 α -DBD	pGBKT7	eigene Klonierung
HIF-2 α -GST	pGEX2.0	Laborsammlung
Importin β -GST	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt-	Gabe von Prof. M.Köhler, Berlin
Importin β -HIS	pQE60	Gabe von Prof. M.Köhler, Berlin
Importin α 1-GST	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt-	Gabe von Prof. M.Köhler, Berlin
Importin α 3-GST	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt-	Gabe von Prof. M.Köhler, Berlin
Importin α 4-GST	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt-	Gabe von Prof. M.Köhler, Berlin
Importin α 5-GST	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt-	Gabe von Prof. M.Köhler, Berlin
Importin α 7-GST	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt-	Gabe von Prof. M.Köhler, Berlin
ING4	pCDNA3	eigene Klonierung
ING4	pG β 1-II	Laborsammlung Prof. E. Metzen
Nucleoplasmin	pQE60	Gabe von Prof. M.Köhler, Berlin
PHD1	pCDNA3	Laborsammlung
PHD1 K118A	pCDNA3	Mutagenese von PHD1
PHD1 K118A-GFP	pEGFP-N1	Mutagenese von PHD1-GFP
PHD1 K118AK120A	pCDNA3	Mutagenese von PHD1 K118A
PHD1 K118AK120A-GFP	pEGFP-N1	Mutagenese von PHD1 K118A-GFP
PHD1 K118AK120AK102A-GFP	pEGFP-N1	Mutagenese von PHD1 K118AK120A-GFP
PHD1 K118AK120AK133A-GFP	pEGFP-N1	Mutagenese von PHD1 K118AK120A-GFP
PHD1-GFP	pEGFP-N1	Laborsammlung Prof. E. Metzen
PHD1-NES-GFP	pEGFP-N1	Klonierung der PHD2-NES in PHD1-GFP
PHD2	pCDNA3	Laborsammlung
PHD2 Δ NES	pEGFP-N1	Mutagenese von PHD2-GFP
PHD2 K111A-GFP	pEGFP-N1	Mutagenese von PHD2-GFP
PHD2-GFP	pEGFP-N1	Laborsammlung Prof. E. Metzen
SUMO1-HIS	pCDNA3	Laborsammlung Prof. E. Metzen
SUMO-GFP	pCDNA3	Laborsammlung Dr. F. Kaiser, Humangenetik Lübeck
UBC9-AD	PGADT7	Laborsammlung Dr. F. Kaiser, Humangenetik Lübeck
V5-OS9	V5-OS9	Laborsammlung Prof. E. Metzen
Importin α 5 ARM2	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt	Gabe von R. Fagerlund, Helsinki
Importin α 5 ARM3	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt	Gabe von R. Fagerlund, Helsinki
Importin α 5 ARM7	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt	Gabe von R. Fagerlund, Helsinki
Importin α 5 ARM3/8	pQE60 - HIS-Tag durch GST-Tag ersetzt	Gabe von R. Fagerlund, Helsinki

	pGEX2.0	Laborsammlung
	pEGFP-N1	Laborsammlung
	pEGFP-C1	Laborsammlung
	pGBKT7	Laborsammlung Dr. F. Kaiser, Humangenetik Lübeck
	PGADT7	Laborsammlung Dr. F. Kaiser, Humangenetik Lübeck

2.1.6 ENZYME

<i>Bam</i> HI	New England Biolabs
<i>Sa</i> II	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
GoTaq Polymerase	Promega GmbH
Superscript Taq-polymerase	Ambion

2.1.7 PRIMER

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primer.

Funktion		Name	Sequenz 5'→3'
Mutagenese von PHD1 K118A	forward	PHD1Lys118Ala	GGCCTGAGGCCCGCGCGGAAATG GGCCGAGG
	reverse	PHD1Lys118Ala-r	CCTCGGCCCATTTCCGCGCGGGGC CTCAGGCC
Mutagenese von PHD1 K118AK120A	forward	PHD1K118Ak120Afor	GGCCTGAGGCCCGCGCGGGCATG GGCCGAGG
	reverse	PHD1K118Ak120Afor-r	CCTCGGCCCATGCGCGCGGGGC CTCAGGCC
Mutagenese von PHD1 K102A	forward	PHD1_K102A	AGCGCTGGTCACCGCGGGTGCCAG CGA
	reverse	PHD1_K102A_rev	TCGCTGGCACCCGCGGTGACCAGC GCT
Mutagenese von PHD1 K133A	forward	PHD1_K133A	CCCTCCACCCAGCGCACGGCCCTGG GCC
	reverse	PHD1K133ArevII	GGCCAGGGCCGTGCGCTGGGTGAA GGG
Mutagenese HIF-1 α K214A	forward	SUMO_K214A_for	CAGTGTGGGTATAAGGCACCACCTA TGACCTGCTTG
	reverse	SUMO_K214A_rev	CAAGCAGGTCATAGGTGGTGCCTTA TACCCACACTG
Mutagenese HIF-1 α K310A	forward	SUMO_K310A_for	CAGTACAGGATGCTTGCCGAAGAG GTGGATATGTCTG
	reverse	SUMO_K310A_rev	CAGACATATCCACCTCTTGCGGCAA GCATCCTGTACTG
Mutagenese HIF-1 α K392A	forward	SUMO_K392A_for	GCCTCTTTGACAACTTAAGGCGGA ACCTGATGCTTTAAC
	reverse	SUMO_K392A_rev	GTAAAGCATCACCTTCCGCCTTAA GTTTGTCAAAGAGGC
Mutagenese HIF-1 α K477A	forward	SUMO_477_finn_fo	(PO ₄) - CAAGAAGTTGCATTAGCAT TAGAACCAATCCAGAG
	reverse	SUMO_477_finn-re	(PO ₄) - ATTGAGTGCAGGGTCAGCA CTACTTGG
Mutagenese HIF-1 α K538A	forward	SUMO_K538A_for	CAAGTTGGAATTGGTAGAAGCACTT TTTGCTGAAGACACAG
	reverse	SUMO_K538A_rev	CTGTGTCTTCAGCAAAAAGTGCTTC TACCAATCCAACCTTG

2. MATERIAL UND METHODEN

Mutagenese HIF-1 α K547A	forward	SUMO_K547_ForIII	(PO ₄) - GCTGAAGACACAGAAGCGC AGAACCCATTTTCTAC
	reverse	SUMO_K547_RevII	(PO ₄) - GTAGAAAATGGGTTCTGCG CTTCTGTGTCTTCAGC
Mutagenese HIF-1 α K721A	forward	HIF1_K721A-for	GAATGCTCAGAGAAAGCGAGCAATG GAACATGATGGTTTCAC
	reverse	HIF1_K721A-rev	GTGAACCATCATGTTCCATTGCTCG CTTTCTCTGAGCATTC
Mutagenese PHD2 K111A	forward	PHD2_K11A_mut	GGGACGCGGCCAAGGGAGCAGTAA AGGCCAAG
	reverse	PHD2_K11A_mut_rev	CTTGGCCTTTACTGCTCCCTTGCC GCGTCCCC
Mutagenese PHD2 Δ NES	forward	PHD2 del562-585_for	GGCAGACGAAGCCCAGTACATCGT GCC
	reverse	PHD2 del562-585_rev	GGCAGATGTACTCGGGCTTCGTCT GCC
Mutagenese HIF-2 α K394A	forward	HIF2a_K394A	CTTCCTATTCACCAAGCTAGCGGAG GAGCCCGAGGAGCTG
	reverse	HIF2a_K394A-r	CAGCTCCTCGGGCTCCTCCGCTAGC TTGGTGAATAGGAAG
Mutagenese HIF-2 α K497A	forward	HIF2a_K497A	CTTTGGATAACGACCTGGCGATTGA AGTGATTGAGAAGC
	reverse	HIF2a_K497A-r	GCTTCTCAATCAATTCAATCGCCAG GTCGTTATCCAAAG
PCR ING4	forward	ING4_for	TCTGCAGAATTCATGGCTGCGGGGA TGTATTTGG
	reverse	ING4_rev_KpnI	TCTGCAGGTACCCTATTTCTTCTTC CGTTCTTGGG
PCR NES	forward	PHD2NESsacIIfor	CAAGAACCGCGGGCCGCTCATCGC TGTTCC
	reverse	PHD1-NES_rev	CAACAAGGATCCCGGTGCAGGGCGC GCACCTC
PCR HIF1 in pGBKT7	forward	hHIFbamHI_for	TTGGATCCATGGAGGGCGC
	reverse	hHIFbamHI_rev	GCGGATCCGTTAACTTGATCC
PCR HIF2 in pGBKT7	forward	hHIF2a_bamHI_for	GCGGATCCATGACAGCTGACAAG
	reverse	HIF2apGBKt7BamHlr	AAAAAGGATCCTCAGGTGGCTGGT CC
Sequenzierung HIF-1 α Start 1981		forw.mutagenese	GATACTCAAAGTCGGACAGC
Sequenzierung HIF-1 α Start 715		forw.mutagenese2	AGCAAGACTTTCCTCAGTCG
Sequenzierung HIF-1 α Start 1454		forw.mutagenese3	AGAACCAAATCCAGAGTCAC
Sequenzierung pCDNA3/pGEM forward		T7	AATACGACTCACTATAGG
Sequenzierung pCDNA3/pGEM reverse		SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
Sequenzierung PHD1 NLS		Seq_mut_PHD1_220	AGAGCCACAAGCCACCTCTACC
Sequenzierung PHD1-NES- GFP		SequencePHD1intern	GCCAGCCTATGCCACCAGCTAC
Sequenzierung HIF-2 α Start 770		HIF2_intern1	GCATGGACATGAAGTTCACCTACTG
Sequenzierung HIF-2 α Start 1540		HIF2_intern2	GGACACAGAGGCCAAGGACCAAT

2.1.8 ZELLINIEN

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft
U2OS	aus humanem Osteosarkom-Gewebe
HeLa	aus humanem Zervix-Karzinom-Gewebe
COS-7	Nierenfibroblasten der Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
HEK293	humane embryonale Nierenzellen
Kelly	aus humanem Neuroblastom-Gewebe

2.1.9 BAKTERIENSTÄMME

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme.

<i>E.coli</i>	Herkunft	Funktion
JM101	Laborsammlung	Überexpression von Proteinen
BL21 pREp4	aus Transformation von BL21	Überexpression von Proteinen
BL21	Laborsammlung	Überexpression von Proteinen
XL-1	Laborsammlung	Plasmidpräparation
JM110	Laborsammlung	Präparation von unmethylierter Plasmide
XL 10 gold	STRATAGENE	Transformation von Mutagenese-PCR
XL blue	STRATAGENE	Transformation von Mutagenese-PCR
OneShot® TOP10	Invitrogen GmbH	Transformation von TOPO-Klonierungen
DH5α	Laborsammlung	Plasmidpräparation

2.1.10 HEFESTÄMME

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Hefestämme.

Stamm	Herkunft	Anwendung
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109	Clontech	Yeast two Hybrid

2.1.11 ANTIKÖRPER

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Organismus	gekoppelt	Verdünnung		Firma
			WB	IF	
anti Gal4 TA	Maus	-	1:200	-	Santa Cruz
anti CRM1	Kaninchen	-	1:2500	-	Bethyl Laboratories
anti Gal4-DBD	Maus	-	1:200	-	Santa Cruz
anti HIF-1α	Maus	-	1:1000	1:50	BD Transduction Laboratories
anti HIF-2α	Ziege	-	1:1000	1:500	R&D Systems
anti Kaninchen IgG	Ziege	HRP	1:2000	-	DAKO A/S
anti Maus IgG	Ziege	Cy3	-	1:400	Zymed Laboratories
anti Maus IgG	Ziege	Alexa532	-	1:1000	Invitrogen
anti Maus IgG	Ziege	HRP	1:2000	-	DAKO A/S

anti PHD2 NB100-138	Kaninchen	-	1:500		Novus Biologicals
anti Ziege IgG NB120-6949	Esel	Cy3	-	1:1000	Novus Biologicals
anti-V5	Maus	-	-	1:500	Serotec
unspezifisches Maus IgG	Maus	-	-		DAKO A/S

2.1.12 ALGORITHMEN ZUR VORHERSAGE VON NLS, NES UND SUMOAKZEPTORLYSINEN

NLS: PredictNLS (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/>)
 PSORT II Prediction (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>)
 NES NetNES (www.cbs.dtu.dk/services/NetNES)
 SUMO SUMOplot (www.abgent.com/tools/sumoplot)

2.1.13 LÖSUNGEN, PUFFER, MEDIEN

Blot-Puffer

25mM Tris, 200mM Glycin, 20% Methanol

Bradford-Reagenz

0,12mM Coomassie-brilliant-blue G250, 5% Ethanol, 10% ortho-Phosphorsäure

Calciumchloridlösung

60mM CaCl₂, 15% Glycerin, 10mM MOPS

Coomassie Entfärber

40% Methanol, 10% Essigsäure

Coomassie Entfärber kolloidal

10% Ethanol, 2% ortho-Phosphorsäure

Coomassie Färbelösung –kolloidal-

10% Ethanol, 2% ortho-Phosphorsäure, 5% Aluminiumsulfat-Hydrat, 0,02%

Coomassie-brilliant-blue G250

Coomassie Färbelösung

40% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Coomassie-brilliant-blue G250

Dialysepuffer

50mM HEPES pH 7,5, 200mM NaCl, 5% Glycerin, Proteaseinhibitorcocktail

Elutionspuffer GST-Fusionsprotein-Aufreinigung

50mM Tris pH 8,0, 10mM reduziertes Glutathion, Proteaseinhibitorcocktail

Import-Puffer

20mM HEPES, 37,5mM NaCl, 100mM KOAc, 5mM MgOAc, 0,5mM EGTA,
 250mM Saccharose, Proteaseinhibitorcocktail, pH 7,4

Laufpuffer

50mM Tris, 400mM Glycin, 2% SDS

LB – Medium nach Lennox

10g/l Baktotrypton, 85mM NaCl, 5g/l Hefeextrakt, pH 7,0, 20g/l Agar Agar (für Platten)

Lysepuffer HIS- Fusionsprotein-Aufreinigung

50mM Tris, 500mM NaCl, 2mM MgOAc, 5mM β -Mercaptoethanol, Proteaseinhibitorcocktail

PBS

140mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 1,8mM KH_2PO_4 , pH 7,4

PBS-KM

PBS +1mM MgCl_2 , 3mM KCl, Proteaseinhibitorcocktail

PBS-KMT

1mM MgCl_2 , 3mM KCl, 1mM EDTA, 0,1% Tween20, 20mg Lysozym, Proteaseinhibitorcocktail

Probenpuffer SDS-PAGE

150mM Tris, 2% SDS, 30% Glycerin, 15% β -Mercaptoethanol, 18mg/l Bromphenolblau

RIPA-Puffer

50mM Tris.HCl, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 1% IGEPAL, 0,5% Deoxychelate, Proteaseinhibitorcocktail

SD-medium

6.7 g/l „Yeast nitrogen base without amino acids“, 20 g/l Agar Agar (für Platten), 100 ml/l passende sterile 10X Dropout Solution, 2% Glucose

SDS-PAGE Gel-Lösungen

Tabelle 7: Zusammensetzung von Gellösungen.

	Sammelgel	7,5%	10%	12,5%	15%
H ₂ O [ml]	6,1	12,13	10,25	7,95	5,9
30% Acryl-Bisacrylamidmix [ml]	1,3	6,25	8,35	10,425	12,5
1,5M Tris pH 8,8 [ml]	-	6,25	6,25	6,25	6,25
0,5M Tris pH 6,8 [ml]	2,5	-	-	-	-
10% SDS [ml]	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
10% Ammoniumpersulfatlösung [ml]	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
TEMED [ml]	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125

TAE – Puffer

40mM Tris, 1mM EDTA, 1,14% Essigsäure

TB – Medium

12g/l Baktotrypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4% Glycerin, 17mM KH_2PO_4

TE-Puffer + Lithiumacetat

10mM Tris, 1mM EDTA, 100mM LiAc

Waschpuffer HIS- Fusionsprotein-Aufreinigung

50mM Tris, 500mM NaCl, 2mM MgOAc 5mM β -Mercaptoethanol

YPD-Medium

10g/l Hefeextrakt, 20g/l Pepton, 120mM Glucose, pH 6,5

Z-Puffer

115mM Na_2HPO_4 , 45mM NaH_2PO_4 , 10mM KCl, 2mM MgSO_4 , pH 7,0

2.2 METHODEN

2.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1.1 ANZUCHT VON BAKTERIEN

E.coli wurden standardmäßig in flüssigem LB-Medium nach Lennox kultiviert. Bei Anzucht von transformierten Bakterien wurde das dem Plasmid entsprechende Antibiotikum zugegeben. Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$, Kanamycin in einer Endkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Für eine Anzucht auf Agarplatten wurde das Medium mit 15g/l Agar versetzt. In Ausnahmefällen wurde für die Anzucht TB-Medium benutzt.

2.2.1.2 HERSTELLUNG CHEMISCH-KOMPETENTER ZELLEN

400ml LB-Medium wurden mit 4ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Bei $\text{OD}_{600}=0,375$ wurden die Bakterien in Zentrifugenbechern für 10min auf Eis inkubiert und anschließend bei 1600g und 4°C für 7min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert und erneut für 5min bei 1100g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40ml CaCl_2 -Lösung aufgenommen und für 30min auf Eis inkubiert. Nach angeschlossener fünfminütiger Zentrifugation bei 4°C und 1100g wurde das Pellet in 8ml

CaCl₂-Lösung aufgenommen, aliquotiert und nach Einfrieren im flüssigen Stickstoff bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 TRANSFORMATION

Um Plasmid-DNA in Bakterien einzuschleusen wurden 100µl chemisch-kompetenter Bakterien mit entsprechender Menge DNA gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein kurzer Hitzeschock der Bakterien bei 42°C für 2 min. Nach Zugabe von 1ml LB-Medium wurden die Zellen für 30-60min bei 37°C schüttelnd inkubiert und schließlich auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert.

2.2.1.4 PLASMIDPRÄPARATION

Zur Präparation von Plasmiden wurden *E.coli* XL1 mit dem entsprechenden Plasmid transformiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Aufreinigung der Plasmide wurden verschiedene Kits benutzt. Zur Präparation im kleinen Maßstab („Minipräp“) wurde das Kit *NucleoSpin® Plasmid* der Firma Macherey & Nagel, für eine Präparation im großen Maßstab („Maxipräp“) das Kit *PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit* der Firma Invitrogen verwendet. Die Präparationen wurden jeweils nach Protokoll der Firma durchgeführt.

2.2.1.5 KLONIERUNGEN UND RESTRIKTIONEN

Zur Restriktion von Plasmiden und PCR-Fragmenten wurden Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer der Firma New England Biolabs verwendet. Der Restriktionsansatz mit 20µl Endvolumen wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Wurde die restringierte DNA für Klonierungen eines PCR-Fragments benutzt, so wurde 25ng Vektor mit PCR-Fragment in einem 5-molaren Überschuss über Nacht bei 16°C ligiert. Der 20µl Ligationsansatz wurde anschließend komplett transformiert und positive Klone durch einen Testverdau selektiert und mittels Sequenzierung verifiziert.

2.2.1.6 AGAROSEGELE

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Elektrophorese wurden Agarosegele verwendet. Je nach Größe der Fragmente wurden 1-2g Agarose in 100ml TAE-Puffer durch Kochen gelöst und mit 6µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Im Gel aufgetrennte DNA wurde anschließend mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.1.7 AMPLIFIKATION VON DNA-FRAGMENTEN MITTELS PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde standardmäßig die Taq-Polymerase der Firma Ambion verwendet. 50µl PCR Standardansatz enthielten Puffer, je 10pmol forward und reverse Primer, je 0,2mM von jedem dNTP, ca.10ng Plasmid und 5U der Polymerase. Ein Standardprogramm begann mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 96°C für 5 min. Die angeschlossene Schleife bestand zumeist aus 25-35 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt (96°C für 1min), einer Annealing-Phase (5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer für 1min) und einer Elongations-Phase (72°C für 1min/kb). Das Programm schließt mit einer finalen Elongations-Phase von 10min bei 72°C. Analyse des Produktes erfolgte über Gelelektrophorese.

2.2.1.8 REINIGUNG UND AUFKONZENTRIERUNG VON DNA

Zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung von DNA wurden unterschiedliche Methoden verwendet. Für das Aufreinigen von DNA-Banden aus einem Agarosegel wurde ein entsprechendes Kit der Firma Invitrogen verwendet (PureLink™ Quick Gel Extraction Kit). Die DNA wurde in low-melt-Agarose aufgetrennt. Zur Fällung von DNA wurde der DNA-Lösung Natriumacetat zugegeben (300mM Endkonzentration aus einer 3M Natriumacetatlösung mit einem pH-Wert von 5,5) und anschließend die Lösung mit 2,5 Volumen eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt. Nach Zentrifugation bei 16000g und 4°C für 5 min wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet mit eiskaltem 70%igen unvergällten Ethanol gewaschen. Anschließend wurde unter denselben Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das getrocknete Pellet im gewünschten Volumen Puffer aufgenommen.

2.2.1.9 ORTSGERICHTETE MUTAGENESE

Für das Einbringen von Mutationen in verschiedene Gene wurde das auf PCR basierende Mutagenese Kit der Firma STRATAGENE (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit oder QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit) verwendet und nach Protokoll durchgeführt. Die entsprechenden Primersequenzen wurden online mit dem Programm der Firma STRATAGENE erstellt und über die Firma Operon Biotechnologies GmbH bezogen. Die Mutageneseansätze wurden in *E.coli XL10 Gold* oder *E.coli XL blue* (STRATAGENE) nach Protokoll transformiert. Für die Mutagenese von HIF-1 α K477A und K547A wurde das Mutagenese-Kit der Firma Finnzymes verwendet und laut Protokoll für die PCR phosphorylierte Primer verwendet.

2.2.1.10 DNA SEQUENZIERUNG

Mit Sequenzierungen von Plasmiden wurde die Firma SeqLab GmbH beauftragt.

2.2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.2.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN

Für die Experimente wurden die verschiedenen Zelllinien in Zellkulturflaschen als Monolayer kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), 40 μ g/ml Penicillin-G und 80 μ g/ml Streptomycin-Sulfat verwendet und die Zellen bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ vermehrt. Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen passagiert, indem sie durch Trypsin von der Flasche gelöst und in neuem Medium ausgesät wurden. Für die verschiedenen Versuche wurden Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 15cm oder 10cm, 6-well Platten und 24-well Platten verwendet. Für Fluoreszenzanalysen wurden 24-well Platten zusätzlich mit Deckgläschen versehen. Am Vortag des Versuches wurden 2x10⁶ Zellen in 15cm Schalen, 5x10⁵ Zellen in 10cm Schalen, 2x10⁵ Zellen in 6-well Platten und 2x10⁴ Zellen in 24-well Platten ausgesät. Für Versuche unter Hypoxie wurden die Zellen in der invivo₂ Hypoxia Workstation 400 für 4 Stunden bei 1% Sauerstoff inkubiert.

2.2.2.2 TRANSFEKTION

Für die Transfektion mit zirkulärer Plasmid DNA wurden entsprechende Zellen bis zu einem Zellrasen von ca. 70% Dichte kultiviert. Vor der Transfektion wurde das Kulturmedium durch antibiotikafreies DMEM mit 10% FKS ersetzt. Hauptsächlich wurde liposomale Transfektion mit dem Transfektionsreagenz FuGENE HD der Firma Roche durchgeführt. Die DNA wurde zunächst in serumreduziertem OPTIMEM gelöst. Pro µg DNA wurden 3µl FuGENE HD zum Transfektionsansatz gegeben, der Ansatz für 20min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Mengen der DNA und die daraus resultierenden Volumen der Transfektionsansätze variierten je nach Größe der Kultur und sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Transfektionsansätze für Transfektion mit FuGENE HD.

Platten/ Kulturschalen	Kulturvolumen [ml]	Optimem [µl]	DNA/FuGENE [µg/µl]	Volumen auf Zellen [µl]
24well	0,5	100	2/6	25
6well	2	100	2/6	100
10cm Ø	10	500	10/30	500
15cm Ø	20	1000	20/60	1000

2.2.2.3 ZELLAUFSCHLUSS

Zur Analyse wurden die Zellen zunächst zweifach mit PBS gewaschen, geerntet und anschließend bei 3000g und 4°C für 5min pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in RIPA-Puffer aufgenommen und die Proteinkonzentration über die Proteinbestimmung nach Bradford bestimmt.

2.2.2.4 LOKALISATIONSSTUDIEN MIT FLUORESCENZ-MARKIERTEN PROTEINEN

Die entsprechenden Zellen wurden 24h vor der Transfektion in 24-well Platten auf Deckgläschen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den Plasmiden, die für das GFP-Fusionsprotein codierten, transfiziert. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend 20min zum Fixieren in 3,7% Formaldehyd in PBS inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen

erneut dreimal mit PBS und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Deckgläschen wurden schließlich in einem Tropfen Eindeckmedium (ProLong® Gold antifade reagent with DAPI von Molecular Probes, Inc.) auf Objektträgern fixiert. Nach Aushärten des Eindeckmediums konnten die Zellen dann am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

2.2.2.5 KERNEXPORTBLOCK MIT LMB

Um den Einfluss des Kernexports auf bestimmte Proteine zu untersuchen, wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert und mit entsprechenden Plasmiden transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde der Inhibitor des Kernexports Leptomycin B (LMB) ins Medium gegeben (20ng/ml) und 4-5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträgern wie beschrieben fixiert und am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.2.6 IMMUNFLUORESZENZ

Die Zellen wurden in 24-well Platten auf Deckgläschen kultiviert und ggf. transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS bevor die Zellen in kaltem 0,5% Triton X100 in PBS permeabilisiert wurden. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen über Nacht in 0,4% fish skin gelatine (FSG) in PBS blockiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper entsprechend in 0,2% FSG verdünnt und für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Nach zweimaligem Waschen wurde anschließend der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Nach abschließendem Waschen wurden die Zellen auf Objektträgern fixiert, wie zuvor beschrieben.

2.2.2.7 IMMUNPRÄZIPITATION

Die entsprechenden Zellen wurden in 15cm-Schalen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in RIPA-Puffer lysiert. 2mg Gesamtzelllysate wurde dann für eine Immunpräzipitation eingesetzt.

Das Gesamtzelllysate wurde in einem Gesamtvolumen von 900µl RIPA-Puffer aufgenommen und mit 100µl Protein G-Agarose Suspension (Amersham) zum

„Preclearen“ versetzt und für 2h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Agarose durch Zentrifugation abgetrennt und der Proteinlösung der entsprechende Antikörper zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Protein-Antikörper-Komplexe mit 100µl Protein G-Agarose Suspension gefällt und der Komplex durch Aufkochen der Agarose in 30µl Probenpuffer denaturiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Western Blot analysiert.

2.2.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.2.3.1 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten und aufgereinigten rekombinanten Proteinen wurde die Methode nach Bradford verwendet. In einer Mikrotiterplatte wurde zunächst eine Standardreihe angelegt, indem BSA von 0 bis 10,5µg in physiologischer Kochsalzlösung auf ein Endvolumen von 21µl verdünnt wird. Ebenso wurde die Proteinlösung entsprechend auf ein Endvolumen von 21µl in Kochsalzlösung verdünnt. Nach Zugabe von 200µl Bradford-Reagenz konnte die Absorption bei 595nm im ELISA-Reader gemessen und darüber die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

2.2.3.2 SDS-PAGE

Die Proteine wurden je nach der molekularen Masse der Zielproteine in 7,5%-igen, 10%-igen, 12,5%-igen oder 15%-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proteinproben wurden für 5min bei 96°C in Probenpuffer aufgekocht, und anschließend auf das Gel aufgetragen (Lösungszusammensetzung siehe Tabelle 7). Die Elektrophorese erfolgte bei 120V, als Größenstandard diente die vorgefärbte Proteinleiter *PageRulerTM* der Firma Fermentas Life Sciences.

2.2.3.3 COOMASSIE FÄRBUNG

Um Proteine im Gel sichtbar zu machen, wurden diese mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Hierfür wurde das Gel zunächst 20-30min in Färbelösung geschwenkt, und anschließend in Entfärbelösung wieder entfärbt. Da Coomassie

mit Proteinen einen stabilen Komplex bildet, blieben die Proteine angefärbt und waren als Bande identifizierbar. Für einige Gele wurde auch die etwas sensitivere Methode mit kolloidalem Coomassie durchgeführt. Hierfür wurde das Gel zunächst 3 x 5 Minuten in destilliertem Wasser geschwenkt und anschließend in Farbelösung inkubiert, bis die Banden sichtbar waren. Gegebenenfalls wurde das Gel kurz in Entfärbelösung geschwenkt, um den Hintergrund auszuwaschen.

2.2.3.4 WESTERN BLOT

Um mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine immunologisch nachzuweisen, wurden Proteine aus einem Polyacrylamid-Gel im Halb-nass-Verfahren auf eine Nitozellulosemembran (Amersham) geblottet. Dazu wurde die in Blot-Puffer getränkte Membran auf das Gel gelegt. Von beiden Seiten wurden zusätzlich zwei in Puffer getränkte Filterpapiere aufgelegt und über einen Blotter eine Spannung angelegt. Für den Transfer auf die Membran wurden die Proteine bei 10V für eine Stunde geblottet. Um den Transfer zu bestätigen und Luftblasen auszuschließen wurde die Membran anschließend in Ponceau S-Lösung (Sigma Aldrich) gefärbt und in destilliertem Wasser wieder entfärbt. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen der Membran blockiert. Hierfür wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Milchlösung (5g Trockenmilchpulver in 100ml PBS) inkubiert. Danach wurde die Membran für eine Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert. Entsprechend der Spezifität des Antikörpers wurde dieser in 3%-iger Milchlösung verdünnt (siehe Tabelle 6, Antikörper). Nach dreimaligem Waschen der Membran in PBS für jeweils 10min wurde der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper in entsprechender Verdünnung auf die Membran gegeben und eine Stunde inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde anschließend durch Waschen der Membran entfernt. Die Entwicklung des Blots erfolgte über Aufsprühen von Visualizer™ Spray & Glow™ ECL Western Blotting Detection System (Millipore) und anschließendem Auflegen eines Röntgenfilms (Amersham).

