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

Die Bedeutung des Lektins OS9

für die Regulation des Transkriptionsfaktors

Hypoxie-induzierbarer Faktor-1

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

vorgelegt von
Corinna Platzek
aus Schneverdingen

Lübeck 2011

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Eric Metzen
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Jan Rupp
Tag der mündlichen Prüfung:	15.12.2011
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	15.12.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 8

1.1 Sauerstoffmangel und dessen Bedeutung für die Medizin 8

1.2 Der Transkriptionsfaktor HIF: Aufbau, Funktion und Regulation 9

1.3 Das Lektin OS9 15

1.4 Zielsetzung der Arbeit 17

2. Material und Methoden 19

2.1 Lösungen und Puffer 19

2.2 Antikörper 22

2.3 Enzyme und Puffer 22

2.4 Plasmide und siRNA 23

2.5 Molekularbiologische Methoden 23

2.5.1 Klonierung von Plasmiden 23

2.5.2 Plasmidpräparation: Herstellung einer Mini-Präparation 25

2.5.3 Testverdau 25

2.5.4 Sequenzierung 26

2.5.5 Plasmidpräparation: Herstellung einer Maxi-Präparation 26

2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 26

2.7 Eukaryotische Zellkultur 27

2.7.1 Zelllinien 27

2.7.2 Zellkultur und Subkultivierung 28

2.7.3 Transiente Transfektion mit Plasmiden 28

2.7.4 Behandlung der Zellen mit Chemikalien 29

2.7.5 Transfektion der Zellen mit siRNA 30

2.8 Proteinbiochemische Methoden 30

2.8.1 Isolation von Gesamtzellprotein 30

2.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung 31

2.8.3 Western Blot 31

2.8.4 Co-Immunpräzipitation 32

2.9 Immunfluoreszenz 33

3. Ergebnisse 35

3.1 Regulation von HIF-1α 35

3.1.1 Einfluss von Hemmstoffen der Prolylhydroxylasen auf HIF-1 α 35

3.1.2 Die Rolle der Prolylhydroxylase 2 in der HIF-1α-Regulation 36

3.2 Expression, Regulation und Abbau des Lektins OS9 37

3.2.1 Expression von OS9 in unterschiedlichen Zelllinien 37

3.2.2 Spleißvarianten von OS9 38

3.2.3 Expression von OS9 bei Inkubation unter Hypoxie und mit DMOG 39

3.2.4 Abbau von OS9 43

3.3 Co-Immunpräzipitation von PHD2 und OS9 46

3.4 Effekt von gesteigerter und verminderter OS9-Expression auf HIF-1α 49

3.5 Subzelluläre Lokalisation 51

4. Diskussion 56

5. Zusammenfassung 67

6. Literaturverzeichnis 68

7. Danksagung 76

8. Lebenslauf 77

Abkürzungen

A	Alanin
APS	Amoniumpersulfat
AE	Initialen des Spendernamens
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
Bcl2	B-Zell-Lymphom/Leukämie-2 Gen
BiP	Binding immunglobulin protein (Hsp70)
Borat	Salz der Borsäure
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CBP	CREB bindendes Protein
CGRP	Calcitonin gene related peptide
CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator 2
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoCl2	Cobaltchlorid
CPX	Ciclopirox
CREB	cAMP response element-binding (Transkriptionsfaktor)
CRM1	Exportin-1 Homolog in Hefen (Yeast)
DC-STAMP	Dendritic cell-specific transmembrane protein
DFO	Deferoxamin
DH	Initialen des Spendernamens
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
DMOG	Dimethyloxalylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDEM 1	ER degradation-enhancing α-mannosidase-like 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Epo	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum assoziiertes Degradationssystem
et al.	et alii, et aliae, et alia
Fibro	Fibroblasten

FIH-1	Factor Inhibiting HIF-1 (HIF-inhibierender Faktor)
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
Flt-1	VEGF-Rezeptor 1
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GLUT	Glukose-Transporter
GRP94	Endoplasmin (Chaperon der Hsp90-Familie)
HA	Hämagglutinin
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HJ	Initialen des Spendernamens
Hrd-1	ERAD-assoziierte E3 Ubiquitin-Proteinligase
HRE	Hypoxie-Responsibles Element
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Hsp	Hitze-Schock-Proteine
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
kb/kbp	Kilo-Basenpaare
kD	Kilodalton
Km	Michaelis-Menten-Konstante
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MG132	Proteasominhibitor (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucinal)
mRNA	messenger RNA
NFκB	Nuclear factor-κB
NH	Nebenhoden
NIP3-Gen	Nineteen kD interacting protein-3 aus der Bcl2 Familie
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization sequence)
NO	Stickstoffmonoxid
NP40	Tergitol-type NP-40
ODDD	Oxygen Dependend Degradation Domain
OS9	vermehrt in Osteosarkomen amplifiziertes Protein
O_2	Sauerstoff
PAS	Per/ARNT/Sim

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase (ER-Marker)
PHD	Prolylhydroxylase
PI-3	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PK	Synonym für V5-Tag
p53	Tumorsuppressorprotein, Molekulargewicht 53 kD
p300	Histon Acetyl-Transferase
RPMI	Medium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEL-1L	Sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)
siRNA	short interferring RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoproteins
SOB	Super Optimal Broth
SOC	SOB mit Glukosezusatz
SP6	Primer
TA	Thymin-Adenin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAD	Transaktivierungsdomäne
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPV4	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4
T7	Primer
Ub	Ubiquitin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VH	Vorhaut
VHL	Von-Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein
YOS9	OS9-Homolog in Hefen/Yeast

1. Einleitung

1.1 Sauerstoffmangel und dessen Bedeutung für die Medizin

Die Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase spielt bei verschiedensten Erkrankungen des menschlichen Organismus eine große Rolle. So kommt es bei zahlreichen Krankheitsbildern, insbesondere bei kardiovaskulären Erkrankungen und dem Wachstum von Tumoren, sowie auch bei chronischen Lungenerkrankungen zur Entstehung von Hypoxie, einem Mangelzustand an Sauerstoff (Semenza et al., 2000).

Beim Myokardinfarkt äußert sich dies als ischämische Zone, in der es unter anderem zu einer Überexpression des Proteins Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) kommt, die zur Angiogenese, also Neubildung von Blutgefäßen und damit verbesserter Sauerstoffversorgung des Gewebes führt. Bei der cerebralen Ischämie zeigt sich in der Penumbra, der direkt an den Infarkt grenzenden Zone, ebenfalls eine Induktion von VEGF, jedoch auch von Enzymen, die eine Umstellung auf die anaerobe Glykolyse ermöglichen und somit zum Überleben der Zellen in dieser Zone beitragen können (Semenza, 2000).

Das Wachstum von Tumoren, in denen es aufgrund des hohen Umsatzes und der enorm beschleunigten Zellteilung häufig zu hypoxischen Regionen kommt, stellt ein weiteres Beispiel dieser Regulation dar, die in diesem Zusammenhang allerdings negative Folgen für den Organismus hat. Durch die vermehrte Expression von VEGF kommt es auch hier zu einer verbesserten Durchblutung und Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes, die wiederum zu einem beschleunigten Wachstum des Tumors führt (Zundel et al., 2000).

Die Hauptrolle in der Regulation der Sauerstoffhomöostase und somit oben beschriebener Mechanismen zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung unter hypoxischen Bedingungen spielt der Hypoxie-induzierbare Faktor „HIF“ (Semenza, 1998).

Neben den genannten Wirkungen hat HIF aber auch einen induzierenden Effekt auf die p53-vermittelte Apoptose und transaktiviert ein proapoptotisches Gen (NIP3). Dies scheint dazu beizutragen Zellen zu eliminieren, die unfähig sind sich an die hypoxischen Bedingungen anzupassen (Semenza, 2000). Eine HIF-Überexpression in Tumoren wirkt sich insgesamt negativ auf die Prognose des Patienten aus (Semenza, 2003) und könnte somit einen Angriffspunkt für die Krebstherapie, jedoch auch für die Behandlung anderer mit Hypoxie assoziierter Erkrankungen, wie zum Beispiel der diabetischen Retinopathie und der pulmonalen Hypertension bieten (Mazure et al., 2004).

1.2 Der Transkriptionsfaktor HIF: Aufbau, Funktion und Regulation

Im Jahre 1992 beschrieben Semenza und Wang einen Faktor, der an den Enhancer des Erythropoetin-Gens bindet und seine Transkription induziert, und charakterisierten ihn im Jahre 1995 als zelltypunabhängigen ubiquitär exprimierten Hypoxie-induzierbaren Faktor „HIF“ (Semenza und Wang, 1992; Wang und Semenza, 1995). Dabei handelt es sich um eine Familie heterodimerer Transkriptionsfaktoren, die essentielle Mediatoren des menschlichen Sauerstoffhaushaltes darstellen. HIF wird unter hypoxischen Bedingungen induziert, wodurch es zu einer vermehrten Transkription seiner Zielgene kommt. Insgesamt sind bereits über 70 Gene bekannt, bei denen HIF als transaktivierender Faktor experimentell nachgewiesen ist. Jüngeren Mikroarray-Untersuchungen zufolge liegt die wirkliche Anzahl der Zielgene jedoch weit über dieser Zahl. So ist geschätzt worden, dass etwa 2% der gesamten transkribierten menschlichen Gene in Endothelzellen unter der Kontrolle von HIF stehen (Mazure et al., 2004). Die Funktion der Zielgene liegt vereinfacht gesagt in der Anpassung der Gewebe und des Organismus an hypoxische Bedingungen. Mit den prominentesten Vertretern Erythropoetin und VEGF seien zunächst nur zwei dieser Zielgene genannt. Zum besseren Verständnis der HIF-Regulation soll zunächst dessen Aufbau erläutert werden.

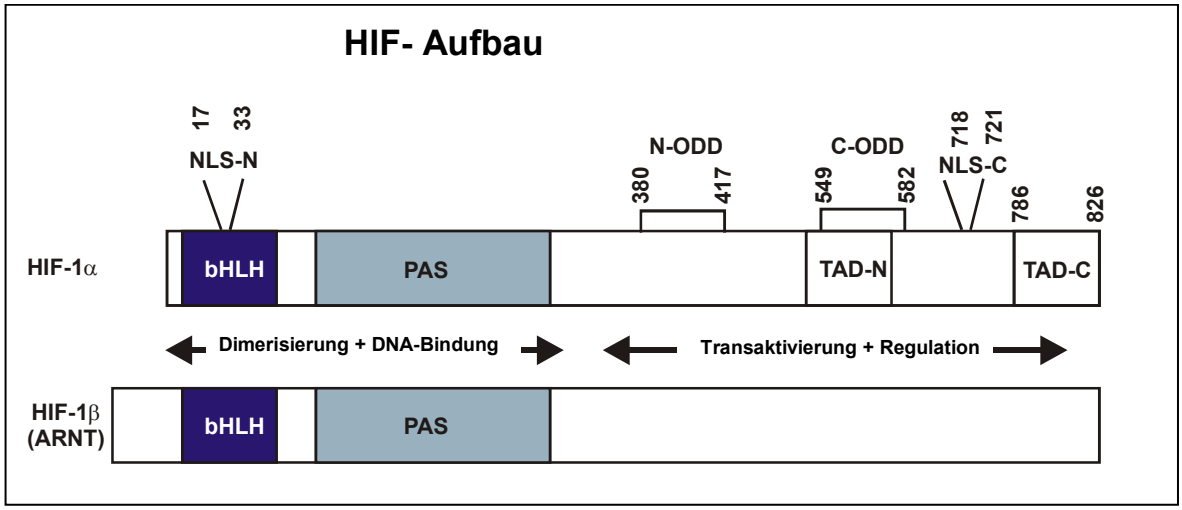


Abbildung 1.1: Aufbau des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF-1

In der HIF-1α-Untereinheit folgt auf eine N-terminale Kernlokalisationssequenz eine basische Helix-Loop-Helix Schleife mit anschließender PAS-Domäne. C-terminal befindet sich die N-TAD, eingebettet in die ODDD mit den für die Prolylhydroxylasen wichtigen Prolinen P 402 und P 564. Im Anschluss liegt die C-terminale Kernlokalisationssequenz sowie die C-TAD mit dem für den HIF-inhibierenden Faktor (FIH) wichtigen Asparagin N 803 (Abb. modifiziert nach Semenza,G.L. 2001).

Der Transkriptionsfaktor HIF besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten: aus einer sauerstoffresponsiblen α- und einer konstitutiv exprimierten β-Untereinheit (Wang und Semenza, 1995; Salceda und Caro, 1997). Es sind drei α-Untereinheiten bekannt, die teils gleiche, aber auch spezifische Funktionen aufweisen. Entscheidend für die sauerstoffabhängige Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 und damit auch am besten untersucht und im Folgenden dargestellt, ist die Untereinheit HIF-1α (Pugh et al., 1997).

Der N-Terminus beider HIF-1-Untereinheiten (α und β) enthält eine Kernlokalisations-sequenz, gefolgt von einer Helix-Schleife-Helix Domäne, über welche die DNA-Bindung und die Dimerisation der α- und β-Untereinheit erfolgt. Daneben besitzen die Untereinheiten am N-Terminus eine PAS-Domäne, die als Interaktionsstelle für Proteine dient und in die Dimerisation und andere Funktionen involviert ist (Jiang et al., 1996). Der C-terminale Anteil von HIF-1α dient der Degradation und der Transaktivierung. Er enthält im Bereich der Aminosäuren 531-826 zwei Transaktivierungsdomänen (TAD). Davon ist die Amino-terminale N-TAD (Aminosäure 531-575) durch Hypoxie induzierbar und in eine sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODDD) eingebettet, in der die Proline 402 und 564 enthalten sind, die für die Markierung durch die Prolylhydroxylasen entscheidend sind. Die ODDD hemmt die Transaktivierungsdomäne und ist verantwortlich für die sauerstoffabhängige Instabilität. Weiter zum C-terminalen Ende folgt die Carboxy-terminale Kernlokalisationssequenz und letztendlich die C-TAD (Aminosäure 786-826) (Jiang et al., 1997; Huang et al., 1998), in der das für die Regulation durch die Asparaginyl-Hydroxylase „Factor Inhibiting HIF-1“ (HIF-inhibierender Faktor, FIH) wichtige Asparagin N 803 enthalten ist. HIF-1α ist ubiquitär exprimiert und vorwiegend im Zellkern, zu einem geringen Anteil jedoch auch im Zytoplasma lokalisiert. Sein Transport in den Zellkern erfolgt durch eine direkte Interaktion der Kernlokalisationssequenz in der C-TAD mit den α–Importinen 1, 3, 5 und 7. Die N-TAD hingegen ist in diese Interaktion nicht involviert und scheint nicht effektiv zu sein (Wiener et al., 1996; Kallio et al., 1998; Depping et al., 2008).

Die Zielgene von HIF spielen eine große Rolle in der zellulären und physiologischen Reaktion auf Zustände akuter und auch chronischer Hypoxie und sind in die Erythropoese, die Angiogenese, die Glykolyse und in den vaskulären Umbau in Geweben involviert (Semenza, 2001). Allen HIF-Zielgenen ist eine Einheit gemeinsam, die auch als Hypoxie-responsibles Element (HRE) bezeichnet wird. In dieser Region bindet das Heterodimer aus der HIF-1α- und HIF-1β-Untereinheit und führt somit zu einer vermehrten Transkription

des Gens. Um einen besseren Eindruck der HIF-Funktion vermitteln zu können, seien an dieser Stelle einige seiner Zielgene aufgeführt.

Das bekannteste HIF-Zielgen ist Erythropoetin, ein Aktivator der Erythropoese, der zu einer Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität führt. Die gesteigerte Erythropoese führt aufgrund der Hämoglobinsynthese einen erhöhten Eisenbedarf mit sich, der durch eine HIF-vermittelte Induktion von Transferrin und Transferrin-Rezeptor gesättigt werden kann. Ein weiteres bereits genanntes Zielgen von HIF ist das VEGF und einer seiner Rezeptoren (Flt-1), die zu einer Induktion der Angiogenese führen, wodurch die Diffusionsstrecke für den Sauerstoff deutlich herabgesetzt und somit die Sauerstoffversorgung verbessert wird. Eine Steigerung der Durchblutung eines Gewebes kann auch über den Tonus der Gefäße erzielt werden, der durch die Bildung verschiedener Faktoren beeinflusst wird. Dazu gehören die HIF-regulierten vasodilatierenden Faktoren wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (unter anderem produziert durch die HIF-abhängige induzierbare-NO-Synthetase) sowie Kohlenmonoxid (gebildet von der HIF-regulierten Häm-Oxygenase-1). Regulierend auf den Energiemetabolismus wirkt HIF-1 durch die Bereitstellung von Glukose über die Induktion von Glukose-Transportern (GLUT 1-3) und die Glykolyse durch die Induktion von Glykolyseenzymen (z.B. Aldolase A, Laktatdehydrogenase A, Phosphoglyzeratkinase 1 und Enolase 1). Dies ermöglicht eine Umstellung vom aeroben, mitochondrialen auf den glykolytischen Energiestoffwechsel. Weitere Zielgene sind das zur Zellproliferation führende IGF-2 (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2) und verschiedene IGF-Bindeproteine, die für die pH-Regulation zuständige Carboanhydrase-9 sowie das proapoptotisch wirkende NIP-3 aus der Bcl2-Superfamilie (Wenger et al., 2005, Übersicht zu HIF-Zielgenen).

Die Expression dieser Zielgene unterliegt einer präzisen Regulation des HIF durch zwei verschiedene sauerstoffabhängige Mechanismen. Dabei handelt es sich zum einen um die direkte Hydroxylierung zweier Proline durch die Prolylhydroxylasen, die zur Degradation von HIF führt und zum anderen um die Asparaginyl-Hydroxylierung in der C-TAD durch das FIH-1, die zur HIF-Inaktivierung führt (Epstein et al., 2001; Lando et al., 2002). Der unter normoxischen Bedingungen kontinuierlich ablaufende proteasomale Abbau von HIF-1α bleibt unter hypoxischen Bedingungen weitgehend aus, sodass es zu einer Akkumulation von HIF kommt.

Die Prolylhydroxylasen stellen eine essentielle Komponente im Degradationsweg von HIF dar und sind die eigentlichen Sauerstoffsensoren in diesem System. Es werden drei verschiedene Isoformen unterschieden, wobei PHD1 aus 407 Aminosäuren, PHD2 aus 426

und PHD3 aus 239 Aminosäuren besteht. Auch bezüglich ihrer Lokalisation weisen die Isoformen Unterschiede auf. Während PHD1 ausschließlich im Zellkern zu finden ist, kann PHD2 überwiegend im Zytoplasma, zu geringen Anteilen aber auch im Zellkern detektiert werden. PHD3 hingegen ist gleichmäßig sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert. Durch Hypoxie ist diese Lokalisation nicht zu beeinflussen (Huang et al., 2002; Metzen et al., 2003). Nur in Anwesenheit von Sauerstoff führen die Prolylhydroxylasen zu einer spezifischen Hydroxylierung der HIF-1α-Untereinheit am Prolin 402 und/oder 564 in der ODDD (Epstein et al., 2001). Dabei hat die PHD2 die größte Spezifität (Huang et al., 2002). Nach der Hydroxylierung von HIF-1α erfolgt dessen Polyubiquitinierung durch das von-Hippel-Lindau Tumor-Supressor Protein. Dies ist ein Bestandteil einer E3-Ubiquitin-Ligase, durch den die spezifischen hydroxylierten Proline erkannt werden (Maxwell et al., 1999; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Willam et al., 2002). Die polyubiquitinierten Proteine werden anschließend im 26S Proteasom degradiert (Salceda und Caro, 1997; Huang et al., 1998; Kallio et al., 1998). Bei der proteasomalen Degradation handelt es sich um den Hauptabbauweg von zytoplasmatischen Proteinen. Findet keine Prolylhydroxylierung statt, wie es zum Beispiel unter hypoxischen Bedingungen der Fall ist, so bleiben die Polyubiquitinierung und somit auch die proteasomale Degradation aus. Es kommt zur Akkumulation von HIF-1α, das in den Zellkern transloziert (Kallio et al., 1998), dort mit der β-Untereinheit dimerisiert und zusammen mit weiteren Koaktivatoren als Komplex an die HRE seiner Zielgene bindet und deren Transkription stimuliert.

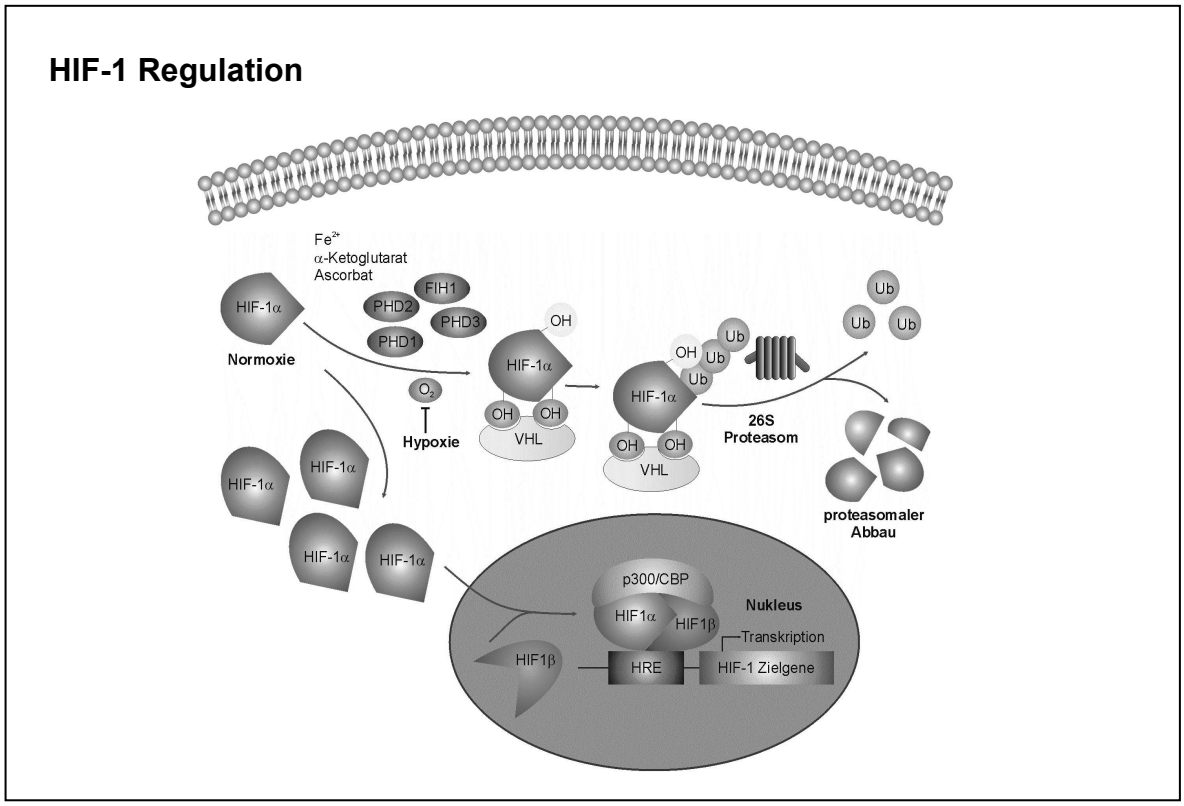


Abbildung 1.2: Regulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors HIF

In Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt die Hydroxylierung der HIF-α-Untereinheit mit anschließender Polyubiquitinierung durch das pVHL und proteasomaler Degradation. Zudem erfolgt eine Hydroxylierung der Aminosäure N 803. Unter hypoxischen Bedingungen bleibt die Hydroxylierung aus, folglich transloziert HIF-1α in den Zellkern und fusioniert unter Rekrutierung weiterer Kofaktoren mit der β-Untereinheit, sodass eine Translation der Zielgene ermöglicht wird (modifiziert nach Bruegge et al., 2007).

