

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

**Bedeutung der subzellulären
Lokalisation der
Prolyl-4-Hydroxylasen für die
molekulare Sauerstoffsensorik**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Naturwissenschaften –



vorgelegt von
Friederike Katharina Pientka
aus Frechen

Lübeck 2012

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann
2. Berichterstatter : Prof. Dr. Stefan Anemüller

Tag der mündlichen Prüfung : 27. August 2012
Prüfungsvorsitzender : Prof. Dr. Thomas Peters

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31. August 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Bedeutung des Sauerstoffs	1
1.1.1	Sauerstoffversorgung der Gewebe und Zellen	1
1.1.2	Normoxie und Hypoxie	2
1.2	Regulation der Sauerstoffhomöostase durch HIF	3
1.2.1	Struktureller Aufbau und Expression von HIF	3
1.2.2	Regulation und Stabilisierung von HIF-1 α	4
1.2.3	HIF-1-abhängige Zielgene	6
1.3	Regulation von HIF-1 α durch die PHD	8
1.3.1	Expression und Struktur der PHD	8
1.4	Zelluläres Sauerstoffsensing in der Tumorbiologie	11
1.4.1	Abhängigkeit der Tumorentwicklung von der Sauerstoffversorgung	11
1.4.2	Einfluss der PHD-Expression auf die Tumorprogression	12
1.4.3	Analyse der Strahlenresponsivität von Tumorzellen	12
1.5	Grundlagen des subzellulären Proteintransports	13
1.5.1	Proteintransport durch die Kernmembran	13
1.5.2	Nukleäre Transport-Rezeptoren	14
1.5.3	Importin α/β -vermittelter Kernimport	16
1.5.4	CRM1-vermittelter Kernexport	17
1.5.5	Kernlokalisierungs- und Kernexportsignale	17
1.5.6	Regulation des subzellulären Transports durch Phosphorylierungen	20
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	21
2	Material	23
2.1	Hersteller	23
2.2	Geräte	24
2.3	Chemikalien	26
2.4	Gebrauchsmaterialien	28
2.5	Oligonukleotide	29

2.6	Plasmide	32
2.7	Zelllinien	34
2.8	Zellkulturmedien	34
2.9	Bakterienstämme	34
2.10	Bakterienkulturmedien	35
2.11	Kits	36
2.12	Antikörper	36
2.13	Transfektionsreagenzien	37
2.14	Enzyme und Größenmarker	37
2.15	Puffer und Lösungen	37
2.16	Computerprogramme	42
3	Methoden	43
3.1	Zellbiologische Arbeiten	43
3.1.1	Kultivierung von Säugerzellen	43
3.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen	44
3.1.3	Zellaufschluss und Probenvorbereitung	44
3.1.4	Transfektion von Säugerzellen	44
3.1.5	Behandlung von Säugerzellen	46
3.1.6	Reportergen-Assay	47
3.1.7	Lokalisierungsstudien mit EGFP-markierten Fusions- proteinen	48
3.1.8	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	48
3.1.9	Förster-Resonanzenergietransfer	49
3.1.10	Bestrahlung von Zellen mit Röntgenbremsstrahlung	50
3.1.11	Bestimmung der klonogenen Wachstumsfraktion nach Bestrahlung	50
3.2	Mikrobiologische Methoden	51
3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	51
3.2.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	51
3.2.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	52
3.2.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	52
3.3	Molekularbiologische Methoden	53
3.3.1	Alkoholpräzipitation von Nukleinsäuren	53
3.3.2	Bestimmung der Konzentration von DNA in Lösung	53
3.3.3	Isolation von RNA aus Zellkulturen	53
3.3.4	Reverse Transkription von RNA	53
3.3.5	Polymerase-Kettenreaktion	54
3.3.6	Quantitative <i>real-time</i> PCR	55