2.2.3.5 PROTEIN ÜBEREXPRESSION

Zur Überexpression von verschiedenen Proteinen wurden zunächst die entsprechenden Plasmide in spezielle Expressionsstämme (siehe Tabelle 4)

transformiert und der Transformationansatz direkt in eine 100ml Übernachtskultur gegeben. Aus dieser Übernachtskultur wurde die Überexpressionskultur am nächsten Tag angeimpft. Die optische Dichte sollte zu Beginn $OD_{600}=0,1$ betragen. Die Kultur wurde schüttelnd bei 37°C inkubiert bis die optische Dichte einen Wert von $OD_{600}=1,0$ erreichte. Die Proteinexpression wurde nun mit IPTG in einer Endkonzentration von 0.5-2 mmol/l induziert, außerdem wurde der Kultur Ethanol in einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Die Kultur wurde anschließend für weitere 4h oder über Nacht bei 30°C inkubiert. Die erfolgreiche Überexpression wurde durch SDS-PAGE überprüft.

2.2.3.6 AUFREINIGUNG VON GST-FUSIONSPROTEINEN

Bakterienkulturen mit überexprimiertem GST-Fusionsprotein wurden zunächst abzentrifugiert und das Pellet entweder bis zur Weiterverarbeitung eingefroren oder direkt in 20ml/l Bakterienkultur Resuspensionspuffer PBS-KMT aufgenommen. Die Lösung wurde dann für 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien mittels Ultraschall aufgeschlossen wurden. Um Zelltrümmer und unlösliche Proteine abzutrennen wurde die Suspension anschließend bei 20000g und 4°C für eine Stunde zentrifugiert.

Der Überstand wurde dann mit 3ml Glutathion-Sepharose 4B (Amersham) in einem Falconröhrchen gemischt, wobei die Sepharose zuvor mit 30ml PBS-KMT durch dreimalige Waschzentrifugation (1000g, 4°C, 5 min) equilibriert worden war. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Sepharose erfolgte durch Inkubation auf einer rotierenden Plattform bei 4°C für 2 Stunden oder über Nacht. Anschließend wurde die Sepharose zweimal mit PBS-KMT gewaschen und die Sepharose in 15ml PBS-KM-Puffer resuspendiert. Die Sepharose-Suspension wurde auf eine Säulenvorrichtung gegeben. Die sedimentierte Sepharose wurde zweimal gewaschen und das GST-Fusionsprotein anschließend eluiert. Zur Elution wurde die Sepharose sechsmal mit jeweils 1ml Elutionspuffer mit reduziertem Glutathion kurz inkubiert und das Eluat jeweils in 1,5ml Eppendorf-Gefäßen aufgefangen. Die Fraktionen wurden mittels Dot-Blot auf Proteingehalt getestet. Proteinhaltige Fraktionen wurden in einem Dialyseschlauch (MWCO 10000Da) vereinigt und bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt und gegebenenfalls durch Einengung mittels Zentrifugation mit einem Centriprep-

Zentrifugengefäß (Ultracel YM-50, Amicon) erhöht. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Güte der gereinigten Proteine wurde mittels Elektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung oder Western-Blot analysiert.

2.2.3.7 AUFREINIGUNG VON HIS-FUSIONSPROTEINEN

Die Bakterienkulturen mit überexprimierten HIS-Fusionsproteinen wurden abzentrifugiert und das Pellet eingefroren oder direkt in Lysepuffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde 30min auf Eis inkubiert und die Bakterien anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zur Abtrennung von Zelltrümmern folgte eine Ultrazentrifugation bei 60000 rpm und 4°C für eine Stunde. Der Überstand wurde mit equilibriertem Talon (*talon metal affinity resin*, BD Biosciences, equilibriert in Lysepuffer durch zweimalige Waschzentrifugation bei 1000g, 4°C für 5min) für zwei Stunden auf einer rotierenden Plattform bei 4°C inkubiert und anschließend auf eine Säulenvorrichtung gegeben. Das Talon wurde dann mit Waschpuffer in 4 Fraktionen zu je 1ml gewaschen. Anschließend wurden die Proteine über einen Imidazol-Gradienten eluiert. Dem Waschpuffer wurde dafür 50mM, 100mM, 150mM oder 250mM Imidazol zugegeben und für jede Konzentration jeweils vier Fraktionen zu je 1ml gesammelt. Zur Analyse der Fraktionen wurden jeweils 10µl auf ein SDS-Gel aufgetragen und die positiven Fraktionen nach Coomassie-Färbung bestimmt. Diese wurden in einem Dialyseschlauch (MWCO 10000Da) vereinigt und bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt und gegebenenfalls durch Einengung mittels Zentrifugation mit einem Centriprep-Zentrifugengefäß (Ultracel YM-50, Amicon) erhöht. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.8 *IN VITRO* TRANSKRIPTION UND TRANSLATION

Zur radioaktiven Markierung verschiedener Proteine wurden diese *in vitro* transkribiert und translatiert. Dies erfolgte mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System der Firma Promega. Hierbei handelt es sich um ein Kaninchen-Retikulozytenlysats, das alle zur Transkription und Translation notwendigen Enzyme enthält. Zur radioaktiven Markierung der gebildeten Proteine

wurde dem Lysat [³⁵S]-Methionin zugesetzt, welches dann in das Protein eingebaut wurde. Ein 50µl Standardansatz beinhaltete 1µg Plasmid, das das gewünschte Protein codierte, sowie 0,74MBq [³⁵S]-Methionin (Hartmann Analytics, entspricht ca. 2µl). Der Ansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert.

2.2.3.9 GST-PULL-DOWN ASSAY

Um die Bindung von verschiedenen Proteinen an Importine zu testen, wurden die Importine α1, α3, α4, α5, α7 und β als GST-Fusionsproteine sowie GST überexprimiert und aufgereinigt. Ebenfalls wurde Importin β als HIS-Fusionsprotein exprimiert und gereinigt. Für einen Pull-Down Assay wurden jeweils 100µl equilibrierte GSH-Sepharose (Amersham) eingesetzt. Zur Equilibrierung wurden 100µl der Sepharose dreimal in Import-Puffer mittels Zentrifugation (3600rpm, 4°C, 2min) gewaschen und anschließend in 900µl Import-Puffer mit Proteaseninhibitor-Cocktail aufgenommen. Zur Immobilisierung der Importine und GST als Negativkontrolle wurden 15µg der GST-Importine oder GST über Nacht mit der Sepharose bei 4°C inkubiert. Überschüssige ungebundene Importine wurden am nächsten Tag durch zweimalige Zentrifugation der Sepharose ausgewaschen und die Sepharose jeweils in 900µl Import-Puffer mit 2mg/ml Rinderserumalbumin und Proteaseninhibitor-Cocktail aufgenommen. Es wurden anschließend Importin β-HIS in 1,5 molarem Überschuss und 10µl einer IVTT mit radioaktiv markiertem Protein zugegeben und die Ansätze für 2h bei 4°C an einer rotierenden Plattform inkubiert. Anschließend folgten fünf Waschzentrifugationen mit Import-Puffer. Nach der fünften Zentrifugation wurde die Suspension in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, die Sepharose abzentrifugiert und das Pellet zur Denaturierung der Komplexe in 60µl SDS-Probenpuffer aufgekocht. 15µl der Proben wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und die gefällten Proteine mit Coomassie gefärbt. Das Gel wurde getrocknet und die Banden der gefällten, radioaktiven Proteine mittels Autoradiographie detektiert. Densitometrische Analysen zur Signalquantifizierung wurden mit dem Programm PCBAS durchgeführt. Bei Verdrängungsversuchen mit Nucleoplasmin wurde rekombinantes His-Nucleoplasmin in vierfach molarem Überschuss zu den immobilisierten Importinen gegeben, 30min bevor das radioaktiv markierte Protein zugegeben wurde.

2.2.3.10 SUMOYLIERUNGSASSAY VON [³⁵S]-MARKIERTEM ZIELPROTEIN

Um eine Konjugation von SUMO (small ubiquitin-like modifier)-1, -2 oder -3 an HIF-1 α und HIF-2 α *in vitro* zu zeigen wurde das SUMOylierungs-Kit der Firma Boston Biochem verwendet. Das Kit beinhaltet alle Proteine und Enzyme, die für eine SUMOylierung *in vitro* nötig sind (SUMO E1 Enzym, SUMO1, UbcH9) sowie einen Reaktionspuffer und eine Mg-ATP-Lösung. Entgegen den Angaben des Herstellers wurden die einzusetzenden Mengen der einzelnen Komponenten verringert. Einem 20 μ l-Ansatz wurden 2 μ l 10x-Puffer, 1 μ l (12,5 μ M) SUMO-1, -2 oder -3, 2 μ l (5 μ M) UbcH9, 2 μ l (50nM) E1 Enzym und 1 μ l (0,5mM) Mg-ATP-Lösung zugegeben. Das zu untersuchende Protein wurde *in vitro* transkribiert und translatiert und dabei radioaktiv markiert (siehe Kapitel 2.2.3.8). Dem SUMOylierungsansatz wurden von diesem Reaktionsansatz 1-2 μ l zugegeben. Die SUMOylierung erfolgte bei 37°C für 90min. Die Reaktionsansätze wurden komplett auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Autoradiographie analysiert.

2.2.3.11 SUMOYLIERUNGSASSAY MIT REKOMBINANTEM PROTEIN

Um die SUMOylierung von rekombinantem Protein zu untersuchen wurde aufgereinigtes HIF-1 α und HIF-2 α eingesetzt. Je 5 μ g Protein wurden in einen 20 μ l SUMOylierungsansatz mit 2 μ l 10x-Puffer, 2 μ l (5 μ M) UbcH9, 2 μ l (50nM) E1 Enzym und 1 μ l (0,5mM) ATP-Lösung gegeben. Statt rekombinantem SUMO1 wurde 1 μ l eines *in vitro*-Transkriptions/Translations-Ansatzes mit [³⁵S]-Methionin eingesetzt. Der Ansatz wurde für 90min bei 37°C inkubiert und komplett auf ein SDS-Gel aufgetragen. SUMOylierung von HIF-1 α und HIF-2 α wurde anschließend über Autoradiographie analysiert.

2.2.4 YEAST TWO HYBRID ASSAY

2.2.4.1 TRANSFORMATION VON HEFE

Um Hefe zu transformieren, wurde diese zunächst über Nacht in YPD-Medium bis zu einer Dichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine neue Kultur mit 2×10^6 Zellen/ml angeimpft und bei 30°C bis zu einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml wachsen gelassen. Die Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation geerntet (5min bei 2000rpm), mit sterilem Wasser gewaschen und

nach erneuter Zentrifugation in 1ml sterilem Wasser resuspendiert. Nach Überführung in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß wurden die Zellen erneut pelletiert und in TE-Puffer mit Lithiumacetat gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet in TE-Puffer mit LiAc aufgenommen. Die Endkonzentration betrug ungefähr 2×10^9 Zellen/ml.

50µl der Suspension wurden dann mit 1µg DNA und 50µg einzelsträngiger Lachssperma-DNA gemischt und 300µl 40%-iges PEG 400 (gelöst in TE-Puffer mit LiAc) zugegeben. Der Transformationsansatz wurde für 30min bei 30°C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 15min bei 42°C im Wasserbad. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in TE-Puffer aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert.

2.2.4.2 MATCHMAKER™ GAL4 TWO-HYBRID SYSTEM 3 (CLONTECH)

Um eine Proteininteraktion zweier Proteine nachzuweisen, wurde das Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 der Firma Clontech verwendet. Die kodierenden Sequenzen von HIF-1α und HIF-2α wurden mittels PCR amplifiziert und über Restriktion mit *Bam*HI in den Vektor pGBKT7 kloniert und somit an die DNA-Bindedomäne (DBD) von GAL4 fusioniert. UBC9 lag im Vektor für die Fusion an die GAL4 Transaktivierungsdomäne (AD) pGADT7 vor. Beide Plasmide trugen unterschiedliche Selektionsmarker (*Leu* und *Trp*) und wurden in die Hefe *S.cervisiae* AH109 co-transformiert. Die co-transformierte Hefe wurde zunächst auf Doppelselektionsmedium ausplattiert (SD-Leu-Trp). Von dieser Platte wurden dann Kolonien auf vierfachem Selektionsmedium (SD-Leu-Trp-Ade-His) übertragen. Wenn Bindedomäne und Transaktivierungsdomäne in der Zelle in direkte Nähe gebracht wurden, konnten die Hefen durch die Aktivierung von Reportergenen (*His* und *Ade*) auf dieser Platte wachsen und eine *in vivo* Bindung der zwei Proteine nachgewiesen werden.

2.2.4.3 FLÜSSIGER ONPG-TEST VON POSITIVEN YEAST TWO HYBRID KLONEN

Jeweils drei positive Klone wurden für eine Übernachtskultur in SD-Selektionsmedium angeimpft. 2 ml der Übernachtskultur wurden dann in 8ml YPD-Medium gegeben und die frische Kultur bei 30°C für 3-5 Stunden schüttelnd bis zur mid-log-Phase ($OD_{600} = 0,5-0,8$) inkubiert und die OD notiert. Je 1,5 ml der

Kulturen wurden dann durch Zentrifugation für 30 sec bei 14000rpm geerntet. Die Zellen wurden jeweils in 1,5 ml Z-Puffer resuspendiert. Zellen wurden durch erneutes Zentrifugieren pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300µl Z-Puffer (Konzentrationsfaktor 5) resuspendiert. 100µl der Suspension wurden dann durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und schnellem Auftauen bei 37°C lysiert. Als Leerwert dienten 100µl Z-Puffer. Nach Zugabe von je 700µl Z-Puffer+ β-Mercaptoethanol (100ml Z-Puffer + 270µl β-Mercaptoethanol) wurden 160µl einer ONPG-Lösung (4mg/ml ONPG in Z-Puffer) zugegeben und die Zeit gemessen. Nach Entwicklung der gelben Färbung wurden dann 400µl einer 1M Na₂CO₃-Lösung zum Stoppen der Reaktion zugegeben und der Zelldebris mittels Zentrifugation abgetrennt. Die optische Dichte bei 420nm des Überstands wurde anschließend ermittelt und über die Formel

$$\beta\text{-Galaktosidase-Reaktionseinheit} = 1000 \times OD_{420} / (t \times V \times OD_{600})$$

t=Inkubationszeit

V=0,1ml x 5 (Konzentrationsfaktor)

die dazugehörigen β-Galaktosidase-Reaktionseinheiten berechnet. In einem Parallelversuch wurden die β-Galaktosidase-Reaktionseinheiten für drei Kontrollklone, transformiert mit UBC9-AD und DBD-Leervektor, ermittelt. Deren Mittelwert wurde jeweils von den berechneten Werten des Versuchs subtrahiert. Aus den ermittelten 9 Versuchswerten (3 Klone à 3 Messungen) wurden Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung bestimmt.

2.2.5 RICHTLINIEN ZUR VERSUCHSVVALIDIERUNG

Als Richtlinie zur Validierung der Ergebnisse wurden in dieser Arbeit angeführte Versuchsergebnisse in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen verifiziert. Eine Ausnahme bildet der Yeast-two-Hybrid Assay, welcher nur zweimal durchgeführt wurde. Alle angeführten Ergebnisse konnten in unabhängigen Versuchen grundsätzlich reproduziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuche wurden vorrangig qualitativ bewertet, dargestellte quantitative Auswertungen beziehen sich auf das dargestellte repräsentative Versuchsergebnis. Für Fluoreszenzmikroskopische

Aufnahmen bei Protein-Lokalisationsstudien wurden für die jeweilige Zellpopulation typische Zellen aufgenommen und die Lokalisation des entsprechenden Proteins qualitativ bewertet. Eine Analyse der Fluoreszenzintensitäten wurde nicht durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER PAS-B-DOMÄNE VON HIF-1 α AUF DIE INTERAKTION MIT DEN IMPORTINEN

Mitglieder der Gruppe der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) sind Schlüsselregulatoren bei der Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase. Unter normoxischen Bedingungen wird die α -Untereinheit durch Prolyl-4-Hydroxylasen (PHDs) an zwei konservierten Prolinresten hydroxyliert, wodurch ein pVHL-vermittelter Abbau über das Proteasom induziert wird. In Hypoxie wird die α -Untereinheit stabilisiert und über Importin α/β vermittelten Kernimport in den Kern transportiert.

Nach Analyse der Primärstruktur von HIF-1 α können zwei theoretische NLS ermittelt werden. Die C-terminal gelegene NLS konnte *in vitro* als funktionell nachgewiesen werden [Depping et al., 2008], jedoch konnte gezeigt werden, dass auch verkürzte Konstrukte von HIF-1 α , in den Kern transportiert werden [Kallio et al., 1998]. Da PAS-Domänen ausschlaggebend für die Dimerisierung und Bindung an andere Proteine sind [Huang et al., 1993; Reisz-Porszasz et al., 1994], wird angenommen, dass durch eine solche Protein-Protein Interaktion der räumliche Zugang von Importinen zur NLS gestört wird. Aufgrund dieser Theorie sollte die Lokalisation von einer PAS-B-Deletionsmutante von HIF1- α (HIF-1 α Δ PAS B) in der Zelle analysiert werden, ebenso wie die Lokalisation von HIF-1 α - Δ PAS B K719A, einer Mutante mit einer Mutation in der funktionellen C-terminalen NLS. Dazu wurden U2OS-Zellen mit dem HIF-1 α Δ PAS B K719A kodierenden Plasmid transfiziert. Als Kontrolle diente das unmutierte HIF-1 α Δ PAS B. Die Zellen wurden mit einem anti-HIF-1 α Antikörper inkubiert, ein Cy3-gekoppelter Sekundär-Antikörper wurde zur Sichtbarmachung des Proteins verwendet. Der Zellkern wurde zusätzlich durch Färbung der DNA mittels Hoechst 33258 dargestellt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten die Lokalisationen der Proteine dann analysiert werden. Die Lokalisation von HIF-1 α Δ PAS B veränderte sich im Vergleich zum Wildtyp HIF-1 α nicht. Unter Normoxie und Hypoxie wird das Protein weiterhin in den Kern transportiert, wo es dann über den Antikörper nachgewiesen werden konnte (siehe Abb.5). Eine zusätzliche Mutation in der C-terminalen NLS bewirkte eine Veränderung der Lokalisation. Diese HIF-1 α -Mutante konnte nicht

mehr in den Zellkern transportiert werden und war mit dem Antikörper nur im Zytoplasma nachweisbar.

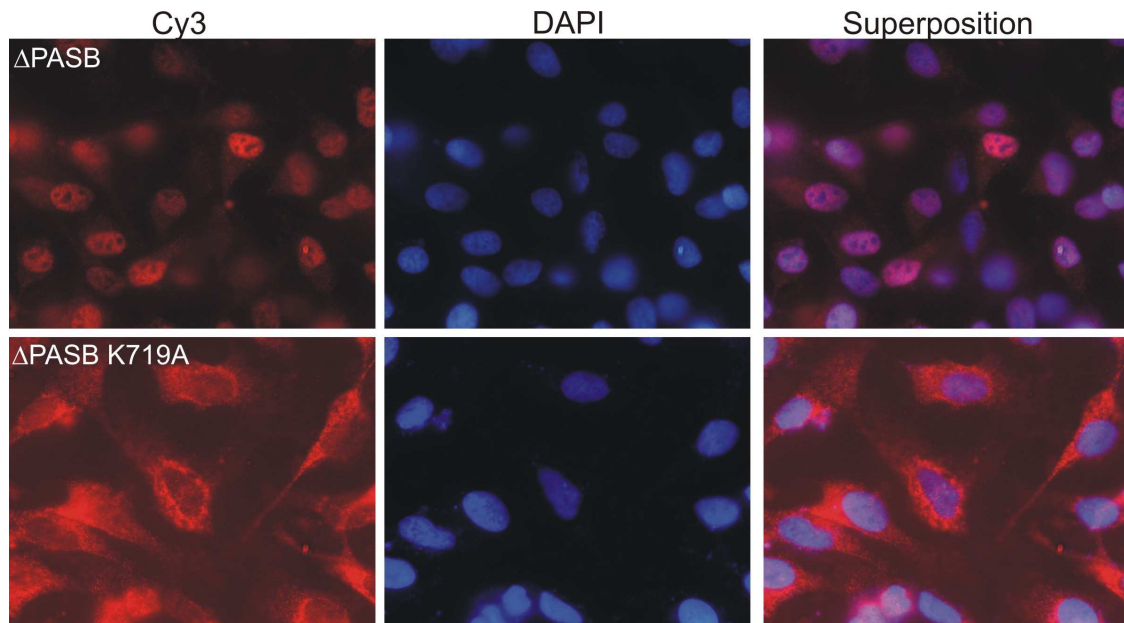


Abb.5: Lokalisation von HIF-1α ΔPAS B und HIF-1α ΔPAS B K719A. Dargestellt ist die Lokalisation von HIF-1α ΔPAS B und ΔPAS B K719A. HIF 1α wurde jeweils über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die DNA der Zellkerne wurde mit DAPI eingefärbt. HIF-1α ΔPAS B zeigt die für HIF-1α typische Lokalisation im Zellkern, die Mutante HIF-1α ΔPAS B K719A zeigt im Gegensatz dazu zytoplasmatische Lokalisation. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUM KERNTTRANSPORT DER PHDS

3.2.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR BINDUNG VON PHD1 AN DIE IMPORTINE

Wichtige Faktoren der Expression hypoxischer Zielgene sind die HIF-α hydroxylierenden Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD1, -2 und -3). Eine Studie mit PHD-GFP-Fusionsproteinen zeigte unterschiedliche Lokalisationen der drei PHDs in der Zelle. Während PHD1 ausschließlich im Kern zu finden ist, scheint PHD2 hauptsächlich im Zytoplasma vorzukommen. PHD3 lässt sich in beiden Zellkompartimenten in ausgeglichenen Mengen finden [Metzen et al., 2003].

Um den Mechanismus des Kernimports von PHD1 zu untersuchen, wurde zunächst die Bindung von Importinen an PHD1 untersucht. Dazu wurden Expressionvektoren, die die ubiquitär vorkommenden Importine (α1, α3, α4, α5, α7

und β) als GST-Fusionsprotein kodieren, in *E.coli* überexprimiert. Nach Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden sie für Interaktionsstudien verwendet. Um die Bindung von PHD1 an die Importine zu überprüfen, wurde PHD1 *in vitro* transkribiert und translatiert und radioaktiv markiert. In einem Pull-down Assay wurde dann eine mögliche Bindung von PHD1 an die immobilisierten Importine analysiert.

In Abbildung 6 ist ein repräsentativer Pull-down Assay für PHD1 dargestellt. Im mit Coomassie-brilliant-blue gefärbten Gel sieht man die immobilisierten Importin α s, und, da ein alternativer ausschließlich Importin β vermittelter Kernimport in Frage kommen kann, Importin β . GST ohne Fusionsprotein dient als Negativkontrolle.

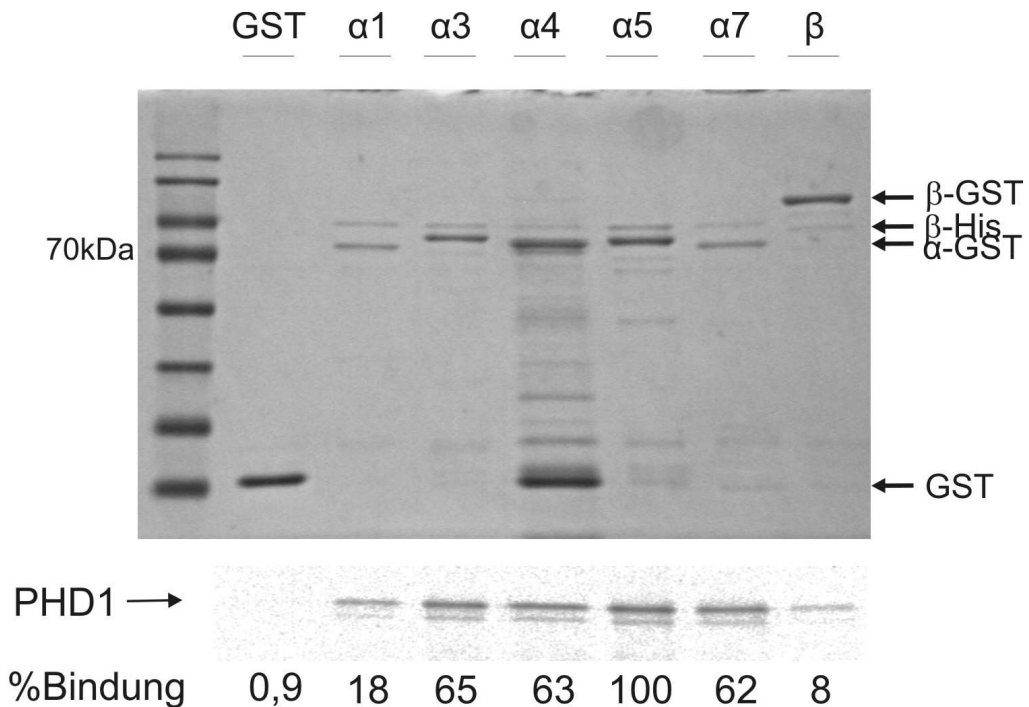


Abb.6: Pull-down Assay von PHD1 mit Importinen. Dargestellt ist ein repräsentativer Pull-down Assay von PHD1 mit den Importinen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und β . GST-fusionierte Importine wurden auf Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit radioaktiv markiertem PHD1 inkubiert. Die Interaktion lässt sich mittels SDS-PAGE (oben) und Autoradiographie (unten) nachweisen. Im Coomassie-brilliant-blue gefärbten Gel sieht man die immobilisierten Importine, in der Autoradiographie die Bande des daran gebundenen [^{35}S]-PHD1. Die stärkste Bindung zeigt sich für PHD1 mit Importin $\alpha 5$ (100% Bindung). Eine starke Bindung ist an alle anderen Importin α s nachweisbar. PHD1 bindet kaum an Importin β (8% Bindung). Der Pull-down Assay von GST dient als Negativkontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für 8 unabhängig durchgeführte Versuche. Die repräsentative densitometrische Auswertung bezieht sich auf den abgebildeten Versuch.

Die Autoradiographie des Gels zeigt eine radioaktive Bande bei ca. 47kDa, der molekularen Masse von PHD1, bei allen Importin α s, keine Bande in der Negativkontrolle und nur eine schwache Bande bei Importin β . Es zeigt sich die stärkste Bindung von PHD1 an Importin α 5. Bei densitometrischen Analysen wird diese Bindung gleich 100% gesetzt. Es lässt sich nur eine leicht schwächere Bindung an Importin α 3, α 4 und α 7 (65%, 63%, 62% Bindung) zeigen, die Bindung an Importin α 1 ist stark schwächer (18% Bindung), aber immer noch deutlich stärker als für Importin β (8% Bindung). PHD1 bindet demnach *in vitro* direkt an alle Importin α s und nur schwach an Importin β .

3.2.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DER BINDUNG VON PHD1 AN DIE IMPORTINE

Um die Spezifität der Bindung von PHD1 an die Importine zu zeigen, wurde ein Verdrängungsexperiment mit Nucleoplasmin durchgeführt. Nucleoplasmin besitzt den Prototyp einer *bipartite* NLS und bindet die Bindungstaschen der Importine mit hoher Affinität. Bei einer spezifischen Bindung einer PHD1-NLS an die Importine sollte die Bindung durch das Nucleoplasmin verdrängt bzw. abgeschwächt werden. Abbildung 7 zeigt einen repräsentativen Pull-down Assay von PHD1 mit und ohne Zugabe von Nucleoplasmin. Beide Ansätze wurden dann in der Autoradiographie verglichen. Für alle Importine zeigt sich eine deutliche Verdrängung von PHD1 durch Nucleoplasmin. Setzt man bei densitometrischer Auswertung die stärkste Bindung von PHD1 an Importin α 5 auf 100% Bindung, so zeigt sich für alle Ansätze von Importin α s ohne Nucleoplasmin mehr als 50% Bindung. Gibt man zu den Ansätzen mit Importin α s Nucleoplasmin, verringert sich die Bindung von PHD1 auf weniger als 12%. Die schwache Bande von Importin β lässt sich durch Nucleoplasmin nicht verdrängen.

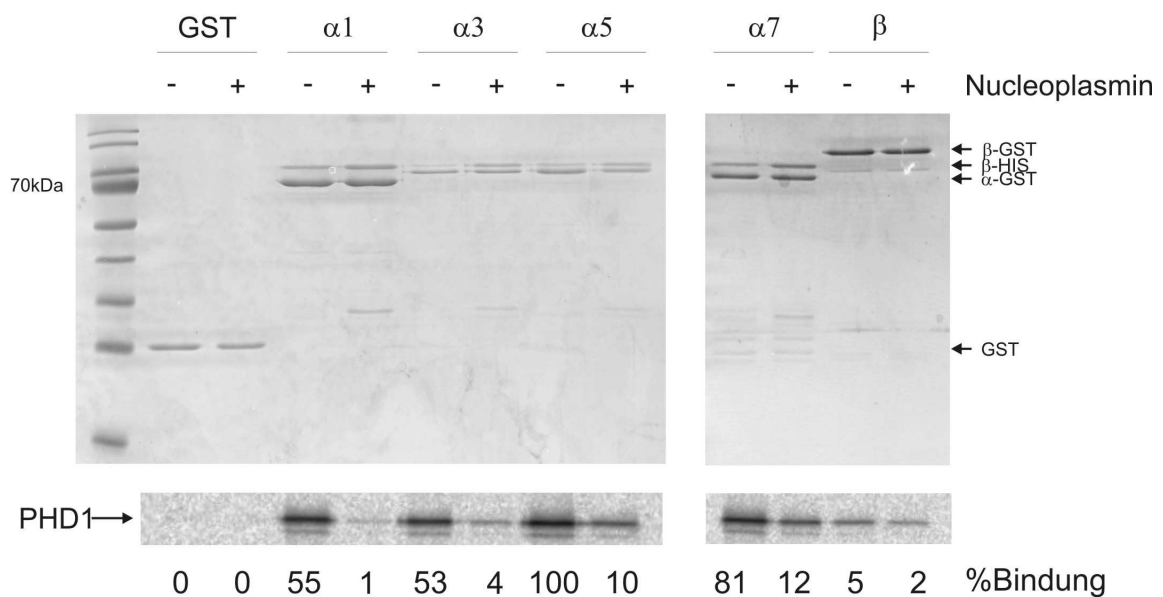


Abb.7: Spezifitätstest der Bindung von PHD1 an die Importine. Dargestellt ist ein repräsentativer Pull-down Assay von PHD1 mit den Importinen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und β ohne Zugabe von Nucleoplasmin (-) und mit Zugabe von Nucleoplasmin in 4M Überschuss zu den Importinen (+). GST-fusionierte Importine wurden auf Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit [^{35}S]-PHD1 und ggf. mit Nucleoplasmin inkubiert. Die Interaktion von PHD1 mit Importinen und eine Verdrängung von PHD1 durch Nucleoplasmin lässt sich mittels SDS-PAGE (oben) und Autoradiographie (unten) nachweisen. Im Coomassie-brilliant-blue gefärbten Gel sieht man die immobilisierten Importine, in der Autoradiographie die Bande des [^{35}S]-PHD1. Die stärkste Bindung zeigt sich für PHD1 mit Importin $\alpha 5$ (100%). Ohne Zugabe von Nucleoplasmin zeigt sich eine Bindung an die Importin $\alpha 5$ von über 50%, bei Zugabe von Nucleoplasmin verringert sich die Bindung auf weniger als 12%. Importin β bindet kaum, GST dient als Negativkontrolle des Versuchs. Die Abbildung ist repräsentativ für 4 unabhängig durchgeführte Versuche. Die repräsentative densitometrische Auswertung bezieht sich auf den abgebildeten Versuch.