Ein kurzer Exkurs zeigt die klinische Bedeutung dieses Prozesses auf. Beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom, einer seltenen autosomal-dominanten Erkrankung, die auf Mutationen im VHL-Gen beruht, liegt ein Defekt des VHL-Proteins vor. Dieser Defekt führt durch die ausbleibende Ubiquitinierung trotz Hydroxylierung zu einem verminderten Abbau von HIF-1α und folglich zu dessen Akkumulation, aus der unter anderem eine gesteigerte Angiogenese durch erhöhte VEGF-Spiegel resultiert. Dadurch kommt es zur Ausbildung maligner und benigner Neubildungen. Typisch für dieses Krankheitsbild sind cerebrale Hämangioblastome und hochvaskularisierte Tumore (Kaelin, 2002).

Neben der Sauerstoffkonzentration gibt es noch zahlreiche weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Aktivität der Prolylhydroxylasen haben. Während der Hydroxylierung wird ein Sauerstoffatom auf HIF-1α übertragen, das zweite führt zur oxidativen Decarboxylierung von α-Ketoglutarat, sodass in stöchiometrischen Mengen Succinat

entsteht (Hirsila et al., 2003). Somit führt der α-Ketoglutarat-Antagonist Dimethyloxalylglycin (DMOG) zu einer Hemmung der Prolylhydroxylasen (Epstein et al., 2001). Außerdem sind die Hydroxylasen eisenabhängig, was den hemmenden Effekt von Eisenchelatoren wie Deferoxamin (DFO) und Ciclopirox (CPX) (Wang und Semenza, 1993; Linden et al., 2003) oder Eisen-Antagonisten wie Cobaltchlorid erklärt (Epstein et al., 2001).

Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass sich Unterschiede im Sauerstoffgehalt nicht nur auf die Aktivität der Prolylhydroxylasen auswirken, sondern auch auf deren Konzentration. So kommt es unter hypoxischen Bedingungen zu einer Induktion der Hydroxylasen (D´Angelo et al., 2003). Dies ermöglicht, dass es nach langer Hypoxie durch eine Reoxygenierung innerhalb kürzester Zeit zu einem Abbau des akkumulierten HIF kommt. Es wird vermutet, dass durch die schnelle Degradation ein proapoptotischer Effekt nach chronischer Hypoxie und Reoxygenierung verhindert wird (Carmeliet et al., 1998; Semenza, 2000). Der Grund für diese hypoxische Induktion der Prolylhydroxylasen ist, dass sie selbst Zielgene von HIF-1α darstellen (Marxsen et al., 2004; Metzen et al., 2005). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Aktivität von HIF-1 für den eigenen Abbau der HIF-1α-Untereinheit notwendig ist (Berra et al., 2001).

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den Prolylhydroxylasen um die eigentlichen Sauerstoffsensoren. Dies lässt sich durch ihre hohe Michaelis-Menten-Konstante (Km) für Sauerstoff erklären (Hirsila et al., 2003; Koivunen et al., 2004). Der Wert liegt bei etwa 200 µM, was der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration entspricht. Dies bedeutet, dass auch geringe Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes erkannt werden und die Hydroxylasen darauf reagieren, sodass HIF streng sauerstoffabhängig reguliert wird. Neben den genannten Unterschieden in der Struktur und ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden sich die Prolylhydroxylasen auch in ihrer Spezifität hinsichtlich der Proline in der HIF-1α-Untereinheit. Es wird vermutet, dass HIF-1α in Normoxie durch PHD2 und in Hypoxie durch die PHD1 und 3 reguliert wird (Nakayama et al., 2004).

Neben der Prolylhydroxylierung unterliegt HIF einer weiteren regulatorischen posttranslationalen Modifizierung. Die Hydroxylierung von Asparagin 803 in der C-TAD von HIF-1α führt zur Hemmung der Transaktivierungsdomäne. Dies erfolgt durch eine Aufhebung der Interaktion zwischen der C-TAD und einem Transkriptions-Koaktivator, dem p300/CBP (Histon-Acetyl-Transferase/CREB bindendes Protein). Dies führt nicht wie bei der Prolylhydroxylierung zu einer Degradation von HIF, sondern zu einer Hemmung seiner transaktivierenden Funktion. Diese Asparaginyl-Hydroxylierung erfolgt durch die

Asparaginyl-Hydroxylase FIH-1 (Lando et al., 2002). FIH-1 ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und nicht durch Hypoxie induzierbar (Metzen et al., 2003). Im Vergleich zu den Prolylhydroxylasen hat es eine niedrige Michaelis-Menten-Konstante und ist damit auch unter stärkerer Hypoxie aktiv (Koivunen et al., 2004).

Abgesehen von den Hydroxylasen werden zahlreiche weitere Mechanismen und Proteine diskutiert, die in einem regulierenden Zusammenhang mit HIF stehen könnten. So führen zum Beispiel Insulin und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren, Zytokine wie IL-1β oder TNFα oder die PI-3-Kinase-abhängige Aktivierung von NFκB zu einer Induktion von HIF-1α durch gesteigerte Translation (Wenger, 2000). Ein weiteres Protein ist das durch Hypoxie induzierte CITED 2, das mit sehr hoher Affinität an p300 bindet und somit einen negativen regulierenden Effekt auf das HIF-1α hat. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) bewirken eine HIF-1α-Phosphorylierung und haben vermutlich einen Effekt auf die Interaktion zwischen HIF-1α und p300. Sie führen zu einer gesteigerten Transkriptionsaktivität von HIF-1α (Mazure et al., 2004). Auch Stickstoffmonoxid (NO) hat einen stabilisierenden Effekt auf HIF-1α, da es die Prolylhydroxylasen hemmt (Callapina et al., 2005).

Die Arbeitsgruppe von Baek et al. brachte im Jahre 2005 ein weiteres Protein mit der HIF-Regulation in Zusammenhang, das nicht nur eine Interaktion mit HIF-1α und den Prolylhydroxylasen 2 und 3 zeigt, sondern auch einen regulierenden Einfluss auf HIF-1α hat. Im Folgenden soll dieses Protein genauer vorgestellt werden.

1.3 Das Lektin OS9

Das Lektin OS9 *(amplified in osteosarcoma-9)* trägt seinen Namen aufgrund seiner Entdeckung in Zellen eines Osteosarkoms. Bekannt wurde es zunächst durch seine Interaktion mit dem N-Copine, einem Protein, das vermutlich für die Plastizität der Synapsen verantwortlich ist und als zytoplasmatischer Calcium-Sensor dient (Nakayama et al., 1999). Ein weiterer früh identifizierter Interaktionspartner von OS9 ist das Meprin β, das in die Degradation von biologisch aktiven Polypeptiden involviert ist (Litovchick et al., 2002). Inzwischen sind zahlreiche Interaktionspartner von OS9 bekannt. Das Protein setzt sich aus 667 Aminosäuren zusammen und besitzt eine durch Sequenzanalyse vorhergesagte Kernlokalisationssequenz. Das apparente Molekulargewicht liegt bei etwa 75 kD. OS9 ist in humanen Geweben sowohl in Tumorzellen als auch in nicht-transformierten Zellen ubiquitär exprimiert. Sein Gen ist auf Chromosom 12q in der

Region 13-15 lokalisiert, die für ihre starke Amplifikation in Karzinomen bekannt ist und kodiert für 14 Introns und 15 Exons (Su et al., 1996; Kimura et al., 1997). Insgesamt sind zum heutigen Zeitpunkt vier verschiedene Isoformen des Proteins bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen und sich in ihrer Expression unterscheiden. Die genaue Funktion von OS9 ist noch nicht eindeutig geklärt. Zum einen wird es als Beteiligter an der Qualitätskontrolle von Proteinen gesehen. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden Proteine mit der Hilfe von Chaperonen gefaltet und N-glykosyliert. Entstehen dabei Fehler, so müssen diese Proteine erkannt und abgebaut werden (Bhamidipati et al., 2005). Dies geschieht mit Hilfe der ER-assoziierten Degradation (ERAD). Dabei werden fehlerhafte Proteine im ER polyubiquitiniert und ins Zytoplasma überführt, wo sie proteasomal abgebaut werden. Es wird vermutet, dass das OS9 während der ER-Qualitätskontrolle als ER-Substratrezeptor fehlerhaft gefaltete Glykoproteine nach Entfernung ihrer α-1,2-Mannose-Reste erkennt und zum ERAD transportiert. Dort interagiert OS9 mit Chaperonen und dem Membran-assoziierten SEL1L-Hrd1-Ubiquitinligase-Komplex und trägt somit zur Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation fehlerhafter Proteine bei (Christianson et al., 2008; Mueller et al., 2008; Tamura et al., 2008; Alcock und Swanton, 2009; Hosokawa et al., 2009; Lederkremer, 2009). Außerdem scheint eine weitere OS9-Funktion in der Hemmung des Transports von fehlerhaften Proteinen zu deren Funktionsort zu bestehen (Bernasconi et al., 2008). Entgegen der soeben beschriebenen Degradations-fördernden Aufgabe von OS9 wurde für das Protein TRPV4 gezeigt, dass OS9 die Polyubiquitinierung seines Monomers und unreifer Varianten verhindert und somit auch deren Degradation hemmt (Wang et al., 2007).

Eine andere Funktion von OS9 wird in dessen Beteiligung am ER-zu-Golgi-Transport gesehen. Dabei handelt es sich um einen Transport von im ER gefalteten Proteinen zum Golgi-Apparat, von dem aus sie dann letztendlich zu ihrem Zielort gelangen, an dem sie ihre Funktion ausüben können (Friedmann et al., 2002). So scheint OS9 in den ER-zu-Golgi-Transport der Proteine Meprin β und DC-STAMP involviert zu sein und als ein Adapter zu dienen, der die Substrate für diesen Transport erkennt und bindet. Außerdem wird vermutet, dass OS9 in der Membran wie ein Chaperon agiert und dort in die Degradation von DC-STAMP involviert sein könnte (Litovchick et al., 2002; Jansen et al., 2009). Eine vermutete antiapoptotische Wirkung von OS9 könnte eine Rolle im Überleben von Krebszellen spielen (Vourvouhaki et al., 2007).

Im Jahre 2005 wurde publiziert, dass OS9 an der Regulation von HIF-1α beteiligt ist (Baek et al., 2005). In einem Yeast-Two-Hybrid-Ansatz wurde eine Interaktion von OS9 mit den

Prolylhydroxylasen PHD2 und PHD3 und außerdem auch mit HIF-1α beobachtet. Diese Interaktion wurde durch Co-Immunpräzipitations-Experimente bestätigt. Die Bindung von OS9 an HIF-1α findet an einer anderen Stelle im HIF als die der PHD2 statt. Es wird somit eine simultane Bindung der beiden Proteine an HIF-1α vermutet. Neben der Interaktion wird von dieser Arbeitsgruppe auch ein Effekt von OS9 auf die HIF-Regulation gezeigt. OS9-Überexpression führt demnach zu einer gesteigerten Hydroxylierung von HIF-1α durch die Prolylhydroxylasen, woraus eine vermehrte Polyubiquitinierung durch VHL und folglich eine gesteigerte proteasomale Degradation von HIF-1α resultiert. OS9, HIF-1α und die PHD2 verstärken ihre Interaktionen dabei gegenseitig. Diese Ergebnisse zeigen das OS9 also als einen unterstützenden Faktor der Prolylhydroxylasen, durch den es zu einer vermehrten Hydroxylierung und damit zu einer verminderten HIF-1α-Konzentration mit daraus resultierender Funktionsminderung des HIF kommt (Baek et al., 2005).

Die OS9-Funktion wird ebenso wie die Frage nach seiner subzellulären Lokalisation in der Literatur kontrovers diskutiert. Neben der Arbeitsgruppe von Baek et al., die das OS9 sowohl in Zellkern- als auch in Zytoplasmaextrakten detektieren konnte, wird von anderen Arbeitsgruppen eine Lokalisation von OS9 im ER angenommen. Hierbei ist jedoch nicht geklärt, ob es auf der zytosolischen Seite mit der ER-Membran assoziiert ist (Litovchick et al., 2002; Wang et al., 2007; Jansen et al., 2009) oder ob es im Lumen des ER lokalisiert ist (Bernasconi et al., 2008; Christianson et al., 2008; Mueller et al., 2008). Das Wissen um die genaue subzelluläre Lokalisation von OS9 ist auch für das Verständnis seiner Funktion von entscheidender Bedeutung.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Wie in der Einleitung dargestellt, handelt es sich bei HIF-1α um einen Faktor von immenser Bedeutung für die Regulation der Sauerstoffhomöostase und damit assoziierter Erkrankungen. Die Aufklärung seiner Regulation ist somit von entscheidender Bedeutung, auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer Strategien in der Therapie von Tumoren und kardiovaskulären Erkrankungen und soll mit dieser Arbeit unterstützt werden.

Bei der Regulation von HIF spielen vornehmlich die Prolylhydroxylasen eine große Rolle, deren Funktion und Bedeutung im ersten Teil der vorliegenden Arbeit durch Verwendung verschiedener Inhibitoren herausgearbeitet werden soll. Zur spezifischen Hemmung einzelner Hydroxylasen wurde die Technik der short inhibitory RNA (siRNA) eingesetzt. Durch diese Methode kann die Expression von Proteinen spezifisch herunterreguliert werden. In erster Linie wird dadurch der Abbau der Ziel-mRNA eingeleitet. Daneben wird

eine direkte Störung der Translation der messenger RNA (mRNA) durch Verwendung von siRNA und eine Hemmung der Heterochromatinentstehung diskutiert.

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Lektins OS9. Um das Protein genauer beschreiben zu können, führte ich Versuche zu dessen Expression in unterschiedlichen Zelllinien durch. Weiterhin wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), anschließender Klonierung und Sequenzierung untersucht, welche Spleißformen nachweisbar sind. Da viele in die HIF-Regulation involvierte Proteine durch Hypoxie induzierbar sind oder sogar selbst Zielgene von HIF darstellen, sollte für OS9 eine mögliche Induktion durch Hypoxie analysiert werden. Des Weiteren wurden sowohl der Abbauweg, als auch die Abbaugeschwindigkeit von OS9 untersucht.

Einen entscheidenden Faktor in der HIF-Regulation könnte die Interaktion zwischen OS9 und den Prolylhydroxylasen PHD2 und PHD3 sowie HIF-1α, die genauer aufgeklärt werden sollte, spielen. Um nicht nur die Interaktion zu untersuchen, sondern auch die Funktion von OS9 bezüglich der HIF-Regulation aufzuzeigen, wurden Versuche zur Suppression und Überexpression hinsichtlich deren Auswirkung auf HIF und die Prolylhydroxylasen durchgeführt.

Im abschließenden Teil der Arbeit wurde der Fokus auf die bisher kontrovers diskutierte Fragestellung zur genauen subzellulären Lokalisation von OS9, die offensichtlich für die Interaktion mit den HIF-Prolylhydroxylasen von großer Bedeutung sein könnte, gerichtet. Ziel war es, die voneinander abweichenden Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen, die das OS9 zum einen mit der zytosolischen Seite der ER-Membran assoziiert sehen, zum anderen als ein im Lumen des ER lokalisiertes Protein charakterisieren, genauer zu untersuchen und die tatsächliche subzelluläre Lokalisation von OS9 durch Verwendung von Immunfluoreszenz aufzuzeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Lösungen und Puffer

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) 5x	136,9 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH_2PO_4
	8,1 mM Na_2 HPO_4 $2H_2O$
50 x TAE-Puffer	242 g Tris Base
	57,1 ml Eisessig
	100 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0
	ad 1000 ml H_2O
10 x TBE-Puffer	108 g Tris Base
	55 g Borsäure
	40 ml einer 0,5M EDTA-Lösung pH 8,0
	ad 1000 ml H_20
5 x Laufpuffer	15 g Tris Base
	72 g Glycin
	5 g SDS
	ad 1000 ml H_2O
Blotpuffer	25 mM Tris Base
	192 mM Glycin
	20% (v/v) Methanol
	ad 1000 ml H_2O
6-fach Ladepuffer	7 ml Sammelgel
	1,2 mg Bromphenolblau
	3 ml Glycerol
	1 g SDS
	1:20 β-Mercaptoethanol frisch zugeben

5% Trockenmilchlösung	5 g Magermilchpulver PBS ad 100 ml
LB (Luria Bertani)-Medium	25 g LB-Broth ad 1000 ml H_2O autoklavieren
SOB-Medium	2% Bacto Tryptone 0,5% Yeast Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM $MgCl_2$ 10 mM $MgSO_4$ ad 1000 ml H_2O autoklavieren
DNA Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanid 30% (v/v) Glycerin ad 10 ml H_2O
Urea-Puffer	20 ml Glycerol 10 ml 20% SDS 1 ml 1 M DTT 2 ml 1 M Tris pH 6,8 200 ml 8 M Harnstoff-Lösung
NP40-Puffer 0,1%	2 ml einer 1 M Tris-Lösung pH 8,0 10 ml einer 1 M NaCl-Lösung 1 ml einer 0,1 M EDTA-Lösung 5 ml einer 10% (v/v) NP-40-Lösung ad 100 ml H_2O Proteaseinhibitorcocktail 1:100 frisch dazugeben

NP40-Puffer 1%	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	1% NP40
	10 mM NaH_2PO_4
SDS-Acrylamidgel:	
- Sammelgel	Acrylamid 260 µl
	Bidest 1220 µl
	500 µl 0,5 M Tris HCl pH 6,8
	20 µl 10% (w/v) SDS
	10 µl 10% (w/v) APS
	2 µl TEMED
- Trenngel 10%	3,3 ml Acrylamid
	4,0 ml Bidest
	2,5 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8
	100 µl 10% (w/v) SDS
	50 µl (w/v) 10% APS
	5 µl TEMED
SDS 10%	10 g SDS
	H_2O ad 100 ml
APS 10%	10 g APS $(NH_4)_2$ S_2O_8
	ad H_2O 100 ml
	Lagerung bei -20°C
1,5 M Tris HCL pH 8,8	90,65 g Tris Base
	ad H_2O 500 ml
	pH 8,8 mit HCl
1% TAE-Agarose-Gel	1 g Agarose
	5 µl Ethidiumbromid
	ad 100 ml TAE-Puffer

2.2 Antikörper

Primärantikörper:

anti-OS9, polyklonal	
- BC100-519	Novus Biologicals, Littleton, USA
- BC100-520	Novus Biologicals
anti-HIF1α, monoklonal	BD Transduction Laboratories Heidelberg
anti-PHD2, polyklonal	Novus Biologicals
anti-V5 monoklonal	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-PK biotinyliert, MCA 1360B	Serotec, Düsseldorf
anti-Aktin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-α-Tubulin	Santa Cruz Biotechnology

Sekundärantikörper:

anti-mouse Antikörper, HRP-gekoppelt	Dako-Cytomation, Glostrup, Dänemark
anti-rabbit Antikörper, HRP-gekoppelt	Dako-Cytomation
anti-mouse Alexa Fluor green	Invitrogen
anti-rabbit Alexa-Fluor red	Invitrogen

2.3 Enzyme und Puffer

Restriktionsenzyme

Hind III	Fermentas MBI, St. Leon-Rot
Xba I	Fermentas MBI
Xho I	Fermentas MBI

Puffer

y-Tango 1x Puffer	Fermentas MBI
y-Tango 2x Puffer	Fermentas MBI
T4-DNA-Ligase und Ligasepuffer	New England Biolabs
Taq-Polymerase	Invitrogen

2.4 Plasmide und siRNA

Plasmide

pcDNA3.1 OS9-PK

pCR3.1-HA-OS9

pcDNA3-HIS-PHD2

3xFLAG-PHD2-H374A-PK

pCR3.1 (TA-Vektor)

pDs-Red2-Plasmide zur Darstellung von Mitochondrien, ER und Golgi-Apparat

siRNA

PHD2: (MWG Biotech AG, P24041, 26-5086-1/6)
Sequenz: 5`GAC GAA AGC CAU GGU UGC UUG TT 3`

OS9: siRNA1: (Invitrogen, OS9-HSS 116926; stealth)
Position 317-341 in humanem OS9
Sequenz 5` GGA GGA GGA AAC ACC UGC UUA CCA A 3`

siRNA2: (MWG Biotech AG, OS9-384 40-4152-313; nicht-stealth)
Sequenz 5´ GGA CUG GUG GAC AUA UGA ATT 3`

PCR-Primer

OS9: F_hOS9_1315: 5' – AGG ATG AGG ATG AGG ATG AAG A – 3'
R_hOS9_2065: 5' – TCT CAG AAG TCA AAT TCG TCC A – 3'

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Klonierung von Plasmiden

Bei Plasmiden handelt es sich um ringförmige DNA bakteriellen Ursprungs, die mittels Transfektion in Zellen eingebracht werden kann und sich dort repliziert. Durch Transkription und Translation entstehen von der DNA-Sequenz abhängige Proteine. Um gezielt bestimmte Proteine zu erhalten, klonierte ich Plasmide einer spezifischen Sequenz. Dazu wurden Plasmidvektoren verwendet, bei denen es sich um Plasmide handelt, die die Möglichkeit des Transfers, also der Übertragung von einer Zelle zur nächsten, verloren haben.

Der eingesetzte Plasmidvektor pcDNA3 (Invitrogen) enthielt einen Replikationsursprung zur autonomen Replikation in E. coli, eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin zur Selektion, sowie einen Polilinker-Bereich, der multiple Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen besitzt und dem Einfügen von DNA-Fragmenten dient.

Für die Versuche zur Co-Immunpräzipitation klonierte ich ein Plasmid, das als Vektor pcDNA3 mit einem Hexa-Histidin-Abschnitt am 5`-Ende enthält. Ein solcher Abschnitt wird auch als „Tag“ bezeichnet. Des Weiteren enthält das Plasmid als Insert eine mutierte Version des PHD2-Gens mit Austausch eines Histidins durch Alanin im aktiven Zentrum sowie einen als „PK“ bezeichneten Abschnitt, der als Tag dem Nachweis oder der Aufreinigung des Proteins dient. Die beschriebene Mutation führt zu einer enzymatischen Inaktivität, die den toxischen Effekt des Proteins in der Zellkultur herabsetzt.

Die Klonierung von DNA erfolgte in folgenden Schritten:

Nach Auswahl des geeigneten Plasmidvektors (pcDNA3-HIS-PHD2), des erwünschten Inserts (aus 3xFLAG-PHD2-H374A-PK) sowie der passenden Restriktionsschnittstellen mit entsprechenden Enzymen (Xba I und Xho I) und Puffern (y-Tango 2x), erfolgte die Restriktion durch Inkubation des Plasmidvektors und separat des Insert-tragenden Plasmids mit den Restriktionsenzymen für eine Stunde in einem Wasserbad bei 37°C.