3.3.7	Sequenzgerichtete Mutagenese	56
3.3.8	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	57
3.3.9	Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten	58
3.3.10	DNA-Sequenzierung	59
3.4	Proteinbiochemische Methoden	59
3.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford	59
3.4.2	Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese	60
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
3.4.4	Coomassie-Färbung	60
3.4.5	Western-Blot-Analyse	61
3.4.6	Überexpression von GST- und His-Fusionsproteinen	62
3.4.7	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	63
3.4.8	Aufreinigung von His-Fusionsproteinen	64
3.4.9	Aufreinigung von His-Fusionsproteinen aus Einschlusskörperchen	64
3.4.10	Radioaktive Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]	65
3.4.11	Importin α/β -GST-Bindungsstudien	66
3.4.12	Autoradiographie	67
3.5	Statistische Auswertung	67
4	Ergebnisse	69
4.1	Charakterisierung des PHD3-Kernimports	69
4.1.1	Vorarbeiten	69
4.1.2	Spezifische Bindung der PHD3 an α -Importine	69
4.1.3	Eingrenzung eines nicht-klassischen NLS in PHD3	78
4.2	Regulation des subzellulären PHD2-Transports	84
4.2.1	Vorarbeiten	84
4.2.2	PHD2-Kernimport über Huckepack-Mechanismus	84
4.2.3	Identifikation eines nicht-klassischen Kernlokalisierungssignals in PHD2	87
4.2.4	Kernimport-Aktivität des PHD2-NLS-Motives	91
4.2.5	Eingrenzung eines nicht-klassischen NES-Motives in PHD2	93
4.2.6	Effekt der EGFP-Markierung auf die subzelluläre PHD2-Lokalisierung	95
4.3	Regulation durch posttranslationale Modifikationen	97
4.3.1	Subzelluläre PHD-Lokalisierung nach Inhibierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden	97

4.3.2	Intrazellulärer PHD2-Transport nach Mutation vorher- gesagter Phosphorylierungsstellen	101
4.4	Einfluss der Kompartimentierung auf die Sauerstoffsensitivität	103
4.4.1	Kompartimentspezifische Interaktion zwischen HIF-1 α und PHD2	103
4.4.2	Einfluss der PHD2-Lokalisierung auf die transkriptionelle HIF-Aktivität	106
4.4.3	Einfluss der PHD2-Lokalisierung auf die Expression HIF-1 α -abhängiger Zielgene	107
4.4.4	Einfluss der PHD2-Lokalisierung auf die HIF-1 α - Proteinexpression	108
4.5	PHD2-Expression und Strahlenresponsivität	111
4.5.1	Inhibierung der Strahlenresistenz durch PHD2 <i>knockdown</i>	111
4.5.2	Einfluss der subzellulären PHD2-Lokalisierung auf die Strahlensensibilität	113
5	Diskussion	115
5.1	Geregelter subzellulärer Transport der PHD2 und PHD3	115
5.2	Nukleus-spezifische HIF-1 α -Hydroxylierung durch PHD2	123
5.3	Steigerung der Strahlenresistenz durch PHD2-Expression	128
5.4	Ausblick	130
6	Zusammenfassung	133
	Literaturverzeichnis	135
A	Anhang	157
A.1	Abkürzungsverzeichnis	157
A.2	Abbildungsverzeichnis	163
A.3	Tabellenverzeichnis	165
A.4	Aminosäuresequenzen	166
A.4.1	PHD2	166
A.4.2	PHD3	166
A.4.3	LIMD1	166
A.5	Gefahrstoffe	167