3.2.3 CHARAKTERISIERUNG DER NLS VON PHD1

Um die Bindung von PHD1 an die Importine genauer zu charakterisieren, wurde die Aminosäuresequenz analysiert. Über den Algorithmus von PredictNLS konnte eine potentielle *monopartite* NLS zwischen Aminosäure P117 und Aminosäure E123 vorhergesagt werden (PKRKWAE). Um diese Sequenz auf Funktionalität zu testen, wurden über ortsgerichtete Mutagenese Punktmutationen in diesem Bereich gesetzt. Da die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin den Charakter einer NLS ausmachen, wurde zunächst das Lysin 118 durch Alanin ersetzt. Über einen Pull-down Assay sollte dann die Bindung dieser Mutante (PHD1 K118A) an die verschiedenen Importine getestet werden. PHD1 K118A wurde radioaktiv markiert und in einem GST-Pull-down Assay eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation eines Lysins der vorhergesagten NLS ausreicht, um die

Bindung an die Importine deutlich abzuschwächen (siehe Abb.8). Dies wird durch eine deutlich geringere Bandenstärke der Mutante im Vergleich zum Wildtyp bei allen getesteten Importinen deutlich.

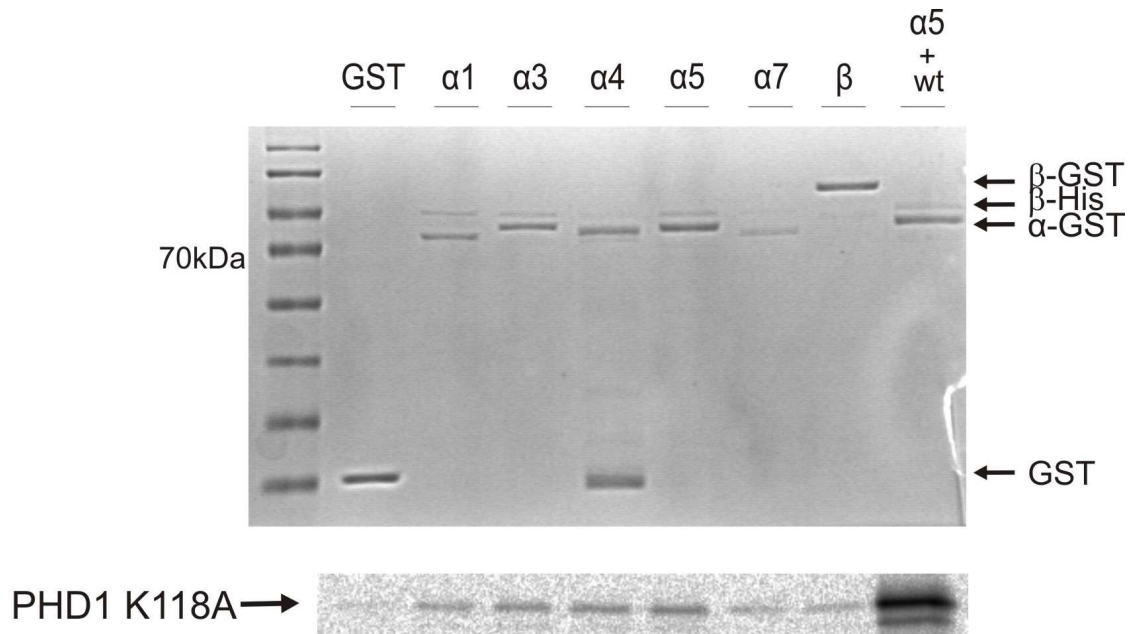


Abb.8: Pull-down Assay von PHD1 K118A mit Importinen. Dargestellt ist ein repräsentativer Pull-down Assay von PHD1 K118A mit den Importinen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und β . GST-fusionierte Importine wurden auf Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit [35 S]-PHD1 K118A inkubiert. Die Interaktion lässt sich mittels SDS-PAGE (oben) und Autoradiographie (unten) nachweisen. Im Coomassie-brilliant-blue gefärbten Gel sieht man die immobilisierten Importine, in der Autoradiographie die Bande des daran gebundenen [35 S]-PHD1 K118A. Als Vergleich dient ein Pull-down Assay von [35 S]-PHD1 mit Importin $\alpha 5$ ($\alpha 5$ +wt). Die Bindung der Mutante ist im Gegensatz zum Wildtyp deutlich abgeschwächt. Der Pull-down Assay mit GST dient als Negativkontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

Um einen Einfluss der Mutation auf Vorgänge in der Zelle zu untersuchen, wurde dieselbe Mutation auch in ein PHD1-GFP-Fusionsprotein (PHD1 K118A-GFP) eingebracht. Das Plasmid, das für diese Mutante kodierte, wurde dann zunächst in HeLa-Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente PHD1-GFP. Die Lokalisation von PHD1 K118A-GFP wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und mit der Lokalisation von PHD1-GFP verglichen. Während PHD1-GFP wie zuvor bereits beschrieben ausschließlich im Zellkern vorliegt (siehe Abb.9, oben) zeigt sich für PHD1 K118A-GFP eine teilweise Verschiebung des Proteins aus dem Kern. Es liegt vermehrt im Zytoplasma vor, jedoch weiterhin hauptsächlich im Zellkern (siehe Abb.9, unten). Da der Kernimport des Proteins und die Bindung

des Proteins an die Importine zwar gestört, aber nicht aufgehoben werden konnte, wurde eine zweite Punktmutation in das Protein eingeführt. Das zweite Lysin (K120) der putativen NLS wurde ebenfalls durch ein Alanin ersetzt (PHD1 K118AK120A und PHD1 K188AK120A-GFP). Untersuchungen im Pull-down Assay und in der Zelle zeigten keinen Unterschied der Doppelmutante zur Punktmutante. Um einen Zelltyp-spezifischen Effekt der HeLa-Zellen auszuschließen wurden zusätzlich sowohl U2OS- als auch COS-7-Zellen mit PHD1-GFP, PHD1 K118A-GFP und PHD1 K118AK120A-GFP transfiziert. Für beide Zelllinien zeigte sich ebenfalls nur eine teilweise Verschiebung des Proteins aus dem Kern ins Zytoplasma.

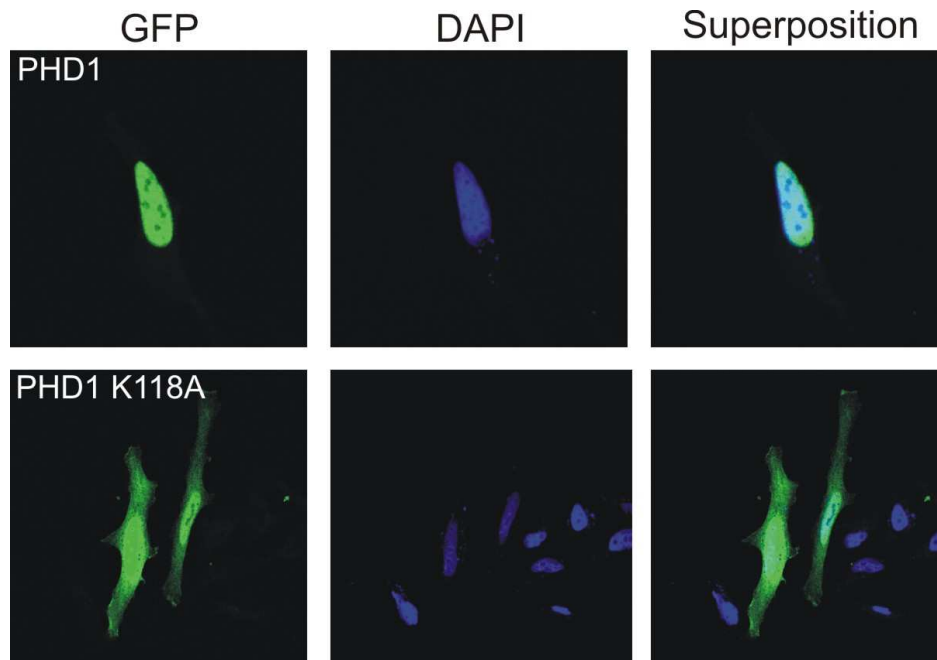


Abb.9: Lokalisation von PHD1 und PHD1 K118A in der Zelle. Dargestellt ist transient transfiziertes PHD1-GFP und PHD1 K118A-GFP. Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Bei der Überlagerung beider Bilder zeigt sich, dass PHD1 ausschließlich im Zellkern zu finden ist, für die Mutante jedoch eine Verteilung in der gesamten Zelle zu beobachten ist. Die Abbildung ist repräsentativ für 5 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.2.4 CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNG VON PHD1 AN IMPORTIN $\alpha 5$

Um die NLS und deren Bindung an die Importine weiter zu charakterisieren, sollte ermittelt werden, welche Importin-Bindungstasche für die Bindung ausschlaggebend ist. Mutanten von Importin $\alpha 5$ mit Punktmutationen in

verschiedenen ARM-Motiven (ARM2, ARM3, ARM7, ARM3/8), die die Funktionalität der ersten (ARM2, ARM3), zweiten (ARM7) oder beiden (ARM3/8) Bindungstaschen außer Kraft setzten, wurden in *E.coli* JM101 überexprimiert und als GST-Fusionsproteine aufgereinigt. Im Pull-down Assay mit [³⁵S]-PHD1 wurden sie im Vergleich zu Importin α5 eingesetzt.

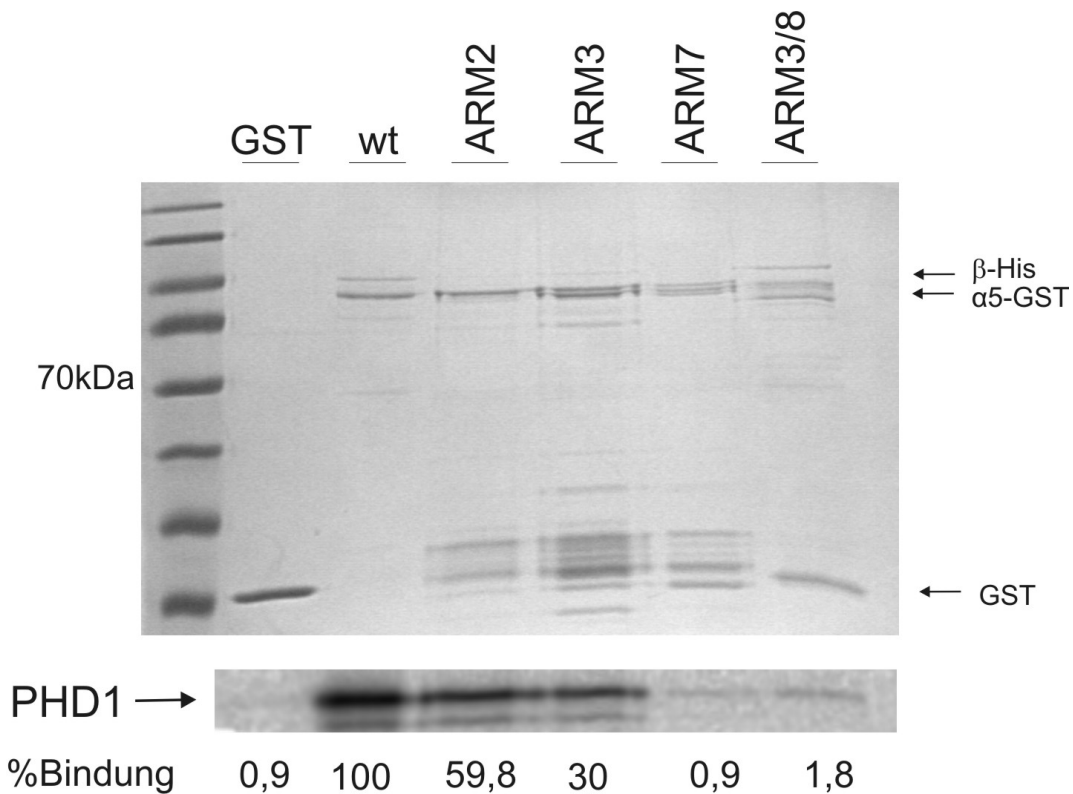


Abb.10: Pull-down Assay von PHD1 mit Importin α5 ARM-Mutanten. Dargestellt ist ein repräsentativer Pull-down Assay von PHD1 mit verschiedenen Mutanten von Importin α5. Bei den Mutanten ist entweder die N-terminale Bindungstasche (ARM2, ARM3), die C-terminale Bindungstasche (ARM7) oder es sind beide Bindungstaschen (ARM3/8) durch Mutation funktionsuntüchtig. GST-fusionierte Importine wurden auf Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit [³⁵S]-PHD1 inkubiert. Die Interaktion lässt sich mittels SDS-PAGE (oben) und Autoradiographie (unten) nachweisen. Im Coomassie-brilliant-blue gefärbten Gel sieht man die immobilisierten Importine, in der Autoradiographie die Bande des daran gebundenen [³⁵S]-PHD1. Bei Mutation der N-terminalen Bindungstasche zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp (100% Bindung) weiterhin eine Bindung des Proteins (59,8%, 30% Bindung). Bei Mutation der C-terminalen Bindungstasche keine Bindung (0,9%, 1,8% Bindung). Der Pull-down Assay von GST dient als Negativkontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche. Die densitometrische Auswertung bezieht sich auf den abgebildeten Versuch.

Die Autoradiographie des Pull-down Assays (siehe Abb.10) zeigt, dass eine Mutation der ersten Bindungstasche (ARM2, ARM3) die Bindung von PHD1 an Importin $\alpha 5$ abschwächt. Die densitometrische Auswertung zeigt eine Abschwächung der Bindung auf 60% bzw. 30% im Vergleich zu Importin $\alpha 5$. Eine Mutation der zweiten Bindungstasche (ARM7, ARM3/8) hat massiven Einfluss auf die Bindung von PHD1. Die Autoradiographie zeigt nur ein schwache Bande, die Bindung von PHD1 an Importin $\alpha 5$ verringert sich auf 0,9% bzw. 1,8%. Eine Bindung von PHD1 an Importin $\alpha 5$ kann nicht mehr stattfinden.

3.2.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR TEILUNGSABHÄNGIGKEIT DER KERNLOKALISATION VON PHD1 K118A

Da PHD1 trotz Mutation der vorhergesagten NLS hauptsächlich im Zellkern zu finden ist, wurde untersucht, worauf dies zurückzuführen ist. Besitzt PHD1 keine NES und wird nicht aus dem Kern transportiert, kann eine Ansammlung von PHD1 K118A auf einen Zellteilungseffekt zurückzuführen sein. Bei Neubildung der Zellkerne nach der Mitose würde PHD1 K118A-GFP im Zellkern eingeschlossen und könnte diesen nicht wieder verlassen. Um dies zu untersuchen wurden HeLa-Zellen mit den PHD1-GFP- und PHD1 K118A-GFP-kodierenden Plasmiden transfiziert. 14 Stunden nach der Transfektion wurde die Lokalisation von PHD1 dann unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Lokalisation von PHD1 zeigte keine Veränderung zu vorherigen Versuchen, PHD1 K118A zeigte weiterhin die charakteristische Lokalisation in Zellkern und Zytoplasma (siehe Abb.11, Mitte). In einem weiteren Versuch, den Teilungseffekt auszuschließen, wurden die Zellen im Zellzyklus arretiert. Hierzu wurden HeLa-Zellen erneut mit den Plasmiden für PHD1-GFP und PHD1 K118A-GFP transfiziert. Nach vier Stunden Inkubation mit dem Transfektionsagens wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und das ursprüngliche Medium durch Medium mit nur 0,5% FKS ersetzt. Dies hat einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus zur Folge. Auch bei diesem Experiment zeigte sich kein Unterschied der Lokalisation von PHD1 K118A-GFP im Vergleich mit den vorherigen Ergebnissen. PHD1 K118A-GFP lag in Zellkern und Zytoplasma vor (siehe Abb.11, unten).

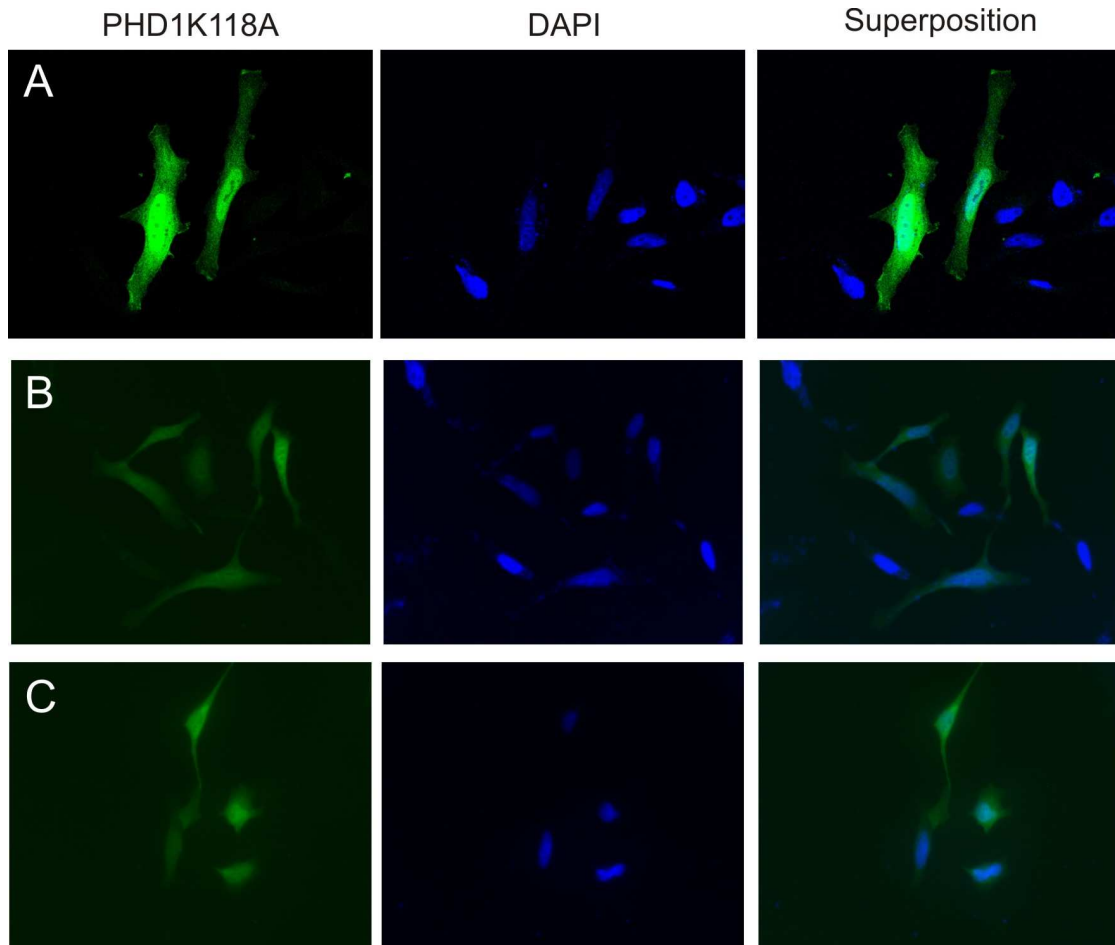


Abb.11: Lokalisation von PHD1 K118A in der Zelle 14 Stunden nach Transfektion und nach Zellzyklusarrest. Dargestellt ist die Lokalisation von PHD1 K118A-GFP in unbehandelten Zellen (A). Im Vergleich dazu wurde die Lokalisation von PHD1 K118A-GFP 14 Stunden nach Transfektion (B) analysiert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Lokalisation. Zusätzlich wurde in PHD1 K118A-GFP transfizierten Zellen 4 Stunden nach der Transfektion das Kulturmedium durch Medium mit 0,5%FKS ersetzt, wodurch ein Zellzyklusarrest eingeleitet wurde (C). Auch in diesem Versuch änderte sich die Lokalisation des Proteins nicht. Die DNA im Zellkern wurde jeweils mit DAPI angefärbt. Die Abbildung ist repräsentativ für jeweils 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.2.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHEN *BIPARTITE* NLS VON PHD1

Da der Kernimport von PHD1 durch Mutation der vorhergesagten NLS nicht vollständig unterbunden wurde, wurde die Aminosäuresequenz von PHD1 dahingehend untersucht, ein mögliches zweites basisches Cluster zu finden, das mit dem bereits charakterisierten eine *bipartite* NLS bilden könnte. Etwa 15 Aminosäuren Richtung N-Terminus (upstream) und 13 Aminosäuren Richtung C-Terminus (downstream) von PHD1 konnte jeweils ein Lysin gefunden werden (K102 und K133). Durch ortsgerichtete Mutagenese von PHD1 K118AK120A-GFP

wurden diese Lysine jeweils durch Alanin ersetzt. Die entstandenen Vektoren, die PHD1 K118AK120AK102A-GFP oder PHD1 K118AK120AK133A-GFP kodieren, wurden im Vergleich mit PHD1 K118AK120A-GFP in HeLa-Zellen transfiziert. Über Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation der Proteine bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Mutation der zusätzlichen Lysine, die theoretisch Teil einer *bipartite* NLS sein könnten, keine Veränderung der Lokalisation, verglichen mit der Punktmutante, auftritt. Beide dreifach-Mutanten können sowohl im Zytoplasma als auch deutlich im Zellkern beobachtet werden (siehe Abb.12).

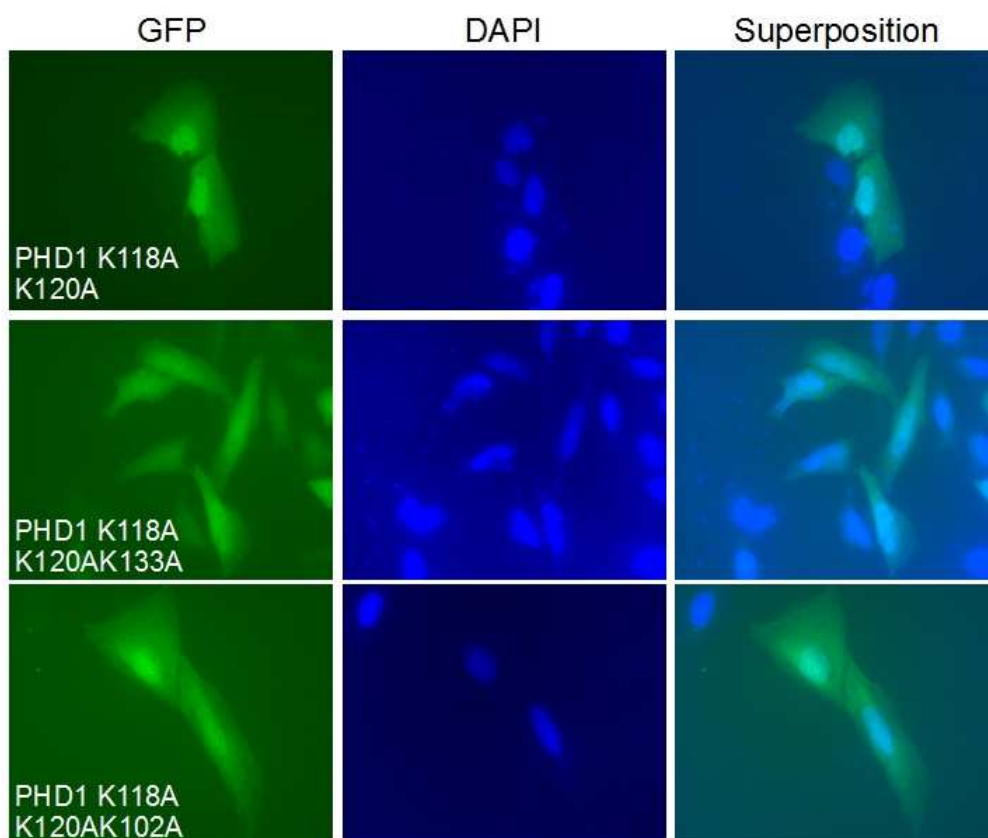


Abb.12: Lokalisation von potentiellen *bipartite* Mutanten. Dargestellt ist die Lokalisation der PHD1 dreifach-Mutanten PHD1 K118AK120AK133A-GFP und PHD1 K118AK120AK102A-GFP im Vergleich mit der Doppelmutante PHD1 K118AK120A-GFP. Durch Mutation der Lysine K118 und K120 in der potentiellen NLS von PHD1 ist der Kernimport von PHD1 gestört, aber nicht unterbunden. Auch die Mutation eines dritten Lysins 16 Aminosäuren upstream (K102A) oder 13 Aminosäuren downstream (K133A) ändert die Lokalisation des Proteins nicht. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.2.7 BINDUNG VON PHD2 AN VERSCHIEDENE IMPORTINE

Studien zeigen eine variierende Lokalisation von PHD2. Als GFP-Fusionsprotein (PHD2-GFP) liegt das Protein fast ausschließlich im Zytoplasma vor [Metzen et al., 2003]. Endogenes PHD2 lässt sich mittels Immunfluoreszenz sowohl im Kern als auch im Zytoplasma nachweisen [Berchner-Pfannschmidt et al., 2008]. Um zu untersuchen, ob ein Kernimport von PHD2 über den klassischen Importin α/β vermittelten Weg stattfindet, sollte zunächst die Bindung an die Importine in einem *in vitro* Pull-down Assay mit den Importinen untersucht werden.

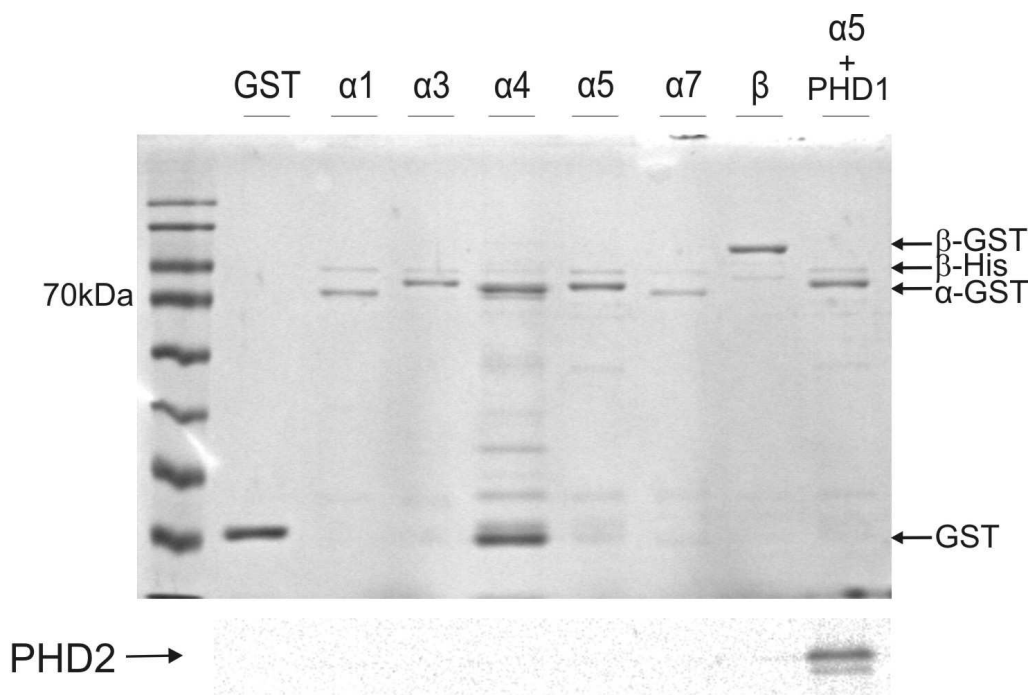


Abb.13: Pull-down Assay von PHD2 mit Importinen. Dargestellt ist ein repräsentativer Pull-down Assay von PHD2 mit den Importinen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und β . GST-fusionierte Importine wurden auf Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit [^{35}S]-PHD2 inkubiert. Als Positivkontrolle dient ein Pull-down Assay von PHD1 mit Importin $\alpha 5$. Die Interaktion lässt sich mittels SDS-PAGE (oben) und Autoradiographie (unten) nachweisen. Im Coomassiebrilliant-blue gefärbten Gel sieht man die immobilisierten Importine, in der Autoradiographie die Bande des an Importin $\alpha 5$ gebundenen [^{35}S]-PHD1. Für PHD2 zeigt sich keine Bande, es bindet nicht an die Importine. Der Pull-down Assay mit GST dient als Negativkontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für 8 unabhängig durchgeführte Versuche.