Dieser Vorgang diente der Öffnung des Plasmidvektors sowie dem Herausschneiden des Inserts aus dem zweiten Plasmid mit den gleichen Restriktionsenzymen, um identische Schnittstellen für die Ligation zu schaffen.

Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem 1% TAE-Agarose-Gel mit Zusatz des DNA-Interkalators Ethidiumbromid (Invitrogen), um den geöffneten Vektor sowie das Insert von der restlichen DNA zu trennen. Zum Größenvergleich wurde ein DNA-Marker (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. Die Proben wurden bei einer Spannung von ca. 60V (Consort E 835, RHYS, Manchester, Großbritannien) aufgetrennt und anschließend auf einer UV-Bank (Faust, MW 312 nm) mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert. Die erwünschten Banden wurden aus dem Gel geschnitten und anschließend mit dem Invitrogen^{TM} Pure Link Extraction Kit (Invitrogen) aufgereinigt.

Zur Ligation des Inserts in den geöffneten Vektor wurde die gewonnene DNA mit einer T4-DNA-Ligase (New England BioLabs) und dazugehörigem Ligasepuffer über Nacht bei 14°C in einer PCR-Maschine (TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der geöffnete Vektor ohne Insert eingesetzt.

2.5.2 Plasmidpräparation: Herstellung einer Minipräparation

Anschließend erfolgte die Vermehrung der Plasmide. Die Arbeiten mit Bakterien erfolgten zur Minimierung von Kontaminationen unter einer Laminar-Flow Werkbank (Faster, BHA 72). Der erste Schritt bestand in der Transformation, also der Aufnahme der DNA in den Escherichia coli Stamm DH5α (Invitrogen). Hierbei handelt es sich um kompetente, also um mit Calciumchlorid und anschließendem Hitzeschock behandelte und damit zur Aufnahme von DNA befähigte Bakterien. Bei der transformierten DNA handelte es sich entweder um das eigens klonierte Plasmid oder um bereits klonierte Plasmide, von denen größere Mengen benötigt wurden. Die Transformation erfolgte durch eine 30 Minuten andauernde Inkubation des Plasmids mit der Bakteriensuspension auf Eis, anschließender 90 Sekunden langer Inkubation bei 42°C im Wasserbad (GFL, Burgwedel) und nochmaliger kurzer Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurde SOC-Medium (entspricht SOB-Medium mit Zusatz von Glucose) dazugegeben und zur Ausbildung der Resistenz gegen Ampicillin für weitere 90 Minuten bei 37°C im Schüttelinkubator bei 180 rpm (Thermoshake, Gerhardt Analytical Systems, Königswinter) inkubiert.

Zur Selektion der plasmidhaltigen und somit Ampicillin-resistenten Bakterien, wurden 100 µl der Lösung auf einer Agarplatte, die mit Ampicillin (Biomol, Hamburg) versetzt war, ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die ausschließlich den geöffneten Vektor enthaltende Probe mitgeführt.

Die gewachsenen Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in 4 ml flüssigem Ampicillin-haltigen LB-Medium aufgenommen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde eine Minipräparation mit dem Nucleo Spin Plasmid-Kit (Macherey und Nagel, Düren) angefertigt. Die DNA-Konzentration wurde mittels eines Spektrophotometers (Nano Drop-1000, PeqLab, Erlangen) bestimmt.

2.5.3 Testverdau

Um festzustellen, ob die Klonierung korrekt verlaufen ist, führte ich einen Testverdau durch, bei dem ca. 1 µg der DNA aus der Minipräparation mit zuvor ausgewählten Restriktionsenzymen (Xba I und Hind III) und entsprechendem Puffer (y-Tango 1x Puffer) eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurde. Im Anschluss erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der geschnittenen Fragmente in einem 1% TBE-Agarose-Gel mit einem DNA-Größenmarker. Aufgrund der bekannten Sequenz der Plasmide, konnte im Voraus eine Aussage getroffen werden, welcher Anzahl und Größe die entstehenden Fragmente sind. Die Detektion erfolgte auf der UV-Bank (Herolab, Wiesloch,

Deutschland) und gab einen ersten Anhalt bezüglich der Korrektheit des klonierten Plasmides. Der Testverdau wurde auch mit Plasmiden durchgeführt, die nicht von mir selbst kloniert, jedoch retransformiert wurden.

2.5.4 Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass die gewonnene DNA die gewünschte Nukleotid-Sequenz enthält, wurde eine Probe des Plasmids mit entsprechenden Primern, in diesem Fall SP6 und T7 (MWG Ebersberg), sequenziert. Bei Primern handelt es sich um Oligonukleotide, die als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen, wobei die Sequenz von T7 5´-d(TAA TACGACTCACTATAGGG)-3´ und die Sequenz von SP6 5´-d(TATTTAGGT GACACTATAG)-3´ ist.

Die eigentliche Sequenzierung erfolgte bei Seqlab (Seqlab Sequence Laboratories, Göttingen) enzymatisch mittels Fluoreszenz-Farbstoff markierter Didesoxynukleotid-triphosphate, die nach Auftrennung in Einzelstränge zu einem Kettenabbruch der DNA-Polymerase führen. Die Kettenabbruchprodukte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und deren Nukleotidsequenz durch ein Chromatogramm sichtbar gemacht. Die Überprüfung der ermittelten Sequenzen auf ihre Richtigkeit und Reinheit erfolgte mit dem Computerprogramm WorkBench (SDSC Biology WorkBench, San Diego, USA).

2.5.5 Plasmidpräparation: Herstellung einer Maxi-Präparation

Für die Isolierung größerer Plasmidmengen wurde mit den klonierten Plasmiden eine Maxi-Präparation durchgeführt. Hierfür wurde ca. 1 ml der zuvor für die Mini-Präparation hergestellten transformierten Bakterienlösung in 300 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und über Nacht in den Schüttelinkubator (Gallenkamp Gemini BV, Apeldoorn, Niederlande) bei 37°C gestellt. Das trübe Medium wurde am nächsten Tag bei 5.000 rpm für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge, GMI, Minnesota, USA) und mittels DNA-Aufreinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde am Spektrophotometer bestimmt. Die gewonnene Präparation des aufgereinigten Plasmides wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. Ich verwendete RNA-Proben aus U2OS-Zellen, die mit Hilfe einer reversen Transkriptase in

cDNA umgeschrieben wurden. Die PCR erfolgte in drei Schritten. Zu Beginn wurde die Doppelstrang-DNA bei 96°C (eine Minute) in Einzelstränge aufgetrennt. Dann erfolgte bei einer Temperatur von 54°C, die eine Minute beibehalten wurde, das sogenannte Annealing. Hierbei verwendete ich die Primer F_hOS9_1315 und R_hOS9_2065, die sich in diesem Schritt an die Einzelstrang-DNA anlagerten. Anschließend wurde bei einer Temperatur von ca. 72°C (drei Minuten) die Elongation durchgeführt. Dies führte, durch die hinzugefügte Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen), zu einer Amplifikation der Einzelstrang-DNA, sodass identische Doppelstrang-DNA-Abschnitte entstanden. Dieser Zyklus wurde 30 Mal wiederholt, sodass es zu einem exponentiellen Wachstum identischer DNA-Abschnitte kam. Für diesen Schritt wurde ein Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Biometra) verwendet. Nachdem die PCR beendet war, erfolgte eine Auftrennung mittels Gelelektrophorese, um die Länge der DNA-Stücke zu überprüfen. Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in den TA-Vektor pCR3.1 (Invitrogen) ligiert und in DH5α transformiert. TA-Vektoren enthalten in der Klonierungsstelle einen besonders hohen Anteil der Base Thymin (T). Da die Taq-Polymerase einen Überschuss an Adenin (A) an die PCR-Produkte anhängt, lassen sich die DNA-Fragmente leicht in diesen Vektor ligieren. Insgesamt wurde aus sieben Klonen Plasmid-DNA aufgereinigt und an die Firma Seqlab (Göttingen) zur Sequenzierung geschickt.

2.7 Eukaryotische Zellkultur

2.7.1 Zelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche, mit Ausnahme der Linie UT7 adhärent wachsende Zelllinien verwendet. Die meisten dieser Zelllinien stammen von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville). Dies waren die epithelialen humanen Osteosarkomzellen U2OS (HTB-96), die humanen epithelialen Hepatomzelllinien HepG2 (HB-8065) sowie Hep3b (HB-8064). Des Weiteren wurden die aus einem Zervixkarzinom gewonnene epitheliale Zelllinie HeLa (CCL-2), die epitheliale humane Brustkrebszelllinie MCF7 (HTB-22), Kolonkarzinomzellen der Duke-Klasse C (Sw620 CCL-227) sowie der Duke-Klasse B (Sw480 CCL-228) und die aus der Niere stammende Fibroblastenzelllinie COS7 (CRL-1651) verwendet.

Von P. J. Ratcliffe (Maxwell et al., 1999) stammten die pVHL-defiziente Nierenkarzinom-Zelllinie RCC4-wt und die mit pcDNA3-pVHL stabil transfizierte Zelllinie RCC4-VHL. Bei UT7/Epo handelt es sich um nicht-adhärent wachsende, Epo-exprimierende humane

Leukämiezellen, die in DMEM/F12 mit Zusatz von 1 U Epo/ml kultiviert wurden (Epoetin beta; Roche/Boehringer, Mannheim, Germany), (Laugsch et al., 2008).
Als nichttransformierte Zelllinien wurden neben den COS7 auch die aus einer humanen Nabelschnurvene stammenden Endothelzellen HUVEC (Promocell, Heidelberg) sowie die von Herrn Prof. Jürgen Brinckmann aus dem Institut für Molekularbiologie der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellten Fibroblasten-Zelllinien NH (Nebenhoden) und VH (Vorhaut) verwendet.

2.7.2 Zellkultur und Subkultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden als Monolayerkultur in 75 cm^2 Polystyrol-Zellkulturflaschen (NUNC, Roskilde, Dänemark) in wasserdampfgesättigten Brutschränken (Heraeus, Hanau) unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Alle Zellen wurden mit dem Nährmedium „Dulbecco´s modifiziertes Eagle´s Medium“ (DMEM, Gibco, Karlsruhe) kultiviert, mit Ausnahme der HepG2-Zellen, die in RPMI-Medium (Gibco) kultiviert wurden. Alle Medien wurden durch Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FCS, Gibco), 2 mM Glutamin, 50 I.U./ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Sigma, Steinheim) ergänzt. Ein Wechsel des Mediums wurde alle zwei bis drei Tage unter einer Laminar-Flow-Werkbank (Microflow, Biological Safety Cabinet, Plymouth, USA) vorgenommen. Zellsubkultivierungen erfolgten bei Konfluenz der Zellen. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, zur Ablösung der Zellen mit Trypsinlösung (Trypsin EDTA; PAA-Laboratories, Cölbe) in calcium- und magnesiumfreiem Puffer überschichtet und für ca. zehn Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Gefäßboden wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von Medium mit 10% fetalem Rinderserum aufgehoben. Anschließend wurde die Zellsuspension auf neue Zellkulturgefäße (Petrischalen, Sarstedt, Newton, USA) verteilt.

2.7.3 Transiente Transfektion mit Plasmiden

Bei der transienten Transfektion handelt es sich um eine Methode, bei der exogene DNA in Form eines Plasmids in die Zellen eingebracht wird. Dies führt zu einer vorübergehenden Expression des Gens, die aufgrund eines Abbaus des Vektors durch Nukleasen jedoch nur von begrenzter Dauer ist.
Als Transfektionsreagenz wurde FuGENE6 (Roche, Mannheim) eingesetzt, wobei es sich um eine Mischung nicht-liposomenbildender Lipide handelt, die unilamelläre Vesikel mit der zu transfizierenden DNA bilden. Diese Vesikel fusionieren mit der Zellmembran und

gelangen durch Endozytose in die Zellen und daraufhin in den Zellkern, wo die Transkription stattfindet. Für die Transfektion ist das Verhältnis zwischen Lipid und DNA entscheidend, wobei die Lipide im Überschuss zur DNA eingesetzt werden sollten (angestrebtes Verhältnis 3:1).

Zur Transfektion wurden Zellen mit einer Konfluenz von ca. 70% in Petrischalen (Sarstedt, 150x20 oder 100x20mm) ausgesät und für ca. fünf Stunden inkubiert, um einen ausreichend festen Kontakt zum Gefäßboden sicherzustellen.

Die Transfektion erfolgte in folgenden Arbeitsschritten:

Als Transfektionsansatz wurden 500 µl des Zellkulturmediums OptiMEM (Gibco) für fünf Minuten mit dem Transfektionsreagenz FuGENE6 inkubiert, anschließend wurde die zu transfizierende DNA hinzugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Dann wurde der Transfektionsansatz zum Zellmedium gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Eine mittelgroße Petrischale (100 mm Durchmesser) wurde mit 5 µg DNA transfiziert, eine große (150 mm Durchmesser) mit 15 µg.

2.7.4 Behandlung der Zellen mit Chemikalien

Zur Behandlung der Zellen mit den unten genannten Chemikalien wurden die entsprechenden Zelllinien mit einer Konfluenz von ca. 80% ausgesät und nach etwa vier Stunden mit dem jeweiligen Stoff inkubiert.

- Cobaltchlorid ($CoCl_2$)

Das $CoCl_2$ wurde in *Aqua dest* gelöst. Die Inkubation erfolgte in einer Konzentration von 100 µM für vier Stunden.

- Deferoxamin (DFO)

Das DFO (Sigma, Deisenhofen) wurde in *Aqua dest* gelöst. Die Inkubation erfolgte für vier bis 24 Stunden mit einer Konzentration von 100 µM.

- Calpastatin

In Wasser gelöstes Calpastatin (Calpastatin Peptide, Calbiochem, Darmstadt) wurde in einer Konzentration von 2 µM für vier Stunden zu den Zellen gegeben.

- Cycloheximid

Cycloheximid (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) wurde in *Aqua dest* gelöst.

Die Substanz wurde in einer Konzentration von 500 µM verwendet.

- MG132

Das MG132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucinal), (Calbiochem) wurde in DMSO (Sigma, Deisenhofen) gelöst und in einer Konzentration von 10 µM für vier Stunden eingesetzt.

- Dimethyloxalylglycin (DMOG)

In DMSO gelöstes DMOG (Porphyrin Systems, Lübeck) wurde in einer Konzentration von 500 µM für 24 Stunden zu den Zellen gegeben.

- Hypoxie

Um hypoxische Umgebungsbedingungen zu schaffen, wurden die Zellschalen in einer Hypoxie-Workbench (In $VivO_2$ Ruskinn Technology; Leeds, Großbritannien) bei 37°C in Anwesenheit von 5% CO_2 inkubiert, in der ein Sauerstoffgehalt von 1-3% aufrechterhalten wurde. Die Zellen wurden für vier bis 24 Stunden in dieser Atmosphäre inkubiert und anschließend nach Protokoll auf Eis geerntet. Negativkontrollen wurden für den gleichen Zeitraum unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

2.7.5 Transfektion der Zellen mit siRNA

Entsprechende Zelllinien wurden transient mit siRNA transfiziert. Dabei handelt es sich um RNA kurzer Sequenz, die mit der mRNA interagiert und diese somit unwirksam macht. Dies führt zu einer Verminderung des entsprechenden Proteins, die auch im Western Blot sichtbar gemacht werden kann. Die Transfektion erfolgte nach oben beschriebenem Transfektionsprotokoll in Medium ohne Zusatz von Antibiotika und Serum, wobei hier jedoch als Transfektionsreagenz Lipofectamin^{TM}2000 (Invitrogen) eingesetzt wurde. Die siRNA gegen PHD2 (MWG Biotech AG, P24041, 26-5086-1/6), die in der Sequenz mit der von Berra et al. verwendeten siRNA übereinstimmt, wurde hierbei in einer Konzentration von insgesamt 40 nM verwendet und im Abstand von zwölf Stunden zweimal mit einer Inkubation von insgesamt 24 Stunden eingesetzt.

Zur Transfektion mit siRNA gegen OS9 wurden zwei verschiedene oben genannte Sequenzen in einer Konzentration von 20 pM (stealth siRNA) bis 80 nM mit einmaliger Gabe bei einer Versuchsdauer von 24 Stunden verwendet.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Isolation von Gesamtzellprotein

Zunächst wurde das Zellmedium entfernt. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gespült. Diese Vorgänge fanden unter Kühlung auf Eis statt, um Stoffwechselprozesse zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen in PBS mit Hilfe eines Spatels (Cell scraper, Sarstedt, Newton, USA) in ein Eppendorfgefäß überführt, bei 3.500 rpm für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R) und der Überstand anschließend vorsichtig abgesaugt. Das erhaltene Pellet wurde in entsprechendem Puffer (Urea, NP 40; Fluka, Seelze) mit Zusatz von Protease-Inhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Set V,

Calbiochem) im Verhältnis 1:100 gelöst und die Zellen durch Behandlung mit Ultraschall (Bandelin-Sonoplus, Berlin) mechanisch aufgeschlossen. Zur Co-Immunpräzipitation wurden die Zellen direkt in einen 1%igen NP-40-Puffer aufgenommen, für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde von den abzentrifugierten Zelltrümmern getrennt. Die erhaltenen Zelllysate wurden bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Eine mechanische Auftrennung blieb in diesem Fall aus.

2.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde mit dem DC Protein Assay (BioRad, Hercules, USA) nach Herstellerangaben unter Verwendung einer Standardproteinlösung photometrisch bestimmt. Dazu wurden Verdünnungsreihen des Proteinstandards (Rinderserumalbumin 10 µg/µl, BioRad) mit physiologischer NaCl-Lösung angesetzt, zu denen parallel zu den Zelllysatproben die BioRad-Reagenzien hinzugefügt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 700 nm in einem Photometer für Mikrotiterplatten (SLT Rainbow, SLT LAB Instruments GmbH, Crailsheim, Deutschland) bestimmt. Anhand der Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

2.8.3 Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine Methode zum Nachweis spezifischer Proteine in Proteingemischen, die mittels Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-elektrophorese) aufgetrennt und auf eine Membran übertragen werden, wo sie mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden können. Das SDS-Polyacrylamidgel bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel und wurde in unterschiedlichen Konzentrationen von 7,5% bis 12% eingesetzt.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die aufgearbeiteten Zelllysate zur Denaturierung mit einem SDS-Ladepuffer versetzt und für zehn Minuten bei 95°C im Wärmeblock inkubiert. Dann wurde das Gel mit ca. 30 µg der jeweiligen Probe neben einem Proteinmarker (Rainbow, Amersham, Freiburg) zum Größenvergleich beladen.

Die Proteine wurden mit einer Spannung von ca. 120 Volt aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden bei einer Spannung von 10 Volt, die ein senkrecht zum Polyacrylamidgel ausgerichtetes elektrisches Feld erzeugte, für eine Stunde im Blotter

(Trans-Blot, Semi-Dry, Transfer Cell, BioRad, München) auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-ECL TM, Amersham Biosciences) übertragen und somit immobilisiert. An der Membranoberfläche blieben die Proteine unter Erhaltung des elektrophoretischen Auftrennungsmusters aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften.

Der Proteintransfer wurde mittels unspezifischer Proteinfärbung nach Ponceau S (Sigma Aldrich Diagnostics) sichergestellt. Anschließend wurden die Membranen für mindestens zwei Stunden in 5%igem Magermilchpulver (Saliter, Obergünzberg) in PBS bei 4°C zum Blockieren freier Bindungsstellen inkubiert, um das Hintergrundsignal in der folgenden Immunodetektion zu minimieren.

Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Die Membran wurde mit dem jeweiligen Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 5%igem Magermilchpulver in PBS für zwei bis zwölf Stunden inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschschritte mit PBS entfernt. Die spezifische Bindung des Primärantikörpers wurde unter Verwendung eines Sekundärantikörpers, der entsprechend gegen Maus- oder Kaninchen-Antikörper gerichtet war, in einer Verdünnung von 1:2000 und einer Inkubationszeit von einer Stunde nachgewiesen. Ungebundene Sekundärantikörper wurden durch weitere Waschschritte mit PBS entfernt. Zum Nachweis der Bindung des Primärantikörpers an das Protein wurde das „enhanced chemiluminescence substrate“ (ECL, Amersham Biosciences) eingesetzt. Das Prinzip dieser Detektion beruht auf der Lumineszenz. Luminol wird durch das an den sekundären Antikörper konjugierte Enzym „horseradish- Peroxidase“ (HRP; engl. Meerrettich) oxidiert, wobei Phenole die Lichtemission 1000-fach verstärken. Die Wellenlänge der Emission liegt bei 428 nm und kann durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden. Das ECL wurde, wie vom Hersteller empfohlen, gemischt und die Membranen für eine Minute darin inkubiert. Anschließend erfolgte die Belichtung von wenigen Sekunden bis zu zwei Stunden sowie die Entwicklung des Films (Amersham Hyperfilm^{TM}, MP) in der Dunkelkammer mit anschließendem Trocknen in einem Wärmeschrank.

Zur sukzessiven Detektion mehrerer Proteine auf derselben Membran wurde diese erneut für mindestens zwei Stunden in 5%igem Magermilchpulver in PBS inkubiert.

2.8.4 Co-Immunpräzipitation

Bei der Co-Immunpräzipitation handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Wechselwirkungen zwischen Proteinen detektiert werden können. Dieser Nachweis erfolgt durch einen Antikörper, der an Agarose immobilisiert ist und über seine spezifische

Affinität ein Antigen aus einem Zelllysat bindet. Geht dieses Protein eine Interaktion mit einem zweiten Protein ein, so kann dieses zusätzlich präzipitiert werden. Der Nachweis erfolgt im Western Blot.

Zur Immunpräzipitation wurden Streptavidin-Agarose-Beads (Invitrogen) eingesetzt, an die PK-spezifische biotinylierte Antikörper fixiert wurden. Als zu präzipitierendes Protein verwendete ich zum einen ein überexprimiertes OS9, das zur Aufreinigung mit einem PK-Abschnitt versehen wurde, und zum anderen ein überexprimiertes PK-PHD2.

Die Präzipitation erfolgte in folgenden Arbeitsschritten:

Nach gegebenenfalls erforderlicher Transfektion der Zellen, anschließender Herstellung der Zelllysate in 1%-NP-40-Puffer und Bestimmung der Proteinkonzentration, erfolgte die Bindung des entsprechenden Proteins an den spezifischen Antikörper.

Dazu wurden ca. 300 µg Protein der Proben, der biotinylierte PK-Antikörper (5 µg) und NP40-Puffer in einem Gesamtvolumen von 500 µl für zwei Stunden auf einem Rotator bei 4°C inkubiert. Parallel dazu wurden ca. 65 µl der Streptavidin-Agarose-Beads durch kurzes Mischen in NP40-Puffer und anschließender Zentrifugation für eine Minute bei 7.500 rpm gewaschen.

Im Anschluss an die Inkubation der Probe mit dem Antikörper wurden die Proben mit den Beads versetzt. Hierzu wurden die Beads mit NP40-Puffer gemischt, je 200 µl auf jede Proteinprobe verteilt und für eine Stunde auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden bei 7.500 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Nach der Inkubation erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen der Beads in NP40-Puffer, um ungebundene Proteine aus der Lösung zu entfernen.