Einleitung und Zielsetzung

1.1 Biologische Bedeutung des Sauerstoffs

1.1.1 Sauerstoffversorgung der Gewebe und Zellen

Ohne Sauerstoff (O_2) ist ein Überleben für höhere Organismen nicht möglich. Ein Erwachsener konsumiert etwa 250 ml Sauerstoff in der Minute bzw. 360 Liter Sauerstoff täglich [166]. Als Grundlage des aeroben Stoffwechsels ist Sauerstoff zu einem Anteil von 20,9 % in der eingeatmeten Luft enthalten. Für die Erhaltung ihrer Struktur und Erfüllung ihrer spezifischen Funktion benötigen Zellen Adenosintriphosphat (ATP), das in und an der inneren Mitochondrienmembran durch die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) generiert wird. Dabei dient molekularer Sauerstoff unter Bildung von Wasser als terminaler Elektronenakzeptor [174]. Die Evolution mehrzelliger Organismen setzte die Entwicklung eines kardiovaskulären und respiratorischen Systems voraus, um die Zellen des Körpers mit der jeweils notwendigen Menge an Sauerstoff zu versorgen. Neben der Anpassung der Versorgung mit Blutgefäßen spielt dabei die Effizienz des Sauerstofftransports an die Orte des Sauerstoffverbrauchs eine große Rolle. Während nur 1 % des Sauerstoffs im Blutplasma physikalisch gelöst sind, liegen 99 % innerhalb der Erythrozyten an Hämoglobin (Hb) gebunden vor [164]. Der Austausch von Sauerstoff zwischen dem Blut und den Körperzellen in den Geweben oder dem alveolären Gasraum in den Lungen findet durch Diffusion entlang des Sauerstoffpartialdruck (pO_2)-Gradienten statt. Das Modell des Krogh-Zylinders beschreibt den Abfall des pO_2 entlang der Kapillare sowie senkrecht dazu mit der Entfernung von der Kapillare, wodurch Zellen am venösen Ende am schlechtesten mit Sauerstoff versorgt werden [164]. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen ist abhängig von ihrer Aktivität und kann innerhalb eines Organs regional variieren. Zusätzlich wird der Sauerstoffverbrauch durch Temperatur, Hormone sowie zelluläre Modulatoren, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), beeinflusst [164]. Neben dem im Blutplasma gelösten Sauerstoff besitzt die Mehrzahl der Gewebe keine weiteren Sauerstoffspeicher, sodass Einschränkungen in der Sauerstoffverfügbarkeit direkt zu

einer Inhibierung des oxidativen Zellstoffwechsels führen. An der Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase sind eine Vielzahl an Proteinen beteiligt, die für die Regulation der zellulären Entwicklung, Physiologie und Pathophysiologie eine Rolle spielen.

1.1.2 Normoxie und Hypoxie

Der normoxische, arterielle pO_2 liegt auf Meereshöhe bei 70-96 mmHg, während der venöse pO_2 unter diesen Bedingungen 40 mmHg beträgt. Die ungenügende Sauerstoffversorgung eines Gewebes, bedingt durch eine Erniedrigung des Sauerstoffangebotes oder einen erhöhten O_2 -Bedarf, wird als Hypoxie ($pO_2 < \text{normal}$) oder Anoxie ($pO_2=0$ mmHg) bezeichnet [199]. Die kritische Sauerstoffversorgungsgrenze, die den Übergang von normoxischen zu hypoxischen Bedingungen markiert, ist zellspezifisch und liegt bei 10-20 mmHg, wobei die mitochondriale Aktivität erst bei einem pO_2 unter 0,5 mmHg eingeschränkt ist [159, 199]. Hypoxische Bedingungen stellen für den Organismus eine extreme Belastung dar und können Organschäden verursachen. Die verschiedenen Gewebhypoxietypen, denen unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen, sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Einteilung der Gewebhypoxien (nach [173]).

Hypoxietyp	Beschreibung	Ursachen
Hypoxische Hypoxie	Niedriger arterieller pO_2	Verminderte pulmonale Diffusionskapazität Alveoläre Hypoventilation Höhenaufenthalt
Anämische Hypoxie	Verminderte Menge O_2 an Hb gebunden	Anämie Blutverlust Kohlenmonoxid-Vergiftung
Ischämische Hypoxie	Reduzierter Blutfluss	Herzinsuffizienz Schock Thrombose
Histotoxische Hypoxie	Vergiftete O_2 -Verwertung	Cyanid und andere Stoffwechselgifte
Hypoxie durch Diffusionswegverlängerung	Gewebsvermehrung mit inadäquater Kapillargefäßbildung	Tumorwachstum

Unter chronisch oder latent hypoxischen Bedingungen werden das kardiovaskuläre und das respiratorische System durch die Regulation der transkriptionellen Aktivität an die verminderten Sauerstoffbedingungen angepasst. Physiologische Anpassungen zum Erhalt der Sauerstoffhomöostase erfolgen auf zellulärem, lokalem und systemischem Niveau. Diese Adaptation impliziert die Erhöhung der Transportfähigkeit der Erythrozyten für Sauerstoff, die Umstellung des Metabolismus von aerober zu anaerober Glykolyse und die Neovaskularisierung durch die Expression angiogener Faktoren (als Übersichtsartikel [94]). Die Schlüsselfunktion in dieser sauerstoffabhängigen Genexpression übernehmen die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) [197].