PHD2 wurde *in vitro* transkribiert und translatiert und radioaktiv markiert. Durch die Autoradiographie des Versuchs konnte gezeigt werden, dass PHD2 *in vitro* nicht an die Importine bindet. Abbildung 13 zeigt einen repräsentativen Pull-down Assay. GST diente als Negativkontrolle, Importin $\alpha 5$ im Pull-down Assay mit PHD1 als Positivkontrolle. In der Autoradiographie konnte eine Bande von PHD2 weder in Verbindung mit Importin α noch mit Importin β detektiert werden.

3.2.8 UNTERSUCHUNGEN ZUM KERNTTRANSPORT VON PHD2

Um zu untersuchen, ob PHD2-GFP in geringem Maße in den Kern transportiert wird, und anschließend exportiert wird, wurden Versuche durchgeführt, den Kernexport zu blockieren. Das importierte Protein müsste sich dann im Zellkern ansammeln. Als Kernexportblocker wurde Leptomycin B (LMB) verwendet. Es wurden zunächst U2OS-Zellen mit dem PHD2-kodierenden Plasmid transfiziert und LMB zugegeben. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Lokalisation von PHD2-GFP wurde unter dem Mikroskop untersucht. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen mit LMB behandelten und unbehandelten Zellen. Die unbehandelten Zellen zeigten die charakteristische Lokalisation von PHD2 im Zytoplasma und nur sehr wenig Protein im Zellkern. Die behandelten Zellen zeigten eine zwischen Zytoplasma und Zellkern ausgeglichene Lokalisation von PHD2 (siehe Abb.14, B). Zusätzlich wurden verschiedene andere Zelllinien dem gleichen Versuch unterzogen. Sowohl HeLa-Zellen, COS-7-Zellen als auch Kelly-Zellen zeigen die gleiche Lokalisation von PHD2 in Zellkern und Zytoplasma nach Behandlung mit LMB, während unbehandelte Zellen fast ausschließlich PHD2-GFP im Zytoplasma zeigen (siehe Abb.14, A). Als einzige getestete Zelllinie zeigen HEK293-Zellen ein anderes Ergebnis. Die zytoplasmatische Lokalisation von PHD2-GFP ändert sich in diesen Zellen nach Zugabe von LMB zum Kulturmedium nicht (nicht gezeigt).

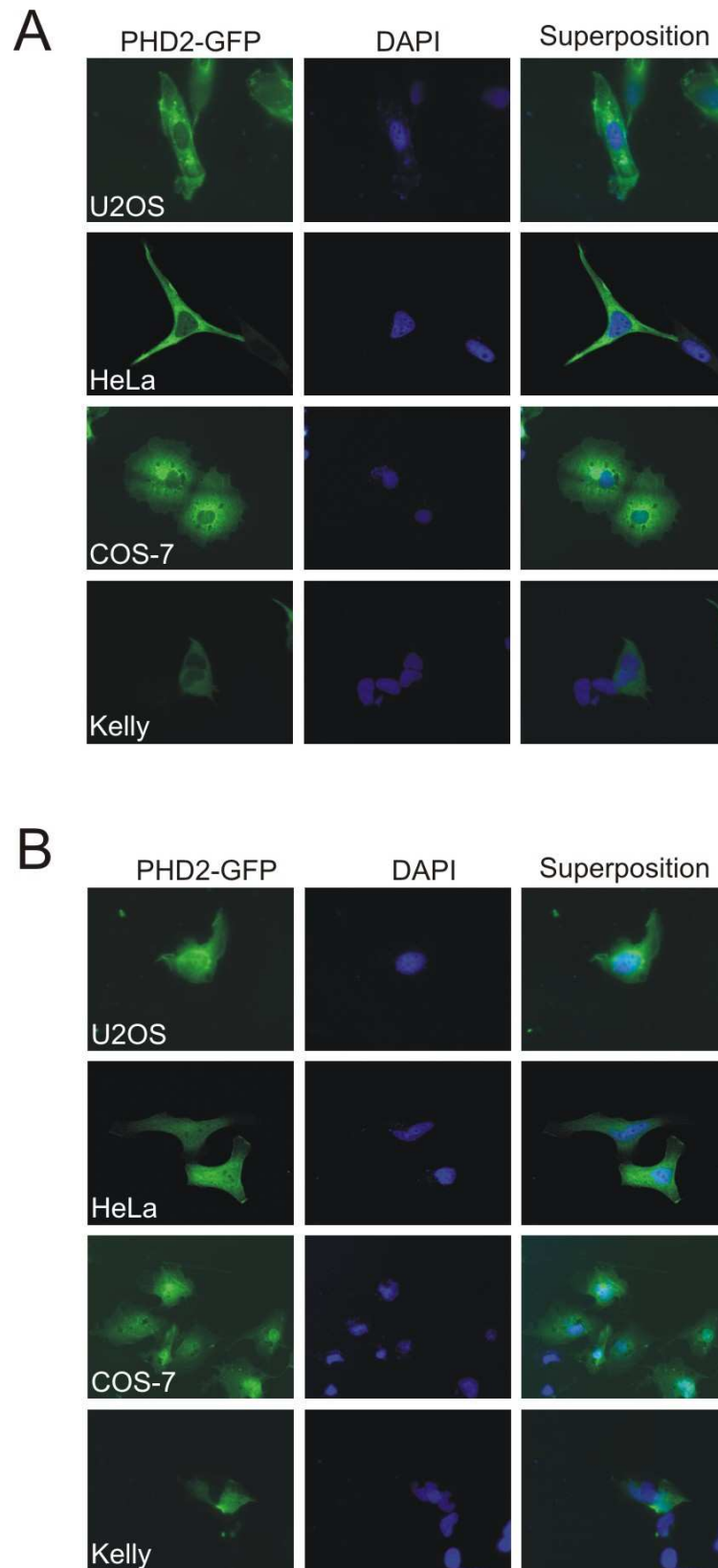


Abb.14: Einfluss von Leptomycin B auf die Lokalisation von PHD2-GFP. Dargestellt ist die Lokalisation von PHD2-GFP in U2OS-, HeLa-, COS-7- und Kelly-Zellen. Die DNA im Zellkern ist mit DAPI angefärbt. A: Ohne Zugabe von LMB zeigt das Protein in allen Zelllinien eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation. B: Nach 4h Inkubation in Medium mit 20ng/ml LMB verschiebt sich das Protein in allen Zellen in den Kern. Es zeigt sich eine zwischen Zellkern und Zytoplasma ausgeglichene Lokalisation von PHD2-GFP. Die Abbildung ist repräsentativ für jeweils mind. 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.2.9 PHD2 BINDET DAS EXPORTIN CRM1

Um eine Bindung von PHD2 an das Exportin CRM1 nachzuweisen, wurden HeLa-Zellen eingesetzt. Aus dem Gesamtzelllysate wurde PHD2 mit einem entsprechenden Antikörper gefällt. Als Negativkontrolle wurde statt des spezifischen Antikörpers ein unspezifisches Maus-IgG in gleicher Menge eingesetzt. Unter den co-präzipitierten Proteinen konnte CRM1 mittels Western Blot nachgewiesen werden (siehe Abb.15). Eine unspezifische Bindung an die Sepharose kann dabei ausgeschlossen werden, da kein CRM1 mit unspezifischem IgG gefällt wird.

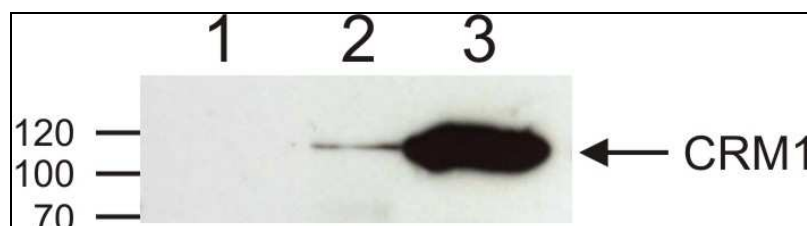


Abb.15: Immunpräzipitation von CRM1 mit PHD2. Dargestellt ist der Western Blot der Immunpräzipitation von PHD2. PHD2 wurde aus untransfizierten HeLa-Gesamtzelllysaten über einen anti-PHD2-Antikörper gefällt (2). Als Negativkontrolle wurde der Antikörper durch unspezifisches Maus-IgG ersetzt (1). Der Antikörper-PHD2-Komplex wurde über ein denaturierendes SDS-Gel aufgetrennt und CRM1 im Western Blot mit einem anti-CRM1-Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurden 50 µg HeLa-Gesamtzelllysate geladen (3). Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.2.10 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT DER VORHERGESAGTEN NES VON PHD2

Analysiert man die Aminosäuresequenz von PHD2 über den Algorithmus NetNES, so erhält man eine wahrscheinliche NES zwischen Aminosäure L188 und I198 (LPALKLALEYI). Zur Untersuchung dieser Sequenz als mögliches Kernexport-Signal wurde das für diesen Bereich kodierende Teil des PHD2-Gens mittels PCR amplifiziert und mittels der Restriktionsenzyme *Sall* und *BamHI* in den Vektor, der für GFP-fusioniertes PHD1 codiert, zwischen PHD1 und GFP einkloniert. Das dadurch entstandene Plasmid codiert somit für ein Fusionsprotein aus dem kernlokalisierten PHD1 mit der potentiellen PHD2-NES und GFP (PHD1-NES-

GFP). Für zusätzliche Untersuchungen der vorhergesagten PHD2-NES wurden die für die Aminosäuren L188-L195 kodierenden Basen mittels ortsgerichteter Mutagenese aus PHD2-GFP deletiert (PHD2-GFP Δ NES).

Um die Lokalisation beider Konstrukte zu untersuchen, wurden die kodierenden Plasmide (pEGFP-N1-PHD1-NES und pEGFP-N1-PHD2- Δ NES) jeweils in HeLa-Zellen transfiziert und die Lokalisation der Proteine über Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zu PHD2-GFP und PHD2-GFP bestimmt (siehe Abb.16). Die Lokalisation von PHD1-NES-GFP ändert sich im Vergleich zu PHD1-GFP nicht. Es liegt ausschließlich im Zellkern vor. Die Deletionsmutante PHD2-GFP Δ NES zeigt wie PHD2-GFP hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisation.

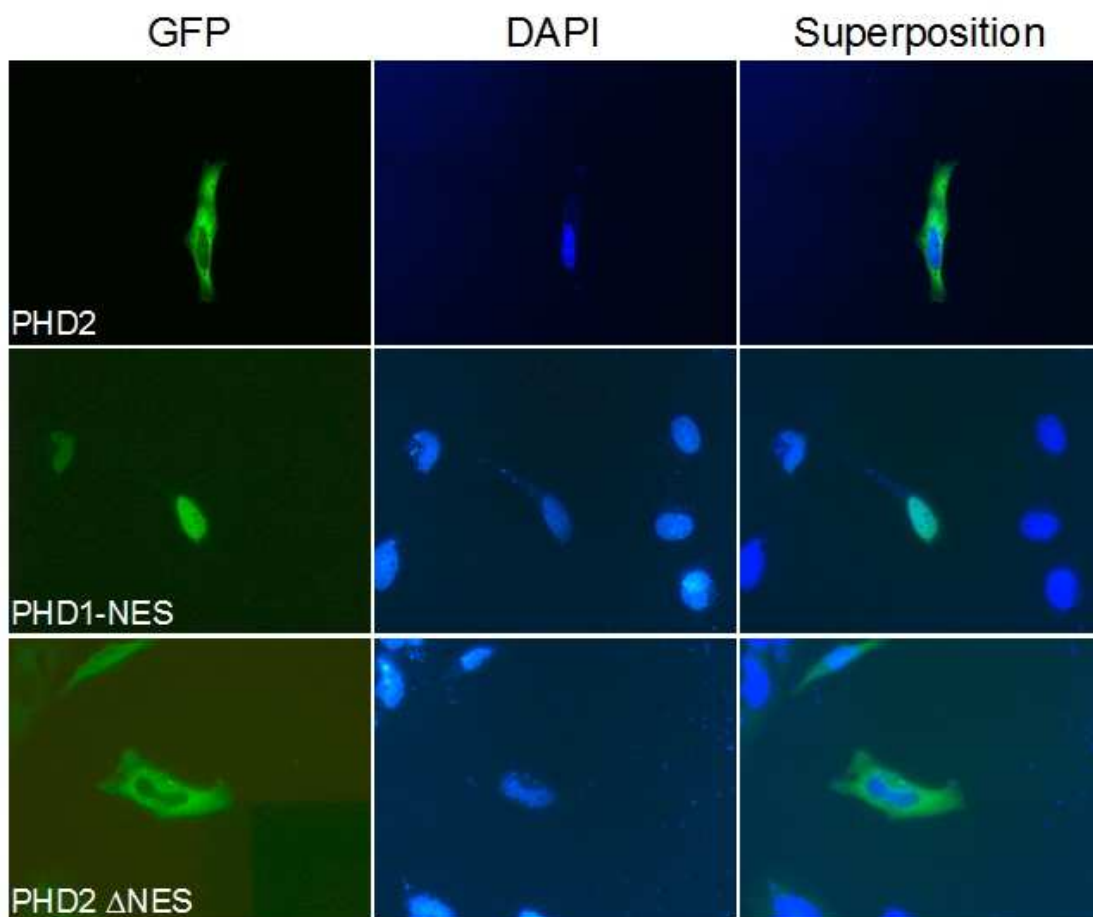


Abb.16: Lokalisation von PHD1-NES-GFP und PHD2 Δ NES-GFP. Dargestellt sind mit PHD2-GFP, PHD1-NES-GFP und PHD2 Δ NES-GFP transfizierte HeLa-Zellen. Im Vergleich zu PHD2-GFP zeigt eine Deletion der putativen NES zu keiner Veränderung der Lokalisation. Eine Fusion aus dem kernlokalisierten PHD1 und der PHD2-NES lässt sich ausschließlich im Kern detektieren. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.2.11 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT DER VORHERGESAGTEN NLS VON PHD2

Durch Analyse der Aminosäuresequenz von PHD2 lässt sich über PSORT II eine klassische NLS für PHD2 zwischen Aminosäure R99 und Aminosäure K115 (RRDNASGDAAKGKVK) vorhersagen. Um die Funktionalität dieser NLS in der Zelle zu überprüfen wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese eine Punktmutation in diese Sequenz von PHD2-GFP eingebracht. Das Lysin 111 wurde durch ein Alanin ersetzt. Die dadurch entstandene Mutante (PHD2 K111A-GFP) wurde dann in HeLa-Zellen transfiziert und die Lokalisation nach Zugabe von LMB analysiert. Als Vergleich galt PHD2-GFP. Abbildung 17 zeigt, dass PHD2 K111A-GFP wie PHD2-GFP in unbehandelten Zellen fast ausschließlich im Zytoplasma zu finden ist. Nach Zugabe von LMB verhält sich PHD2 K111A-GFP genauso wie PHD2-GFP und zeigt eine zwischen Zytoplasma und Zellkern ausgeglichene Lokalisation.

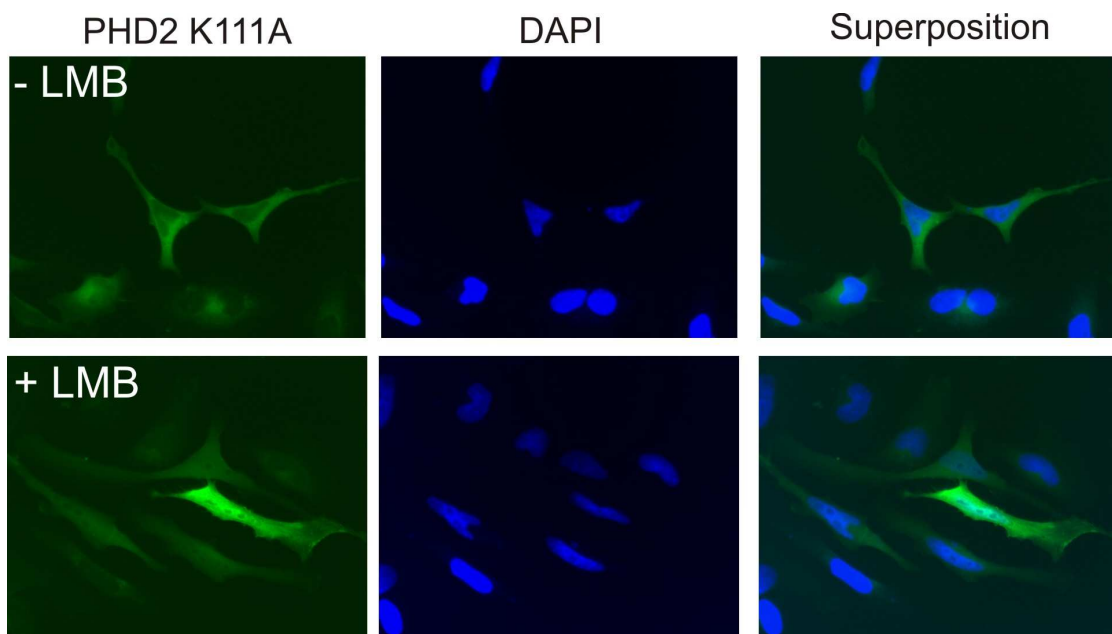


Abb.17: Einfluss von Leptomycin B auf die Lokalisation von PHD2 K111A-GFP. Dargestellt ist die Lokalisation von PHD2 K111A-GFP in HeLa-Zellen. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt. Ohne Zugabe von LMB (-LMB) zeigt das Protein wie PHD2-GFP eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation. Nach 4h Inkubation in Medium mit 20ng/ml LMB verschiebt sich das Protein in den Kern, es zeigt sich eine zwischen Kern und Zytoplasma ausgeglichene Lokalisation von PHD2 K111A-GFP (+LMB). Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.2.12 UNTERSUCHUNGEN ZUM MÖGLICHEN GEKOPPELTEN KERNIMPORT VON PHD2

Ein alternativer Weg des Kernimports für PHD2 wäre die Bindung an ein Protein, welches aktiv über Importine transportiert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Protein OS9 in der Zelle an PHD2 bindet und teilweise im Zellkern vorkommt [Baek et al., 2005]. Sollte OS9 die Transportfunktion für PHD2 ausüben, müsste es über die Importine in den Kern transportiert werden. Um eine Bindung von OS9 an die Importine nachzuweisen, wurde ein Pull-down Assay mit [35 S]-markiertem OS9 und rekombinanten Importinen durchgeführt. In der Autoradiographie des Experiments zeigt sich, dass OS9 nicht an die Importine bindet (siehe Abb.18). Um eine Rolle des OS9 beim Kerntransport von PHD2 auszuschließen wurde das V5-OS9 kodierende Plasmid in U2OS-Zellen transfiziert und die Lokalisation von OS9 in der Zelle mit und ohne LMB bestimmt. Über einen anti-V5 Antikörper und einen Alexa532 gekoppelten Sekundärantikörper wurde OS9 in der Zelle sichtbar gemacht. Es zeigte sich eine hauptsächlich kernperiphere Lokalisation (siehe Abb.19, links). Die Lokalisation änderte sich auch nicht durch Zugabe von LMB zum Kulturmedium (siehe Abb.19, rechts).

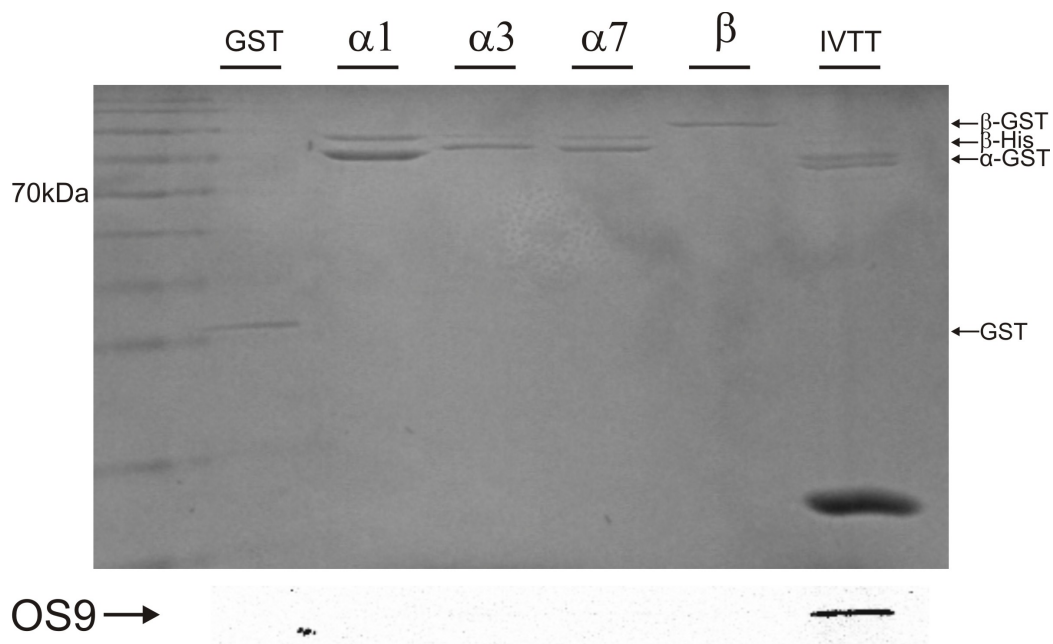


Abb.18: Pull-down Assay von OS9 mit Importinen. Dargestellt ist ein repräsentativer Pull-down Assay von OS9 mit den Importinen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 7$ und β . GST-fusionierte Importine wurden auf Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit [35 S]-OS9 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde [35 S]-OS9 aufgetragen (IVTT). Mittels SDS-PAGE (oben) und Autoradiographie (unten) lässt sich keine Interaktion von OS9 mit Importinen nachweisen. Der Pull-down Assay von GST dient als Negativkontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

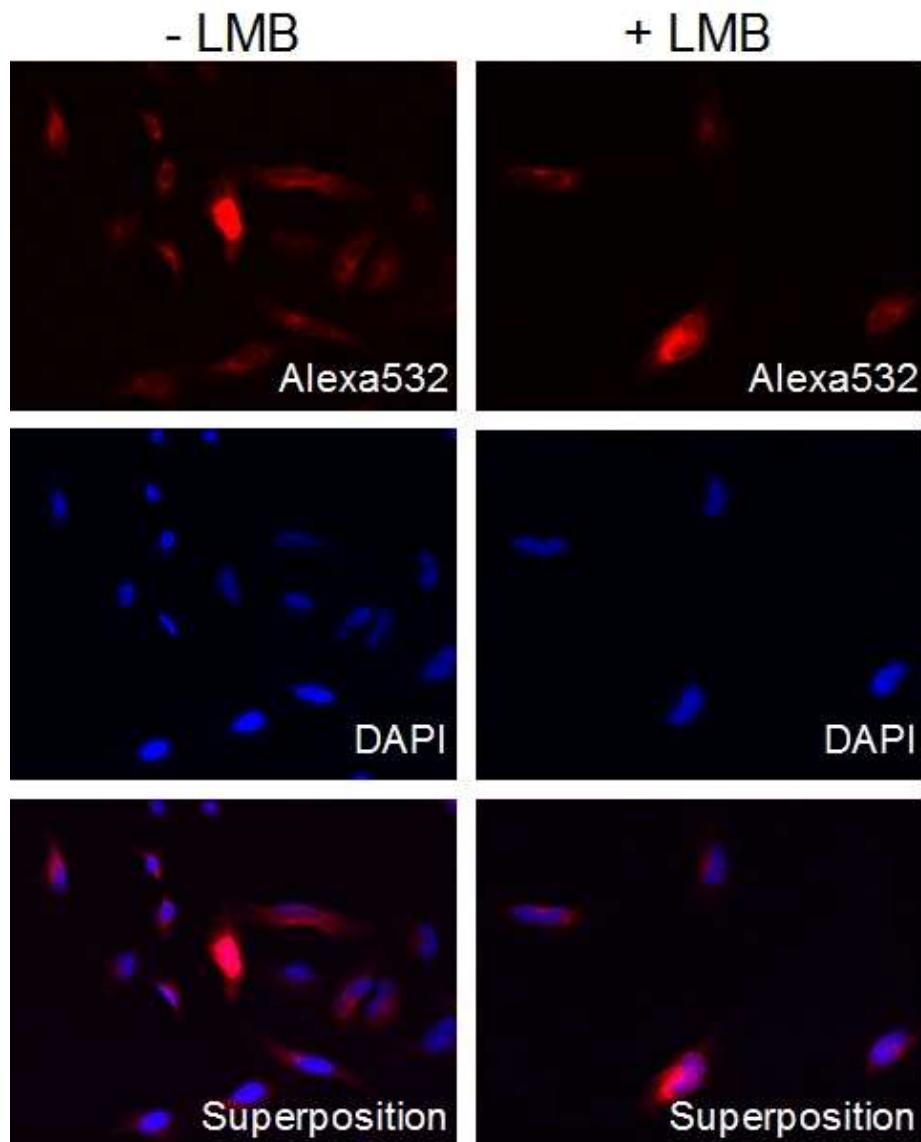


Abb.19: Lokalisation von OS9 mit und ohne Leptomycin B. Dargestellt ist die Immunfluoreszenzfärbung von OS9 in U2OS-Zellen. Über einen anti-V5-Antikörper und eine Alexa532 gekoppelten Sekundärantikörper ist das OS9 in der Zelle sichtbar gemacht. Die DNA in den Zellkernen wurde mit DAPI eingefärbt. Die Überlagerung beider Bilder zeigt eine überwiegend kernperiphere Lokalisation. Diese ändert sich auch durch Inkubation mit 20ng/ml LMB im Medium für 4 Stunden nicht. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

Ein zweites Protein, für das eine Bindung an PHD2 gezeigt werden konnte, ist der Tumorsuppressor ING4 [Ozer und Bruick, 2005]. Als Transkriptionsfaktor ist ING4 im Kern lokalisiert. Eine NLS wurde postuliert [Zhang et al., 2005]. Auch für ING4 wurde ein Pull-down Assay mit den verschiedenen Importinen durchgeführt. Für ING4 konnte eine Bindung an alle Importine gezeigt werden, wobei die Bindung an Importin $\alpha 1$ die stärkste ist und gleich 100% gesetzt wurde. Im Vergleich zu den

Importin α 5 ist die Bindung von Importin β deutlich reduziert (6% Bindung) (siehe Abb.20).

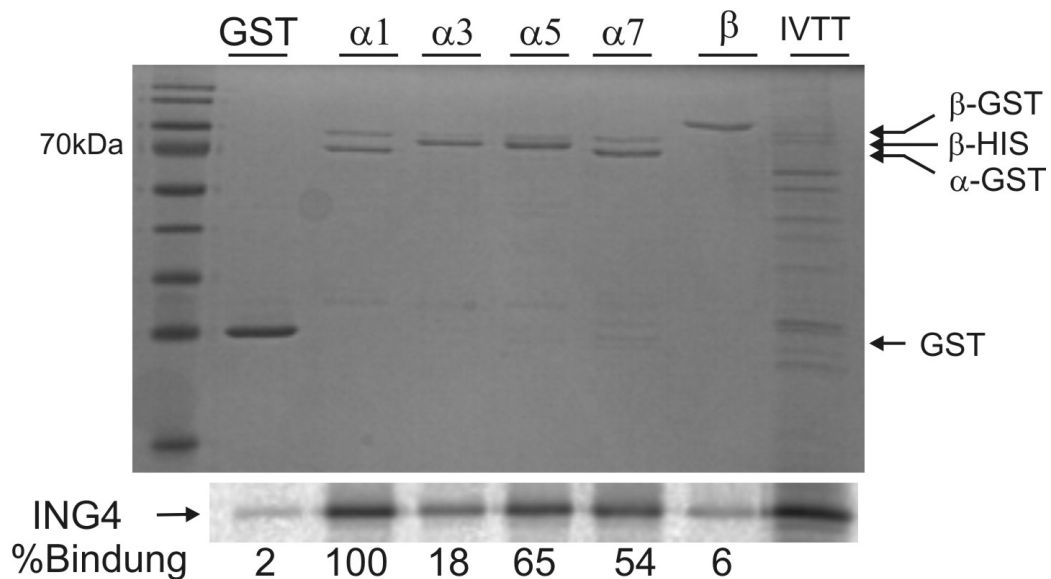


Abb.20: Pull-down Assay von ING4 mit Importinen. Dargestellt ist ein repräsentativer Pull-down Assay von ING4 mit den Importinen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und β . GST-fusionierte Importine wurden auf Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit [35 S]-ING4 inkubiert. Die Interaktion lässt sich mittels SDS-PAGE (oben) und Autoradiographie (unten) nachweisen. Im Coomassiebrilliant-blue gefärbten Gel sieht man die immobilisierten Importine, in der Autoradiographie das gebundene [35 S]-ING4. Der Pull-down Assay von GST dient als Negativkontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für 4 unabhängig durchgeführte Versuche. Die densitometrische Auswertung bezieht sich auf den abgebildeten Versuch.

3.3 SUMOYLIERUNG VON HIF-1 α UND HIF-2 α

3.3.1 Co-LOKALISATION VON HIF-1 α UND HIF-2 α MIT SUMO1

SUMOylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen, bei der das Polypeptid SUMO kovalent an ein Lysin des Zielproteins gekoppelt wird. Für den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF)-1 α konnte gezeigt werden, dass er SUMOyliert wird. Um den Einfluss der SUMOylierung auf die Hypoxie-abhängige Genexpression zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit der Einfluss der SUMOylierung von HIF-1 α und HIF-2 α in der Zelle weiter charakterisiert werden. Da eine Co-Lokalisation beider Proteine unter Hypoxie für eine SUMOylierung sprechen würde, wurden zunächst Zellen mit Plasmiden, die für SUMO-GFP und HIF-1 α bzw. HIF-2 α kodieren, transfiziert und unter Hypoxie inkubiert. Um HIF-1 α und HIF-2 α im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurde ein Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Schaut man sich die Lokalisation von SUMO1 in der Zelle an, so zeigt sich eine überwiegende Kernlokalisierung des Proteins. Geringe Mengen des Proteins sind ebenfalls im Zytoplasma zu finden. Außerdem zeigen sich häufig Anreicherungen des Proteins in Kernkörperchen. Schaut man auf die Lokalisation von HIF-1 α so zeigt sich eine Kernlokalisierung, was mit der Lokalisation von SUMO1 einhergeht. Auch HIF-2 α lässt sich vorwiegend im Zellkern finden und zeigt sich bei Co-Überexpression mit SUMO1-GFP zum Teil in denselben Strukturen. Auch HIF-2 α zeigt Proteinanreicherungen, die mit denen von SUMO-GFP überlagert sind (siehe Abb.21).