Im Anschluss wurden die Proben bei -20°C gelagert oder direkt im Western Blot weiterverarbeitet. Hierzu wurden 20 µl NP40-Puffer und ein entsprechendes Volumen SDS-Probenpuffer zu den Beads gegeben, fünf Minuten bei 95°C gekocht und für eine Minute bei 7.500 rpm zentrifugiert.

Das Laden der Gele sowie die Detektion im Western Blot erfolgte wie beschrieben.

2.9 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz stellt eine Methode dar, durch die ein bestimmtes Protein mit Hilfe eines Antikörpers detektiert und durch einen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden kann. Dadurch kann unter anderem die subzelluläre Lokalisation des Proteins bestimmt werden.

Ich verwendete hierzu U2OS-Zellen, die auf mit Deckgläschen präparierten 6-Well-Kulturschalen (NUNC, Rochester) ausgesät wurden. Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau entweder unbehandelt benutzt, transfiziert oder einem Sauerstoffmangel ausgesetzt.

Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gespült. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit -20°C kaltem Methanol (Carl Roth, Karlsruhe) für zehn Minuten. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit einer 0,5% TritonX-100-Lösung in PBS für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um sie für den Antikörper zu permeabilisieren. Die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen erfolgte in 3%igem Magermilchpulver in PBS für mindestens zwei Stunden. Zur Detektion der Proteine wurden die Zellen mit einem Primärantikörper, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet war, für eine Stunde inkubiert. Der Antikörper wurde in 3%igem Magermilchpulver in PBS in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Ungebundene Antiköper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurde mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper gegen Maus- oder Kaninchen-Antikörper in 3%igem Magermilchpulver in PBS in einer Verdünnung von 1:500 für eine Stunde in Dunkelheit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Kernfärbung mit dem DNA-Interkalator Bisbenzimid H33258 Fluochrom (Calbiochem). Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS und zuletzt *Aqua dest* wurden die Deckgläschen an der Luft getrocknet, anschließend mit Mowiol (Calbiochem) auf Objektträgern eingebettet und in Dunkelheit gelagert.

Die Analyse der angefärbten Zellen erfolgte mit einem Axioplan 2 Imaging Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Mannheim). Das Mikroskop ist mit verschiedenen Filtern ausgestattet, die unter anderem die Visualisierung von Fluorescein-konjugierten Antikörpern ermöglichen. Diese Verbindung emittiert nach Anregung Licht einer bestimmten Wellenlänge, die je nach Sekundärantikörper entweder grün oder rot erscheint. Außerdem kann die Kernfärbung mittels Bisbenzimid durch Emission von Strahlung im Bereich zwischen 385-470 nm (blau) visualisiert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Regulation von HIF-1α

3.1.1 Einfluss von Hemmstoffen der Prolylhydroxylasen auf HIF-1 α

Bei der α-Untereinheit von HIF-1 handelt es sich um die sauerstoffregulierte Einheit des Transkriptionskomplexes. Als Sauerstoffsensoren spielen bei dieser Regulation die Prolylhydroxylasen die entscheidende Rolle. Um den Einfluss der Prolylhydroxylasen auf die Regulation des HIF-1α aufzuzeigen, wurden Hemmstoffe dieser Enzyme eingesetzt. Anschließend wurde HIF-1α mit einem Antikörper detektiert. α-Tubulin diente als Ladekontrolle. Verwendet wurde die Zelllinie U2OS in insgesamt vier Proben. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Probe, die drei weiteren wurden jeweils mit einem der drei Hemmstoffe behandelt. Cobaltchlorid ($CoCl_2$; 100 µM) und Deferoxamin (DFO; 100 µM) wirken während einer vierstündigen Inkubation als Hemmstoffe der eisenabhängigen Prolylhydroxylasen, da sie mit deren zweiwertigem Eisen interferieren. Hypoxie mit einem O_2-Gehalt von 1%, führt zu einer Hemmung der sauerstoffabhängigen Prolylhydroxylasen. Die Detektion des HIF-1α zeigte kein Signal in der Kontrollprobe, jedoch ein deutliches Signal in den drei behandelten Proben. Dies zeigt die bedeutende Rolle der Prolylhydroxylasen in der Regulation des HIF-1α, aus deren Hemmung ein gesteigertes HIF-Signal resultiert.

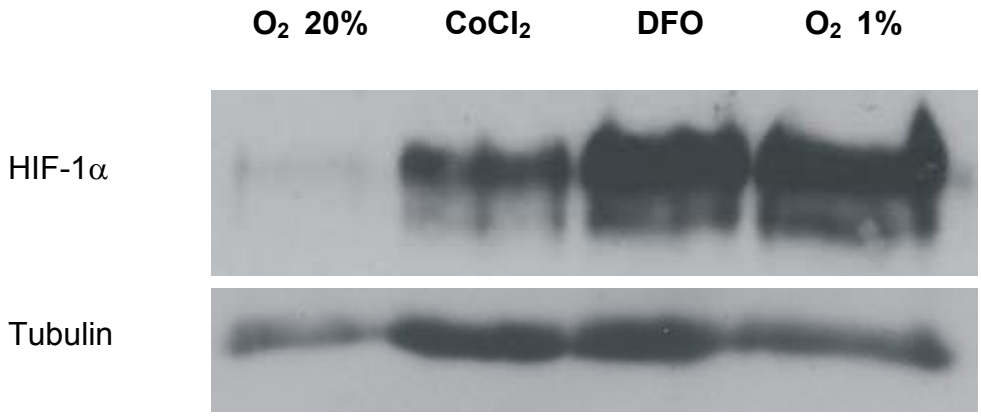


Abbildung 3.1: Inhibitoren der Prolylhydroxylasen stabilisieren HIF-1α

Western-Blot-Analysen von Zellextrakten aus U2OS-Zellen behandelt mit Cobaltchlorid, Deferoxamin und Hypoxie als Inhibitoren der Prolylhydroxylasen und deren Effekt auf das HIF-1α.

3.1.2 Die Rolle der Prolylhydroxylase 2 in der HIF-1α- Regulation

Um zu untersuchen, welche der Prolylhydroxylasen den größten Einfluss auf die HIF-1α-Regulation hat, wurde ein Western Blot durchgeführt, nachdem die Zellen mit siRNA gegen PHD2 inkubiert worden waren. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen die Prolylhydroxylase 2, gegen HIF-1α sowie gegen α-Tubulin als Kontrollprotein für eine gleichmäßige Ladung der Proben. Insgesamt wurden vier mittelgroße Zellkulturgefäße der Zelllinie U2OS eingesetzt, von denen die erste Probe unbehandelt blieb und die zweite Probe unter normoxischen Bedingungen mit siRNA gegen PHD2 transfiziert wurde. Die Proben drei und vier wurden zur Stabilisierung des HIF-1α unter hypoxischen Bedingungen mit einem Sauerstoffgehalt von 1% inkubiert, wobei die dritte Probe ansonsten unbehandelt blieb und die vierte Probe zusätzlich mit siRNA gegen PHD2 transfiziert wurde. Die Behandlungsdauer betrug insgesamt 24 Stunden, wobei die siRNA zweimal im Abstand von zwölf Stunden in einer Konzentration von jeweils 20 nM eingesetzt wurde. Die Sequenz der RNA war 5`GAC GAA AGC CAU GGU UGC UUG TT 3`.

In den mit siRNA behandelten Proben war eine deutliche Verminderung des PHD2-Signals im Vergleich zu den Kontrollproben nachweisbar. Die Signalintensität nahm hierbei unter hypoxischen Bedingungen deutlich zu. Diese Zunahme liegt in der HIF-1 vermittelten Regulation der PHD2 begründet, durch die es bei Sauerstoffmangel zu einer PHD2-Induktion kommt.

Auf der Ebene des HIF-1α zeigte sich in der normoxischen unbehandelten Probe kein Signal, bei Behandlung mit siRNA gegen PHD2 konnte jedoch auch unter normoxischen Bedingungen ein deutliches HIF-1α-Signal detektiert werden. In der hypoxischen unbehandelten Probe, wie auch in der hypoxischen siRNA-transfizierten Probe zeigte sich ein deutliches Signal für HIF-1α.

Eine Hemmung der Prolylhydroxylase 2 kann also nicht durch die weiteren Prolylhydroxylasen kompensiert werden. Die Prolylhydroxylase 2 spielt somit, übereinstimmend mit den Befunden einer anderen Arbeitsgruppe (Berra et al., 2003), die entscheidende Rolle in der HIF-1α-Regulation.

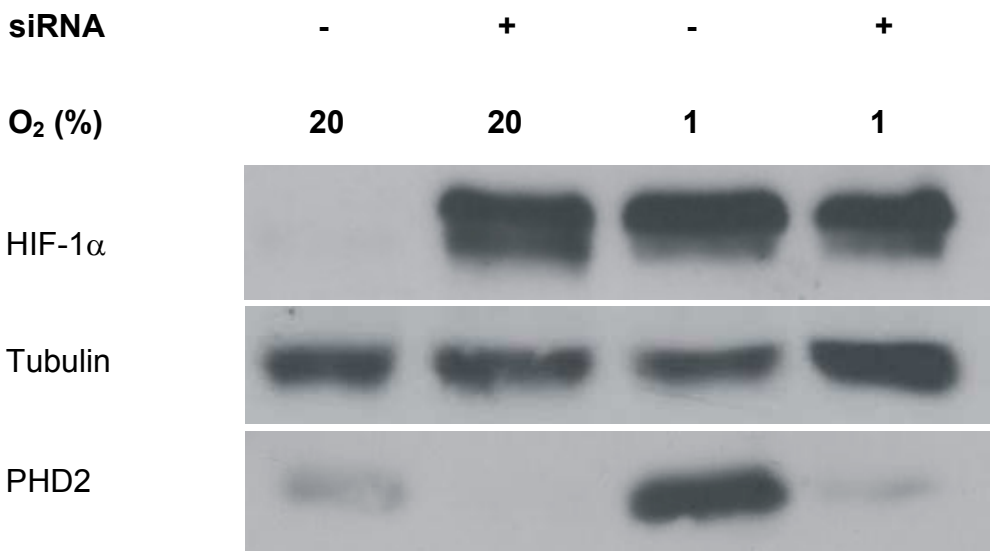


Abbildung 3.2: Suppression der Prolylhydroxylase 2 stabilisiert HIF-1α in Normoxie

Humane Osteosarkomzellen (U2OS) wurden mit siRNA gegen die Prolylhydroxylase 2 in einer Konzentration von 40 nM für 24 Stunden behandelt. Der Effekt auf HIF-1α ist unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gezeigt.

3.2 Expression, Regulation und Abbau des Lektins OS9

3.2.1 Expression von OS9 in unterschiedlichen Zelllinien

Bei dem Lektin OS9 handelt es sich um ein Protein, das erstmals in Zellen eines Osteosarkoms detektiert wurde, die jedoch nicht die einzige OS9-exprimierende Zelllinie darstellt. Um die Expression von OS9 in unterschiedlichen Zelllinien aufzuzeigen, führte ich Western Blots mit einem Antikörper gegen OS9 unter Verwendung der Linien U2OS, HeLa, Hep3b, MCF7, HUVEC, Fibroblasten (VH/AE und NH/HJ), RCC4-wt, RCC4-VHL, HepG2, COS7, Sw620, Sw480 und UT7 durch.

Hierbei zeigte sich ein deutliches OS9-Signal in jeder der getesteten Zelllinien. Beispielhaft ist hier ein Western Blot mit den Zelllinien MCF7, Hep3b, U2OS, Fibroblasten und den Endothelzellen HUVEC gezeigt.

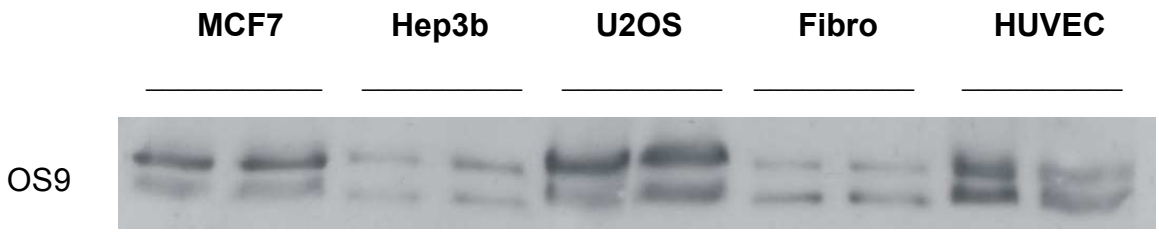


Abbildung 3.3: Expression von OS9 in unterschiedlichen Zelllinien

Dargestellt ist die Expression von OS9 in den Zelllinien MCF7, Hep3b, U2OS, Fibroblasten und HUVEC.

3.2.2 Spleißvarianten von OS9

Das OS9-Gen enthält insgesamt 15 Exons. Es sind vier verschiedene Spleißformen bekannt, von denen in meinen Experimenten im Western Blot in der Regel zwei Formen von OS9 zu detektieren waren. In einer PCR mit anschließender Klonierung und Sequenzierung zeigte ich, dass die häufigste Spleißvariante einen Verlust von Exon 13 aufweist, die zweithäufigste enthält alle Exons. Eine dritte, in der Literatur beschriebene Form hat einen Teilverlust von Exon 11 sowie einen Verlust von Exon 13, die vierte Variante hat einen Teilverlust von Exon 11. Die beiden letztgenannten Spleißformen waren in unseren Kulturen nicht nachweisbar.

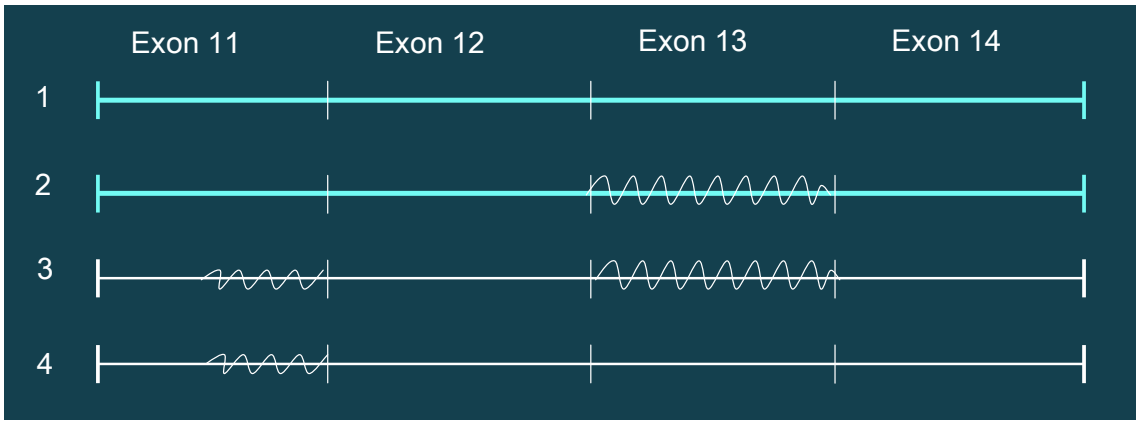


Abbildung 3.4: Schema zur Darstellung der unterschiedlichen OS9-Spleißformen

In der Abbildung sind die verschiedenen Spleißformen mit den entsprechenden Exonverlusten dargestellt. Die häufigste Variante ist dabei die Isoform 2, am zweithäufigsten kann die Isoform 1 detektiert werden.

Die Intensität der beiden Spleißvarianten des endogenen OS9 im Western Blot unterscheidet sich in den unterschiedlichen Zelllinien geringfügig. Beispielhaft ist ein Western Blot unter Verwendung von U2OS und Hela gezeigt. Hier ist in den transfizierten Proben zudem deutlich eine dritte Bande zu detektieren, bei der es sich um Spleißform 1 des OS9 handelt, die zusätzlich um einen PK- und um einen Hexahistidin-Abschnitt verlängert ist. In diesem Western Blot ist auch die Expression der Spleißformen unter hypoxischen Umgebungsbedingungen aufgezeigt, wobei keine Veränderung der Intensität zu verzeichnen war.

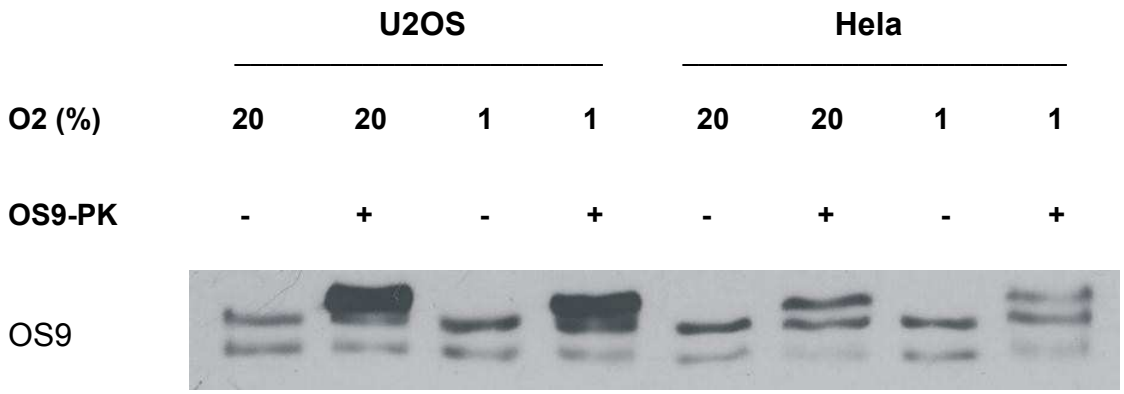


Abbildung 3.5: Expression der unterschiedlichen Spleißformen von OS9

Expression der Spleißvarianten von überexprimiertem und endogenem OS9 in den Zelllinien U2OS und Hela unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.

3.2.3 Expression von OS9 bei Inkubation unter Hypoxie und mit DMOG

Aufgrund der Sauerstoffabhängigkeit der Prolylhydroxylasen führt Hypoxie zu einer HIF-Stabilisierung. Die Hydroxylierung von HIF-1α bleibt aus, somit findet keine Polyubiquitinierung statt und die Untereinheit transloziert in den Zellkern, wo sie einen Komplex mit der β-Untereinheit bildet. Als Folge kommt es zur Transkription der Zielgene (Kallio et al., 1998; Epstein et al., 2001). Wie bereits beschrieben werden auch die Prolylhydroxylasen PHD2 und PHD3 sauerstoffabhängig reguliert. Sie sind direkte Zielgene von HIF (Marxsen et al., 2004; Metzen et al., 2005). So kommt es unter hypoxischen Bedingungen auch zu einer Kumulation der PHDs, die einen beschleunigten Abbau des HIF bei Reoxygenierung nach langer Hypoxie bewirken.

Um die Frage zu beantworten, ob auch OS9 durch Hypoxie reguliert wird und ob es sich um ein Zielgen von HIF handelt, wurden verschiedene Zelllinien hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Hierfür wurden die Zelllinien U2OS, Hela, Hep3b, MCF7, HUVEC, Sw620 und Sw480, RCC4-VHL und RCC4-wt, Fibroblasten (NH/HJ und VH/AE) und UT7 eingesetzt und für jeweils 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen mit einem Sauerstoffgehalt von 1% inkubiert. Als Kontrolle diente pro Zelllinie jeweils eine normoxische Probe. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper gegen OS9 und HIF-1α sowie ein Antikörper gegen α-Tubulin als Ladekontrolle verwendet. Beispielhaft sind Abbildungen der Zelllinien MCF7, Hep3b, U2OS und Fibroblasten gezeigt.

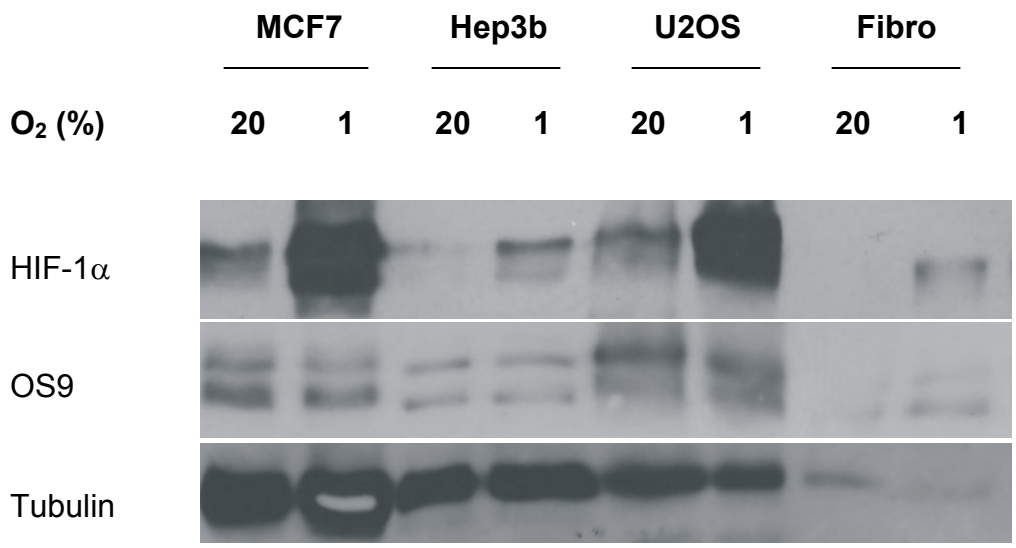
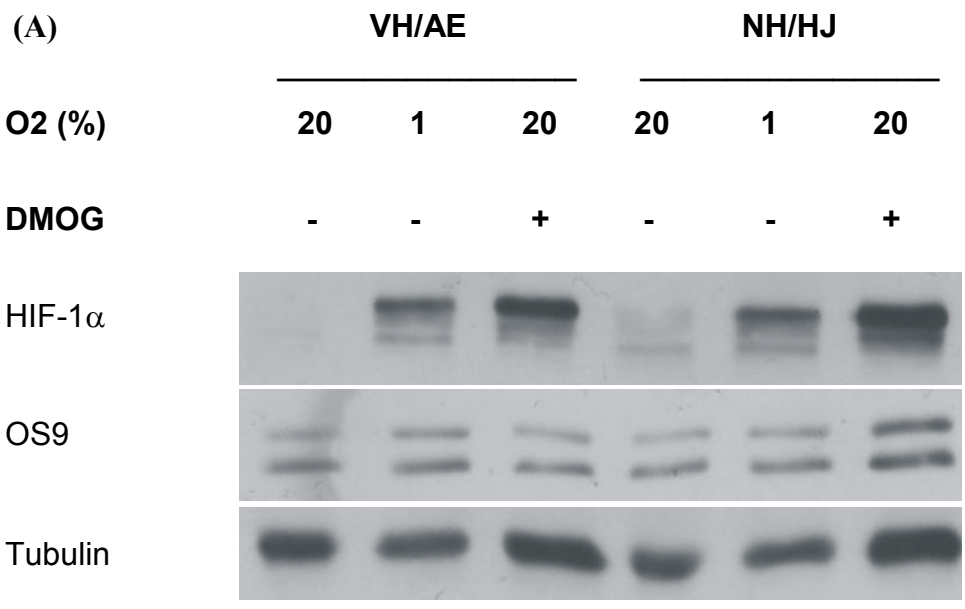


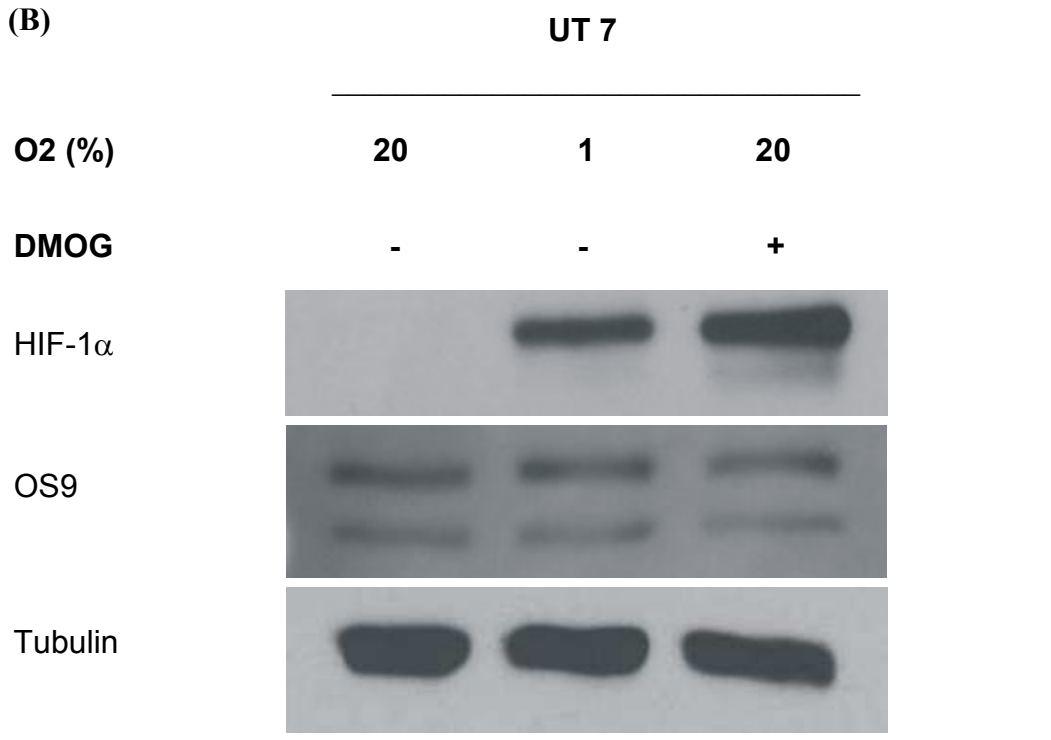
Abbildung 3.6: Effekt von Hypoxie auf die Expression von OS9

Dargestellt ist die Expression von OS9 nach Inkubation unter Hypoxie für 24 Stunden bei einem Sauerstoffgehalt von 1% in den Zelllinien MCF7, Hep3b, U2OS und Fibroblasten.