1.2 Regulation der Sauerstoffhomöostase durch HIF

1.2.1 Struktureller Aufbau und Expression von HIF

Die heterodimeren Transkriptionsfaktoren HIF bestehen aus einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit, die auch als *aryl receptor nuclear translocator* (ARNT, ~ 80 kDa) bezeichnet wird, und einer sauerstofflabilen α -Untereinheit (~ 120 kDa). Es konnten drei verschiedene HIF- α -Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) identifiziert werden, die starke Homologien aufweisen. HIF-1 trägt als Hauptregulator zur Hypoxie-abhängigen Genregulation bei. Die Struktur der HIF- α -Untereinheiten ist in Abbildung 1.1 dargestellt. HIF gehören zur Superfamilie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) PAS-Proteine, welche nach den primär identifizierten Proteinen Per, ARNT und Sim benannt ist [195]. Das N-terminal lokalisierte bHLH-Motiv enthält den basischen Sequenzbereich, der zur Bindung der Hypoxie-responsiven Elemente (HRE) der Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Zielgene beiträgt, und die HLH-Dimerisierungsdomäne. Die angrenzende PAS-Domäne wird in die konservierten repetitiven Regionen PAS A und PAS B unterteilt und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen. Zusammen mit dem HLH-Motiv sorgt die PAS-Domäne für die Heterodimerisierung der α - und β -Untereinheiten [75]. HIF- α enthält zusätzlich eine sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne (ODDD), die für die negative Regulation des Proteins von Bedeutung ist. Die ODDD enthält zwei PEST-ähnliche Motive, deren Sequenz reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) ist [89, 160]. HIF-1 α und HIF-2 α besitzen eine N- und C-terminale Transaktivierungsdomäne (NTAD, CTAD), über die eine Rekrutierung der Transkriptions-Coaktivatoren CBP/p300, SRC-1 und TIF-2 erfolgt [3, 21]. HIF-1 β besitzt lediglich eine Transaktivierungsdomäne.