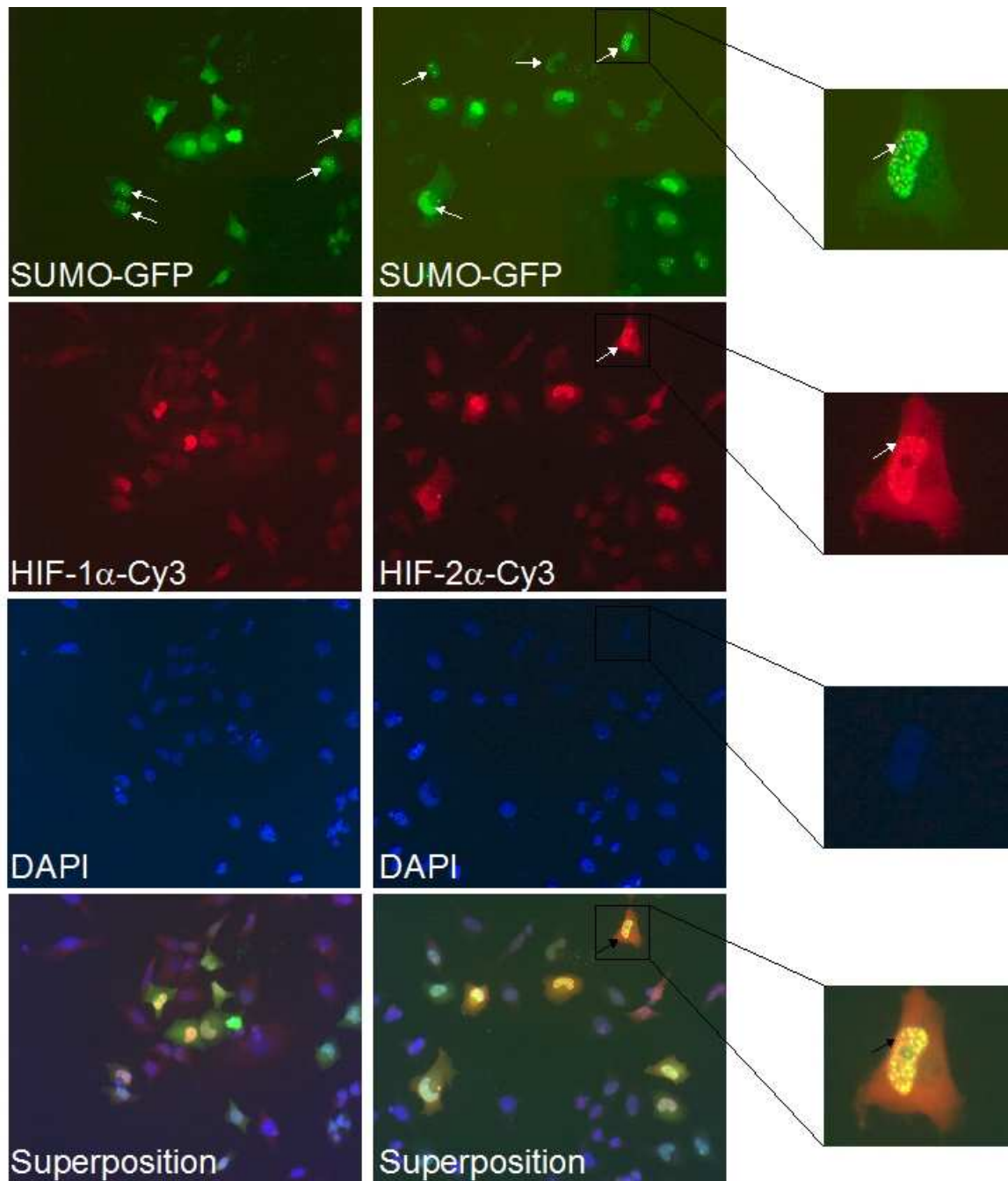


Abb.21: Co-Lokalisation von HIF-1 α und HIF-2 α mit SUMO1-GFP unter Hypoxie. Dargestellt ist die Lokalisation von HIF-1 α , HIF-2 α und SUMO1-GFP in HeLa-Zellen nach 4 Stunden Inkubation bei 1% Sauerstoff. SUMO-1 zeigt überwiegend Kernlokalisierung mit Anreicherungen in Kernkörperchen, nur wenig Protein ist im Zytoplasma zu finden. Zellkerne mit Kernkörperchen sind mit weißen Pfeilen markiert. HIF-1 α und HIF-2 α , angefärbt mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper, zeigen unter Hypoxie ebenfalls hauptsächlich Lokalisation im Zellkern. HIF-2 α ist zum Teil in ähnlichen Strukturen bzw. Kernkörperchen zu finden (weißer Pfeil), die mit den Kernkörperchen von SUMO1-GFP überlagert erscheinen (schwarzer Pfeil). Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.3.2 SUMOYLIERUNG VON HIF-1 α *IN VITRO*

Um eine mögliche SUMOylierung von HIF-1 α zu untersuchen, wurde HIF-1 α zunächst *in vitro* transkribiert und translatiert und mittels [35 S]-Methionin radioaktiv markiert. Um eine SUMOylierung zu zeigen, wurde [35 S]-HIF-1 α mit SUMO1, SUMO2 oder SUMO3 inkubiert. Durch eine SUMOylierung vergrößert sich das Molekulargewicht des Zielproteins und in der Autoradiographie des Versuchs zeigt sich eine SUMOylierung durch zusätzliche radioaktive Banden, die größer sind als das radioaktiv markierte Ausgangsprotein. Abbildung 22 zeigt die *in vitro* SUMOylierung von HIF-1 α mit SUMO1, SUMO2 und SUMO3 im Vergleich zu nicht SUMOyliertem [35 S]-HIF-1 α . Bei allen drei SUMO-Isoformen zeigen sich über der Ausgangsbande von HIF-1 α zusätzliche Banden, die bei dem unbehandeltem *in vitro* transkribierten und translatierten Protein (IVTT) nicht vorhanden sind. Bei der Reaktion mit SUMO1 und SUMO2 zeigen sich drei, bei dem Versuch mit SUMO3 nur zwei zusätzliche Banden.

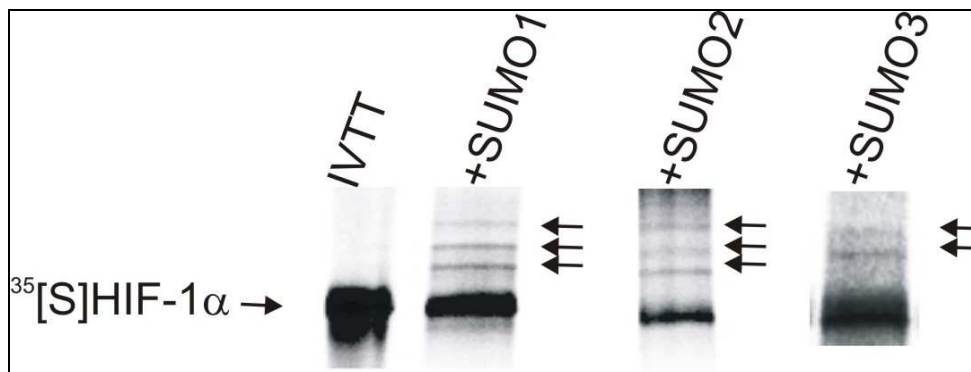


Abb.22: *In vitro* SUMOylierung von HIF-1 α . Dargestellt ist der SUMOylierungs Assay von radioaktiv markiertem HIF-1 α mit SUMO1, SUMO2 und SUMO3 im Vergleich mit nicht SUMOyliertem [35 S]-HIF-1 α (IVTT). Durch SUMOylierung entstandene zusätzliche Banden sind mit Pfeilen markiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 5 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.3.3 SUMOYLIERUNG VON REKOMBINANTEM HIF-1 α

Um die SUMOylierung von HIF-1 α weiter zu analysieren, sollte untersucht werden, ob sich eine dreifache SUMOylierung mit SUMO1 (siehe Abb.22) auch für rekombinantes HIF-1 α zeigen lässt. HIF-1 α wurde als HIS-Fusionsprotein aufgereinigt, und dann für einen SUMOylierungsversuch eingesetzt. Dafür wurde das rekombinante Protein mit radioaktivem SUMO1 inkubiert. Als Kontrolle wurde

einem Reaktionsansatz kein radioaktives SUMO1 zugegeben. Beide Ansätze wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt. Im Gel zeigt sich die Bande des rekombinanten HIF-1 α bei ca. 110 kDa. Nach dem Trocknen des Gels wurden bei der Autoradiographie zwei deutliche Banden mit größerem Molekulargewicht als das rekombinante HIF-1 α detektiert, die in der Kontrolle ohne Zugabe von [35 S]-SUMO1 nicht vorhanden sind (siehe Abb.23). Diese Banden sind auf eine zweifache SUMOylierung von rekombinantem HIF-1 α zurückzuführen.

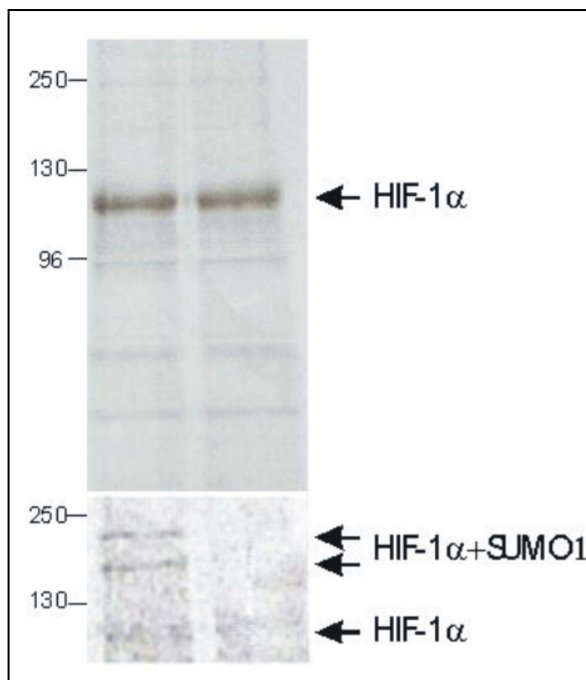


Abb.23: SUMOylierung von rekombinantem HIF-1 α . Dargestellt ist ein SUMOylierungs Assay mit 5 μ g rekombinantem HIS-HIF-1 α . Das Coomassiebrilliant-blue gefärbte Gel (oben) zeigt die Bande des rekombinanten HIF-1 α , die Autoradiographie zwei Banden des mit [35 S]-SUMO1 SUMOylierten Proteins (links). Als Kontrolle diente ein Assay ohne Zugabe von [35 S]-SUMO1 (rechts). Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.3.4 SUMOYLIERUNG VON HIF-1 α MUTANTEN

SUMO wird als postrtranslationale Modifikation kovalent an ein Lysin des Zielproteins gebunden. Dieses Lysin liegt meist in einer Konsensussequenz vor (Ψ KXE) [Rodriguez et al., 2001]. Untersucht man nun die Aminosäuresequenz von HIF-1 α nach dieser Sequenz *in silico* über den Algorithmus von SUMOplot, so kann man zehn mögliche SUMOylierungsstellen finden (siehe Abb.24).

A

No.	Pos.	Group	Score	No.	Pos.	Group	Score
1	K477	NQEV A <u>L</u> KLE PNPES	0.91	6	K310	QYRML <u>A</u> KRG GYVWV	0.62
2	K391	SLFDK <u>L</u> KKE PDALT	0.91	7	K721	NAQRK <u>R</u> KME HDGSL	0.44
3	K532	DMVNE <u>F</u> KLE LVEKL	0.85	8	K214	PQCGY <u>K</u> KPP MLCIV	0.37
4	K156	HRNGL <u>V</u> KKG KEQNT	0.76	9	K392	LFDML <u>K</u> KEP DALTL	0.37
5	K547	AEDTE <u>A</u> KNP FSIQD	0.69	10	K538	KLEIV <u>E</u> KLF AEDTE	0.15

B

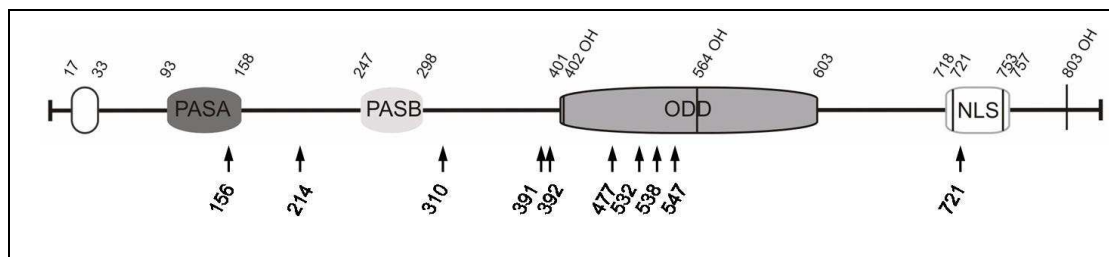


Abb.24: Potentielle SUMOylierungsstellen von HIF-1 α . Analysiert man die Aminosäuresequenz von HIF-1 α *in silico* mit SUMOplot, ergeben sich 10 verschiedene mögliche Akzeptorlysine (Pos./Group) unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit (Score) (A). Diese Lysine sind in verschiedenen Regionen von HIF-1 α , wie ODD-Domäne oder C-terminale NLS, zu finden (B).

Die Lysine K391 und K477 haben dabei die höchste Wahrscheinlichkeit, SUMOyliert zu werden. Um weitere mögliche SUMOylierungsstellen zu finden, wurden verschiedene mögliche Akzeptorlysine über ortsgerichtete Mutagenese durch Alanine ersetzt. Dabei entstanden die HIF-1 α -Mutanten K214A, K310A, K392A, K477A, K538A, K547A und K721A. Diese Mutanten wurden dann *in vitro* transkribiert, translatiert und radioaktiv markiert. Mit allen Mutanten und dem Wildtyp-Protein wurde dann ein SUMOylierungs Assay mit SUMO1 durchgeführt. Alle Ansätze wurden auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen und über Autoradiographie wurden die radioaktiven Proteine detektiert (siehe Abb.25). Der Wildtyp zeigt das für HIF-1 α und SUMO1 charakteristische Bandenmuster über der Ausgangsbande. Bis auf die Mutante K477A zeigen alle anderen Mutanten ein vergleichbares Muster. Der Austausch der Lysine K214, K310, K392, K538, K547 und K721 hat keinen Einfluss auf die *in vitro* SUMOylierung des Proteins. Als einzige Mutante zeigt HIF-1 α K477A ein verändertes Bandenmuster. Die oberen Banden sind nicht vorhanden, und auch die untere Bande lässt sich nicht mehr detektieren. Lediglich die zweite Bande über der Ausgangsbande ist noch vorhanden.

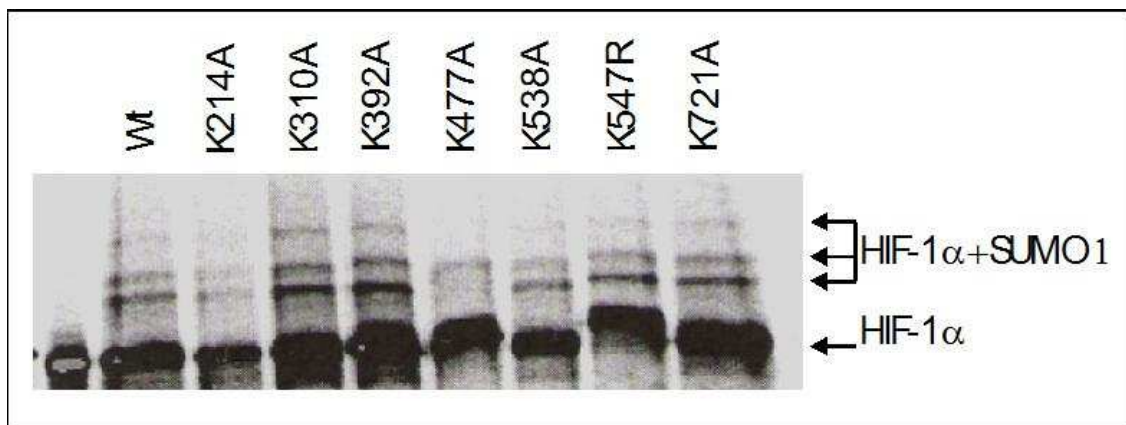


Abb.25: SUMOylierung von HIF-1α Mutanten. Dargestellt sind SUMOylierungs Assays von den HIF-1α Mutanten K214A, K310A, K392A, K538A, K547A und K721A mit SUMO1. Nur HIF-1α K477A zeigt im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes, durch SUMOylierung entstandenes Bandenmuster. Das Bandenmuster aller anderen Mutanten ist mit dem Wildtyp vergleichbar. Zusätzliche Banden sind mit Pfeilen markiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.3.5 SUMOYLIERUNG VON HIF-2α *IN VITRO*

Auch für den Transkriptionsfaktor HIF-2α sollte analog zu HIF-1α eine mögliche SUMOylierung untersucht werden. Mit radioaktiv markiertem HIF-2α wurde ein SUMOylierungs Assay durchgeführt (siehe Abb.26). Für alle drei Isoformen von SUMO zeigt sich ein vergleichbares Bandenmuster über der HIF-2α Ausgangsbande. Es können jeweils zwei zusätzliche Banden erkannt werden.

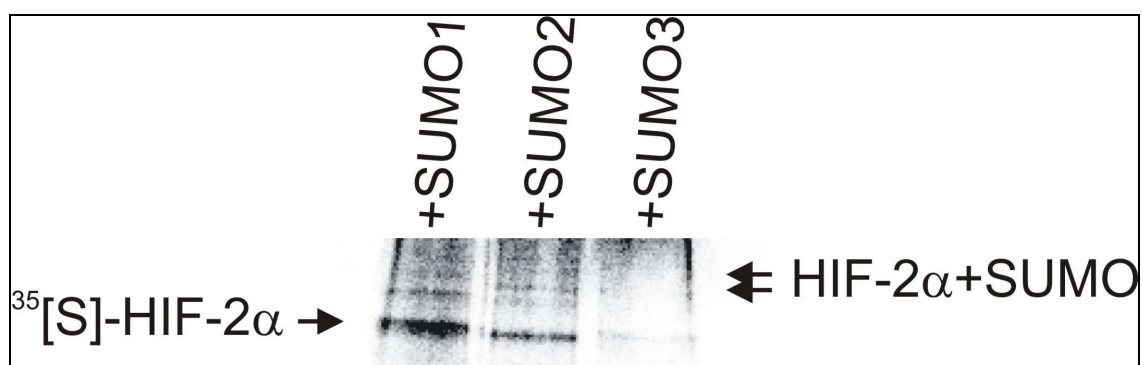


Abb.26: *In vitro* SUMOylierung von HIF-2α. Dargestellt ist der SUMOylierungs Assay von radioaktiv markiertem HIF-2α mit SUMO1, SUMO2 und SUMO3. Durch SUMOylierung entstandene zusätzliche Banden sind mit Pfeilen markiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.3.6 SUMOYLIERUNG VON REKOMBINANTEN HIF-2 α

Auch für HIF-2 α sollte die SUMOylierung weitergehend untersucht werden. Durch SUMOylierungs-Versuche mit rekombinantem HIF-2 α sollte die zweifache SUMOylierung von HIF-2 α bestätigt werden. HIF-2 α wurde als GST-Fusionsprotein aufgereinigt. Rekombinantes GST-HIF-2 α wurde dann für einen SUMOylierungs Assay mit radioaktivem SUMO1 eingesetzt. Als Kontrolle wurde einem Reaktionsansatz kein radioaktives SUMO1 zugegeben. Beide Ansätze wurden zum Vergleich auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen. Im Gel zeigt sich die Bande für das rekombinante HIF-2 α bei ca. 130 kDa. In der Autoradiographie zeigen sich zwei Banden mit höherem Molekulargewicht als rekombinantes GST-HIF-2 α , die in der Kontrolle ohne Zugabe von [35 S]-SUMO1 nicht vorhanden sind (siehe Abb.27). Diese Banden sind auf eine zweifache SUMOylierung von rekombinantem GST-HIF-2 α zurückzuführen.

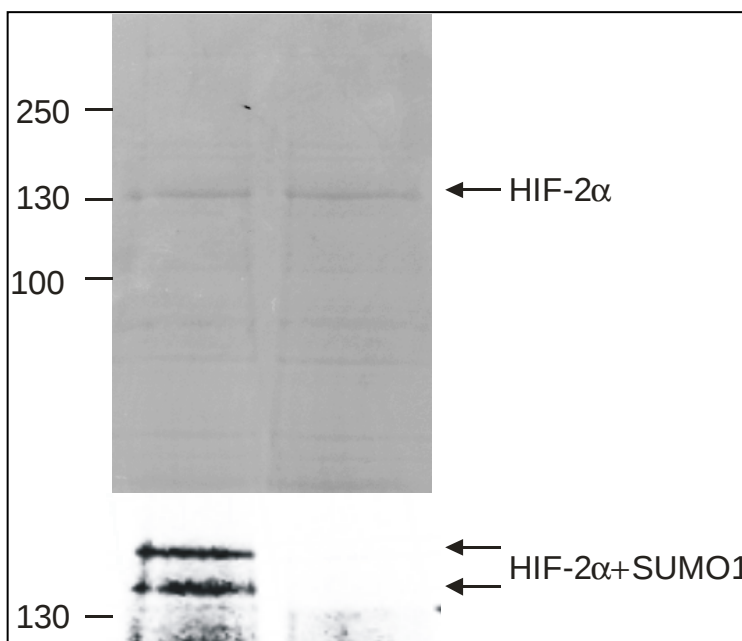


Abb.27: SUMOylierung von rekombinantem HIF-2 α .

Dargestellt ist ein SUMOylierungs Assay mit 5 μ g rekombinantem GST-HIF-2 α . Das mit Coomassie-brilliant-blue gefärbte Gel (oben) zeigt die Bande des rekombinanten HIF-2 α , die Autoradiographie zwei Banden des mit [35 S]-SUMO1 SUMOylierten HIF-2 α (links). Als Kontrolle diente ein Assay ohne Zugabe von [35 S]-SUMO1 (rechts). Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.3.7 SUMOYLIERUNG VON HIF-2 α MUTANTEN

Um SUMOylierungsstellen für HIF-2 α zu charakterisieren, wurden zunächst über eine Aminosäuresequenzanalyse mittels SUMOplot mögliche SUMOylierungsstellen ermittelt (siehe Abb.28).

No.	Pos.	Group	Score	No.	Pos.	Group	Score
1	K497	SLDND <u>LKIE</u> VIEKL	0.91	5	K349	VLSEI <u>EKND</u> VVFSM	0.50
2	K394	FLFTK <u>LKEE</u> PEELA	0.91	6	K596	QQLES <u>KKTE</u> PEHRP	0.48
3	K150	RENLS <u>LKNG</u> SGFGK	0.73	7	K655	FKTRS <u>AKGF</u> GARGP	0.44
4	K312	QYRML <u>AKHG</u> GYVWL	0.62	8	K503	KIEVI <u>EKLK</u> AMDTE	0.15

Abb.28: Potentielle SUMOylierungsstellen von HIF-2 α . Analysiert man die Aminosäuresequenz von HIF-2 α *in silico* über SUMOplot, ergeben sich 8 mögliche Akzeptorlysine (Pos./Group) unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit (Score).

Da HIF-2 α eine große Homologie zu HIF-1 α besitzt, wurden zunächst die Lysine K394 und K497, die zu den zwei Akzeptorlysinen K477 und K391 von HIF-1 α analog sind und die höchste Wahrscheinlichkeit einer SUMOylierung haben, weiter untersucht. Um diese Lysine als SUMO-Akzeptorlysine zu identifizieren, wurden sie zunächst über ortsgerichtete Mutagenese durch Alanine ersetzt. Die dadurch entstandenen Mutanten HIF-2 α K394A und HIF-2 α K497A wurden dann in einem SUMOylierungs Assay auf ihre Fähigkeit, SUMOyliert zu werden, untersucht (siehe Abb.29). Vergleicht man das durch SUMOylierung entstandene Bandenmuster über der Ausgangsbande, so gleichen sich die Bandenmuster des Wildtyps und der Mutante HIF-2 α K497A. Die zwei zusätzlichen Banden sind bei der Mutante HIF-2 α K394A nicht zu detektieren.

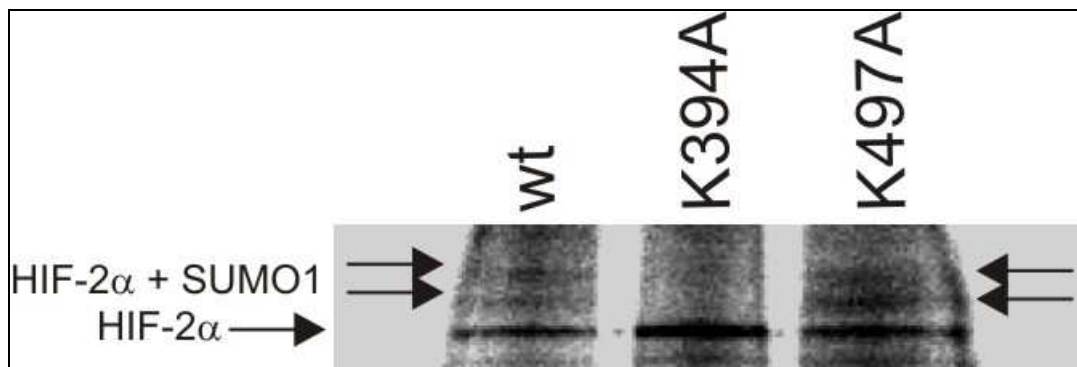


Abb.29: SUMOylierung von HIF-2 α Mutanten. Dargestellt sind SUMOylierungs Assays der HIF-2 α Mutanten K394A und K497A mit SUMO1. Im Gegensatz zum Wildtyp und zur Mutante HIF-2 α K497A sind bei der Mutante HIF-2 α K394A keine zusätzlichen Banden über der Ausgangsbande zu detektieren. Die Bandenmuster von HIF-2 α (wt) und HIF-2 α K497A sind vergleichbar. Durch SUMOylierung entstandene Banden sind mit Pfeilen markiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

3.3.8 NACHWEIS EINER BINDUNG VON HIF-1 α UND HIF-2 α AN DAS SUMOYLIERENDE ENZYM UBC9

Um eine SUMOylierung von HIF-1 α *in vivo* zu untersuchen, sollte die Bindung von HIF-1 α an das SUMOylierende E2 Enzym UBC9 nachgewiesen werden. Dafür wurde das *Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3* verwendet. Dieses System bietet die Möglichkeit, über einen *in vivo* Assay Proteininteraktionen in Hefe nachzuweisen. Die Plasmide für HIF-1 α -DBD und UBC9-AD wurden in Hefe co-transformiert, als Kontrolle diente eine Co-Transformation von pGBKT7-HIF-1 α mit dem Leervektor pGADT7. Kommen die exprimierten Proteine in der Zelle in direkte Nähe, kann GAL4 die Expression der Reportergene *His* und *Ade* initiieren. Die Klone können auf vierfachem Selektionsmedium wachsen. Abbildung 30 zeigt das Wachstum der jeweils acht übertragenen doppelt-positiven Klone auf SD-Leu-Trp-Ade-His-Platten. Bei Co-Transformation von HIF-1 α mit UBC9 wachsen sieben der acht Klone, bei der Kontrolle ohne UBC9 kann für keinen Klon Wachstum festgestellt werden.