Die Ergebnisse der Versuche zeigten ein unverändertes OS9-Signal im Vergleich von Normoxie und Hypoxie. Auf Ebene von HIF-1α, das als Positivkontrolle dient, ist eine Induktion unter hypoxischen Bedingungen zu verzeichnen. Die Ladekontrolle mittels α-Tubulin zeigte gleichmäßige und somit untereinander vergleichbare Banden.
Es liegt folglich keine Beeinflussung der OS9-Konzentration durch Hypoxie vor. OS9 wird nicht sauerstoffabhängig reguliert.

Bei DMOG handelt es sich um einen zellpermeablen, kompetitiven Inhibitor der Prolylhydroxylasen. Es führt somit unter Kulturbedingungen zu einer Stabilisierung des HIF-1α in Normoxie (Epstein et al., 2001). Ich setzte diesen Inhibitor einerseits zu Klärung eines direkt regulierenden Effekts des DMOG auf das OS9 ein, andererseits um zu zeigen, ob es sich bei dem OS9 auch um ein Zielgen von HIF-1α handelt. Sollte dies der Fall sein, wäre das OS9 indirekt durch DMOG zu regulieren, da eine Behandlung über die Hemmung der Prolylhydroxylasen zu einem verstärkten HIF-1α-Spiegel führen würde, der dann ein verändertes OS9-Signal zur Folge hätte. Der Versuch wurde mit einer Konzentration von 500 µM für eine Behandlungsdauer von 24 Stunden in den Zelllinien UT7, Fibroblasten (VH/AE) (NH/NJ), Hep3b, RCC4-wt, RCC4-VHL, Hela, Sw480, Sw60 durchgeführt. Die Positivkontrolle zeigte eine Zunahme des HIF-1α-Signals unter der Behandlung mit DMOG. Das OS9-Signal zeigte keinen Effekt des DMOG. Beispielhaft sind Abbildungen der Zelllinien Fibroblasten, UT7, Hela, Sw620 und Sw480 gezeigt. DMOG hat somit also weder einen direkten Effekt auf die OS9-Regulation noch kann es sich bei OS9 um ein Zielgen des Transkriptionsfaktors HIF-1α handeln.





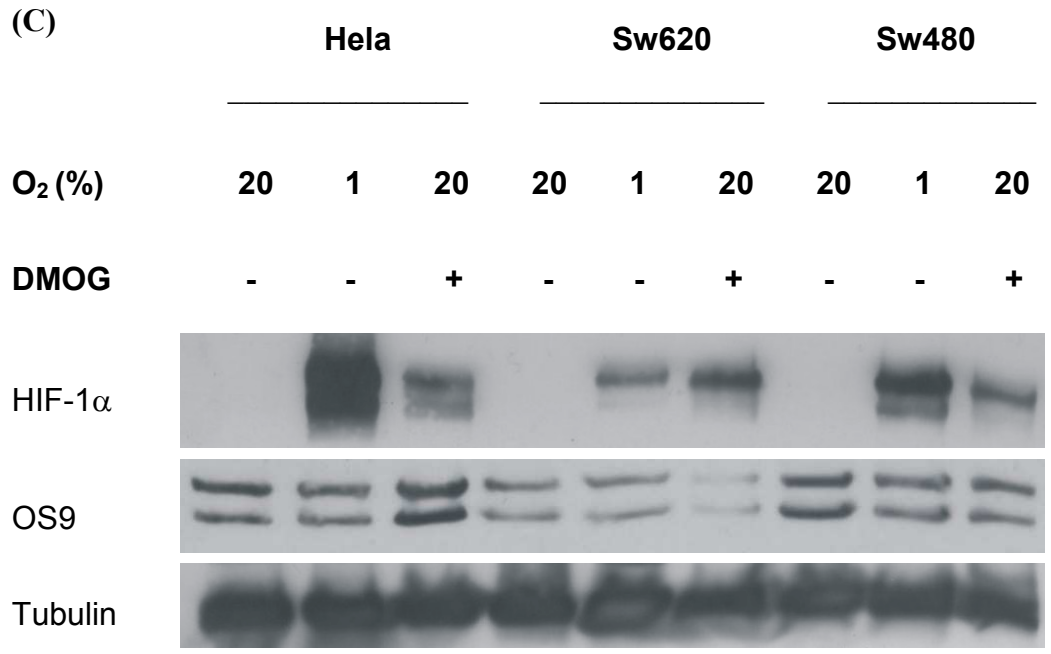


Abbildung 3.7: Effekt von DMOG auf die Expression von OS9

Die Abbildungen zeigen den Effekt von DMOG auf die Expression von OS9 in den Zelllinien Fibroblasten NH/HJ und VH/AE **(A)**, UT7 **(B)** sowie Hela, Sw620 und Sw480 **(C)**.

3.2.4 Abbau von OS9

Um die Umsetzungsgeschwindigkeit des OS9 zu bestimmen, wurde der Translationshemmer Cycloheximid eingesetzt. Dieser unterbindet die OS9-Produktion, wodurch der zeitliche Verlauf des Proteinabbaus durch die Verminderung des Signals im Western Blot sichtbar gemacht werden kann. U2OS blieben entweder unbehandelt oder wurden 30 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden oder sieben Stunden mit Cycloheximid in einer Konzentration von 100 µM behandelt. Zur Detektion wurden ein Antikörper gegen OS9 und ein weiterer Antikörper gegen α-Tubulin als Vergleichsprotein und zur Ladekontrolle eingesetzt.

Die Blots zeigten eine deutliche Abnahme des OS9-Signals, die nach vier Stunden einsetzte. Nach insgesamt sieben Stunden Behandlungsdauer war eine starke Abnahme des Signals zu verzeichnen. Die Ladekontrolle α-Tubulin zeigte ein konstantes Signal.

Das OS9 unterliegt also einem relativ schnellen Abbau, der bereits nach vier Stunden zu einer deutlichen Reduktion der Proteinmenge unter Behandlung mit dem Translationshemmer Cycloheximid führt. Zusätzlich war zu verzeichnen, dass beide Spleißvarianten des OS9 gleichmäßig an Signalintensität verloren haben. Es werden also beide Formen gleich schnell und stark abgebaut.

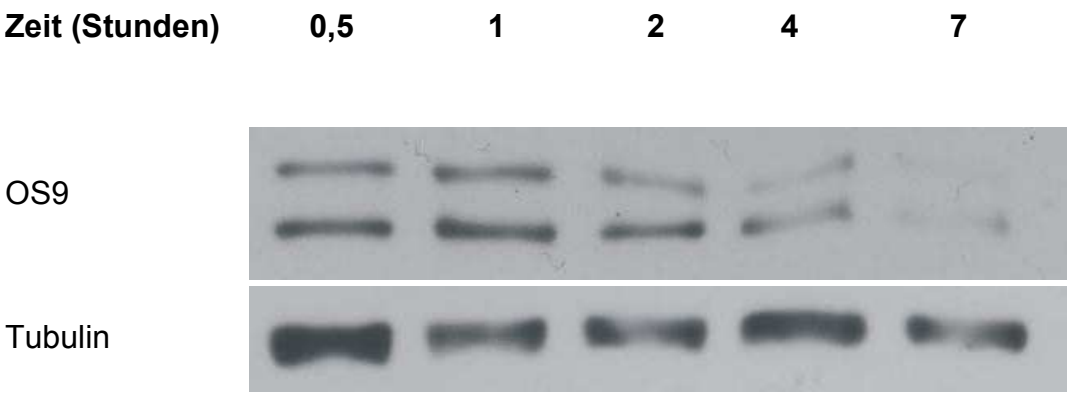


Abbildung 3.8: Umsetzungsgeschwindigkeit von OS9

Humane Osteosarkomzellen wurden für 30 Minuten, eine, zwei, vier und sieben Stunden mit dem Translationshemmer Cycloheximid inkubiert. Der Effekt auf das OS9 ist in der Abbildung dargestellt.

Es existieren verschiedene intrazelluläre Abbaumöglichkeiten für Proteine. Neben der lysosomalen Degradation, bei der vor allem exogene Proteine abgebaut werden, besteht ein weiterer Weg über einen Verdau durch Endolysosomen oder Autophagosomen. Der Abbau endogener Proteine verläuft in der Regel über das regulierbare und selektive Ubiquitin/Proteasom-System. Dies ist beispielsweise bei HIF-1α der Fall, das nach Polyubiquitinierung durch das von-Hippel-Lindau-Protein, einem Bestandteil einer sehr spezifischen E3-Ubiquitin-Ligase, im 26S Proteasom abgebaut wird (Salceda und Caro, 1997). Das 26S Proteasom stellt für die Degradation aller kurzlebigen und bis zu 90% aller langlebigen zellulären Proteine den Hauptabbauweg dar. Die Ubiquitinkette, die sich an Lysinresten des Proteins befindet, wird von der 19S Untereinheit erkannt und abgespalten, das Protein wird linearisiert. Im Anschluss gelangt das Protein in die 20S Untereinheit, in der es abgebaut wird. Bei MG132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucinal) handelt es sich um einen reversiblen Inhibitor des 26S Proteasoms.

In diesem Versuch wurde das MG132 verwendet, um herauszufinden, ob auch OS9 proteasomal degradiert wird. Hierfür wurden die Zelllinien U2OS, MCF7, Hela und Hep3b eingesetzt. Die erste Probe blieb als Kontrolle jeweils unbehandelt, die zweite Probe wurde mit 50 µl DMSO behandelt, um einen toxischen Effekt des Lösungsmittels auszuschließen. Die jeweils dritte Probe wurde dann mit MG132 in einer Konzentration von 10 µM für eine Versuchsdauer von vier Stunden behandelt. In der Positivkontrolle zeigte sich in den mit MG132 behandelten Proben wie erwartet eine deutliche Induktion des HIF-1α-Signals. Auf der Ebene des OS9 zeigte sich keine Veränderung in der Signalintensität durch Behandlung mit MG132 im Vergleich zu den Kontrollproben. Die Membran war gleichmäßig mit Zellprotein beladen. Daraus lässt sich folgern, dass OS9 nicht proteasomal abgebaut wird.

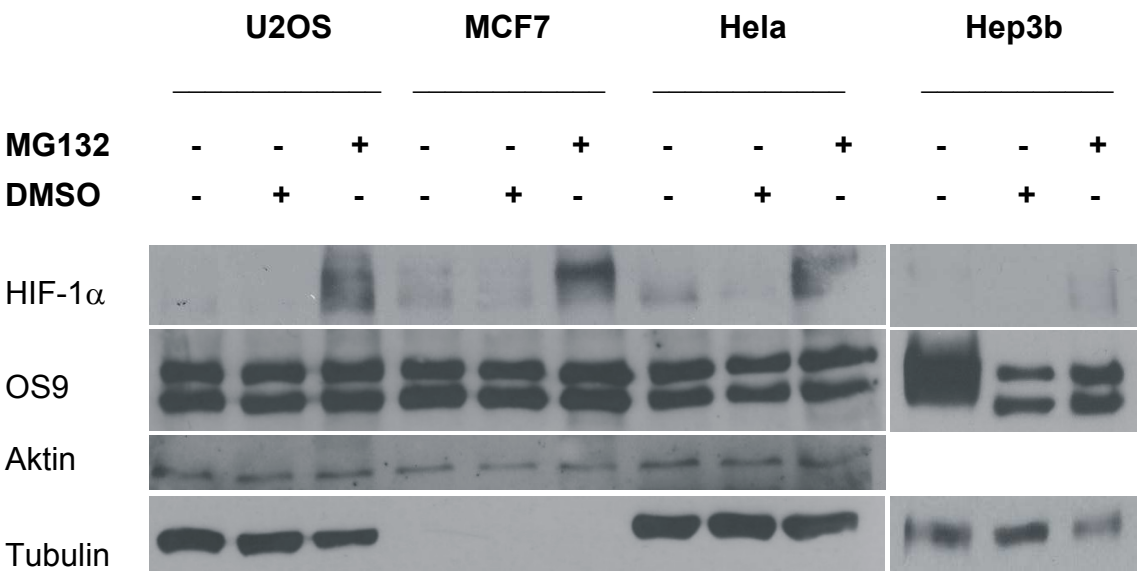


Abbildung 3.9: Proteasomaler Abbau von OS9

Die Abbildung zeigt den Effekt des Proteasom-Inhibitors MG132 auf die Expression von OS9 in den Zelllinien U2OS, MCF7, Hela und Hep3b. Als Positivkontrolle ist das HIF-1α dargestellt.

Eine weitere Möglichkeit Hinweise auf den Abbauweg des OS9 zu erhalten, ist die Verwendung von Calpastatin. Dabei handelt es sich um einen endogenen Protease-Inhibitor, der spezifisch für die nicht-lysosomale calciumabhängige Cystein-Protease Calpain ist. Diese papainähnliche Protease wird in Säugetieren ubiquitär exprimiert und verschiedene Onkogene und Tumorsupressorgenprodukte stellen ihre Substrate dar.

Ein Beispiel für diesen Degradationsweg ist das HIF-1α, das überwiegend im Proteasom, zum Teil jedoch auch durch Calpain abgebaut wird (Zhou et al., 2006).

Um den Einfluss von Calpastatin auf das OS9 aufzuzeigen, wurden U2OS- und Hep3b-Zellen sowie HUVEC mit 2 µM Calpastatin für eine Versuchsdauer von vier Stunden behandelt. Jeweils eine zweite entsprechende Probe jeder Zelllinie diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Zum Nachweis wurden Antikörper gegen OS9 und HIF-1α sowie auch zur Ladekontrolle gegen α-Tubulin verwendet. Das HIF-1α-Signal zeigte eine Induktion durch Behandlung mit Calpastatin. Die Signalintensität des OS9 blieb durch die Behandlung mit Calpastatin unbeeinflusst. Die Membran war ausreichend gleichmäßig mit Protein beladen. OS9 wird somit nicht durch die calciumabhängige Cystein-Protease Calpain abgebaut.

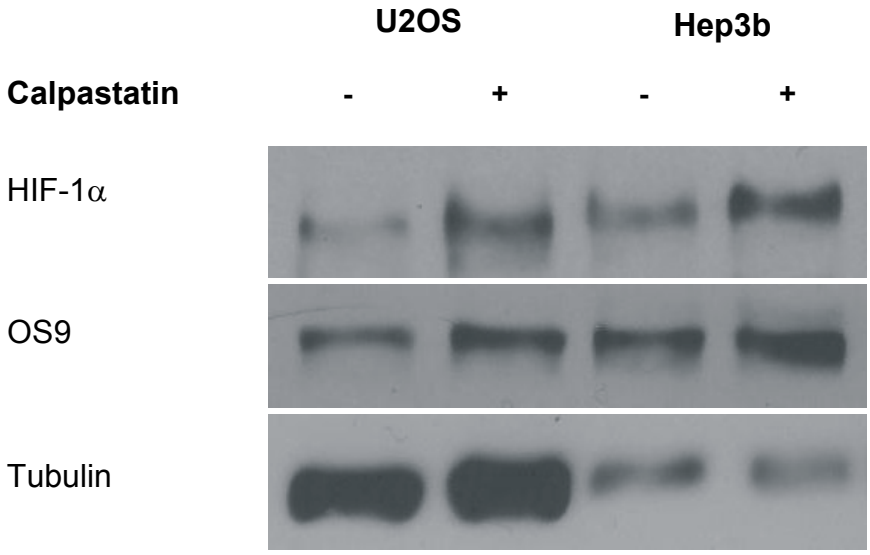


Abbildung 3.10: Effekt von Calpastatin auf den Abbau von OS9

Dargestellt ist der Effekt des Calpain-Inhibitors Calpastatin auf das OS9 in humanen Osteosarkomzellen. Die Zellen wurden für eine Versuchsdauer von vier Stunden mit einer Konzentration von 2 µM behandelt.

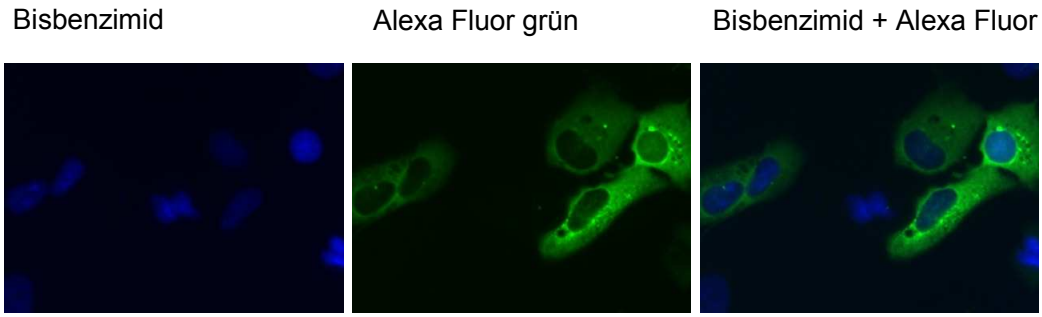
3.3 Co-Immunpräzipitation von PHD2 und OS9

Im Jahre 2005 wurde von Baek et al. eine Interaktion des OS9 sowohl mit der PHD2 und PHD3, als auch mit der HIF-1α-Untereinheit beschrieben, die zunächst in einem Yeast two Hybrid Versuch gesehen und in einer Co-Immunpräzipitation bestätigt wurde. Um die Interaktion zwischen OS9 und PHD2 in U2OS-Zellen nachzuweisen, wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Hierbei wurden Streptavidin-Agarose-Beads als Substrat genutzt, an die biotinylierte PK-Antikörper fixiert wurden. Um über das PK-Tag aufreinigen zu können, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Plasmiden transfiziert, die zur Expression von Proteinen mit einem PK-Abschnitt führen. Proteine ohne PK-Tag wurden nur durch Proteininteraktion co-immunpräzipitiert und mittels Western Blot unter Verwendung der entsprechenden Antikörper detektiert. Zur Erfolgskontrolle der Transfektion führte ich vor der Immunpräzipitation einen Western Blot mit den Zelllysaten durch. Dieser bestätigte die gelungene Transfektion. Zudem wurde eine Immunfluoreszenz mit dem in der Co-Immunpräzipitation eingesetzten, von mir klonierten Plasmid pcDNA3-HIS-PHD2-H374A-PK durchgeführt, um den PK-Abschnitt nachzuweisen und eine erfolgreiche Transfektion sicherzustellen.

(A)

U2OS untransfiziert

(B)



U2OS transfiziert mit pcDNA3-HIS-PHD2-H374A-PK

Abbildung 3.11: Immunfluoreszenz zum Nachweis der Transfektionseffizienz und des PK-Tags

Gezeigt sind untransfizierte U2OS-Zellen **(A)** und mit dem Plasmid pcDNA3-HIS-PHD2-H374A-PK transfizierte U2OS **(B)**. Die Transfektionseffizienz und das PK-Tag wurden mit einem Primärantikörper gegen PK und einem grün-fluoreszierenden Sekundärantikörper (Alexa-Fluor-grün-konjugiertes anti-Maus-IgG) nachgewiesen.

Die zweite Spur der Co-Immunpräzipitation zeigt U2OS-Zellen, die sowohl mit OS9-PK als auch mit pcDNA3-HIS-PHD2 transfiziert wurden. Der PK-Abschnitt des OS9 diente hierbei zur Aufreinigung über die Streptavidin-Agarose-Beads. Die Abbildung zeigt das aufgereinigte OS9 sowie ein Signal für das co-immunpräzipitierte HIS-PHD2. In der dritten Probe wurde überexprimiertes OS9-PK aufgereinigt. Eine Interaktion mit endogenem PHD2 war in dieser Probe nicht zu detektieren.

Die vierte Spur zeigt eine Aufreinigung von überexprimiertem PHD2-PK in U2OS. Dabei handelt es sich um ein von mir in den Vektor pcDNA3 kloniertes PHD2 kompletter Länge mit Mutation im aktiven Zentrum, die zu einem Austausch von Histidin durch Alanin

führte. Zudem wurde in dieses Plasmid ein PK-Abschnitt eingefügt, der die Aufreinigung über Streptavidin-Agarose-Beads mit gekoppeltem PK-Antikörper ermöglichte (pcDNA3-HIS-PHD2-H374A-PK, vgl. Immunfluoreszenz Abbildung 3.11). In dieser Probe konnte kein interagierendes endogenes OS9 nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle der Co-Immunpräzipitation diente eine Probe mit untransfizierten U2OS, die in der Co-Immunpräzipitation kein Signal zeigte und somit wie erwartet negativ war.
Dieser Versuch bestätigte die von Baek et al. beschriebene Interaktion zwischen OS9 und PHD2 mittels Co-Immunpräzipitation. Es war jedoch weder möglich endogenes PHD2 nach Fällung von OS9-PK zu detektieren noch konnte endogenes OS9 nach Präzipitation von PHD2-PK nachgewiesen werden.