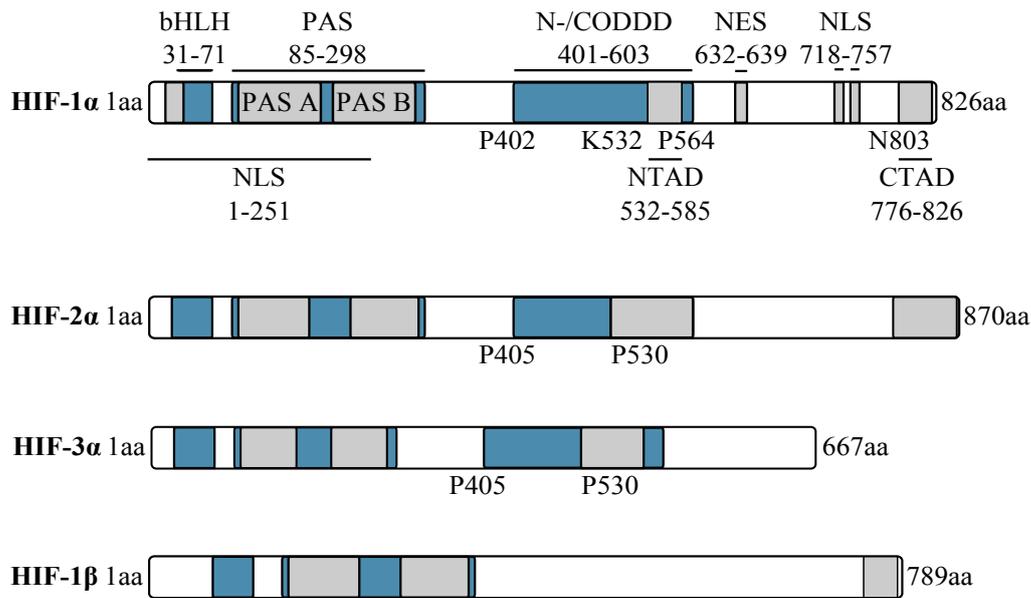


Abbildung 1.1: Struktureller Aufbau der HIF-Untereinheiten. HIF- α und HIF- β gehören zur basischen bHLH- und PAS-Proteinfamilie. Durch die ODDD wird die sauerstoffabhängige Stabilität von HIF- α reguliert. HIF-1 α und HIF-2 α besitzen zwei Transaktivierungsdomänen (NTAD und CTAD), während HIF-1 β nur eine TAD besitzt. In der Aminosäuresequenz von HIF-1 α konnten ein N-terminales sowie ein C-terminales Kernlokalisierungssignal (NLS) und ein Kernexportsignal (NES) identifiziert werden. Auch HIF-1 β enthält ein N-terminales NLS-Sequenzmotiv. Die Aminosäurenlänge jeder Untereinheit ist neben der Domänenstruktur aufgeführt [22, 35, 94, 121, 142].

1.2.2 Regulation und Stabilisierung von HIF-1 α

HIF-1 α wird konstitutiv transkribiert und synthetisiert. Jedoch kann HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen aufgrund seiner geringen Halbwertszeit ($t_{1/2} < 5$ min) nicht detektiert werden [195]. Die transkriptionelle Aktivität, die Proteininstabilisierung, Protein-Protein-Interaktionen und die intrazelluläre Expression von HIF-1 werden durch posttranslationelle Modifikationen, wie Hydroxylierung, Acetylierung und Phosphorylierung, reguliert [41, 80, 81, 156]. Spezifische Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD) hydroxylieren HIF-1 α an zwei Prolinresten innerhalb eines konservierten Motives in der ODDD (P402, P564) [195]. Diese Hydroxylierung erhöht die Affinität von HIF-1 α für das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL). Zusammen mit Elongin B und C, Cullin 2 und dem RING-Box-Protein 1 (RBX1) bildet pVHL einen funktionellen E3-Ligase-Komplex. Dieser vermittelt gemeinsam mit den E1-Ubiquitinaktivierenden und den E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen die HIF-1 α -Degradierung durch das 26S-Proteasom [92]. Bis heute konnten drei HIF-spezifische Prolyl-4-Hydroxylasen nachgewiesen werden, auf deren Expression und Bedeutung im nächsten Abschnitt detailliert eingegangen wird. Die Bindung von pVHL an HIF-1 α und

seine proteasomale Degradierung werden durch die Acetylierung eines Lysinrestes in der ODDD (K532) durch die Acetyltransferase *arrest defective protein 1 homologue* (ARD1) stabilisiert [81]. Die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α wird durch eine zusätzliche Hydroxylierung reguliert. In Normoxie hydroxyliert der HIF-inhibierende Faktor (FIH1), eine Asparaginy-Hydroxylase, einen Asparaginrest in der CTAD (N803) von HIF-1 α , wodurch die Interaktion mit den Koaktivatoren CBP/p300 inhibiert wird.