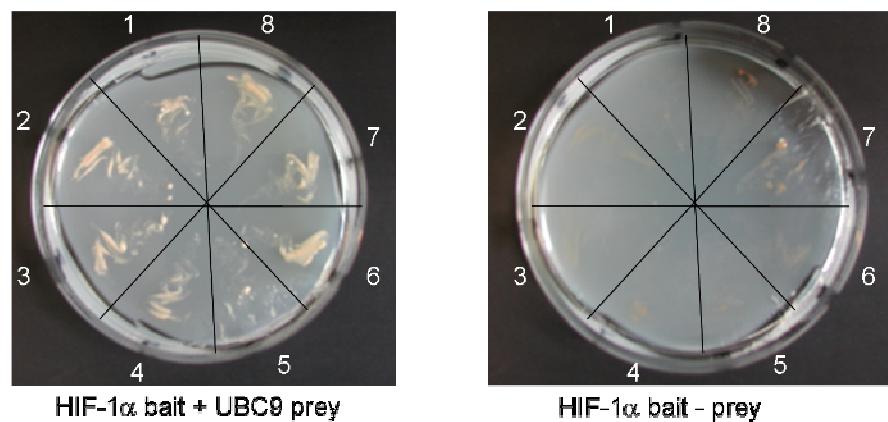
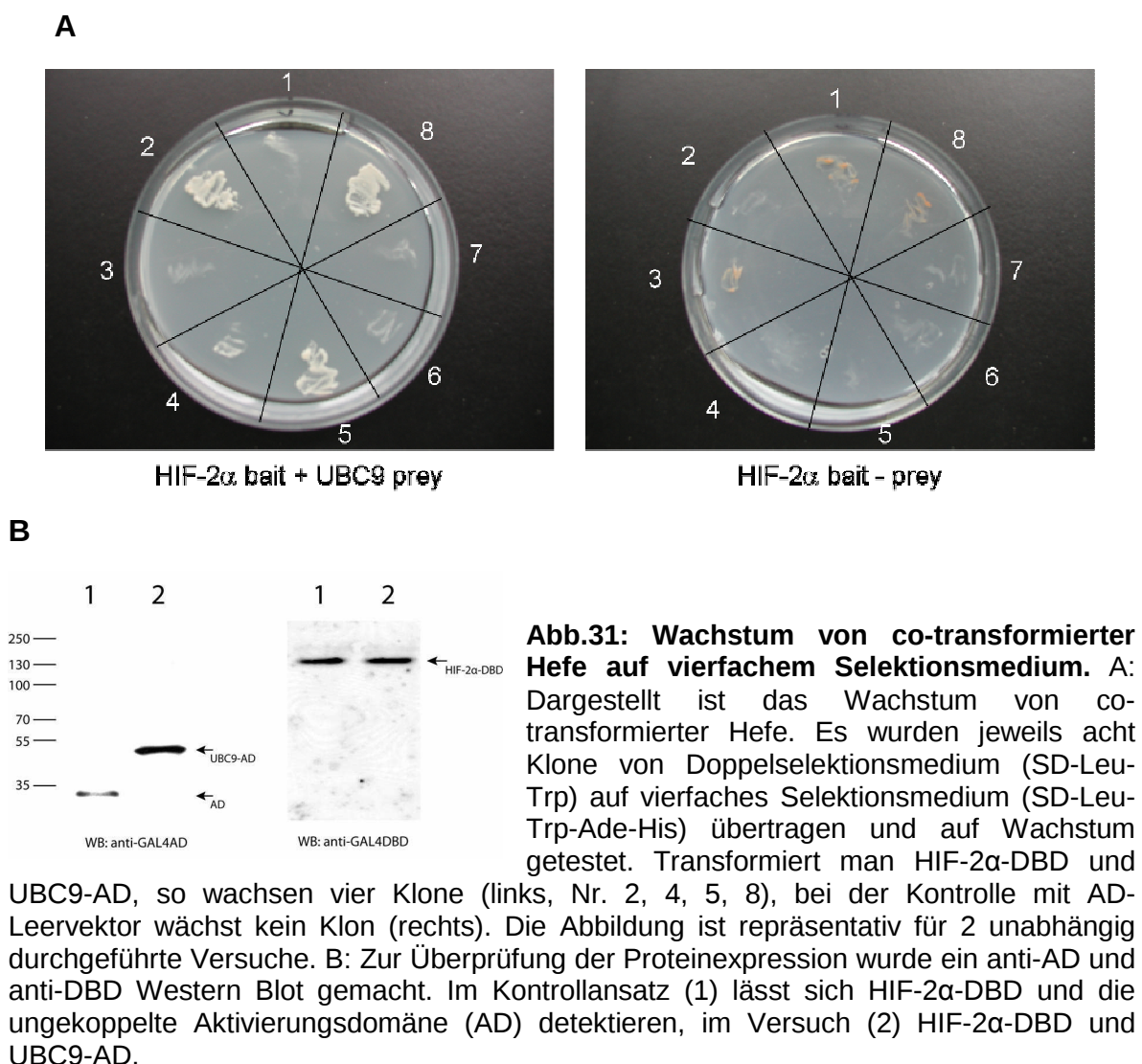


Abb.30: Wachstum von co-transformierter Hefe auf vierfachem Selektionsmedium. Dargestellt ist das Wachstum von co-transformierter Hefe. Jeweils acht Klone wurden von Doppelselektionsmedium (SD-Leu-Trp) auf vierfaches Selektionsmedium (SD-Leu-Trp-Ade-His) übertragen und auf Wachstum getestet. Transformiert man HIF-1 α -DBD und UBC9-AD, so wachsen sieben von acht Klonen (links, Nr. 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8), bei der Kontrolle mit AD-Leervektor wächst kein Klon (rechts). Die Abbildung ist repräsentativ für 2 unabhängig durchgeführte Versuche.

Analog zum Yeast-Two-Hybrid Assay von HIF-1 α und UBC9 wurde ein Assay mit HIF-2 α durchgeführt. Jeweils acht Klone wurden auf ihr Wachstum auf SD-Leu-

Trp-Ade-His-Platten überprüft. Durch Aktivierung der Reportergene, die durch das aus der Interaktion von HIF-2 α -DBD und UBC9-AD entstehende GAL4 aktiviert werden, wachsen die Mehrzahl der Klone auf dem vierfachen Selektionsmedium. Die Kontroll-Klone mit der Aktivierungsdomäne von GAL4 ohne eine Fusion an UBC9 wachsen nicht (siehe Abb.31, A).

Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden die transformierten Proteine mittels Western Blot mit einem anti-AD und einem anti-DBD Antikörper detektiert. Abbildung 31 (B) zeigt die Expression von HIF-2 α -DBD und UBC9-AD, sowie von der ungekoppelten Aktivierungsdomäne (AD) im Kontrollversuch.



3.3.9 FLÜSSIGER ONPG-TEST MIT HIF-1 α UND HIF-2 α

Um die gezeigte Bindung von HIF-1 α und HIF-2 α an UBC9 zu quantifizieren und die relative Affinität beider Proteine an UBC9 zu vergleichen, wurden β -Galactosidase Assays durchgeführt. Die Hefe *S. cerevisiae* AH109 besitzt das *lacZ*-Gen, das für das Enzym β -Galactosidase codiert. Dieses Reportergen wird durch GAL4 kontrolliert. Kommen die an die DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne gekoppelten Proteine HIF und UBC9 in direkte Nähe, so kann das *lacZ*-Gen exprimiert werden, es wird in der Zelle β -Galactosidase gebildet. Ein artifizielles, chromogenes Substrat des Enzyms ist auch das ONPG, bei dessen Spaltung Galaktose und der gelbe Farbstoff o-Nitrophenol freigesetzt wird. Diese Reaktion kann zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Aktivität der β -Galactosidase verwendet werden. Co-transformiert man die Hefe mit den Plasmiden für HIF- α -DBD und UBC9-AD, so wird während des Wachstums eine von der Affinität der Proteine abhängige Menge β -Galactosidase durch die Aktivierung des *lacZ*-Gens gebildet. Gibt man nach der Zelllyse das Substrat ONPG zum Zelllysatz, so bildet sich im Reaktionsverlauf o-Nitrophenol, dessen Menge bei 420nm photometrisch bestimmt werden kann. Da die Intensität der Gelbfärbung mit der Konzentration der β -Galactosidase variiert, kann über deren Reaktionseinheiten auf die Expression des *lacZ*-Gens und dadurch auf die Affinität der untersuchten Proteine zueinander rückgeschlossen werden.

Für die Ermittlung der β -Galactosidase Reaktionseinheiten bei Co-Expression von HIF-1 α -DBD bzw. HIF-2 α -DBD mit UBC9-AD wurden jeweils drei positive Klone von vierfachem Selektionsmedium getestet. Diagramm 1 zeigt die ermittelten Miller-Units beider Versuche im Vergleich zueinander. Für Hefen, transformiert mit HIF-1 α und UBC9 wurden im Mittel 1,6 Reaktionseinheiten der β -Galactosidase ermittelt, bei Transformation mit HIF-2 α und UBC9 2,4 Reaktionseinheiten. In Hefezellen mit HIF2- α -DBD und UBC9-AD wird dementsprechend die 1,5-fache Menge an dem Reporter β -Galactosidase umgesetzt.

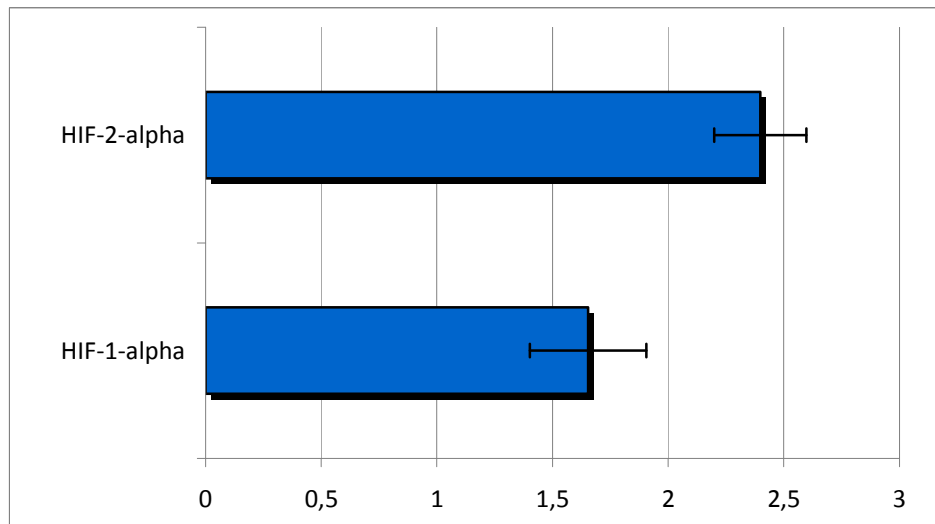


Diagramm 1: Miller-Units bei Co-Expression von HIF-1 α und HIF-2 α mit UBC9. Dargestellt sind Reaktionseinheiten der β -Galaktosidase von HIF- α -DBD und UBC9-AD exprimierenden Hefen. Das *lacZ*-Gen liegt in der Hefe *S. cerevisiae* unter der Kontrolle eines GAL4 responsiven Promotors vor. Bei Interaktion der Fusionsproteine wird der Reporter aktiviert. Durch Spaltung des ONPG können die jeweiligen Reaktionseinheiten der β -Galaktosidase ermittelt werden. Durch Interaktion von HIF-2 α mit UBC9 wird im Vergleich mit HIF-1 α und UBC9 die 1,5 fache Menge an ONPG umgesetzt.

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des Kernimports und der SUMOylierung in der molekularen Sauerstoff-Sensorik. Im ersten Teil der Arbeit sollte der Kernimport der kernlokalisierten Prolylhydroxylase PHD1 charakterisiert werden. Zusätzlich sollte eine möglicher Kernimport und Kernexport von PHD2 genauer untersucht werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine SUMOylierung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF-1 α und HIF-2 α gezeigt werden und mögliche SUMO-Akzeptorstellen ermittelt werden.

4.1 DIE ROLLE DES KERNIMPORTS IN DER MOLEKULAREN SAUERSTOFF-SENSORIK

Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren sind die Schlüsselregulatoren der Zelle bei der Antwort auf Sauerstoffmangel. Sie induzieren spezifische Zielgene, die eine Adaption an niedrige Sauerstoffkonzentrationen bewirken, was das längerfristige Überleben der Zelle sichert. Um ihre Rolle als Transkriptionsfaktoren auszuüben, müssen die Mitglieder der Familie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) in den Kern transportiert werden, wo sie als Heterodimer aus HIF- α und HIF-1 β an die DNA binden. Ein geregelter Kernimport ist demnach entscheidend für die hypoxische Antwort der Zelle [Übersicht in: Lisy und Peet, 2008; Smith et al., 2008].

In *in vitro* Assays konnte gezeigt werden, dass sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α an verschiedene Importin α s binden [Depping et al., 2008]. Beim klassischen Kernimport wird eine im zu transportierenden Protein vorhandene NLS von Importin α gebunden und über Bindung an Importin β wird das Zielprotein in den Kern transportiert. Eine *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz von HIF-1 α ergibt zwei potentielle NLS, zum einen im C-terminalen Bereich, zum anderen im N-terminalen Bereich. Es konnte in vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Punktmutation in der C-terminalen NLS ausreicht, um den Kernimport des Proteins zu unterbinden, da eine Bindung an Importin α nicht länger möglich war [Depping et al., 2008]. Damit einher geht die Entdeckung einer verkürzten Variante von HIF-1 α , der die C-terminale NLS fehlt. Ohne die funktionelle NLS zeigt das Protein eine zytoplasmatische Lokalisation [Chun et al., 2002]. Andere Veröffentlichungen legen allerdings nahe, dass ein alternatives Kernimport-Signal

in HIF-1 α existieren könnte. Ein Fusionsprotein aus den ersten 74 Aminosäuren von HIF-1 α und GFP, das die vorhergesagte N-terminale NLS beinhaltet, zeigt eine Translokation in den Zellkern. Bei einer Verlängerung dieses Konstrukts um weitere 260 Aminosäuren beschränkt sich die Lokalisation jedoch auf das Zytoplasma [Kallio et al., 1998]. Auch andere verkürzte Isoformen von HIF-1 α konnten sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern gefunden werden, obwohl ihnen die C-terminale NLS fehlt [Chun et al., 2001; Lee et al., 2004]. Die ersten 300 Aminosäuren von HIF-1 α beinhalten die PAS A und PAS B Domänen, über die eine Dimerisierung mit anderen Proteinen stattfindet, so bindet u.a. das Chaperon HSP90 an die PAS B-Domäne von HIF-1 α [Whitelaw et al., 1993; Katschinski et al., 2004]. Kallio und Mitarbeiter nahmen an, dass durch Dimerisierung mit anderen Proteinen die N-terminale NLS maskiert wird [Kallio et al., 1998]. Beschrieben ist eine solche Maskierung von Lokalisationssignalen u. a. für den murinen Arylhydrocarbon-Rezeptor, der durch Bindung an XAP2 nicht von Importin β gebunden wird [Petrulis et al., 2003] oder für den Transkriptionsfaktor c-Fos, der durch Dimerisierung mit c-Jun nicht mehr aus dem Kern exportiert wird [Malnou et al., 2007]. Um einen Effekt der Proteininteraktion auf die N-terminale NLS zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Lokalisationsstudien einer HIF-1 α PAS B-Deletionsmutante durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der PAS B-Domäne keinen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung von HIF-1 α hat, es wird weiterhin in den Kern transportiert. Durch das Einführen einer Punktmutation in die C-terminale NLS zeigt sich jedoch eine Unterbindung des Kernimports von HIF-1 α und eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation. Auch für die HIF-1 α Δ PAS B Mutante ist also der Kernimport nur über die C-terminale NLS des Proteins vermittelt, die PAS-B-Domäne hat demnach keinen Einfluss auf die Funktionalität der putativen N-terminalen NLS. Diese Ergebnisse gehen mit Ergebnissen einher, die zeigen, dass ein Kernimport von HIF-1 α unabhängig von der Bindung an HSP90 stattfindet [Minet et al., 1999; Katschinski et al., 2004], oder dass eine Zugabe von HSP90 zu *in vitro* Pull-down Assays die Bindung von HIF-1 α an Importine nicht beeinflusst [persönliche Kommunikation mit Dr. R. Depping].

Bei der Sauerstoff-abhängigen Regulation der HIF- α Untereinheiten spielen die Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 eine entscheidende Rolle [Epstein

et al., 2001]. Sie katalysieren die Hydroxilierung spezifischer Prolyl-Reste innerhalb der ODD-Domäne [Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001] und vermitteln so einen, durch Bindung an das von-Hippel-Lindau-Protein und daraus folgender Polyubiquitinylierung, proteasomalen Abbau [Ivan et al., 2001; Masson und Ratcliffe, 2003]. Obwohl PHD2 als Hauptenzym der Hydroxylierung von HIF-1 α diskutiert wird [Berra et al., 2003; Appelhoff et al., 2004], wird es unter chronisch hypoxischen Bedingungen auch von PHD1 und PHD3 hydroxyliert [Ginouvé et al., 2008]. Die PHDs zeigen in der Zelle verschiedene Lokalisationen. Eine Studie mit GFP-Fusionsproteinen, exprimiert in U2OS Osteosarkom-Zellen, zeigt eine Kernlokalisierung von PHD1, eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation von PHD2 und eine homogene Verteilung in der ganzen Zelle von PHD3 [Metzen et al., 2003]. Diese Ergebnisse bestätigen die Lokalisation von *flag*-fusioniertem PHD1 und PHD2 in COS-1-Zellen [Huang et al., 2002]. Weitere Studien zeigen eine zumindest teilweise Translokation von endogenem PHD2 in den Zellkern in Zellkulturversuchen [Berchner-Pfannschmidt et al., 2008]. Immunhistochemische Lokalisationsstudien verschiedener Gewebe zeigen zumeist eine zytoplasmatische Lokalisation von PHD2, wobei nur die Leydig-Zellen des Hodengewebes eine Ausnahme darstellen und PHD2 in ausgeglichenem Verhältnis in Kern und Zytoplasma zeigen [Soilleux et al., 2005]. In Tumorgeweben zeigen sich unterschiedliche Lokalisationen von PHDs. So geht eine zunehmende Akkumulation von PHD2 in Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinomen mit der steigenden Aggressivität des Tumors einher [Jokilehto et al., 2006]. Im Gegensatz dazu zeigt sich für die PHDs in Bronchialkarzinomen eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation [Giatromanolaki et al., 2008]. In endokrinen Bauchspeicheldrüsenkarzinomen wurden alle PHDs sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern gefunden [Couvelard et al., 2008].

Obwohl die Lokalisation der PHDs in der molekularen Sauerstoff-Sensorik eine wichtige Rolle zu spielen scheint, ist der Transportmechanismus der Proteine unklar. Um die Bedeutung der Lokalisation der PHDs für die hypoxische Induktion von Zielgenen besser verstehen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Mechanismus der Translokation von PHD1 und PHD2 genauer untersucht. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die intrazelluläre Lokalisation von PHD1 und PHD2 abhängig von Im- und Export über

Transportproteine ist. Der klassische Kernimport von Proteinen ist in humanen Zellen über das Importin α/β System vermittelt, wobei Importin α über die Bindung der NLS des Zielproteins als dessen Adapter fungiert und Importin β den Transport durch die Kernpore vorantreibt [Görlich und Kutay, 1999]. In humanen Zellen existieren sechs Importin α Isoformen, die gewebespezifisch exprimiert werden [Köhler et al., 1997]. Sie können wiederum in drei Untergruppen aufgeteilt werden: $\alpha 1$ Untergruppe eins, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ Untergruppe zwei, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ Untergruppe drei [Köhler et al., 1997]. Klassische NLS sind charakterisiert durch Abfolgen basischer Aminosäuren [Dingwall und Laskey, 1991] und können oft über die Algorithmen der Programme PredictNLS und PSORT II durch Analyse der Aminosäuresequenz von Proteinen vorhergesagt werden. Für PHD1 konnte mittels PredictNLS ein Kernlokalisierungssignal zwischen Aminosäure P117 und E123 vorhergesagt werden (PKRKWAE). Dies legte die Vermutung eines klassischen Imports des kernlokalisierten PHD1 nahe. Über einen Pull-down Assay wurde die Bindung von [^{35}S]-markiertem PHD1 an die rekombinanten Importine $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ nachgewiesen, und auch die Spezifität für alle getesteten Importin α s konnte durch ein Verdrängungsexperiment mit Nucleoplasmin sichergestellt werden. Die nicht selektive Bindung an alle Importin α s ist im Einklang mit der Bindung anderer Proteine an die Importine. So bindet z.B. Nucleoplasmin universell an alle Importin α s [Friedrich et al., 2006], und auch HIF-1 α und HIF-2 α können von allen Importin α s transportiert werden [Depping et al., 2008]. Eine Bindung an mehrere Importine stellt sicher, dass ein Kernimport des Proteins kontinuierlich stattfinden kann, und nicht von äußeren Umständen abhängig ist, da die Expression einiger Importine durch Differenzierung und Zellzyklus beeinflusst wird [Giarrè et al., 2002; Köhler et al., 2002]. Die Affinität der NLS zu den verschiedenen Importinen scheint zu variieren, was sich durch unterschiedliche Bindungsintensitäten im Pull-down Assay zeigt. Da für verschiedene Proteine gezeigt werden konnte, dass diese mit unterschiedlicher Effizienz von den Importinen transportiert werden [Köhler et al., 1999; Quensel et al., 2004], gelangt man zu der Annahme, dass PHD1 *in vivo* mit höchster Affinität zu Importin $\alpha 5$ transportiert wird.

Zur Charakterisierung der Bindung von PHD1 an die Importin α s und zur Bestimmung der funktionellen NLS wurde die *in silico* vorhergesagte NLS weitergehend untersucht. Für eine PHD1 NLS-Mutante mit einer Punktmutation

des Lysins K118 konnte eine Verminderung der Bindungsaffinität von PHD1 zu den Importinen im Pull-down Assay festgestellt werden. Auch bei Lokalisationsstudien mit GFP-Fusionsproteinen zeigte sich im Vergleich von PHD1 K118A-GFP mit PHD1-GFP eine abweichende Lokalisation. Statt ausschließlich im Kern, verändert sich die Lokalisation der Punktmutante. Das Protein tritt vermehrt im Zytoplasma auf, was auf einen gestörten Kernimport zurückzuführen ist. Ein ähnliches Phänomen ist für das Protein BRCA1 publiziert, es ist bei Mutation der NLS zwischen Aminosäure P605 und S615 sowohl im Zytoplasma als auch im Kern zu finden [Chen et al., 1996]. Auch eine weitere Mutation in der NLS-Sequenz von PHD1 (PHD1 K118A K120A) führte nur zu einer Störung, nicht aber zu einer Unterbindung des Kernimports von PHD1. Um einen Effekt der Zellteilung auszuschließen, wurden weitere Experimente mit PHD1 K118A-GFP gemacht. Da PHD1 ein ausschließlich kernlokalisiertes Protein ist und sich über NetNES kein Kernexportsignal vorhersagen lässt, könnte das in der NLS mutierte Protein bei der Kernneubildung nach der Mitose im Kern eingeschlossen werden. Um diesen Effekt auf die Lokalisation der Mutante auszuschließen, wurden transfizierte Zellen zunächst 14 Stunden nach der Transfektion untersucht. In einem zweiten Experiment wurde das Medium 4 Stunden nach der Transfektion durch Medium mit nur 0,5% FKS ersetzt. Solche ungünstige Wachstumsbedingungen können Zellen veranlassen, in eine verlängerte G1-Phase einzutreten, die sie erst durch Stimulation wieder verlassen können. Beide Versuche zeigen keinen Einfluss auf die Lokalisation von PHD1 K118A-GFP, die Zellteilung hat keinen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation der Mutante. Die NLS vermittelte Bindung eines Proteins an Importin α wird über zwei in Importin α vorhandene Bindungstaschen vermittelt. Für die Struktur von Importin α ausschlaggebend sind neun nacheinander angeordnete sog. Armadillo-Motive (ARM-Motive). Dabei bilden ARM 1-4 die größere Bindungstasche und ARM5-9 die kleinere Bindungstasche [Conti et al., 1998; Fontes et al., 2000]. Bei Bindung einer *monopartite* NLS scheint physiologisch die größere Bindungstasche von Bedeutung zu sein, eine *bipartite* NLS bindet beide Bindungstaschen, wobei vornehmlich der N-terminale Teil der NLS die kleinere Bindungstasche bindet [Conti und Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2000; Fontes et al., 2003a/b]. In einem Pull-down Assay mit [35 S]-PHD1 sollte die Bindung an Mutanten von Importin α 5 getestet werden. Die verschiedenen Mutanten tragen Mutationen in

verschiedenen ARM-Motiven, die entweder die große (ARM2, ARM3) oder die kleine (ARM7) Bindungstasche oder beide Bindungstaschen (ARM3/8) inaktivieren [Melen et al., 2003]. Im Vergleich von PHD1 mit nicht mutiertem Importin $\alpha 5$ zeigt sich eine nur leichte Reduktion der Bindung, wenn die größere Bindungstasche inaktiviert ist, jedoch eine fast komplette Aufhebung der Bindung bei Mutation der kleineren Bindungstasche. Die Bindung der PHD1-NLS ist also über die zweite Bindungstasche vermittelt. Dies ist aus bisherigen Arbeiten zumeist von Proteinen mit einer *bipartite* NLS bekannt [Conti und Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2003a/b]. Da sich die *in silico* Vorhersage auf eine *monopartite* NLS beschränkte, und durch die Ergebnisse des Pull-down Assays mit den ARM-Mutanten von Importin $\alpha 5$ die Vermutung einer *bipartite* NLS nahelag, wurden weitere Lysine in der Umgebung der NLS-Sequenz untersucht. Da die zwei basischen Bindungsstellen einer *bipartite* NLS meist durch einen Cluster von 10-15 Aminosäuren getrennt sind [Dingwall und Laskey, 1991; Robbins et al., 1991], kommen für PHD1 zwei Lysine für eine potentielle *bipartite* NLS in Betracht. Zum einen ist dies ein C-terminal der NLS gelegenes Lysin (K133), und zum anderen ein Lysin N-terminal der NLS (K102). Zur Analyse des Einflusses beider Lysine auf den Kernimport von PHD1 wurden dreifach Mutanten generiert, bei denen alle Lysine der einen oder anderen möglichen *bipartite* NLS durch Alanine ersetzt wurden (PHD1 K118AK120AK133A und PHD1 K118AK120AK102A). Eine Änderung der Lokalisation im Vergleich zur Punktmutante K118A oder der Doppelmutante K118AK120A konnte allerdings nicht gezeigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die vorhergesagte NLS tatsächlich eine funktionelle *monopartite* NLS ist, die entgegen bisherigen Studien die kleinere Bindungstasche der Importin $\alpha 5$ bindet. Eine kürzlich veröffentlichte Studie, in welcher verschiedene NLS-Sequenzen getestet wurden, hat gezeigt, dass neue Klassen von *monopartite* NLS mit einer Konsensussequenz existieren, die vornehmlich die kleinere Bindungstasche der Importin $\alpha 5$ binden [Kosugi et al., 2008]. Es kann angenommen werden, dass die PHD1 NLS zu dieser Klasse der Kernimport-Signale gehört. Da die teilweise Kernlokalisierung der PHD1 NLS-Mutanten nicht auf einen Teilungseffekt zurückzuführen ist und auch eine *bipartite* NLS nicht wahrscheinlich erscheint, könnte ein zusätzlicher alternativer Kernimport in Betracht gezogen werden. Veröffentlichungen zeigen Proteine, die zwei NLS besitzen, wie das Protein BRCA1 [Chen et al., 1996]. Auch über Bindung an andere Proteine können Proteine in den Kern transportiert werden.

Beispiele hierfür sind der Komplex aus p52 und RelB, der ausschließlich über die NLS von p52 transportiert wird, oder der Komplex aus p65 und p52, dessen Import über die NLS von p52 vermittelt ist [Fagerlund et al., 2008]. Ein weiteres Beispiel für Bindungspartner vermittelten Kernimport ist das TAF10, welches im Komplex mit seinen Bindungspartnern in den Kern importiert wird [Soutoglu et al., 2005]. Für PHD1 konnte im Rahmen dieser Arbeit also gezeigt werden, dass dessen Kernimport abhängig der vorhergesagten *monopartite* NLS über das klassische Importin α/β -System vermittelt wird. Zusätzlich ist möglicherweise ein weiterer Mechanismus für den Kernimport wichtig.