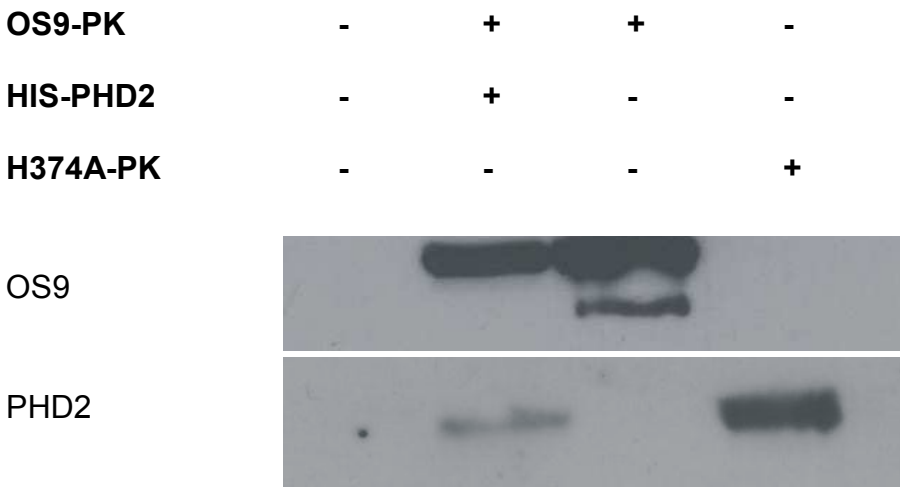


Abbildung 3.12: Co-Immunpräzipitation von PHD2 durch OS9-PK

Die Abbildung zeigt eine Co-Immunpräzipitation von OS9 und PHD2 unter Verwendung von Antikörpern gegen PK. Transfiziert wurden Plasmide, die für ein PK-markiertes OS9, ein nicht-PK-markiertes PHD2 und ein PK-markiertes PHD2 mit Mutation im aktiven Zentrum kodieren. Der Nachweis einer Interaktion erfolgte mit Antikörpern gegen OS9 und PHD2.

In einem weiteren Versuch wurde die Co-Immunpräzipitation wiederholt und zudem die Interaktion zwischen OS9 und HIF-1α untersucht. Hierzu diente eine mit OS9-PK behandelte Probe, die zusätzlich mit DFO behandelt wurde, um die HIF-1α Untereinheit zu stabilisieren. Hierbei konnte kein co-immunpräzipitierendes HIF-1α nachgewiesen werden.

3.4 Effekt von gesteigerter und verminderter OS9-Expression auf HIF-1α

Neben der Interaktion von OS9 mit PHD2, PHD3 sowie HIF-1α publizierten Baek et al. im Jahre 2005, dass eine OS9-Überexpression zu einer vermehrten HIF-1α-Hydroxylierung und folgender Degradation führt, eine OS9-Verminderung hingegen zu einer gesteigerten Expression von HIF-1α.

Um herauszufinden, ob OS9 einen unterstützenden Effekt auf die Funktion der Prolylhydroxylasen bezüglich des Abbaus von HIF-1α besitzt, führte ich Experimente mit den Zelllinien U2OS und Hela durch. Zwei Kulturen wurden dabei unter normoxischen Bedingungen gehalten, wovon eine Probe als Kontrolle unbehandelt blieb, die zweite Probe mit dem Plasmid pcDNA3.1-OS9-PK transfiziert wurde, um eine Überexpression von OS9 herbeizuführen. Die zwei weiteren Proben wurden für 24 Stunden hypoxischen Bedingungen mit einem Sauerstoffgehalt von 1% ausgesetzt. Die erste dieser hypoxischen Proben blieb unbehandelt, während die zweite Probe mit pcDNA3.1-OS9-PK transfiziert wurde. Die transfizierte DNA-Menge betrug je 1µg. Zur Detektion der Proteine wurden Antikörper gegen OS9 und HIF-1α sowie gegen α-Tubulin als Ladekontrolle eingesetzt.

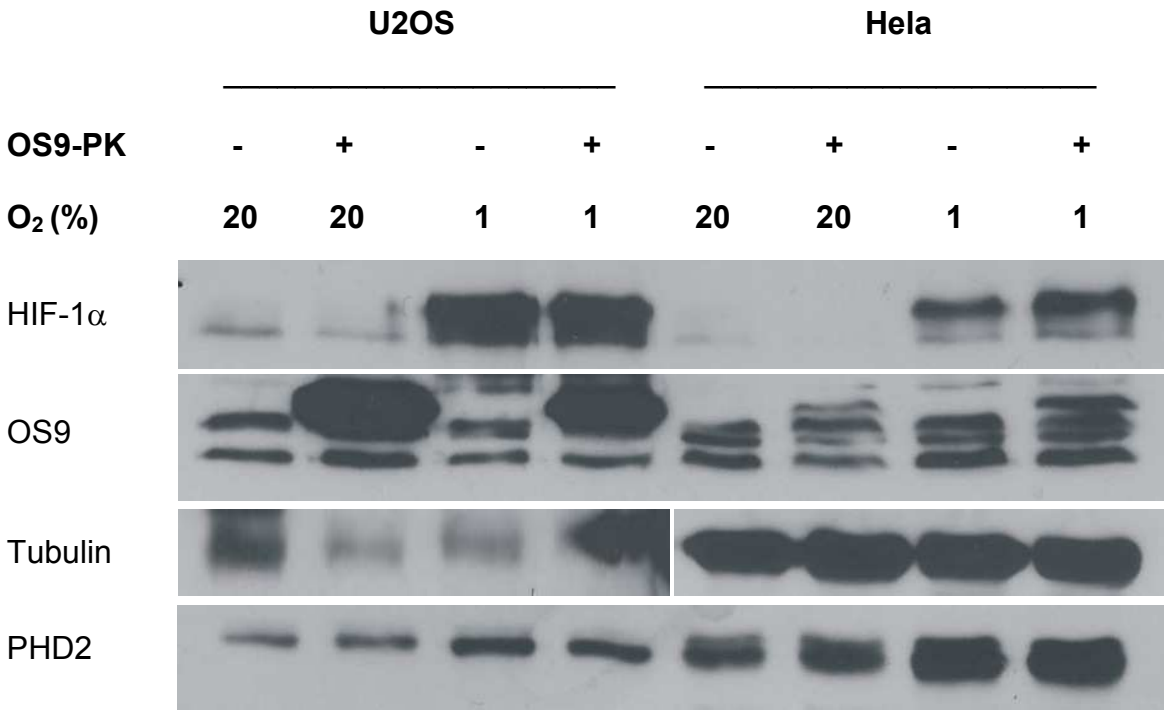


Abbildung 3.13: Überexpression von OS9 hat keinen Effekt auf HIF-1α und PHD2

Die Abbildung zeigt den Effekt der OS9-Überexpression auf HIF-1α in den Zelllinien U2OS und Hela unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Zudem ist der Effekt auf die Prolylhydroxylase PHD2 dargestellt.

Die OS9-Überexpression war deutlich erkennbar. Bei Betrachtung der HIF-1α-Signale zeigte sich weder in der unbehandelten noch in der transfizierten normoxischen Probe eine Bande. Um einen unterstützenden Effekt des OS9 auf die Prolylhydroxylasen sichtbar machen zu können, wurden Proben untersucht, in denen HIF-1α durch hypoxische Bedingungen induziert war. Bei einem verstärkenden Effekt des OS9 auf die Prolylhydroxylasen wäre eine Abnahme des HIF1α-Signals in der transfizierten Probe im Vergleich zur untransfizierten Probe zu erwarten. Im vorliegenden Versuch zeigte sich in den U2OS jedoch kein Unterschied in der Signalintensität zwischen transfizierten und untransfizierten Proben. Dies gilt sowohl für die Zelllinie U2OS als auch für Hela. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt also, dass überexprimiertes OS9 keinen unterstützenden Effekt auf die Prolylhydroxylasen bezüglich der Regulation des HIF-1α hat.

Um neben der OS9-Überexpression auch den Effekt der OS9-Suppression auf die HIF-1α-Untereinheit zu überprüfen, wurde siRNA gegen OS9 eingesetzt. Hierbei wurden verschiedene Sequenzen verwendet, die auch miteinander kombiniert wurden. Durch den Einsatz der siRNA kam es nicht zu einem kompletten Auslöschen des OS9-Signals, jedoch in der Regel zu einer deutlichen Reduktion. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, die Ergebnisse zeigten hinsichtlich der Suppression der OS9-Expression eine hohe Variabilität. Mit einem HIF-1α-Western Blot wurde untersucht, ob die Unterdrückung der OS9-Expression zu einer Induktion von HIF-1α führt.

Das Ergebnis des abgebildeten Versuchs zeigt in der Zelllinie U2OS eine deutliche OS9-Reduktion nach Transfektion mit siRNA gegen OS9 und ein ausreichend gleichmäßiges α-Tubulin-Signal. Auf der Ebene des HIF-1α war keine Induktion des HIF durch OS9-Suppression zu verzeichnen. Das Ergebnis spricht gegen eine HIF-Regulation durch OS9.

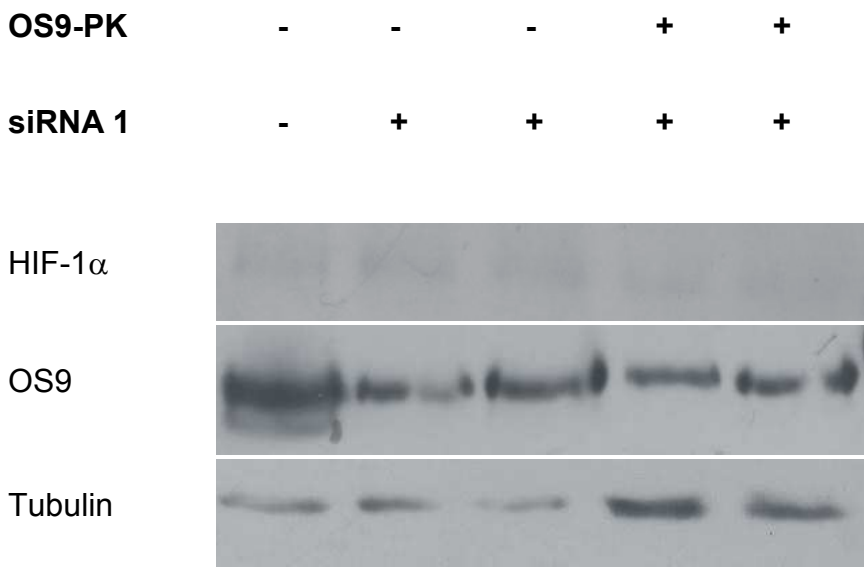


Abbildung 3.14: Effekt der OS9-Suppression auf HIF-1α

Durch Verwendung von siRNA in der Zelllinie U2OS wurde das OS9 supprimiert und der Effekt auf das HIF-1α aufgezeigt. Dies erfolgte in einer Doppelbestimmung mit zwei voneinander unabhängig behandelten Proben.

3.5 Subzelluläre Lokalisation

Zur Lokalisationsbestimmung des OS9 wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei wurde OS9 mittels Transfektion mit pcDNA3.1-OS9-PK überexprimiert und mit einem polyklonalen Antikörper gegen OS9 nachgewiesen.

Die erste Abbildungsreihe zeigt untransfizierte U2OS-Zellen, die zweite Reihe eine OS9-Überexpression. Die Detektion erfolgte in beiden Proben mit einem Antikörper gegen OS9.

(A)

U2OS untransfiziert

(B)

U2OS OS9-PK-transfiziert

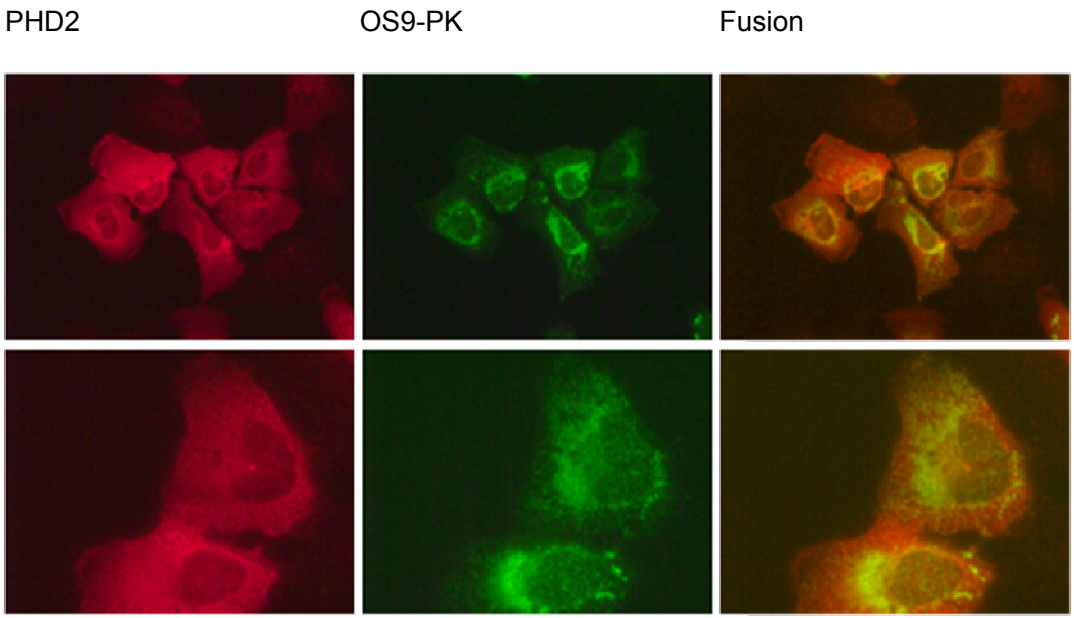
Abbildung 3.15: Nachweis der subzellulären OS9-Lokalisation

Dargestellt ist die subzelluläre Lokalisation von endogenem OS9 **(A)** und überexprimiertem OS9 **(B)**. Verwendet wurde ein polyklonaler Antikörper gegen OS9.

Die untransfizierte Probe zeigte nur nach sehr langer Belichtung ein schwaches Signal für das OS9. Die Spezifität dieses Signals ist unklar. Endogenes OS9 konnte unter diesen Versuchsbedingungen also nicht sicher detektiert werden. In der zweiten Versuchsreihe zeigte sich neben der Kernfärbung ein deutliches Signal für das überexprimierte OS9.

In einem weiteren Versuch wurde die subzelluläre Lokalisation von OS9 und PHD2 parallel aufgezeigt. Hierbei wurde endogenes PHD2 in U2OS mit einem rot-fluoreszierenden Antikörper nachgewiesen. Zum Nachweis der OS9-Lokalisation wurden die Zellen mit OS9-PK transfiziert und das Protein mit einem grün-fluoreszierenden

Antikörper detektiert. Dabei zeigte sich ein typisches zytoplasmatisches Muster für die Prolylhydroxylase PHD2. Das OS9-Signal stellte sich retikulär und perinukleär dar. Diese Resultate sprechen gegen eine gemeinsame Lokalisation von OS9 und PHD2.



Nachweis von endogenem PHD2 und OS9-PK in U2OS

Abbildung 3.16: Lokalisation von OS9 und PHD2 im Vergleich

Die Abbildung zeigt endogenes PHD2 durch einen Primärantikörper gegen PHD2 und den Sekundärantikörper gegen Kaninchen (Alexa-Fluor) in rot. In grün zeigt sich transfiziertes OS9-PK durch einen PK-Primärantikörper und einen Sekundärantikörper gegen Maus (Alexa-Fluor). Im rechten Teil der Abbildung ist eine Fusion der Einzelbilder und somit Überschneidung der OS9 und PHD2 Lokalisation gezeigt.

Zur genaueren Eingrenzung der subzellulären Lokalisation des OS9 wurden zusätzlich zur OS9-Überexpression Vektoren transfiziert, die zur Bildung des rot-fluoreszierenden Proteins Ds-Red in spezifischen Zellkompartimenten führen. Das Ds-Red war entweder im Golgi-Apparat, in Mitochondrien oder im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, konnte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen und mit der Lokalisation des überexprimierten OS9-PK verglichen werden.

Die erste dieser Abbildungsreihen zeigt eine Überexpression des mitochondrialen Ds-Red. Das überexprimierte OS9 stellte sich durch den PK-Antikörper und den FITC-gekoppelten Sekundärantikörper grün dar. Bei der Überlagerung dieser Proben zeigte sich keine

Übereinstimmung der Lokalisation. Das überexprimierte OS9 ist somit nicht mitochondrial lokalisiert.

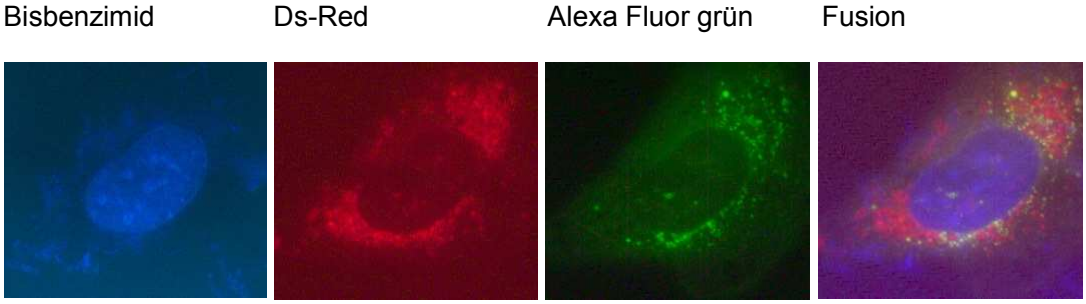


Abbildung 3.17: Subzelluläre Lokalisation von OS9 im Vergleich zum co-transfizierten mitochondrialen Ds-Red

U2OS wurden mit einem mitochondrial lokalisierten rot-fluoreszierenden Ds-Red und einem OS9-PK co-transfiziert. OS9 ist in grün durch einen PK-Antikörper und einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt.

Die folgende Abbildungsreihe zeigt die Transfektion mit einem Lokalisationsvektor für den Golgi-Apparat (rot), der bei der Überlagerung mit dem überexprimierten OS9 (grün) keine Übereinstimmung aufwies. Überexprimiertes OS9 ist somit nicht im Golgi-Apparat lokalisiert.

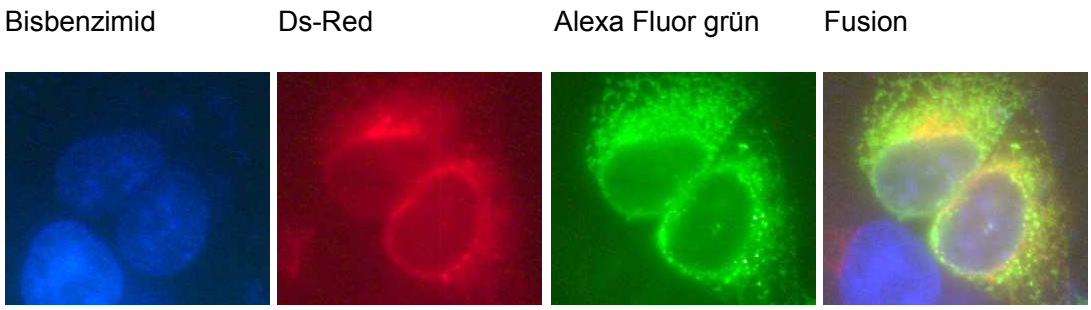


Abbildung 3.18: Subzelluläre Lokalisation von OS9 im Vergleich zum co-transfizierten im Golgi-Apparat lokalisierten Ds-Red

U2OS wurden mit einem im Golgi-Apparat lokalisierten rot-fluoreszierenden Ds-Red und einem OS9-PK co-transfiziert. OS9 ist in grün durch einen PK-Antikörper und einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt.

Die dritte Versuchsreihe zeigt eine Transfektion mit einem Lokalisationsvektor für das Endoplasmatische Retikulum, das rot dargestellt ist. In der Überlagerung dieses Signals mit dem grünen Signal für das OS9 zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung. Die Lokalisation des OS9 ist in diesem Versuch also mit dem Endoplasmatischen Retikulum vereinbar.

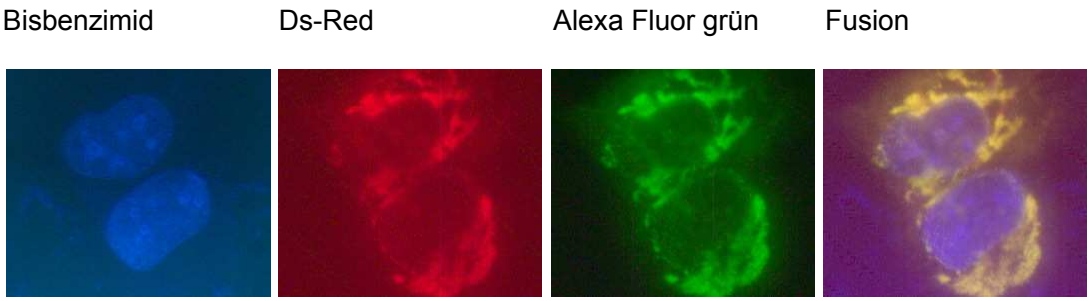


Abbildung 3.19: Subzelluläre Lokalisation von OS9 im Vergleich zum co-transfizierten im ER lokalisierten Ds-Red

U2OS wurden mit einem OS9-PK und einem im ER lokalisierten rot-fluoreszierenden Ds-Red co-transfiziert. OS9 ist in grün durch einen PK-Antikörper und einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt.

4. Diskussion

Der Hypoxie-induzierbare-Faktor HIF stellt den Hauptfaktor in der Regulation der Sauerstoffhomöostase dar. Seine Regulation erfolgt vornehmlich durch die HIF-Prolylhydroxylasen, deren Bedeutung zu Beginn dieser Arbeit dargestellt wurde. Die Entdeckung und Erforschung weiterer Regulatoren in diesem System ist von großer medizinischer und wissenschaftlicher Bedeutung. Das jüngst mit der Regulation des Transkriptionsfaktors HIF in Zusammenhang gebrachte Lektin OS9 stellt solch ein Protein dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Charakterisierung dieses Proteins hinsichtlich seiner Wirkung auf die HIF-Regulation.