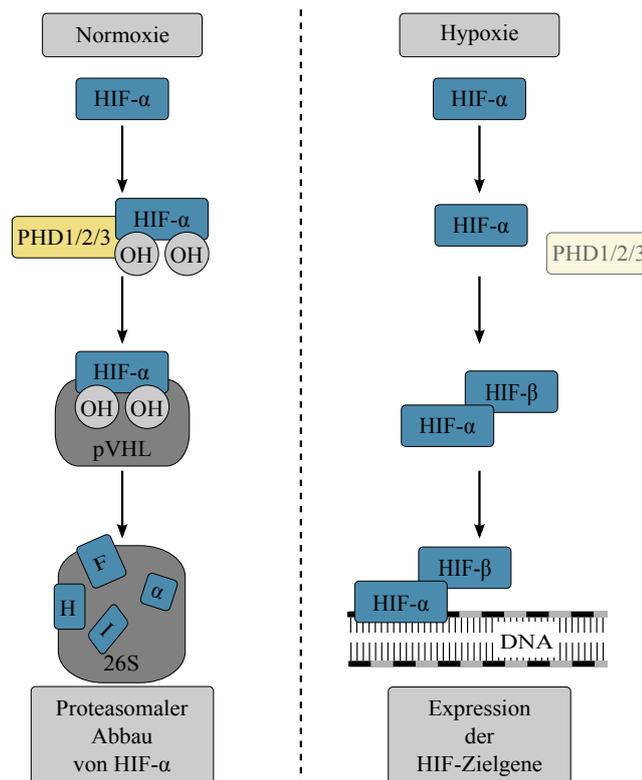


Abbildung 1.2: Sauerstoffabhängige Regulation von HIF- α . Unter normoxischen Bedingungen wird die HIF- α -Untereinheit durch die PHD an spezifischen Prolinresten hydroxyliert. Für ihre enzymatische Aktivität benötigen die PHD Fe²⁺, α -KG, Ascorbat und molekularen Sauerstoff. Hydroxylierte HIF- α -Untereinheiten werden vom pVHL erkannt und für den proteasomalen Abbau durch das 26S-Proteasom markiert. Unter Hypoxie wird die Hydroxylierung durch die PHD aufgrund des Sauerstoffmangels verhindert, wodurch HIF- α stabilisiert wird. Im Zellkern heterodimerisieren die HIF-Untereinheiten und aktivieren die Expression HIF-abhängiger Zielgene (modifiziert nach [94]).

Eine bedeutende Rolle für die Regulation der Stabilität, der transkriptionellen Aktivität und der intrazellulären Lokalisierung von HIF-1 α spielen phosphorylierungsabhängige Signaltransduktionskaskaden. Es konnte gezeigt werden, dass der Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)-Signalweg die transkriptionelle HIF-1-Aktivität durch direkte Phosphorylierung aktiviert [156]. Die Phosphorylierung der HIF-1 α -Serinreste S641 und S643 durch die p42/44 MAPK führt zu nukleärer Ak-

kumulation und erhöhter transkriptioneller Aktivität von HIF-1 α , indem sie den Kernexport des Proteins inhibiert [142]. Die Regulation der transkriptionellen Aktivität und Proteinsynthese von HIF-1 α durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT)-Signalkaskade wird durch verschiedene AKT-Zielproteine vermittelt [36]. Kürzlich wurde zudem die Bedeutung der Casein-Kinase 1 δ (CK1 δ)-abhängigen Phosphorylierung von HIF-1 α für den HIF-1-Signalweg aufgeklärt. Durch die CK1-abhängige Modifikation des HIF-1 α -Serinrestes S247 wird die Assoziation der beiden HIF-1-Untereinheiten vermindert, wodurch die Aktivität von HIF-1 kontrolliert wird [90].

Des Weiteren kann HIF-1 α durch S-Nitrosylierung posttranslational modifiziert werden. Neben der Inhibierung der PHD durch NO [133] konnten weitere Mechanismen gezeigt werden, die PHD-unabhängig zur Regulation von HIF-1 α durch S-Nitrosylierung beitragen [114, 182]. Die Sumoylierung von HIF-1 α führt zelltypabhängig zur Aktivierung oder Inhibierung der HIF-1 α -Aktivität [36]. HIF-1 α wird zudem sauerstoffunabhängig reguliert, wobei Cytokine, Wachstumsfaktoren, Umwelteinflüsse und andere Signalmoleküle eine Rolle spielen [94].