PHD2 wird als Hauptenzym zur HIF-1 α Hydroxylierung angesehen. Trotz der hauptsächlich zytoplasmatischen Lokalisation von PHD2-GFP wird der geringere Anteil von PHD2 im Zellkern als der aktive Anteil des gesamten PHD2 diskutiert [Berra et al., 2003; Minamishima et al., 2008; Berchner-Pfannschmidt et al., 2008]. Die Studie von Groulx und Lee [Groulx und Lee, 2002] trägt zusätzlich zu der Vorstellung bei, dass HIF-1 α zunächst in den Kern importiert wird, wo anschließend die Hydroxylierung der Prolinreste, vermittelt durch PHD2, stattfindet. Nach Anlagerung von VHL wird HIF-1 α dann aus dem Kern exportiert und im Zytoplasma über das Proteasom abgebaut. Die Determination einer untypischen NES in HIF-1 α als Bindungsstelle für das Exportin CRM1 stützt dieses Modell [Mylonis et al., 2008]. Entgegen der zytoplasmatischen Lokalisation von PHD2-Fusionsproteinen [Metzen et al., 2003; Huang et al., 2002] muss demnach ein Kernimport für PHD2 in der Zelle stattfinden. Nach der Analyse der primären Aminosäuresequenz kann ein klassisches Kernlokalisierungssignal zwischen Aminosäure R99 und K115 vorhergesagt werden, was einen über Importin α/β vermittelten Kernimport nahe legt. Gegen diesen Mechanismus des Kernimports spricht jedoch der *in vitro* Pull-down Assay von [35 S]-PHD2 mit den Importinen. Es konnte keine Bindung an Importin α s oder Importin β nachgewiesen werden. Da endogenes PHD2 unter verschiedenen Umständen, wie in Tumoren [Jokilehto et al., 2006; Couvelard et al., 2008] oder im gesunden Hodengewebe [Soilleux et al., 2005] im Zellkern gefunden werden konnte, wurde ein Modell angenommen, in dem PHD2-GFP in den Kern transportiert wird und direkt wieder exportiert wird. Durch Blockierung des Kernexports sollte dann eine Anreicherung von PHD2 im Zellkern zu beobachten sein. Ein potenter Kernexport-Blocker ist das Leptomycin

B (LMB), das durch Bindung an einen Cysteinrest des Exportin CRM1 dessen Konformation ändert und eine Bindung der NES des Zielproteins unterbindet [Yoshida und Horinouchi, 1999; Meissner et al., 2004]. Eine solche Blockierung des Kernexports in mit PHD2-GFP transfizierten Zellen löste in verschiedenen Zelllinien eine teilweise Verschiebung von PHD2-GFP in den Zellkern aus. In den behandelten Zellen konnte PHD2 in ausgeglichenen Mengen in Zytoplasma und Zellkern beobachtet werden, was einen spezifischen Kernimport und Kernexport des Proteins vermuten lässt. Durch Co-Immunpräzipitation konnte das Exportin CRM1 als Bindungspartner und somit als Regulator des Kernexports von PHD2 identifiziert werden. CRM1 bindet Leucin-reiche Sequenzen (NESs) der zu transportierenden Proteine [Übersicht in: Nigg, 1997; Ossareh-Nazari und Dargemont, 1999]. Über eine Aminosäuresequenz Analyse lässt sich eine solche Bindungsstelle zwischen Aminosäure L188 und I198 vorhersagen. Zur Identifikation dieser Sequenz als CRM1-Bindungsstelle von PHD2, wurde sie weitergehend untersucht. Weder eine Fusion der potentiellen NES an das kernlokalisierte PHD1 noch eine Deletion der Sequenz konnte eine Funktionalität zeigen. Eine Fusion aus PHD1 und NES ist weiterhin kernlokalisiert und eine Deletion der potentiellen NES führt zu keiner Anreicherung des Proteins im Zellkern. Somit kommt diese Sequenz nicht als CRM1 Bindungsstelle in Frage. Unabhängig vom Kernexport wird das PHD2-GFP in den Kern transportiert. Da das Fusionsprotein eine molekulare Masse von ca. 75kDa besitzt, kommt ein passiver Diffusionsmechanismus nicht in Frage. Durch die Kernporen können Salze und Moleküle bis ca. 40kDa frei diffundieren. Mit zunehmender Größe der Moleküle ist ein aktiver Transportmechanismus von Nöten [Übersicht in: Lim et al., 2008]. Versuche konnten zeigen, dass auch eine Punktmutation im Bereich der vorhergesagten NLS von PHD2 das Kernimport-Verhalten bei Zugabe von LMB nicht verändert. Diese Beobachtungen gehen einher mit den Bindungsstudien mit den Importinen. Da PHD2 *in vitro* nicht an die getesteten Importin α s bindet, ist der NLS-vermittelte klassische Import wenig wahrscheinlich. Ein möglicher alternativer Kernimport könnte über die Bindung an aktiv importierte Proteine wie die „ β -like“ Importine erfolgen. Diese bänden direkt an PHD2 ohne einen Mediator wie Importin α . Dies wäre wahrscheinlich, da „ β -like“ Importine NLS binden, die verschieden von klassischen NLS sind, und die vorhergesagte klassische NLS für PHD2 nicht funktionell zu sein scheint. Häufig werden Proteine nicht als einzelnes

Molekül, sondern in Komplexen mit anderen Proteinen über die Kernmembran von einem Kompartiment in das andere transportiert. Eines der wichtigsten Beispiele hierfür ist der Kernexport von RNA. RNA liegt mit Proteinen in Form von Ribonucleoproteinen Komplexen vor (mRNPs), die als Komplex aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert werden [Übersicht in: Erkmann und Kutay, 2004]. Als möglicher Co-Transporter käme ein Protein in Frage, das sowohl an PHD2 bindet, als auch über Importine aktiv in den Zellkern transportiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung zweier möglicher Proteine an die Importine getestet, zum einen OS9, zum anderen ING4. Eine Studie konnte zeigen, dass das OS9 eine wichtige Rolle bei der Degradation von HIF-1 α spielt [Baek et al., 2005]. Obwohl OS9 hauptsächlich als Protein des endoplasmatischen Retikulums bekannt war [Wang et al., 2007; Friedmann et al., 2002], konnte OS9 sowohl in Zytoplasma- als auch in Kernextrakten gefunden werden. Zusätzlich konnte eine Bindung sowohl an HIF-1 α als auch an PHD2 oder PHD3 gezeigt werden. Eine Aminosäuresequenzanalyse lässt außerdem auf eine NLS-Sequenz im C-terminalen Bereich des Proteins schließen. Eine Bindung an Importine konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Immunfluoreszenzversuche eine zytoplasmatische Lokalisation, die sich auch durch Zugabe von LMB nicht änderte. Diese Ergebnisse lassen nicht auf einen aktiven Transports des OS9 schließen, über den das PHD2 in den Kern transportiert werden kann. Auch das von Baek und Mitarbeitern dargestellte Modell der Komplexbildung [Baek et al., 2005], eine Bindung von OS9 zunächst an HIF-1 α und darüber an PHD2, schließt ein Mitwirken des OS9 beim PHD2-Kerntransport aus. Da angenommen werden kann, dass eine HIF-1 α Hydroxylierung im Zellkern stattfindet [Berchner-Pfannschmidt et al., 2008], kann OS9 als Importeur für PHD2 ausgeschlossen werden. Für den Tumorsuppressor ING4 konnte eine direkte Interaktion mit PHD2 nachgewiesen werden. Es wird ein Modell angenommen, bei dem PHD2 nicht nur die Stabilität von HIF-1 α beeinflusst, sondern auch durch Rekrutierung von ING4 die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 verringert [Ozer et al., 2005]. Für ING4 konnte des Weiteren eine NLS determiniert werden [Zhang et al., 2005], die für den Kernimport des Proteins notwendig ist. Diese Arbeit konnte weiterführend eine *in vitro* Bindung an alle Importine zeigen. Da für ING4 ein spezifischer Kernimport über Importine abläuft und eine Bindung an PHD2 gezeigt werden konnte, wäre ein gekoppelter

Kernimport von ING4 mit PHD2 nicht auszuschließen. Nicht auszuschließen ist ebenfalls ein für PHD2 spezifischer Kerntransport über einen zum klassischen Importin α/β vermittelten Kerntransport verschiedenen Mechanismus. Möglich wäre dabei eine direkte Interaktion mit Nucleoporinen [Xu und Massagué, 2004]. In den vergangenen Jahren konnten außerdem Importfaktoren charakterisiert werden, die sich von Importin α und β unterscheiden und unterschiedliche Transportsignale erkennen [Christophe et al., 2000]. Auch durch verschiedene Stimuli regulierter Kernimport wäre für PHD2 denkbar. Kürzlich konnte ein Bindungsmotiv für den Importfaktor Importin 7 charakterisiert werden, welches nur in phosphorylierter Form als Import Sequenz erkannt wird. Eine Phosphorylierung der Aminosäuresequenz Serin-Prolin-Serin (SPS; ERK1) oder Threonin-Prolin-Threonin (TPT; SMAD3 und MEKs) führt zu einem Kernimport der Proteine [Chuderland et al., 2008]. Ein SPS-Motiv kann im N-terminalen Bereich von PHD2 gefunden werden, wodurch ein Importin 7 vermittelter Kernimport, induziert durch Phosphorylierung, für PHD2 denkbar wäre. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen das Modell, bei dem PHD2 als aktives Enzym HIF-1 α im Kern hydroxyliert. Reguliert wird die Kernlokalisierung von PHD2 durch einen unbekannten Weg des Kernimports, sowie einen CRM1 vermittelten Kernexport.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Untersuchungen zum Mechanismus des Kernimports bei der molekularen Sauerstoff-Sensorik tragen dazu bei, dem Ablauf der HIF- α Regulation unter normalen Sauerstoffbedingungen zu verstehen. Das Verständnis des Kerntransports der verschiedenen Faktoren unterstützt einen bisher diskutierten Mechanismus (siehe Abb.32): HIF-1 α und HIF-2 α werden über das klassische Importin α/β -System in den Zellkern transportiert. Dieser Transport ist über funktionelle NLS im C-terminalen Ende vermittelt. Auch PHD1 und PHD2 werden in den Zellkern importiert, PHD1 über die Bindung an Importin α , PHD2 über einen noch nicht aufgeklärten Mechanismus. Unter Normoxie wird HIF- α im Kern hydroxyliert und nach Bindung an VHL über einen CRM1 vermittelten Export aus dem Kern transportiert und im Zytoplasma über das Proteasom abgebaut. Ein eventueller Abbau des Komplexes im Zellkern kann zusätzlich erfolgen. Die Konzentration von PHD2 im Zellkern wird über einen Kernexport über CRM1 reguliert.

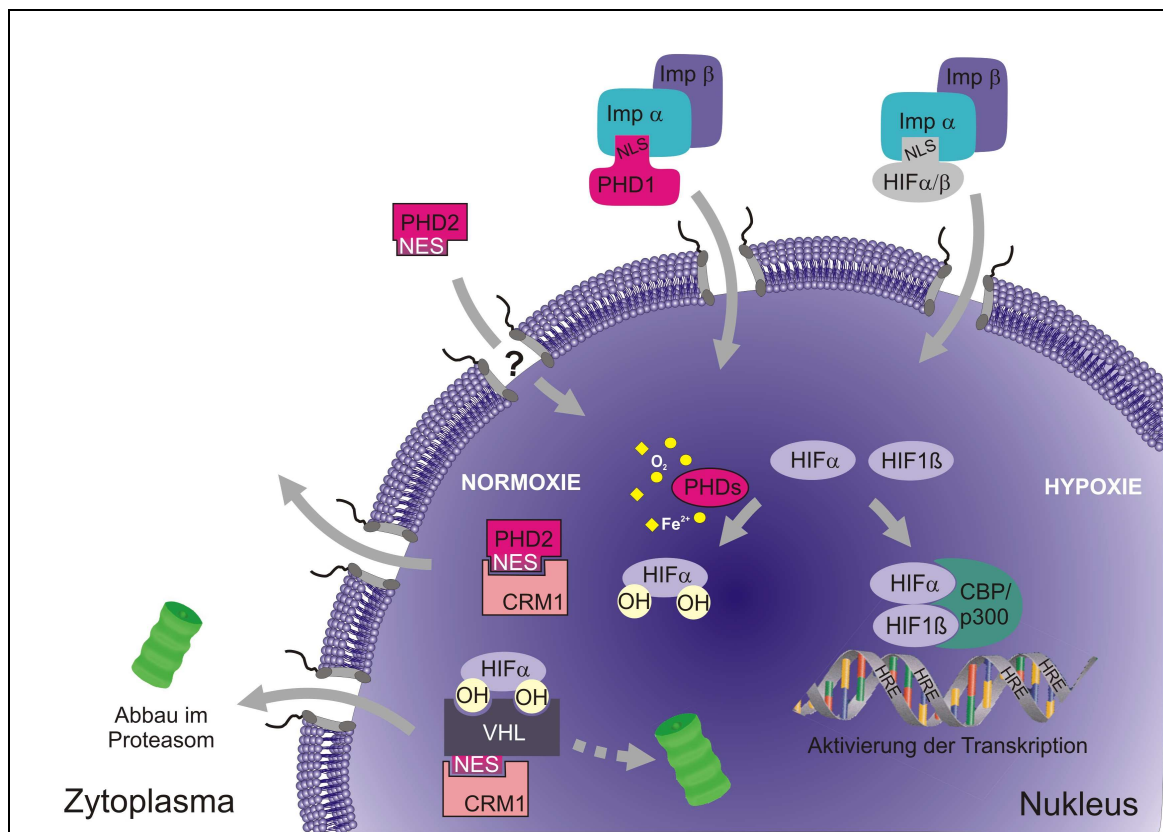


Abb.32: Schematische Darstellung der Bedeutung des Kernimports für die Molekulare Sauerstoff-Sensorik. Dargestellt sind die Wege des Kernimports von HIF, PHD1 und PHD2 sowie der Abbau der Sauerstoff-sensitiven α -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors. Für HIF und PHD2 erfolgt der Kerntransport über das klassische Importin α/β -System, der Kernimport von PHD2 ist unklar. PHD2 wird in seine Konzentration im Zellkern über einen CRM1 vermittelten Export reguliert.

4.2 SUMOYLIERUNG VON HIF-1 α UND HIF-2 α

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung u.a. und auch Ubiquitylierung und SUMOylierung sind an allen zellulären Prozessen und Vorgängen beteiligt und beeinflussen u. a. Parameter wie Stabilität, Struktur, Funktion, Aktivität, Lokalisation oder Interaktionen ihrer Zielproteine [Perkins, 2006]. Ihre Eigenschaft, schnelle Veränderungen von Proteinen, Komplexen und zellulären Strukturen herbeizuführen, ist dabei von entscheidender Rolle. Ubiquitin und SUMO sind dabei selbst kleine Proteine, die kovalent an Lysinreste gebunden werden. Ubiquitin ist hauptsächlich für seine Rolle als zum Abbau im 26S Proteasom kennzeichnende Modifikation bekannt [Übersicht in: Li und Ye, 2008]. SUMO ist dem Ubiquitin strukturell sehr ähnlich [Bayer et al., 1998] und wird ebenfalls an spezifische Lysine der Zielproteine gekoppelt. SUMO modifiziert eine große Anzahl von Proteinen, die verschiedensten Abläufen in der Zelle zugehörig sind. Die Funktionen einer SUMOylierung scheinen so divers wie ihre Zielproteine. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass SUMO bei der Regulation von Proteininteraktionen [Matunis et al., 1998], Kernimport und Lokalisation von Proteinen [Seeler und Dejean, 2001; Pichler und Melchior, 2002; Chen et al., 2006; Ohuchi et al., 2008], Protein-DNA Interaktionen [Hong et al., 2001], enzymatischer Aktivität von Proteinen [Hardeland et al., 2002] beteiligt ist oder als Antagonist zu Ubiquitin agieren kann [Desterro et al., 1998; Hoege et al., 2002].

Der Einfluss einer SUMOylierung auf Transkriptionsfaktoren ist je nach Protein unterschiedlich. SUMOylierung kann zu einer Aktivierung oder wie in den meisten Fällen zu einer Inhibierung der Transkription führen [Übersicht in: Gill, 2003; Gill, 2005; Lyst und Stancheva, 2007]. Beispiele aus der Literatur zeigen eine aktivierende Wirkung z.B. bei HSF1 und HSF2, p53, oder auch SOX9 [Hong et al., 2001; Goodson et al., 2001; Gostissa et al., 1999; Hattori et al., 2006]. Inhibierend wirkt eine Sumoylierung u.a. auf den Androgen Rezeptor, Elk1, den Glucocorticoid Rezeptor oder AP-1 und 2 [Poukka et al., 2000; Tian et al., 2002; Eloranta und Hurst, 2002; Yang et al., 2003]. Für den jeweiligen Mechanismus, über den SUMOylierung die Aktivität des Transkriptionsfaktors beeinflusst, gibt es keine molekulare Basis. Klar ist, dass eine Modifikation mit SUMO die Proteinoberfläche verändert und zu Konformationsänderungen führen kann. Dies wiederum kann Proteininteraktionen fördern oder unterbinden, was direkt auf die Aktivität des

Transkriptionsfaktors Einfluss nehmen kann. Auch kann die SUMOylierung, wie im Beispiel für den Transkriptionsfaktor SOX9 gezeigt, zur Änderung der nukleären Lokalisation führen. Im Fall von SOX9 führt dies zu einer erhöhten Aktivität [Hattori et al., 2006]. Gründe für eine Inhibierung der Transkription liegen meist in der Rekrutierung von Co-Repressoren oder der Konformationsänderung und deren Einfluss auf Protein-Protein und Protein-DNA Interaktionen. Zusätzlich scheint auch der Abzug SUMOylierter Proteine in subnukleäre Domänen, in denen sie nicht länger wirken können, ein wichtiger Mechanismus der Hemmung von Transkriptionsfaktoren zu sein [Übersicht in: Verger et al., 2003; Hay, 2005].

Gegenstand dieser Arbeit ist die SUMOylierung der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α . Ein Einfluss von Hypoxie auf den SUMOylierungs-Status der Zellen wurde zum ersten Mal in der Studie von Comerford und Mitarbeitern beschrieben, in der gezeigt wurde, dass Hypoxie zu einer erhöhten globalen Transkription von SUMO1 in Zellkultur führt [Comerford et al., 2003]. Dies konnte ebenfalls *in vivo* gezeigt werden, in murinen Herzen und Hirnen eine Co-Lokalisation und Interaktion von SUMO1 mit HIF-1 α gezeigt werden [Shao et al., 2004]. Co-Lokalisations-Studien der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Lokalisationen von HIF-1 α oder HIF-2 α mit SUMO1 im Zellkern überlappen. SUMO1 zeigte sich dabei häufig in Anreicherungen, die auf Kernkörperchen hinweisen. In einigen Zellen waren gleiche Strukturen auch für das co-transfizierte HIF-2 α zu beobachten. SUMO wird beschrieben als wichtiger Bestandteil der PML Kernkörperchen (PML NBs). SUMO reguliert den Austausch von Proteinen zwischen PML NBs und dem Nukleoplasma, sowie nukleäre Architektur [Übersicht in: Heun, 2007]. Neuere Studien zeigen Anreicherungen von SUMO in PML NBs-unabhängigen Kernkörperchen die SUMO Kernkörperchen genannt wurden, sowie in neuronalen Cajal bodies [Seeler und Dejean 2001; Navascués et al., 2007, Navascues et al., 2008]. Eine mögliche Bedeutung für die Co-Lokalisation von HIF-2 α und Kernkörperchen bleibt allerdings unklar. Nicht auszuschließen wäre ein Einfluss auf die Proteinstabilität, wie das Beispiel des Transkriptionsfaktors PAX8 zeigt. PAX8 wird in SUMO Kernkörperchen angereichert, und durch SUMOylierung stabilisiert [de Christofaro et al., 2008]. Erste Hinweise auf spezifische SUMOylierungsstellen von HIF-1 α zeigten *in vitro* SUMOylierungsversuche der ODD-Domäne. Zwei Akzeptorlysine wurden postuliert und eine SUMOylierung beider Stellen mit einer Stabilisierung und

gesteigerter Transkriptionsaktivität in Verbindung gebracht [Bae et al., 2004; Carbia-Nagashima et al., 2007]. Die SUMOylierungsversuche von rekombinantem HIF-1 α gehen mit diesen Ergebnissen einher. Auch in diesem Versuch konnte eine zweifache SUMOylierung gezeigt werden. Eine Analyse der primären Aminosäuresequenz des volle-Länge HIF-1 α ergab jedoch zusätzlich zu den postulierten Lysinen acht weitere, die für eine SUMOylierung in Frage kamen. Eine *in vitro* SUMOylierung von [³⁵S]-HIF-1 α zeigte für SUMO1 und SUMO2 mehr als zwei zusätzliche Banden. Insbesondere das mögliche Akzeptor Lysin K721, ein Lysin in der C-terminalen NLS [Depping et al., 2008], wäre ein mögliches SUMO- Akzeptorlysin, da SUMOylierung neben anderen Funktionen auch in der Regulation des Kernimports einen wichtigen Faktor darstellt [Übersicht in: Pichler und Melchior, 2002]. Bekannt ist der Effekt von SUMOylierung innerhalb der NLS von anderen Proteinen wie Sp100, PML oder ATF7 [Sternsdorf et al., 1999; Duprez et al., 1999; Hamard et al., 2007]. *In vitro* Versuche mit Punktmutanten von HIF-1 α zeigten jedoch für alle getesteten Mutanten ein unverändertes SUMOylierungs-Verhalten, verglichen mit dem Wildtyp. Als einzige SUMOylierungsstelle konnte über die Punktmutationen von HIF-1 α das parallel gezeigte Lysin K477 gezeigt werden. Ein Austausch dieses Lysins durch Alanin führte im SUMOylierungsassay zu einem veränderten Bandenmuster. Die Bande mit dem größten Molekulargewicht, die einer dreifachen SUMOylierung entspricht, fällt für diese Mutante weg, ebenso die Bande für einfache SUMOylierung. Dies legt die Vermutung nahe, dass HIF-1 α an einer weiteren Stelle SUMOyliert wird. Die weiterhin vorhandene Bande ließe sich durch eine doppelte SUMOylierung erklären, da alle SUMO-Isoformen in der Lage sind, Ketten zu bilden [Knipscheer et al., 2007; Vertegaal, 2007]. Bis heute ist die genaue Funktion der SUMOylierung von HIF-1 α kontrovers diskutiert. Die bereits postulierten SUMOylierungsstellen für HIF-1 α wurden auch durch die Studie von Berta und Mitarbeitern bestätigt. Im Gegensatz zu den vorher genannten Veröffentlichungen wurde jedoch eine Inhibierung der Transkriptionsaktivität gezeigt [Berta et al., 2007]. Während der murinen Embryogenese beeinflusst die SUMOylierung von HIF-1 α die Stabilität des Proteins. Die SUMOylierung scheint hier als Abbaumerkmal zu funktionieren [Cheng et al., 2007]. Da zelluläre Hypoxie die SUMO Bildung aktiviert [Shao et al., 2004] und hypoxischer Stress die Bildung von RSUME, einem SUMOylierungs-Enhancer, induziert [Carbia-Nagashima et al.,

2007], der auch die SUMOylierung von HIF-1 α fördert, scheint es wahrscheinlich, dass auch HIF-2 α unter Hypoxie einer SUMOylierung unterzogen wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher neben HIF-1 α auch die SUMOylierung von HIF-2 α untersucht. In *in vitro* Versuchen konnte eine SUMOylierung sowohl für rekombinantes als auch für *in vitro* translatiertes und transkribiertes [^{35}S]-HIF-2 α gezeigt werden. Während die SUMOylierung von rekombinantem HIF-2 α auf zwei mögliche SUMOylierungen schließen lässt, bei denen jedoch eine SUMOylierung des GST nicht auszuschließen ist, zeigten sich bei der SUMOylierung von [^{35}S]-HIF-2 α drei zusätzliche Banden. In Analogie zu HIF-1 α wurden zwei der acht vorhersagbaren Akzeptorlysine weiter untersucht und durch Mutagenese wurde das Lysin K394 als Akzeptorlysin für SUMO1 nachgewiesen. Eine Mutation dieses Lysins führte zu einer kompletten Aufhebung der SUMOylierung *in vitro*. Anders als bei HIF-1 α scheint es daher nur an einem Lysin in der Nähe der ODD-Domäne SUMOyliert zu werden. Einen wichtigen Hinweis auf SUMOylierung *in vivo* gibt der in dieser Arbeit gezeigte Yeast-Two-Hybrid Assay. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α in der Zelle mit UBC9 interagieren. Wie für Ubiquitylierung wird SUMO über eine Isopeptidbindung der C-terminalen Carboxylgruppe des SUMOs und der ϵ -Aminogruppe des Ziellysins gebunden. In einem dreistufigen Prozess wird SUMO zunächst über eine Thioesterbindung an das E1-Enzym gebunden und von dort auf UBC9 übertragen. UBC9 ist die einzig bekannte SUMO-E2-Ligase, von der SUMO auf das Zielprotein übertragen werden kann [Melchior, 2000; Müller et al., 2001]. Eine Interaktion von UBC9 mit anderen Proteine geht mit einer SUMOylierung einher. Ein Beispiel dafür ist SUMO selbst. Durch transiente Interaktion mit UBC9 wird SUMO SUMOyliert und eine SUMOkette gebildet [Knipscheer et al., 2007]. Auch die im Vergleich zu HIF-1 α höhere Affinität zu UBC9 macht eine SUMOylierung von HIF-2 α *in vivo* wahrscheinlich.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse tragen dazu bei, die Kenntnisse über eine SUMOylierung von HIF-1 α zu erweitern. Zum ersten Mal konnte auch eine SUMOylierung des Transkriptionsfaktors HIF-2 α gezeigt werden. Die Funktion einer SUMOylierung für HIF-1 α wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert und bleibt für HIF1 α sowie auch für HIF-2 α zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Mitglieder der Familie der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs) sind als die Schlüsselregulatoren der Aufrechterhaltung der Sauerstoff-Homöostase bekannt. Sie regeln die Transkription von Genen, die einer Sauerstoff-Unterversorgung der Zelle entgegen wirken. Sie sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus einer Sauerstoff-sensitiven α - und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit bestehen. In Gegenwart von Sauerstoff wird die α -Untereinheit über Sauerstoff-abhängige Dioxygenasen, den PHDs, hydroxyliert und somit zum Abbau über das 26S Proteasom markiert. Bei der zellulären Antwort auf Sauerstoffmangel ist der Kerntransport der HIFs von entscheidender Bedeutung, über eine funktionelle C-terminale NLS werden die HIF-Untereinheiten mittels klassischen Kernimports in den Kern transportiert. Die Theorie der Maskierung einer N-terminalen NLS durch Interaktion mit anderen Proteinen über die PAS B Domäne wurde durch Lokalisationsstudien mit HIF-1 α PAS B-Deletionsmutanten widerlegt.

Da die PHDs unterschiedliche Lokalisationen in der Zelle zeigen, scheint auch der Kerntransport von PHD1, PHD2 und PHD3 ein wichtiger Schritt in der zellulären Antwort auf Sauerstoffmangel zu sein. Untersuchungen konnten eine funktionelle NLS für PHD1 charakterisieren, über die ein klassischer Importin α/β vermittelter Kernimport stattfindet. Durch eine Blockierung des Kernexports mit Leptomycin B konnte gezeigt werden, dass PHD2 CRM1 abhängig aus dem Kern transportiert wird. Der Mechanismus des Kernimports von PHD2 bleibt jedoch unaufgeklärt.

Die Ergebnisse zum Kernimport der PHDs unterstützen ein Modell, in dem HIF-1 α im Kern von dort lokalisiertem PHD2 hydroxyliert wird und anschließend zum Abbau ins Zytoplasma transportiert wird.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α *in vitro* SUMOyliert werden können. Versuche zur Bindung der Faktoren an UBC9, die SUMO E2 Ligase, in Hefe tragen zur Aufklärung des gesamten Mechanismus bei. Funktionen der SUMOylierung bei der Sauerstoff-Sensorik wurden in der Vergangenheit kontrovers diskutiert, aber ein Einfluss auf transkriptionelle Aktivität oder auf die Stabilität von HIF-1 α und HIF-2 α ist wahrscheinlich.

Durch die vorliegende Arbeit sind wichtige Mechanismen in Bezug auf den spezifischen Kerntransport von Faktoren der Sauerstoff-Sensorik aufgeklärt

worden. Die Ergebnisse sind weitere Schritte zum vollständigen Verständnis der zellulären Antwort auf Sauerstoffmangel.

6. ABSTRACT

The family of hypoxia inducible factors (HIFs) are known as key regulators in cellular adaption to low oxygen concentrations. They regulate transcription of genes involved in oxygen homeostase. HIFs consist of two subunits, the oxygen sensitive α subunit and the constitutively expressed β subunit. The stability of the α subunit is regulated through hydroxylation of specific proline residues by oxygen dependent dioxygenases called PHDs. This hydroxylation promotes protein degradation by targeting the protein to the 26S proteasome. Due to its transcriptional activity, nuclear import of HIFs is an important step in the process of molecular oxygen sensing. By Bindung a functional C-terminal nuclear localisation signal, Importin α and β carry HIF-1 α and HIF-2 α into the nucleus. A hypothesis about a second NLS in the N-terminus, masked by dimerisation with other proteins via the PAS B domain was disproved by showing the localisation of a PAS B deletion mutant, combined with a NLS mutation, being mainly cytoplasmic.

The PHDs show different localisation within the cell, which is why the nuclear import is an additional step in the complex answer to low oxygen concentrations. Experiments characterised a functional NLS for the nuclear protein PHD1. The mainly cytoplasmic PHD2 is able to enter the nucleus by an undefined pathway and its intracellular localisation is regulated by CRM1 mediated nuclear export. These findings support a proposed model of HIF- α being imported to the nucleus before being hydroxylated by PHDs, followed by a subsequent nuclear export and the degradation in the cytoplasm.

Additionally it could have been shown a SUMOylation of HIF-1 α and, for the first time, of HIF-2 α *in vitro*. An interaction of both members of the HIF family with the SUMO ligase UBC9 in yeast suggests a SUMOylation even *in vivo*. Discussed controversially, a function of SUMOylation in the process of oxygen sensing remains unclear to date.

The present study reveals important mechanisms concerning the cellular answer to reduced oxygen availability. The results are important steps in understanding the complex molecular oxygen sensing process.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Agbor, T. A. und Taylor, C. T. (2008). SUMO, hypoxia and the regulation of metabolism. *Biochem Soc Trans* 36, 445-8.
- Appelhoff, R. J., Tian, Y., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. und Gleadle, J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279, 38458-65.
- Aragonés, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirkx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N. H., Lambrechts, D., Bishop, T., Lafuste, P., Diez-Juan, A., Harten, S. K., Van Noten, P., De Bock, K., Willam, C., Tjwa, M., Grosfeld, A., Navet, R., Moons, L., Vandendriessche, T., Deroose, C., Wijeyekoon, B., Nuyts, J., Jordan, B., Silasi-Mansat, R., Lupu, F., Dewerchin, M., Pugh, C., Salmon, P., Mortelmans, L., Gallez, B., Gorus, F., Buyse, J., Sluse, F., Harris, R. A., Gnaiger, E., Hespel, P., Van Hecke, P., Schuit, F., Van Veldhoven, P., Ratcliffe, P., Baes, M., Maxwell, P. und Carmeliet, P. (2008). Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* 40, 170-80.
- Bae, S., Jeong, J., Park, J. A., Kim, S., Bae, M., Choi, S. und Kim, K. (2004). Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 394-400.
- Baek, J. H., Mahon, P. C., Oh, J., Kelly, B., Krishnamachary, B., Pearson, M., Chan, D. A., Giaccia, A. J. und Semenza, G. L. (2005). OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell* 17, 503-12.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. und Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-86.

- Berchner-Pfannschmidt, U., Tug, S., Trinidad, B., Oehme, F., Yamac, H., Wotzlaw, C., Flamme, I. und Fandrey, J. (2008). Nuclear Oxygen Sensing: Induction of Endogenous Prolyl-hydroxylase 2 Activity by Hypoxia and Nitric Oxide. *J Biol Chem* 283, 31745-53.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D. und Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 22, 4082-90.
- Berta, M. A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J. und Brahimi-Horn, M. C. (2007). SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 646-52.
- Bishop, T., Gallagher, D., Pascual, A., Lygate, C. A., de Bono, J. P., Nicholls, L. G., Ortega-Saenz, P., Oster, H., Wijeyekoon, B., Sutherland, A. I., Grosfeld, A., Aragonés, J., Schneider, M., van Geyte, K., Teixeira, D., Diez-Juan, A., Lopez-Barneo, J., Channon, K. M., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Davies, A. M., Carmeliet, P. und Ratcliffe, P. J. (2008). Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 28, 3386-400.
- Boddy, M. N., Howe, K., Etkin, L. D., Solomon, E. und Freemont, P. S. (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13, 971-82.
- Bohren, K. M., Nadkarni, V., Song, J. H., Gabbay, K. H. und Owerbach, D. (2004). A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279, 27233-8.
- Boulikas, T. (1995). Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 5, 1-77.

- Bruick, R. K. und McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-40.
- Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G. K., Holsboer, F. und Arzt, E. (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. *Cell* 131, 309-23.
- Chan, D. A., Sutphin, P. D., Yen, S. und Giaccia, A. J. (2005). Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell Biol* 25, 6415-26.
- Chen, A., Wang, P., Yang, Y., Huang, Y., Yeh, J., Chou, Y., Cheng, J., Hong, Y. und Li, S. S. (2006). SUMO regulates the cytoplasmic-nuclear transport of its target protein Daxx. *J Cell Biochem* 98, 895-911.
- Chen, C. F., Li, S., Chen, Y., Chen, P. L., Sharp, Z. D. und Lee, W. H. (1996). The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin- α subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem* 271, 32863-8.
- Cheng, J., Kang, X., Zhang, S. und Yeh, E. T. H. (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 α during hypoxia. *Cell* 131, 584-95.
- Christophe, D., Christophe-Hobertus, C. und Pichon, B. (2000). Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell Signal* 12, 337-41.
- Chuderland, D., Konson, A. und Seger, R. (2008). Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Mol Cell* 31, 850-61.
- Chun, Y. S., Choi, E., Yeo, E. J., Lee, J. H., Kim, M. S. und Park, J. W. (2001). A new HIF-1 α variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. *J Cell Sci* 114, 4051-61.