Zunächst konnte ich durch den Einsatz verschiedener Hemmstoffe der Prolylhydroxylasen deren Bedeutung für die Regulation von HIF-1α aufzeigen. Inhibition der Prolylhydroxylasen führt zur Stabilisierung von HIF-1α. Durch den Einsatz von Hypoxie mit einem Sauerstoffgehalt von 1% konnte ich das HIF-1α in der Zellkultur stabilisieren. Passend zu den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen konnte ich somit zeigen, dass das HIF-1α sauerstoffabhängig reguliert wird. Die Prolylhydroxylasen stellen aufgrund ihrer hohen Michaelis-Menten-Konstante für Sauerstoff den eigentlichen Sauerstoffsensor dar (Hirsila et al., 2003; Koivunen et al., 2004). Dies bedeutet, dass bereits geringe Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes erkannt werden. Durch sauerstoffabhängige Hydroxylierung von HIF-1α an den spezifischen Aminosäuren Prolin 402 und Prolin 564 initiieren sie den Abbau von HIF-1 unter normoxischen Bedingungen. Dieser erfolgt nach einer Ubiquitinierung der hydroxylierten α-Untereinheit durch das von-Hippel-Lindau-Protein, das Bestandteil einer sehr spezifischen E3-Ubiquitin-Ligase ist (Maxwell et al., 1999; Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Willam et al., 2002). Im Anschluss daran, kommt es zur proteasomalen Degradation von HIF-1α im 26S Proteasom (Salceda und Caro, 1997; Huang et al., 1998). Unter den von mir hergestellten Versuchsbedingungen bleibt durch den Mangel an Sauerstoff die Hydroxylierung von HIF-1α durch die Prolylhydroxylasen aus. Somit findet keine Ubiquitinierung statt und es kommt zu einer Stabilisierung von HIF-1α. Dieser Versuch bestätigt somit die Sauerstoffabhängigkeit der Prolylhydroxylasen. Ausreichend für die Stabilisierung von HIF ist dabei Hypoxie mit einem Sauerstoffgehalt von unter 6% und einer Behandlungsdauer von zwei Stunden (Jiang et al., 1996). Bereits weniger als fünf Minuten nach Reoxygenierung kommt es wieder zu einer deutlichen und schnellen Abnahme des HIF-Signals aufgrund einer

Reaktivierung der Hydroxylasen (Wang und Semenza, 1993; Huang et al., 1998; Epstein et al., 2001; D´Angelo et al., 2003; Metzen et al., 2005).

Neben der hypoxischen Induktion konnte ich zeigen, dass es durch Verwendung von Cobaltchlorid zu einer Stabilisierung von HIF-1α kommt. Dies geht mit Angaben in der Literatur konform, wobei der Transkriptions-stimulierende Effekt von Cobaltchlorid auf das Erythropoetin-Gen zum ersten Mal von Schuster und Koautoren im Jahre 1989 und durch Goldberg et al. im Jahre 1991 festgestellt wurde (Schuster et al., 1989; Goldberg et al., 1991). Mit einer Inhibition der Prolylhydroxylasen konnte das Cobaltchlorid erst später in Zusammenhang gebracht werden (Epstein et al., 2001; Berchner-Pfannschmidt et al., 2004).

Ein weiterer von mir eingesetzter Hemmstoff der Prolylhydroxylasen ist das Deferoxamin (DFO), durch dessen Verwendung ich eine Stabilisierung von HIF-1α unter normoxischen Bedingungen zeigen konnte. Bei DFO handelt es sich um einen Eisenchelator, der zu einer Verminderung des freien zweiwertigen Eisens führt. Für DFO wurde zunächst gezeigt, dass es zu einer erhöhten Transkription des Erythropoetin-Gens kommt, die auf eine induzierte HIF-1α-Aktivität zurückgeführt werden konnte (Wang und Semenza, 1993). Die Eisenabhängigkeit der Prolylhydroxylasen wurde von Epstein et al. im Jahre 2001 beschrieben, wodurch die Induktion von HIF mit der Inhibition der Prolylhydroxylasen durch DFO erklärt werden konnte. In meinem Experiment konnte ich somit bestätigen, dass die Behandlung mit DFO zu einer Induktion von HIF-1α führt, die durch Inhibition der eisenabhängigen Prolylhydroxylasen hervorgerufen wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Prolylhydroxylasen den entscheidenden Faktor in der Regulation von HIF-1α darstellen.

In einem weiteren Versuch konnte ich die herausragende Rolle der PHD2 bezüglich der Regulation von HIF herausarbeiten. Durch Verwendung von siRNA gegen PHD2, die zu einer Verminderung der PHD2-Konzentration führte, konnte ich eine deutliche Stabilisierung von HIF-1α unter normoxischen Bedingungen zeigen. Dies lässt sich auf eine Hemmung der Hydroxylierung zurückführen, die den HIF-Abbau verhindert. Es existieren drei verschiedene Isoformen der Prolylhydroxylasen, die sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren sowie in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden. In meinem Experiment konnte ich zeigen, dass die Funktion der Prolylhydroxylase 1 und 3 nicht ausreichend ist um den Verlust der PHD2-Funktion kompensieren zu können, was mit der Aussage übereinstimmt, dass die PHD2 das Schlüsselenzym in der Regulation des HIF-1α ist (Berra et al., 2003). Ein weiteres interessantes Resultat dieses Versuches ergibt sich aus

der genaueren Betrachtung des PHD2-Signals. So zeigt sich unter hypoxischen Bedingungen ein deutlich gesteigertes Signal im Vergleich zur Normoxie, was eine Induktion der PHD2 durch Hypoxie aufzeigt (D´Angelo et al., 2003). Dies passt zu der Erkenntnis, dass es sich bei den Prolylhydroxylasen selbst um direkte Zielgene des HIF-1α handelt (Metzen et al., 2005). Somit kann eine erhöhte HIF-Konzentration nach Reoxygenierung schnell wieder reguliert werden (Berra et al., 2001; Berra et al., 2003). Interessanterweise kommt es im Zustand chronischer Hypoxie nicht nur zu einer vermehrten Transkription, sondern auch zu einer erhöhten Aktivität der Prolylhydroxylasen (Ginouves et al., 2008), sodass die Zellen vor einer Überaktivität des HIF-Systems bewahrt werden, die zu einer Induktion der Apoptose führen könnte.

Meine Untersuchungen in der Zellkultur bestätigen die entscheidende Rolle der Prolylhydroxylasen, insbesondere der PHD2 in der Regulation von HIF-1α und somit in der Sauerstoffhomöostase und bilden eine wichtige Grundlage für die weiteren Versuche und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Funktion des OS9 in der Sauerstoffregulation.

OS9 *(amplified in osteosarcoma-9)* wurde erstmals in humanen Osteosarkomzellen detektiert und danach benannt. Die Untersuchungen zur Expression von OS9 in unterschiedlichen Zelllinien sind von großer Bedeutung und dienen auch dem besseren Verständnis zu dessen Funktion. Über die Regulation und mögliche Abbauwege von OS9 ist in der Literatur bis dato nur wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich die Expression von OS9 in zahlreichen Zelllinien zeigen. Hier sei auf Abbildung 3.3 hingewiesen, die das OS9 in einem Western Blot mit den Zelllinien MCF7, Hep3b, U2OS sowie in nicht-transformierten Fibroblasten und humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVEC) zeigt. Zahlreiche Western Blots mit weiteren Zelllinien zeigten übereinstimmende Resultate. Die Ergebnisse sprechen übereinstimmend mit den Befunden verschiedener Arbeitsgruppen für eine ubiquitäre Expression des Proteins. So publizierten Su et al., bereits im Jahre 1996, dass das OS9-Gen für eine 2.8 kb mRNA kodiert, die in allen der von ihnen untersuchten humanen Geweben, einschließlich transformierter Zellen zu detektieren ist und vermuteten, dass OS9 ubiquitär exprimiert wird (Su et al., 1996).

Kimura et al. konnten die ubiquitäre Expression sowohl in transformierten als auch in nicht-transformierten Zellen ein Jahr später bestätigen und fanden zudem heraus, dass das OS9-Gen in der Bande 13 des langen Armes von Chromosom 12 lokalisiert und vermutlich haploid ist. Bei dieser Region, also der Bande 13-15 auf Chromosom 12q handelt es sich

um eine in humanen Sarkomen und malignen Gliomen stark amplifizierte Region (Su et al., 1996; Kimura et al., 1997), was einen wichtigen Hinweis auf die Funktion des OS9 geben könnte. In meinen Experimenten unterschied sich die Intensität der Expression in verschiedenen Zelllinien. Ein sicherer Unterschied zwischen transformierten und nicht-transformierten Zelllinien war jedoch nicht zu verzeichnen, so dass eine Überexpression in Tumorzellen nicht sicher bestätigt werden konnte, wobei jedoch auch auf die ungenaue Aussagekraft des Western Blots in Bezug auf quantitative Vergleiche hingewiesen sei. Ein Unterschied in der Expression stimmt mit Erkenntnissen aus der Literatur überein. So konnte im Northern Blot gezeigt werden, dass mehrere Tumorzelllinien aus Sarkomen, Karzinomen und myeloider Leukämie eine gleich starke Expression des OS9-Gens zeigen, manche Sarkomzelllinien jedoch eine höhere Konzentration an OS9-mRNA aufweisen (Kimura et al., 1998; Litovchick et al., 2002).

Zur genaueren Aufklärung der verschiedenen OS9-Isoformen beschäftigte ich mich mit dem Vorgang des Spleißens, womit man den Prozess der Aneinanderreihung der Exons in der prä-mRNA bezeichnet. Während des konstitutiven Spleißprozesses im Spleißosom, einer Ansammlung zahlreicher snRNP-Bestandteile sowie externer Spleißproteine, werden die Introns entfernt, die Exons bleiben in der mRNA enthalten. Beim alternativen Spleißen, das bei circa einem unter 20 Genen abläuft, können aus einer prä-mRNA verschiedene reife mRNAs entstehen, die verwandte, aber verschiedene Proteine kodieren. Dies wird durch das Herausspleißen unterschiedlicher Exons bzw. Exonanteile ermöglicht. Ein einzelnes Gen kann somit die Information für mehrere Proteine tragen (Knippers, 1997).

Das OS9-Gen setzt sich bei einer Größe von ca. 30,4 kbp aus insgesamt 15 Exons und 14 Introns zusammen. Das Startcodon ist auf Exon 1 lokalisiert, die potentielle nukleäre Lokalisationssequenz auf Exon 10. Exon 15 weist die größte Länge auf, dient der Kodierung des C-Terminus des Proteins und beinhaltet die nicht übersetzte 3´-Region (Kimura et al., 1997). In der Literatur werden verschiedene OS9-Isoformen beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstehen. Dies könnte dazu führen, dass die verschiedenen Isoformen zwar untereinander verwandt sind, sich jedoch in ihrer Funktion und Regulation voneinander unterscheiden und ist somit von Bedeutung.

In meinen Experimenten konnte ich zunächst im Western Blot zwei verschiedene OS9-Banden detektieren, die den zwei exprimierten Spleißvarianten entsprechen. In der Zelllinie Hela waren bei einem Experiment sogar drei verschiedene Isoformen zu detektieren. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden mehrerer Arbeitsgruppen überein. So wurde im Jahre 1998 von Kimura et al. erstmals publiziert, dass drei Isoformen von

humaner OS9-cDNA aus Leukämiezellen isoliert und charakterisiert werden können. In weiteren Publikationen konnte, passend zu meinen Ergebnissen für unterschiedliche Zelllinien (HEK 293, MEF und dendritische Zellen) die Expression der Isoformen 1 und 2, nicht jedoch die der Isoform 3 gezeigt werden (Bernasconi et al., 2008; Christianson et al., 2008; Jansen et al., 2009). Im Jahre 2007 beschrieben und charakterisierten Wang et al., eine vierte Isoform des humanen OS9.

Nach Isolation der zellulären mRNA und reverser Transkription amplifizierte ich einen Teil der kodierenden OS9-Sequenz mittels PCR. Die PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert. Durch Vergleich der Sequenzen mit den OS9-Isoformen konnte ich zeigen, dass es sich bei den in U2OS-Zellen exprimierten Formen zum einen um die Isoform 1 mit der gesamten Länge des OS9, bestehend aus 667 Aminosäuren handelt und zum anderen um Isoform 2 bestehend aus 612 Aminosäuren mit einem Verlust von Exon 13. Isoform 3 mit einer Länge von 597 Aminosäuren und einem Verlust von Exon 13 sowie dem hinteren Anteil von Exon 11 und auch Isoform 4 aus 652 Aminosäuren mit einem Verlust des hinteren Anteils von Exon 11 (Kimura et al., 1998; Wang et al., 2007; Bernasconi et al., 2008) waren nicht nachweisbar. Ein Zelltyp-spezifisches Spleißen liegt bei dem OS9-Gen somit vermutlich nicht vor, da in jeder der bisher untersuchten Zelllinie Isoform 1 und 2 existent sind. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Bernasconi et al. aus dem Jahre 2008, war das Signal für die Isoform 2 hierbei deutlich stärker.

Des Weiteren konnte ich nachweisen, dass Hypoxie keinen Effekt auf das Konzentrationsverhältnis zwischen den OS9-Spleißformen hat. Darüber hinaus zeigte sich, dass durch Überexpression von OS9-PK eine weitere Bande im Western Blot zu detektieren ist, bei der es sich um die Isoform 1 des OS9 handelt, die zusätzlich durch einen PK- und einen Hexahistidin-Abschnitt verlängert ist.

Nachdem nun der OS9-Aufbau sowie dessen Expression genauer erläutert wurden, stellt sich die Frage nach der Regulation des Lektins OS9. Um herauszufinden, ob OS9 einer sauerstoffabhängigen Regulation unterliegt, führte ich in zahlreichen Zelllinien Vergleiche des OS9-Signals unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen durch, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsbedingungen zeigte. Somit ist zu konstatieren, dass das OS9 nicht sauerstoffabhängig reguliert wird. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der von Baek et al. im Jahre 2005 gesehenen geringfügigen Induktion der OS9-mRNA in HEK 293-Zellen bei 1% Hypoxie. Diese Induktion ließ sich folglich auf Proteinebene nicht bestätigen. Die Frage nach der OS9-Regulation ist insofern wichtig, als dass der Sauerstoffgehalt der Umgebung eine große Rolle in der Regulation des HIF-

1α spielt und nicht nur die Funktion der PHD2 und PHD3 sauerstoffabhängig ist, sondern sie selbst auch als Zielgen von HIF einer Induktion unter hypoxischen Bedingungen unterliegen (Metzen et al., 2005). Die Vermutung, dass OS9 unter einer ähnlichen Regulation steht, konnte somit nicht bestätigt werden.

Eine pharmakologische Aktivierung von HIF durch Verwendung von DMOG führte ebenfalls nicht zu einer Induktion von OS9. Bei DMOG handelt es sich um einen kompetitiven Antagonisten von α-Ketoglutarat, einem essentiellen Co-Substrat der Prolylhydroxylasen, die somit inhibiert werden (Epstein et al., 2001). Eine Regulation von OS9 durch HIF-1α, Hypoxie, und DMOG konnte ich folglich ausschließen. Dieser Befund geht mit dem Ergebnis von Baek et al. aus dem Jahre 2005 konform, dass auch unter Behandlung mit DFO keine Induktion der OS9-mRNA zu verzeichnen war.

Um genauere Vorstellungen über die Regulation und Funktion von OS9 gewinnen zu können, ist es von Interesse sich mit dem Abbau dieses Proteins zu beschäftigen. Ein wichtiger Punkt ist dabei die Frage nach seiner biologischen Halbwertszeit. Um dies zu klären, setzte ich den Translationsinhibitor Cycloheximid ein, einen Hemmstoff der Proteinentstehung in Eukaryoten. Auf zellulärer Ebene blockiert es die Translation der mRNA in den zytosolischen 80S Ribosomen, jedoch nicht die Proteinsynthese in den Organellen. Ein Beispiel für ein Protein, dessen Entstehung durch die Verwendung von Cycloheximid zu unterbinden ist, ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Semenza und Wang, 1992; Lee und Lee, 2008). Nach Verwendung von Cycloheximid verfolgte ich den Abfall der OS9-Konzentration mittels Western Blotting über mehrere Stunden. Dabei stellte ich eine deutliche Abnahme der Signalintensität des OS9 bereits nach vier Stunden fest, die für einen relativ hohen Proteinumsatz spricht. Das Vergleichsprotein α-Tubulin zeigte ein deutlich konstanteres Signal. OS9 stellt also ein potentiell schnell regulierbares Protein dar. Interessant ist die Erkenntnis des hohen Umsatzes zudem, da sie bestätigt, dass eine Behandlungsdauer mit den verschiedenen Chemikalien und siRNA über einen Zeitraum von vier bis 24 Stunden angemessen gewählt wurde, um einen Effekt auf das OS9 zu erzielen.

Um neben der Abbaugeschwindigkeit auch den Abbauweg von OS9 zu bestimmen, blockierte ich verschiedene Proteasen. Durch die Verwendung von MG132, einem Inhibitor des 26S-Proteasoms konnte ich zeigen, dass OS9 nicht über den proteasomalen Degradationsweg abgebaut wird. Die Behandlung der Zellen mit MG132 zeigte keinen Effekt auf die Signalintensität von OS9. Als Positivkontrolle wurde HIF-1α untersucht, von dem bekannt ist, dass es durch Inhibition des Proteasoms induziert wird.

Eine weitere Möglichkeit Erkenntnisse über den Abbauweg des OS9 zu gewinnen, bietet der Eingriff in das Calpain-System. Dabei handelt es sich um einen Komplex aus drei Molekülen: zwei calciumabhängigen nicht-lysosomalen Cystein-Proteasen, mu-Calpain und m-Calpain, sowie einem dritten Polypeptid, dem Calpastatin, dessen Funktion in der Hemmung der beiden Calpaine besteht (Goll et al., 2003). Die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen endogenen Protease-Inhibitor Calpastatin zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die OS9-Signalstärke. Als Positivkontrolle diente erneut HIF-1α, das zum Teil auch über dieses alternative System abgebaut wird (Zhou et al., 2006; Herr et al., 2007), bei dem erwartungsgemäß eine Induktion zu verzeichnen war. Somit lässt sich die Aussage treffen, dass OS9 weder proteasomal noch durch die Protease Calpain abgebaut wird. Eine zu geringe Konzentration der Inhibitoren sowie eine zu kurze Inkubationszeit als Ursache für das konstante OS9-Signal sind vor dem Hintergrund der gelungenen Positivkontrolle sowie des hohen OS9-Proteinumsatzes unwahrscheinlich. Da Zellen über mehrere Proteasesysteme verfügen, ist es durchaus möglich, dass die Frage nach dem genauen Abbauweg derzeit nicht geklärt werden kann.

Im Jahre 2005 wurde OS9 zum ersten Mal durch die Arbeitsgruppe von Baek et al. in Zusammenhang mit der Regulation von HIF-1α gebracht. Diese Befunde zeigen eine Interaktion zwischen OS9 und HIF-1α sowie mit PHD2 und PHD3 zunächst in einem Yeast-two-Hybrid-Versuch, der durch eine Co-Immunpräzipitation bestätigt wird. Baek et al. berichten, dass ein mit einem FLAG-Abschnitt markiertes HIF-1α bzw. durch DFO stabilisiertes HIF-1α durch OS9-PK sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie co-immunpräzipitiert werden kann. Außerdem kann eine Interaktion zwischen OS9-PK und endogenem PHD2 und PHD3 sowie auch mit FLAG-HIF-1α gezeigt werden. Die Interaktion findet sowohl mit der Isoform1 als auch mit Isoform 2 des humanen OS9 statt. Dabei sind im HIF-1α die Aminosäuren im Bereich von 653-826 für die Interaktion mit dem OS9 und die Aminosäuren 531-610 für die Interaktion mit der PHD2 verantwortlich. OS9 und PHD2 binden nach diesen Befunden an unterschiedlichen Stellen an HIF-1α (Baek et al., 2005).

Als Grundlage für weitere Untersuchungen führte ich eine Co-Immunpräzipitation durch. Hierbei konnte ich eine Interaktion zwischen PHD2 und OS9 zeigen. Dabei konnte überexprimiertes PHD2 durch OS9-PK unter Verwendung eines an Agarose gekoppelten PK-Antikörpers co-immunpräzipitiert werden. Diese Interaktion stimmt mit den publizierten Ergebnissen überein (Baek et al., 2005). Jedoch konnte ich weder eine Interaktion zwischen überexprimiertem PHD2 und endogenem OS9 noch eine Interaktion

zwischen durch DFO stabilisiertem HIF-1α und überexprimiertem OS9-PK nachweisen. Die von Baek et al. publizierten Interaktionen konnten in unserem Labor also nur für die Interaktion zwischen der überexprimierten PHD2 und OS9 bestätigt werden. Die Problematik der Interaktion zwischen OS9 und HIF-1α ist aus der Literatur bekannt. So gelang es Kim et al. im Jahre 2006 nicht, das mit einem FLAG-Abschnitt markierte OS9 durch HA-markiertes HIF-1α mittels Antikörper gegen den HA-Abschnitt zu präzipitieren. Es ist also möglich, dass tatsächlich keine Interaktion zwischen OS9 und HIF-1α besteht oder aber dass diese Interaktion zwar stattfindet, unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht gezeigt werden kann. Da die Interaktion der endogenen Proteine nicht eindeutig belegt werden konnte, wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt, um die funktionellen Konsequenzen der Beeinflussung der OS9-Expression auf die HIF-Regulation nachzuweisen. Die Arbeitsgruppe von Baek et al. berichtet im Jahre 2005, dass die Überexpression von OS9 eine starke Verminderung der HIF-1α-Konzentration zur Folge hat, die zu einer deutlichen Verminderung der HIF-Aktivität führt. Dies wird auf eine unterstützende Wirkung von OS9 auf die Funktion der PHD 2 und 3 zurückgeführt. OS9 soll dabei einen heterotrimeren Komplex durch simultane Bindung an HIF-1α mit der PHD2 bilden, der zu einer verbesserten Hydroxylierung führt und damit eine erhöhte Degradation von HIF-1α zur Folge hat. Außerdem soll die Interaktion zwischen der PHD2 und HIF-1α durch die OS9-Überexpression verstärkt werden (Baek et al., 2005).

Daher untersuchte ich die HIF-1α-Signale unter OS9-Überexpression sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen. Das Ergebnis zeigte, dass die OS9-Überexpression keinen Effekt auf die Expression von HIF-1α hat. Um die Funktion von OS9 weiter zu untersuchen, führte ich nach der Überexpression auch Experimente zur OS9-Suppression durch. Dies gestaltete sich jedoch schwierig, da eine zuverlässige Suppression von OS9 mittels siRNA nicht reproduzierbar zu erreichen war. Dieses Problem ist bereits aus den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe bekannt (Mueller et al., 2008). Eine reproduzierbare, inverse Korrelation zwischen OS9-Expression und HIF-1α, so wie sie von Baek et al. postuliert wurde, war nicht erkennbar.

Bislang wurde dargestellt, dass OS9 und PHD2 physisch miteinander interagieren, dass eine Interaktion zwischen OS9 und HIF hingegen nicht nachweisbar ist und dass eine Modifikation der OS9-Expression keinen reproduzierbaren Effekt auf die HIF-Regulation hat. Es stellt sich die Frage, wie diese Befunde in Einklang zu bringen sind. Ein Schlüssel zum Verständnis der Ergebnisse könnte in der Aufklärung der subzellulären Lokalisation des OS9 liegen. Diese ist Gegenstand aktueller Diskussionen in der Literatur.

Zur Untersuchung der Lokalisation führte ich Immunfluoreszenz-Experimente mit Detektion von OS9-PK durch. Die Ergebnisse meiner Experimente sind mit einer Lokalisation von OS9 im ER vereinbar. Dabei zeigte ich zunächst das überexprimierte OS9-PK, das ein dem ER sehr ähnliches perinukleäres Muster aufwies. Um die subzelluläre Lokalisation von OS9 genauer untersuchen zu können, transfizierte ich Zellen mit Lokalisationsvektoren, die zur Produktion von Ds-Red im Golgi-Apparat, in den Mitochondrien und im ER führen, wobei sich nur für den ER-Lokalisationsvektor eine Übereinstimmung mit dem OS9-PK-Signal zeigte. Dies spricht für eine OS9-Lokalisation im ER. Kritisch anzumerken ist, dass die Interpretation von Immunfluoreszenz-Untersuchungen insbesondere bei langen Expositionszeiten und Messungen in verschiedenen Farbkanälen erschwert sein kann. Eine Überstrahlung des eigentlich roten Lokalisations-Fluoreszenzproteins in den grünen OS9-Bereich ist somit nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen. Des Weiteren handelt es sich bei dem von mir detektierten OS9 meist um überexprimiertes Protein, aus dessen Überangebot eine veränderte Lokalisation resultieren könnte (Litovchick et al., 2002). Zum anderen kommt es durch das Einfügen eines PK-Abschnittes in das überexprimierte Protein möglicherweise zu einer Veränderung der Lokalisation. Da die Sequenz des PK-Abschnittes aber nur sehr kurz ist und außerdem an das 3´-Ende angefügt ist während die Lokalisationssequenz des OS9 am 5´-Ende liegt (Mueller et al., 2008), sollte dies keinen Einfluss haben.

Die von mir aufgezeigte Lokalisation von OS9 im ER stimmt zudem mit verschiedenen bereits publizierten Ergebnissen überein. Dabei kommen mehrere Arbeitsgruppen zu dem Schluss, dass OS9 im ER-Lumen lokalisiert ist (Bernasconi et al., 2008; Christianson et al., 2008; Mueller et al., 2008). Andere Arbeitsgruppen wiederum berichten von einer Assoziation des OS9 mit der zytosolischen Seite der ER-Membran (Litovchick et al., 2002; Wang et al., 2007; Jansen et al., 2009), während die Arbeitsgruppe von Baek et al. OS9 sowohl in Kernextrakten als auch in Zytoplasmaextrakten detektieren konnte (Baek et al., 2005).

Nach der Identifizierung der potentiellen nukleären Lokalisationssequenz in Exon 10 (Kimura et al., 1997), wurde das OS9 als ein den Chaperonen BiP und Calnexin ähnliches Protein beschrieben, das als peripheres Membranprotein mit der zytosolischen Seite der ER-Membran assoziiert ist und vermutlich eine nicht-kovalente Bindung mit einem integralen Membranprotein eingeht. Hierzu würde auch die Interaktion von OS9 mit dem zytoplasmatischen Ende des Proteins DC-STAMP passen (Jansen et al., 2009). Auf der anderen Seite steht die Aussage, dass das OS9 ein im Lumen des ER lokalisiertes Protein

darstellt. Dafür spricht, dass für alle drei Spleißvarianten eine N-terminale Signalsequenz vorhergesagt ist, sie zudem eine Mannose-Rezeptor-Domäne enthalten und N-glykosyliert sind, wie es typisch für ER-luminale Proteine ist. Das OS9 besitzt zwar nicht wie sein Homolog aus Hefen (YOS9) eine ER-Retentionssequenz, seine Retention könnte jedoch durch Assoziation mit permanent im ER lokalisierten Proteinen wie zum Beispiel EDEM 1 und 2, GRP94, BiP oder dem Multiproteinkomplex SEL1L ermöglicht werden (Christianson et al., 2008). OS9 weist weitere für im ER synthetisierte und lokalisierte Proteine typische Eigenschaften wie eine spaltbare aminoterminale Sequenz, eine Beteiligung an intramolekularen Disulfidbrücken sowie eine Ko-Lokalisation mit dem ER-Marker PDI auf. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass OS9 ein Protein des ER-Lumens und nicht der Membran ist (Bernasconi et al., 2008; Mueller et al., 2008).

Die genaue Lokalisation wie auch die eigentliche Funktion des OS9, die zum einen in der Funktion als Chaperon, zum anderen in einer möglichen Beteiligung an der ER-assoziierten Degradation (ERAD) durch die Erkennung fehlerhaft gefalteter Proteine gesehen wird, ist somit noch nicht vollständig geklärt.

Mit der von mir eingesetzten Methode konnte ich zeigen, dass meine Ergebnisse mit einer subzellulären Lokalisation von OS9 im ER vereinbar sind. Um zu klären, ob es sich dabei um das ER-Lumen oder die zytosolische Seite der ER-Membran handelt, wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe eine weitere Methode angewandt. Im Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zeigte sich eine Interaktion zwischen OS9 und dem ER-Protein GRP94, das permanent im Lumen des ER lokalisiert ist. Dieses Ergebnis spricht also deutlich für eine OS9-Lokalisation im Lumen des ER (Brockmeier et al., 2011).

Interessant ist die subzelluläre Lokalisation des OS9 auch in Hinblick auf seine Interaktion mit HIF-1α und PHD2. In einer Co-Immunpräzipitation konnte ich eine Interaktion zwischen PHD2 und OS9 aufzeigen. In weiterführenden Untersuchungen mittels FRET konnte diese Interaktion von unserer Arbeitsgruppe jedoch nicht bestätigt werden. PHD2 ist bekannt als vornehmlich im Zytoplasma aber auch im Zellkern lokalisiertes Protein (Metzen et al., 2003). Es besteht eine Art Importin-unabhängiger Shuttle-Mechanismus für PHD2, in dem das Exportin CRM1 und die N-terminalen 100 Aminosäuren des Proteins für dessen Kernexport verantwortlich sind (Steinhoff et al., 2009). In einer Immunfluoreszenz konnte ich die Lokalisation von OS9 und PHD2 gemeinsam darstellen, wobei sich keine Ko-Lokalisation der Proteine ergab. Eine Interaktion von OS9 und PHD2 scheint in vivo nicht möglich zu sein. Dies würde die diskrepanten Ergebnisse erklären. So kann es in vitro in der Co-Immunpräzipitation aufgrund der Zerstörung der

Zellkompartimente zu der gesehenen Interaktion der beiden Proteine kommen. Im FRET sind die Grenzen der subzellulären Kompartimente jedoch nicht aufgehoben. OS9 und PHD2 können somit nicht interagieren und das FRET-Ergebnis ist negativ. Eine Interaktion zwischen PHD2 und OS9 scheint also theoretisch möglich zu sein, durch deren unterschiedliche Lokalisation jedoch in vivo nicht stattzufinden. Gleiches gilt für das vordringlich im Zellkern, zu geringen Anteilen auch zytoplasmatisch lokalisierte HIF-1α. Eine Lokalisation von OS9 im ER schließt eine Interaktion zwischen OS9 und HIF-1α unter physiologischen Bedingungen aus.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass die Analyse der funktionellen Bedeutung bestimmter Proteininteraktionen komplex und methodisch sehr aufwändig sein kann. Die in der Literatur beschriebene Interaktion des Sauerstoffsensorproteins PHD2 mit OS9 erfolgt zwar wenn diese Proteine unphysiologischerweise miteinander in Kontakt kommen, allerdings ist es jedoch aufgrund der Präsenz der Proteine in unterschiedlichen Zellkompartimenten unwahrscheinlich, dass diese Interaktion in vivo von funktioneller Bedeutung ist.

5. Zusammenfassung

Die Sauerstoffhomöostase des menschlichen Organismus ist von entscheidender Bedeutung, wobei der Transkriptionskomplex HIF (Hypoxie-induzierbarer Faktor) in dieser Regulation die Schlüsselrolle einnimmt. Seine Zielgene, unter anderem Epo und VEGF, führen zu einer Anpassung des Organismus an hypoxische Bedingungen, was beispielsweise bei dem Wachstum von Tumoren oder Organinfarkten von Bedeutung ist. Der Transkriptionskomplex selbst unterliegt einer sauerstoffabhängigen Regulation, die über Prolylhydroxylasen gesteuert wird. Unter hypoxischen Bedingungen sind diese inaktiv, sodass es zu einem erhöhten HIF-Spiegel mit folglich vermehrter Transkription der HIF-Zielgene kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die HIF-Regulation verdeutlicht und neben den Prolylhydroxylasen ein weiteres Protein, das OS9, untersucht. Dabei handelt sich um ein zunächst in Zellen eines Osteosarkoms beschriebenes Lektin. Im Jahre 2005 wurde es erstmals mit HIF in Zusammenhang gebracht, indem es als Interaktionspartner von HIF-1α sowie der Prolylhydroxylase 2 und 3 beschrieben wurde, dem zudem ein unterstützender Effekt auf die PHD2 in Bezug auf die HIF-Regulation zugesprochen wurde.

Zunächst gelang eine Charakterisierung von OS9 mit Nachweis seiner Expression in verschiedenen Zelllinien, der Identifizierung seiner unterschiedlichen Spleißvarianten mittels PCR, Experimenten zu seinem Abbauweg sowie der Bestimmung seiner Umsetzungsgeschwindigkeit unter Verwendung von Cycloheximid. Ich konnte aufzeigen, dass OS9 selbst weder durch Hypoxie noch direkt durch HIF-1α reguliert wird.

In den von mir dargestellten Ergebnissen konnte durch Co-Immunpräzipitation aufgezeigt werden, dass überexprimiertes OS9 eine Interaktion mit überexprimiertem PHD2 eingeht. Jedoch konnte weder eine Interaktion zwischen endogenen Proteinen noch zwischen OS9 und HIF bestätigt werden. Zudem zeigte sich kein Einfluss des OS9 auf die HIF-Regulation. Um aufzuklären, warum sich eine Interaktion zwischen OS9 und PHD2 nachweisen lässt, sich auf der Ebene der Proteinregulation jedoch kein Effekt zeigt, führte ich Immunfluoreszenz-Untersuchungen zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation durch. Das Ergebnis zeigt eine OS9-Lokalisation im ER. In Zusammenschau bedeutet dies, dass OS9 zwar unter gewissen artifiziellen Versuchsbedingungen eine Interaktion mit der PHD2 eingeht, unter physiologischen Bedingungen jedoch weder eine Interaktion mit HIF-1α noch mit den Prolylhydroxylasen eingehen kann und somit auch keinen Einfluss auf deren Regulation hat.

6. Literaturverzeichnis

Alcock, F. and Swanton, E. (2009). Mammalian OS-9 is upregulated in response to endoplasmic reticulum stress and facilitates ubiquitination of misfolded glycoproteins. *J. Mol. Biol.* **385,** 1032-1042.

Baek, J. H., Mahon, P. C., Oh, J., Kelly, B., Krishnamachary, B., Pearson, M., Chan, D. A., Giaccia, A. J. and 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,** 503-512.

Berchner-Pfannschmidt, U., Petrat, F., Doege, K., Trinidad, B., Freitag, P., Metzen, E., de Groot, H. and Fandrey, J. (2004). Chelation of cellular calcium modulates hypoxia-inducible gene expression through activation of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* **279,** 44976-44986.

Bernasconi, R., Pertel, T., Luban, J. and Molinari, M. (2008). A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: Inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal. *J. Biol. Chem.* **283,** 16446-16454.

Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D. and 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,** 4082-4090.

Berra, E., Richard, D. E., Gothié, E. and Pouyssegur, J. (2001). HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1α degradation. *FEBS letters* **491,** 85-90.

Bhamidipati, A., Denic, V., Quan, E. M. and Weissman, J. S. (2005). Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen. *Mol. Cell* **19,** 741-751.

Brockmeier, U., Platzek, C., Schneider, K., Patak, P., Bernardini, A., Fandrey, J. and Metzen, E. (2011). The function of hypoxia-inducible factor (HIF) is independent of the endoplasmic reticulum protein OS-9. *PLoS ONE* **6,** e19151.

Bruegge, K., Jelkmann, W., Metzen, E. (2007). Hydroxylation of Hypoxia-Inducible Transcription Factors and Chemical Compounds Targeting the HIF-α Hydroylases. *Curr Med Chem.* **14,** 1853-62.

Callapina, M., Zhou, J., Schnitzer, S., Metzen, E., Lohr, C., Deitmer, J. W. and Brune, B. (2005). Nitric oxide reverses desferrioxamine- and hypoxia-evoked HIF-1alpha accumulation--implications for prolyl hydroxylase activity and iron. *Exp Cell Res.* **306,** 274-84.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neemann, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P. et al. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature* **394,** 485-90.

Christianson, J. C., Shaler, T. A., Tyler, R. E. and Kopito, R. R. (2008). OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat. Cell Biol.* **10,** 272-282.

D´Angelo, G., Duplan, E., Boyer, N., Vigne, P. and Frelin, C. (2003). Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity - a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J. Biol. Chem.* **278,** 38183-38187.

Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S. G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzen, E., Hartmann, E. and Köhler, M. (2008). Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1783,** 394-404.

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. et al. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107,** 43-54.

Friedmann, E., Salzberg, Y., Weinberger, A., Shaltiel, S. and 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,** 35274-35281.

Ginouves, A., Ilc, K., Macias, N., Pouyssegur, J. and Berra, E. (2008). PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 4745-4750.

Goldberg, M. A., Gaut, C. C. and Bunn, H. F. (1991). Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranslational events. *Blood* **77,** 271-7.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.* **83,** 731-801.

Herr, B., Zhou, J., Dröse, S. and Brune, B. (2007). The interaction of superoxide with nitric oxide destabilizes hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cell Mol. Life Sci.* **64,** 3295-305.

Hirsila, M., Koivunen, P., Günzler, V., Kivirikko, K. I. and Myllyharju, J. (2003). Characterization of the human prolyl 4 hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* **278,** 30772-30780.

Hosokawa, N., Kamiya, Y., Kamiya, D., Kato, K. and Nagata, K. (2009). Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *J. Biol. Chem.* **284,** 17061-17068.

Huang, J., Zhao, Q., McMooney, S. M. and Lee, F. S. (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J. Biol. Chem.* **277,** 39792-39800.

Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1α is mediated by an O_2-dependant degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 7987-7992.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. and Kaelin, W. G.,Jr. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O_2 sensing. *Science* **292,** 464-8.

Jaakkola, P., Mole, D., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J. et al. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von hippel-lindau ubiquitylation complex by O_2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292,** 468-72.

Jansen, B. J., Eleveld-Trancikova, D., Sanecka, A., van Hout-Kujier, M., Hendriks, I., Looman, M., Leusen, J. and Adema, G. (2009). OS9 interacts with DC-STAMP and modulates its intracellular localization in response to TLR ligation. *Molecular Immunology* **46,** 505-515.

Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R. and Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem* **271,** 17771-8.

Jiang, B. H., Zheng, J., Leung, S. W., Roe, R. and Semenza, G. L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α. *J. Biol. Chem.* **272,** 19253-19260.

Kaelin, W. G.,Jr. (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* **2,** 673-82.

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

Kimura, Y., Nakazawa, M., Tsuchiya, N., Asakawa, S., Shimizu, N. and Yamada, M. (1997). Genomic organization of the OS-9 gene amplified in human sarcomas. *J. Biochem.* **122,** 1190-1195.

Kimura, Y., Nakazawa, M. and Yamada, M. (1998). Cloning and characterization of three isoforms of OS-9 cDNA and expression of the OS-9 gene in various human tumor cell lines. *J. Biochem.* **123,** 876-882.

Knippers, R. (1997). Molekulare Genetik. 7. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York.

Koivunen, P., Hirsila, M., Gunzler, V., Kivirikko, K. I. and Myllyharju, J. (2004). Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **279,** 9899-9904.

Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L. and Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* **16,** 1466-1471.

Laugsch, M., Metzen, E., Svensson, T., Depping, R. and Jelkmann, W. (2008). Lack of functional erythropoietin receptors of cancer cell lines. *Cancer Cell Biology* **122,** 1005-1011.

Lederkremer, G. Z. (2009). Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19,** 515-523.

Lee, D. H. and Lee, Y. J. (2008). Quercetin suppresses hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) through inhibiting protein synthesis. *J. Cell Biochem.* **105,** 546-53.

Linden, T., Katschinski, D. M., Eckhardt, K., Scheid, A., Pagel, H. and Wenger, R. H. (2003). The antimycotic ciclopirox olamine induces HIF-1alpha stability, VEGF expression, and angiogenesis. *FASEB J.* **17,** 761-763.

Litovchick, L., Friedmann, E. and Shaltiel, S. (2002). A selective interaction between OS-9 and the carboxyl-terminal tail of meprin beta. *J. Biol. Chem.* **277,** 34413-34423.

Marxsen, J. H., Stengel, P., Doege, K., Heikkinen, P., Jokiletho, T., Wagner, T., Jelkmann, W., Jaakkola, P. and Metzen, E. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *J. Biochem.* **381,** 761-767.

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. and Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399,** 271-275.

Mazure, N. M., Brahimi-Horn, M. C., Berta, M. A., Benizri, E., Bilton, R. L., Dayan, F., Ginouves, A., Berra, E. and Pouyssegur, J. (2004). HIF-1: Master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochemical Pharmacology* **68,** 971-980.

Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W. Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W. et al. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: Implications for oxygen sensing. *J. Cell. Sci.* **116,** 1319-1326.

Metzen, E., Stiehl, D. P., Doege, K., Marxsen, J. H., Hellwig-Burgel, T. and Jelkmann, W. (2005). Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: Identification of a functional hypoxia-responsive element. *J. Biochem.* **387,** 711-717.

Mueller, B., Klemm, E. J., Spooner, E., Claessen, J. H. and Ploegh, H. L. (2008). SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 12325-12330.

Nakayama, K., Frew, I. J., Hagensen, M., Skals, M., Habelhah, H., Bhoumik, A., Kadoya, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Frappell, P. B. et al. (2004). Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* **117,** 941-952.

Nakayama, T., Yaoi, T., Kuwajima, G., Yoshie, O. and Sakata, T. (1999). Ca^{2+}-dependent interaction of N-copine, a member of the two C2 domain protein family, with OS-9, the product of a gene frequently amplified in osteosarcoma. *FEBS letters* **453,** 77-80.

Pugh, C. W., O´Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M. and Ratcliffe, P. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit. *J. Biol. Chem.* **272,** 11205-11214.

Salceda, S. and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1α protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. *J. Biol. Chem.* **272,** 22642-22647.

Schuster, S. J., Badiavas, E. V., Costa-Giomi, P., Weinmann, R., Erslev, A. J. and Caro, J. (1989). Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood* **73,** 13-6.

Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O_2 homeostasis. *Current opinion in genetics & development* **8,** 588-594.

Semenza, G. L. (2000). Surviving ischemia: Adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of clinical investigation* **106,** 809-812.

Semenza, G. L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13,** 167-171.

Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3,** 721-32.

Semenza, G. L., Agani, F., Feldser, D., Iyer, N., Kotch, L., Laughner, E. and Yu, A. (2000). Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **475,** 123-30.

Semenza, G. L. and 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 requiered for transcriptional activation. *The Journal of Clinical Investigation* **12,** 5447-5454.

Steinhoff, A., Pientka, F. K., Möckel, S., Kettelhake, A., Hartmann, E., Köhler, M. and Depping, R. (2009). Cellular oxygen sensing: Importins and exportins are mediators of intracellular localisation of prolyl-4-hydroxylases PHD1 and PHD2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387,** 705-711.

Su, Y. A., Hutter, C. M., Trent, J. M. and Meltzer, P. S. (1996). Complete sequence analysis of a gene (OS-9) ubiquitously expressed in human tissues and amplified in sarcomas. *Mol. Carcinog.* **15,** 270-275.

Tamura, T., Cormier, J. H. and Hebert, D. N. (2008). Sweet bays of ERAD. *Trends Biochem. Sci.* **33,** 298-300.

Vourvouhaki, E., Carvalho, C. and Aguiar, P. (2007). Model for osteosarcoma-9 as a potent factor in cell survival and resistance to apoptosis. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin Soft Matter Phys.* **76,** 011926.

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

Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **270,** 1230-1237.

Wang, Y., Fu, X., Gaiser, S., Kottgen, M., Kramer-Zucker, A., Walz, G. and Wegierski, T. (2007). OS-9 regulates the transit and polyubiquitination of TRPV4 in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **282,** 36561-36570.

Wenger, R. H. (2000). Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regualtion. *The Journal of Experimental Biology* **203,** 1253-1263.

Wenger, R. H., Stiehl, D. P. and Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. STKE* **2005,** re12.

Wiener, C. M., Booth, G. and Semenza, G. L. (1996). In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 485-8.

Willam, C., Masson, N., Tian, Y. M., Mahmood, S. A., Wilson, M. I., Bicknell, R., Eckardt, K. U., Maxwell, P., Ratcliffe, P. and Pugh, C. W. (2002). Peptide blockade of HIFalpha degradation modulates cellular metabolism and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 10423-8.

Zhou, J., Köhl, R., Herr, B., Frank, R. and Brüne, B. (2006). Calpain mediates a von hippel-lindau protein-independent destruction of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol. Biol. Cell* **17,** 1549-58.

Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A. R., Ryan, H. E., Johnson, R. S., Jefferson, A. B. et al. (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene exprseeion. *Genes Dev.* **14,** 391-6.

7. Danksagung

Ich danke insbesondere Herrn Professor Dr. med. Eric Metzen für die Überlassung des interessanten Themas und die uneingeschränkte Unterstützung bei inhaltlichen und organisatorischen Fragestellungen. Außerdem danke ich ihm für die Möglichkeit der Veröffentlichung der Ergebnisse und die Hilfe bei der Organisation meines Forschungsaufenthaltes in Nizza.

Herrn Professor Dr. W. Jelkmann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die stets freundliche Beratung und die Unterstützung meiner Vorhaben.

Mein besonderer Dank gilt Tanja Svensson und Bettina Stier, die durch ihre vollste Unterstützung maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, dies sowohl durch die Hilfe bei experimentellen Fragestellungen als auch durch stete moralische Unterstützung.

Ich danke Kathrin Brügge und Magdalena Laugsch für die Einführung in die Laborarbeit sowie allen weiteren hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern des Instituts für Physiologie der Universität zu Lübeck für die gute Zusammenarbeit und Beantwortung von Fragen.

Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie, die mich stets in meinen Plänen bestärkt haben und immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Corinna Platzek
Geburtsdatum	26. November 1982
Geburtsort	Soltau

Ausbildung

Seit Oktober 2009	Assistenzärztin im Klinikum Bad Bramstedt Rheumatologie

Studium

April 2009	Ärztliche Prüfung Abschluss des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck
Herbst 2007	Forschungsaufenthalt am Centre Antoine-Lacassagne, Nizza Arbeitsgruppe Prof. J. Pouysségur
Februar 2007	Erhalt des Promotionsstipendiums „Exzellenzmedizin“
Sommer 2006	Promotionssemester
Februar 2006	Beginn der Dissertation
August 2004	Ärztliche Vorprüfung
Oktober 2002	Beginn des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck

Schulausbildung

1995 – 2002	Gymnasialzweig, Kooperative Gesamtschule Schneverdingen
1993 – 1995	Orientierungsstufe, Kooperative Gesamtschule Schneverdingen
1989 – 1993	Grundschule Schneverdingen

Veröffentlichung

Brockmeier, U., Platzek, C., Schneider, K., Patak, P., Bernardini, A., Fandrey, J. and Metzen, E. (2011). The function of hypoxia-inducible factor (HIF) is independent of the endoplasmic reticulum protein OS-9. *PLoS ONE* **6,** e19151.