- Chun, Y., Choi, E., Kim, T., Kim, M. und Park, J. (2002). A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1alpha gene. *Biochem J* 362, 71-9.
- Cimarosti, H., Lindberg, C., Bomholt, S. F., Rønn, L. C. B. und Henley, J. M. (2008). Increased protein SUMOylation following focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 54, 280-9.
- Comerford, K. M., Leonard, M. O., Karhausen, J., Carey, R., Colgan, S. P. und Taylor, C. T. (2003). Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 986-91.
- Conti, E. und Kuriyan, J. (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure* 8, 329-38.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. und Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94, 193-204.
- Couvelard, A., Deschamps, L., Rebours, V., Sauvanet, A., Gatter, K., Pezzella, F., Ruszniewski, P. und Bedossa, P. (2008). Overexpression of the oxygen sensors PHD-1, PHD-2, PHD-3, and FIH Is associated with tumor aggressiveness in pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res* 14, 6634-9.
- de Cristofaro, T., Mascia, A., Pappalardo, A., D'Andrea, B., Nitsch, L. und Zannini, M. (2008). Pax8 protein stability is controlled by sumoylation. *J Mol Endocrinol*. 2008. Oct. 30.

- Depping, R., Schindler, S., Friedrich, B., Sommer, N., Hartmann, E., Jelkmann, W., Metzen, E. und Köhler, M. (2005). Nuclear translocation of hypoxia-sensing transcription factors: involvement of the importin alpha/beta-system. *FEBS Journal* Vol. 272, Suppl.1.
- Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S. G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzen, E., Hartmann, E. und Köhler, M. (2008). Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta* 1783, 394-404.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. und Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell* 2, 233-9.
- Desterro, J. M., Thomson, J. und Hay, R. T. (1997). Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* 417, 297-300.
- Dingwall, C. und Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* 16, 478-81.
- Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., Solomon, E., de Thé, H., Hay, R. T. und Freemont, P. S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3), 381-93.
- Ebert, B. L., Gleadle, J. M., O'Rourke, J. F., Bartlett, S. M., Poulton, J. und Ratcliffe, P. J. (1996). Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. *Biochem J* 313 (Pt 3), 809-14.
- Eloranta, J. J. und Hurst, H. C. (2002). Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumoylated *in vivo*. *J Biol Chem* 277, 30798-804.

- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. und Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4273-8.
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C.W., Schofield, C. J. und Ratcliffe, P. J. (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43-54.
- Erkmann, J. A. und Kutay, U. (2004). Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp Cell Res* 296, 12-20.
- Fagerlund, R., Melén, K., Cao, X. und Julkunen, I. (2008). NF-kappaB p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin alpha molecules. *Cell Signal* 20, 1442-51.
- Fandrey, J. (2007). Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1. *BIOspektrum*, 13. Jahrgang, 26-28.
- Fontes, M. R., Teh, T. und Kobe, B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol* 297, 1183-94.
- Fontes, M. R. M., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R. I. und Kobe, B. (2003a). Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence Bindung by importin-alpha. *J Biol Chem* 278, 27981-7.

- Fontes, M. R. M., Teh, T., Toth, G., John, A., Pavo, I., Jans, D. A. und Kobe, B. (2003b). Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin-alpha. *Biochem J* 375, 339-49.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. und Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-60.
- Fried, H. und Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60, 1659-88.
- Friedmann, E., Salzberg, Y., Weinberger, A., Shaltiel, S. und Gerst, J. E. (2002). YOS9, the putative yeast homolog of a gene amplified in osteosarcomas, is involved in the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi transport of GPI-anchored proteins. *J Biol Chem* 277, 35274-81.
- Friedrich, B., Quensel, C., Sommer, T., Hartmann, E. und Köhler, M. (2006). Nuclear localization signal and protein context both mediate importin alpha specificity of nuclear import substrates. *Mol Cell Biol* 26, 8697-709.
- Giarrè, M., Török, I., Schmitt, R., Gorjánác, M., Kiss, I. und Mechler, B. M. (2002). Patterns of importin-alpha expression during *Drosophila* spermatogenesis. *J Struct Biol* 140, 279-90.
- Giatromanolaki, A., Koukourakis, M. I., Pezzella, F., Turley, H., Sivridis, E., Bouros, D., Bougioukas, G., Harris, A. L. und Gatter, K. C. (2008). Expression of prolyl-hydroxylases PHD-1, 2 and 3 and of the asparagine hydroxylase FIH in non-small cell lung cancer relates to an activated HIF pathway. *Cancer Lett.* 2008 Jan 8.
- Gill, G. (2003). Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Curr Opin Genet Dev* 13, 108-13.

- Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15, 536-41.
- Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18, 2046-59.
- Ginouvès, A., Ilc, K., Macías, N., Pouysségur, J. und Berra, E. (2008). PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4745-50.
- Goodson, M. L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Park-Sarge, O. K. und Sarge, K. D. (2001). Sumo-1 modification regulates the DNA Bindung activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem* 276, 18513-8.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. und Hartmann, E. (1996). A 41 amino acid motif in importin-alpha confers Bindung to importin-beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J* 15, 1810-7.
- Görlich, D. und Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-60.
- Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A. und Hartmann, E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 79, 767-78.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M. und Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18, 6462-71.
- Groulx, I. und Lee, S. (2002). Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 22, 5319-36.

- Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L. und Bradfield, C. A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 7, 205-13.
- Hamard, P., Boyer-Guittaut, M., Camuzeaux, B., Dujardin, D., Hauss, C., Oelgeschläger, T., Vigneron, M., Kedinger, C. und Chatton, B. (2007). Sumoylation delays the ATF7 transcription factor subcellular localization and inhibits its transcriptional activity. *Nucleic Acids Res* 35, 1134-44.
- Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. und Schär, P. (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J* 21, 1456-64.
- Harel, A. und Forbes, D. J. (2004). Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol Cell* 16, 319-30.
- Hattori, T., Eberspaecher, H., Lu, J., Zhang, R., Nishida, T., Kahyo, T., Yasuda, H. und de Crombrughe, B. (2006). Interactions between PIAS proteins and SOX9 result in an increase in the cellular concentrations of SOX9. *J Biol Chem* 281, 14417-28.
- Hay, R. T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.
- Heun, P. (2007). SUMO Organization of the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 19, 350-5.
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-41.
- Hogarth, C. A., Calanni, S., Jans, D. A. und Loveland, K. L. (2006). Importin alpha mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis. *Dev Dyn* 235, 253-62.

- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Mayhew, C. N., Goodson, M. L., Park-Sarge, O. K., Sarge, K. D. und Goodson, M. (2001). Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276, 40263-7.
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M. und Lee, F. S. (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 277, 39792-800.
- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M. und Bunn, H. F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271, 32253-9.
- Huang, Z. J., Edery, I. und Rosbash, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* 364, 259-62.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. und Kaelin, W.G. Jr. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-8.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, Av., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. und Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-72.
- Jokilehto, T., Rantanen, K., Luukkaa, M., Heikkinen, P., Grenman, R., Minn, H., Kronqvist, P. und Jaakkola, P. M. (2006). Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res* 12, 1080-7.

- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. und Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.
- Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. und Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* 17, 6573-86.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Fukuda-Kamitani, T. und Yeh, E. T. (1998). Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* 273, 11349-53.
- Katschinski, D. M., Le, L., Schindler, S. G., Thomas, T., Voss, A. K. und Wenger, R. H. (2004). Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. *Cell Physiol Biochem* 14, 351-60.
- Kewley, R. J., Whitelaw, M. L. und Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 189-204.
- Knipscheer, P., van Dijk, W. J., Olsen, J. V., Mann, M. und Sixma, T. K. (2007). Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *EMBO J* 26, 2797-807.
- Kodiha, M., Chu, A., Matusiewicz, N. und Stochaj, U. (2004). Multiple mechanisms promote the inhibition of classical nuclear import upon exposure to severe oxidative stress. *Cell Death Differ* 11, 862-74.
- Köhler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H. und Hartmann, E. (1997). Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett* 417, 104-8.

- Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D. und Hartmann, E. (1999). Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol* 19, 7782-91.
- Köhler, M., Fiebler, A., Hartwig, M., Thiel, S., Prehn, S., Kettritz, R., Luft, F. C. und Hartmann, E. (2002). Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 12, 335-44.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. und Yanagawa, H. (2008). Six classes of nuclear localization signals specific to different Bindung grooves of importin alpha. *J Biol Chem.* 2008 Nov. 10.
- Kvietikova, I., Wenger, R. H., Marti, H. H. und Gassmann, M. (1997). The hypoxia-inducible factor-1 DNA recognition site is cAMP-responsive. *Kidney Int* 51, 564-6.
- Kvietikova, I., Wenger, R. H., Marti, H. H. und Gassmann, M. (1995). The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res* 23, 4542-50.
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L. und Bruick, R. K. (2002b). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16, 1466-71.
- Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J. und Whitelaw, M. L. (2002a). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295, 858-61.

- Lee, K., Park, J. und Chun, Y. (2004). Non-hypoxic transcriptional activation of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in concert with a novel hypoxia-inducible factor-1alpha isoform. *Nucleic Acids Res* 32, 5499-511.
- Li, W. und Ye, Y. (2008). Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 65, 2397-406.
- Lim, R. Y. H. und Fahrenkrog, B. (2006). The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol* 18, 342-7.
- Lim, R. Y. H., Ullman, K. S. und Fahrenkrog, B. (2008). Biology and biophysics of the nuclear pore complex and its components. *Int Rev Cell Mol Biol* 267, 299-342.
- Lisy, K. und Peet, D. J. (2008). Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ* 15, 642-9.
- Luo, J. C. und Shibuya, M. (2001). A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene* 20, 1435-44.
- Lyst, M. J. und Stancheva, I. (2007). A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans* 35, 1389-92.
- Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 570-94, table of contents.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. und Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.

- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A. und Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414, 550-4.
- Malnou, C. E., Salem, T., Brockly, F., Wodrich, H., Piechaczyk, M. und Jariel-Encontre, I. (2007). Heterodimerization with Jun family members regulates c-Fos nucleocytoplasmic traffic. *J Biol Chem* 282, 31046-59.
- Marxsen, J. H., Stengel, P., Doege, K., Heikkinen, P., Jokilehto, T., Wagner, T., Jelkmann, W., Jaakkola, P. und Metzen, E. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J* 381, 761-7.
- Masson, N. und Ratcliffe, P. J. (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J Cell Sci* 116, 3041-9.
- Matunis, M. J., Coutavas, E. und Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135, 1457-70.
- Matunis, M. J., Wu, J. und Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 140, 499-509.
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R. und Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-5.
- Maynard, M. A., Evans, A. J., Shi, W., Kim, W. Y., Liu, F. und Ohh, M. (2007). Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle* 6, 2810-6.

- Meissner, T., Krause, E. und Vinkemeier, U. (2004). Ratjadone and leptomycin B block CRM1-dependent nuclear export by identical mechanisms. *FEBS Lett* 576, 27-30.
- Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 591-626.
- Melen, K., Fagerlund, R., Franke, J., Kohler, M., Kinnunen, L. und Julkunen, I. (2003). Importin alpha nuclear localization signal Bindung sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem* 278, 28193-200.
- Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W. Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Bürgel, T., Jelkmann, W., Acker, H. und Fandrey, J. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116, 1319-26.
- Minamishima, Y. A., Moslehi, J., Bardeesy, N., Cullen, D., Bronson, R. T. und Kaelin, W. G. (2008). Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* 111, 3236-44.
- Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J. und Michiels, C. (1999). Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett* 460, 251-6.
- Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J., Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S., Shigeta, M., Hiraoka, Y., Haraguchi, T. und Yoneda, Y. (2004). Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin alpha and cause a conventional nuclear import block. *J Cell Biol* 165, 617-23.
- Moroianu, J. (1998). Distinct nuclear import and export pathways mediated by members of the karyopherin beta family. *J Cell Biochem* 70, 231-9.

- Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 202-10.
- Mukhopadhyay, D. und Dasso, M. (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci* 32, 286-95.
- Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E. und Simos, G. (2008). Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J Biol Chem* 283, 27620-7.
- Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S. und Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 281, 33095-106.
- Navascues, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, M. T. und Lafarga, M. (2008). SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J Struct Biol* 163, 137-46.
- Navascués, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Vaqué, J. P., Lafarga, M. und Berciano, M. T. (2007). Characterization of a new SUMO-1 nuclear body (SNB) enriched in pCREB, CBP, c-Jun in neuron-like UR61 cells. *Chromosoma* 116, 441-51.
- Nigg, E. A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-87.
- Oehme, F., Ellinghaus, P., Kolkhof, P., Smith, T. J., Ramakrishnan, S., Hütter, J., Schramm, M. und Flamme, I. (2002). Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 343-9.

- Ohuchi, T., Seki, M., Branzei, D., Maeda, D., Ui, A., Ogiwara, H., Tada, S. und Enomoto, T. (2008). Rad52 sumoylation and its involvement in the efficient induction of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 7, 879-89.
- Ossareh-Nazari, B. und Dargemont, C. (1999). Domains of Crm1 involved in the formation of the Crm1, RanGTP, and leucine-rich nuclear export sequences trimeric complex. *Exp Cell Res* 252, 236-41.
- Ozer, A. und Bruick, R. K. (2005). Regulation of HIF by prolyl hydroxylases: recruitment of the candidate tumor suppressor protein ING4. *Cell Cycle* 4, 1153-6.
- Ozer, A., Wu, L. C. und Bruick, R. K. (2005). The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7481-6.
- Palmeri, D. und Malim, M. H. (1999). Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol* 19, 1218-25.
- Palvimo, J. J. (2007). PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans* 35, 1405-8.
- Perkins, N. D. (2006). Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25, 6717-30.
- Petrulis, J. R., Kusnadi, A., Ramadoss, P., Hollingshead, B. und Perdew, G. H. (2003). The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem* 278, 2677-85.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. und Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-20.

- Pichler, A. und Melchior, F. (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* 3, 381-7.
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O. A. und Palvimo, J. J. (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14145-50.
- Quensel, C., Friedrich, B., Sommer, T., Hartmann, E. und Kohler, M. (2004). In vivo analysis of importin alpha proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. *Mol Cell Biol* 24, 10246-55.
- Reich, N. C. (2002). Nuclear/cytoplasmic localization of IRFs in response to viral infection or interferon stimulation. *J Interferon Cytokine Res* 22, 103-9.
- Reisz-Porszasz, S., Probst, M. R., Fukunaga, B. N. und Hankinson, O. (1994). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol Cell Biol* 14, 6075-86.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. und Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615-23.
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C. und Hay, R. T. (2001). SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting. *J. Biol. Chem.* 276, 12654-12659.
- Saitoh, H. und Hinchey, J. (2000). Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* 275, 6252-6258.
- Seeler, J. S. und Dejean, A. (2001). SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7243-9.

- Semenza, G. L., Agani, F., Booth, G., Forsythe, J., Iyer, N., Jiang, B. H., Leung, S., Roe, R., Wiener, C. und Yu, A. (1997). Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int* 51, 553-5.
- Semenza, G. L. und Wang, G. L. (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, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-32.
- Shao, R., Zhang, F., Tian, F., Anders Friberg, P., Wang, X., Sjöland, H. und Billig, H. (2004). Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett* 569, 293-300.
- Shen, Z., Pardington-Purtymun, P. E., Comeaux, J. C., Moyzis, R. K. und Chen, D. J. (1996). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36, 271-9.
- Smith, T. G., Robbins, P. A. und Ratcliffe, P. J. (2008). The human side of hypoxia-inducible factor. *Br J Haematol* 141, 325-34.
- Soilleux, E. J., Turley, H., Tian, Y. M., Pugh, C. W., Gatter, K. C. und Harris, A. L. (2005). Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. *Histopathology* 47, 602-10.
- Soutoglou, E., Demény, M. A., Scheer, E., Fienga, G., Sassone-Corsi, P. und Tora, L. (2005). The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain-containing interaction partners. *Mol Cell Biol* 25, 4092-104.

- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. und Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90, 1041-50.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Reich, B. und Will, H. (1999). The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem* 274, 12555-66.
- Stiehl, D. P., Wirthner, R., Köditz, J., Spielmann, P., Camenisch, G. und Wenger, R. H. (2006). Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem* 281, 23482-91.
- Takahashi, Y. (2004). Identification and function of ubiquitin-like protein SUMO E3 (PIAS family and RanBp2, Pc2). *Seikagaku* 76, 381-4.
- Takeda, K., Aguila, H. L., Parikh, N. S., Li, X., Lamothe, K., Duan, L., Takeda, H., Lee, F. S. und Fong, G. (2008). Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. *Blood* 111, 3229-35.
- Takeda, K., Cowan, A. und Fong, G. (2007). Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system. *Circulation* 116, 774-81.
- Takeda, K., Ho, V. C., Takeda, H., Duan, L., Nagy, A. und Fong, G. (2006). Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol* 26, 8336-46.
- Tang, Z., Hecker, C. M., Scheschonka, A. und Betz, H. (2008). Protein interactions in the sumoylation cascade: lessons from X-ray structures. *FEBS J* 275, 3003-15.

- Tempé, D., Piechaczyk, M. und Bossis, G. (2008). SUMO under stress. *Biochem Soc Trans* 36, 874-8.
- Tian, S., Poukka, H., Palvimo, J. J. und Jänne, O. A. (2002). Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J* 367, 907-11.
- Tojo, M., Matsuzaki, K., Minami, T., Honda, Y., Yasuda, H., Chiba, T., Saya, H., Fujii-Kuriyama, Y. und Nakao, M. (2002). The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *J Biol Chem* 277, 46576-85.
- Verger, A., Perdomo, J. und Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4, 137-42.
- Vertegaal, A. C. O. (2007). Small ubiquitin-related modifiers in chains. *Biochem Soc Trans* 35, 1422-3.
- Viault, F. (1890). Sur l'augmentation considérable du nombre des globules rouges dans le sang chez les habitants des hautes plateaux de l'Amérique du Sud. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Académie des Sciences, Paris*, 917-918.
- Wang, Y., Fu, X., Gaiser, S., Köttgen, M., Kramer-Zucker, A., Walz, G. und Wegierski, T. (2007). OS-9 regulates the transit and polyubiquitination of TRPV4 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 282, 36561-70.
- Wenger, R. H., Kvietikova, I., Rolfs, A., Camenisch, G. und Gassmann, M. (1998). Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-Bindung site. *Eur J Biochem* 253, 771-7.

- Whitelaw, M. L., Göttlicher, M., Gustafsson, J. A. und Poellinger, L. (1993). Definition of a novel ligand Bindung domain of a nuclear bHLH receptor: co-localization of ligand and hsp90 Bindung activities within the regulable inactivation domain of the dioxin receptor. *EMBO J* 12, 4169-79.
- Wiesener, M. S., Turley, H., Allen, W. E., Willam, C., Eckardt, K. U., Talks, K. L., Wood, S. M., Gatter, K. C., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. und Maxwell, P. H. (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 92, 2260-8.
- Wu, S., Nishiyama, N., Kano, M. R., Morishita, Y., Miyazono, K., Itaka, K., Chung, U. und Kataoka, K. (2008). Enhancement of angiogenesis through stabilization of hypoxia-inducible factor-1 by silencing prolyl hydroxylase domain-2 gene. *Mol Ther* 16, 1227-34.
- Xu, L. und Massagué, J. (2004). Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 209-19.
- Yang, S., Jaffray, E., Hay, R. T. und Sharrocks, A. D. (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* 12, 63-74.
- Yang, W., Sheng, H., Warner, D. S. und Paschen, W. (2008). Transient global cerebral ischemia induces a massive increase in protein sumoylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 269-79.
- Yoshida, M. und Horinouchi, S. (1999). Trichostatin and leptomycin. Inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann N Y Acad Sci* 886, 23-36.
- Zhang, X., Wang, K., Wang, Z., Xu, L., Wang, Q., Chen, F., Wei, D. und Han, Z. (2005). Nuclear localization signal of ING4 plays a key role in its Bindung to p53. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 1032-8.

Ziegler, E. C. und Ghosh, S. (2005). Regulating inducible transcription through controlled localization. Sci STKE 2005, re6.

8. ANHANG

8.1 ABKÜRZUNGEN

2-OG	2-Oxoglutarat
AD	Aktivierungsdomäne
AP-1/-2	Synonym für <i>jun oncogene</i>
ARM	Armadillo Motiv
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATF7	Activating Transcription Factor 7
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BRCA1	Breast Cancer 1
BSA	Rinder Serum-Albumin
CAD	C-terminale Transaktivierungsdomäne
CBP	CREB Bindung Protein
c-Jun	<i>jun oncogene</i>
CRM1	Chromosome maintenance 1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
Elk1	Mitglied der Familie der ETS Onkogene
EPAS1	Endothelial PAS Domain Protein 1 oder auch HIF-2 α
EPO	Erythropoietin
ERK1	MAPK3, „mitogen-activated protein kinase 3“
FIH1	Factor-Inhibiting HIF 1
FKS	fötales Kälberserum
FSG	Fish Skin Gelatine
GAL4	Hefe-spezifischer Transkriptionsfaktor
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein

GLUT-1/-3	Glukosetransporter 1/3
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HIS	6x-Histidin-Tag
HRE	Hypoxie-Responsives Element
HSF1/2	Heat shock factor 1/2
HSP90	Heat Shock Protein 90
ING4	Inhibitor of Growth Family Member 4
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IPAS	Inhibitory PAS Domain Protein, Splicevariante von HIF-3 α
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IVTT	<i>In Vitro</i> Transkription und Translation
LB	Luria Broth Medium
LMB	Leptomycin B
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
MEL1	Alpha-Galactosidase in Hefe
NAD	N-terminale Transaktivierungsdomäne
NES	Nuclear Export Signal (Kernexportsignal)
NLS	Nuclear Localisation Signal (Kernlokalisationssignal)
NPC	Nuclear Pore Complex (Kernporenkomplex)
OD	optische Dichte
ODD Domäne	Oxygen-Dependent-Degradation Domäne
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
OS9	Protein amplified in Osteosarcoma 9
PAS	Per-Arnt-Sim
PAX8	Paired Box Gene 8
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PHD	Prolyl Hydroxylase Domain Containing Protein
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
PML	Promyelocytic Leukemia

pVHL	von-Hippel-Lindau Protein
Ran	Ras-Related Nuclear Protein
RanBP2	RAN Bindung Protein 2
RelB	v-Rel Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog B
RIPA	Radio-Immuno-Precipitation-Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
SAE1/2	SUMO Activating Enzyme 1/2
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SENp	SUMO1/Sentrin Specific Peptidase
SMAD3	SMAD Family Member 3
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9
SUMO	Small Ubiquitin Related Modifier
TAF10	TATA Box Bindung Protein (TBP)-Associated Factor
TB	Terrific Broth Medium
UBC9	Ubiquitin Conjugating Enzyme 9
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
XAP2	Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein

8.2 LEBENS LAUF

Name: Amrei Steinhoff

Geburtsdatum: 11.08.1980

Geburtsort: Stade

Akademischer Werdegang:

Seit 10/05	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologie in Lübeck
09/00-05/05	Studium der Biotechnologie an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Hamburg
1.6.05	Abschluss des Studiums als Dipl.Ing. (FH) der Biotechnologie

Praktische Erfahrungen:

09/04-04/05	Diplomarbeit am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg, Abteilung Molekulare Zellbiologie. Thema: <i>„Untersuchungen zur Dynamik des Kerngerüsts in lebenden Zellen“</i>
09/03-03/04	Praxissemester am Carlsberg Research Centre, in Kopenhagen, Dänemark, Department of Physiology. Thema: <i>“Characterisation of the role of the caspase Yca1p during different environmental stresses”</i>
09/02-03/03	Projekt am Forschungsschwerpunkt Bioprozess- und Analysentechnik, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg. Titel: <i>„Etablierung eines Western Blots zur Analyse des rekombinanten Proteins I-TAC aus Kultivierung mit Pichia pastoris“</i>

8.3 VERÖFFENTLICHUNGEN UND ABSTRACTS

Publikationen:

Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, Hartmann E, Köhler M. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1783(3):394-404. Epub 2008 Jan 8.

Steinhoff A, Möckel S, Kettelhake A, Hartmann E, Köhler M, Depping R.

Cellular oxygen sensing: Importins and Exportins are effectors of intracellular localisation of Prolyl-4-Hydroxylases PHD1 and PHD2.

In Submission

Abstracts:

Hilz A., Kettelhake, A., Köhler, M., Metzen, E., Depping, R. Intracellular Allocation of human HIF-alpha hydroxylases. *Annals of Hematology*, Vol 85, Number 9, Sept 2006.

Hilz A., Schindler, SG., Köhler, M., Depping, R. Nuclear Import of human HIF-1 α hydroxylases: Characterisation of NLS in human PHD1 and PHD3. *Acta Physiologica*, Vol. 189, Suppl. 653, March 2007.

Hilz A., Schillinger, T., Schindler, S.G., Köhler, M., Depping, R. Characterisation of NLS in human PHD1 and PHD3. *FEBS Journal*, Vol. 274, Suppl. 1, Jul. 2007.

Steinhoff A., Kaiser, FJ., Depping, R. SUMOylation of HIF-1 α and HIF-2 α . *FEBS Journal*, Vol. 275, Suppl. 1, Jun. 2008.

8.4 VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN

Vorträge:

XI. Treffen hansischer Physiologen des Ostseeraumes, 19. - 20. 05.2006 in Lübeck.

Titel: *Die Funktion von spezifischen Kerntransport-Faktoren für die O₂-Sensorik*

XII. Treffen hansischer Physiologen des Ostseeraumes, 10. - 11. 05.2007 in Kiel.

Titel: *SUMO – in der Arena mit HIF-1 α ?*

Posterpräsentationen:

7th International Luebeck Conference on the Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin and other Hemopoietic Growth Factors, 2006 in Lübeck.

Authors: Amrei Hilz, Antje Kettelhake, Susann Schindler, Matthias Köhler, Reinhard Depping

Titel: *Intracellular allocation of human HIF α Hydroxylases*

Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2007 in Hannover.

Authors: Amrei Hilz, Thomas Schillinger, Susann Schindler, Matthias Köhler, Reinhard Depping

Titel: *Nuclear import of human HIF-1 α hydroxylases: Characterisation of NLS in human PHD1 and PHD3*

Erster Lübecker Doktorandentag - Uni im Dialog, 06. Juni 07 in Lübeck.

Authors: Amrei Hilz, Reinhard Depping

Titel: *Die Rolle des Kernimports beim O₂-Sensing*

7th FEBS Young Scientist Forum, 5.-7. Juli 2007 in Wien.

Authors: A. Hilz, M. Köhler, R. Depping

Titel: *Characterisation of NLS in human PHD1 and PHD3*

32nd FEBS Congress Molecular Machines, Molecular Machines, 7.-12. Juli 2007
in Wien.

Authors: A. Hilz, M. Köhler, R. Depping

Titel: *Characterisation of NLS in human PHD1 and PHD3*

2. Lübecker Doktorandentag – Uni im Dialog, 04. Juni 08 in Lübeck.

Authors: Amrei Steinhoff, Reinhard Depping

Titel: *Molekulare Vorgänge in der Zelle bei Sauerstoffmangel*

33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, Biochemistry of Cell Regulation,
28.6-3.7.2008, in Athen.

Authors: Amrei Steinhoff, Frank Kaiser, Reinhard Depping

Titel: *SUMOylation of HIF-1 α and HIF-2 α*

8.5 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Physiologie durchzuführen, für seine fortwährende Begeisterung über meine Arbeit und die Unterstützung im Verfahren der Zulassung zur Promotion.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Reinhard Depping für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung in seiner Arbeitsgruppe. Danke für die meist offene Tür und all die Ratschläge und Diskussionen. Danke für das Vertrauen in meine Arbeit und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ich danke der FEBS für die Einladung zum Young Scientist Forum 2007 und das damit verbundene Stipendium für den 8-tägigen Aufenthalt in Wien, sowie der GBM für den Reisekostenzuschuss zur Reise nach Athen zum Besuch der jährlichen Tagung der FEBS 2008. Der DFG danke ich für die Finanzierung meiner Stelle.

Bedanken möchte ich mich auch bei Susann Schindler für die gute Zusammenarbeit im Labor und für all die Methoden, Tipps und Tricks, die ich von ihr lernen durfte sowie für die nicht endende Hilfsbereitschaft auch in letzter Minute. Danke für die schöne und lustige Zeit in Labor 123, für die Diskussionen und Gespräche.

Dr. Frank Kaiser danke ich für die Unterstützung und Hilfe bei der Bearbeitung des SUMO-Themas, sowie für die nette Aufnahme in seinem Labor im Institut für Humangenetik zur Durchführung einiger Experimente.

Bei Ursula von Wussow muss ich mich für die Aufnahme in ihrem Büro bedanken. Außerdem für das immer offene Ohr, wenn es mal nicht so gut lief, die Geduld beim Zuhören und vor allem für die lustigen Stunden innerhalb und außerhalb des Instituts und die vielen Touren zum Bahnhof.

Meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen Susanne Mathie, Tom Schillinger, Dominic Meusch, Friederike Jung und Antje Kettelhake möchte ich für das gute Arbeitsklima danken. Tanja Svensson danke ich für das Ansetzen der Zellkultur und für die damit verbundene Hilfe. Ein Dank gilt auch dem gesamten Institut für Physiologie für ein nettes Arbeitsumfeld.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinem Mann Kenneth danke ich für seine fortwährende Unterstützung und seinen nicht endenden Glauben an mich. Wenn ich durchhing, war er es, der meinen Blick wieder auf das Ziel gelenkt hat. Meinen Eltern Johanna und Wilhelm Hiltz danke ich für die Ermöglichung des Studiums und all ihre Unterstützung bis heute. Außerdem danke ich meinem Bruder Hauke Hiltz, seiner Frau Yee Hiltz und allen Freunden für ihre Anteilnahme und ihr Interesse an meiner Arbeit.

8.6 EIDESSTATLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen habe und dass ich die hier beigefügte Arbeit selbständig angefertigt habe. Die dabei verwendeten Hilfsmittel und Quellen habe ich vollständig angegeben.

Lübeck, den

Amrei Steinhoff