Unter hypoxischen Bedingungen sind die Hydroxylasen PHD und FIH1 in ihrer enzymatischen Aktivität inhibiert, da molekularer Sauerstoff als essentieller Cofaktor nicht länger zur Verfügung steht. Die pVHL Bindung wird inhibiert, wodurch die HIF- α -Untereinheit stabilisiert wird. Stabilisiertes HIF-1 α transloziert, vermittelt durch die N- und C-terminal lokalisierten Kernlokalisierungssignale (NLS) (Abbildung 1.1) [22, 35], in den Zellkern, heterodimerisiert mit HIF-1 β und aktiviert die Expression der HIF-1-abhängigen Zielgene.

1.2.3 HIF-1-abhängige Zielgene

Durch die Untersuchung der transkriptionellen Erythropoietin (EPO)-Expression konnte durch Semenza und Wang der Transkriptionsfaktor HIF-1 identifiziert und charakterisiert werden [196]. Die HIF-1-DNA-Bindung in nicht-EPO-exprimierenden Zellen implizierte eine generelle Rolle von HIF-1 in der Hypoxie-abhängigen Signaltransduktion. HIF-1 aktiviert die Expression der HIF-abhängigen Zielgene über die Bindung an die HRE der DNA. Diese zeichnen sich durch die Konsensussequenz (A/G)CGTG aus und sind in den regulierenden Regionen der HIF-abhängigen Zielgene lokalisiert [201]. Bis heute wurden hunderte HIF-1 regulierte Gene beschrieben, von denen mehr als 90 Gene durch die Identifikation einer HRE als direkte HIF-1-Zielgene verifiziert werden konnten (als Übersichtsartikel [167, 165]). Die HIF-1-Zielgene tragen zu der zellulären und systemischen Anpassung an veränderte Sauerstoffbedingungen bei. Durch HIF-abhängige Zielgene werden kurzfristige hypoxische Reaktionen, wie die Erythropoese und die Glykolyse, kontrolliert. Auch

langfristige zelluläre Anpassungen, wie die Angiogenese und die zelluläre Differenzierung, werden durch HIF-abhängige Zielgene reguliert. Eine Auswahl an HIF-1-abhängigen Zielgenen ist in Tabelle 1.2 aufgeführt.

Tabelle 1.2: Auswahl an HIF-1-Zielgenen (nach [201]).

Funktion	Zielgen	Referenz
Sauerstoffversorgung		
Erythropoese	Erythropoietin (EPO)	[196]
Eisentransport	Transferrin (TF)	[161]
Angiogenese	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)	[51]
Gefäßkontraktion	Endothelin 1 (ET1)	[74]
Zellmetabolismus		
Laktattransport	Monocarboxylattransporter (MCT4)	[189]
Glykolyse	Aldolase A und C (ALD A, C)	[169]
Glykolyse	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	[63]
Glykolyse	Hexokinase 1,2 (HK1,2)	[125]
Glykolyse	Pyruvatkinase M (PKM)	[170]
Glukoseaufnahme	Glukosetransporter 1 und 3 (GLUT1, 3)	[23]
Zellwachstum		
Trophoblastentwicklung	Transformierender Wachstumsfaktor- β 3 (TGF- β 3)	[163]
Wachstumsfaktor	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 2 (IGF 2)	[45]
Telomerase	Telomerase reverse Transkriptase (TERT)	[145]
p53-Inhibierung	Nucleophosmin (NPM)	[115]
Zellüberleben		
Apoptose	BCL-2 Bindeprotein (NIP3)	[19]
Matrixmetabolismus		
Matrixdegradierung	Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP2)	[7]
Kollagensynthese	Prolyl-4-Hydroxylase α (4-PH α)	[183]
Sauerstoffsensing		
HIF- α -Hydroxylierung	Prolyl-4-Hydroxylasen 2 und 3 (PHD2, 3)	[134, 152]

Durch HIF-1 α regulierte Gene spielen eine essentielle Rolle für die Embryonalentwicklung und die Pathophysiologie von Krankheiten. Die Inaktivierung von HIF-1 α in *knockout* Mäusen führt zu Störungen in der Entwicklung des vaskulären Systems und zu embryonaler Lethalität [78, 162]. HIF-1 α wirkt bei verringertem pO₂ für das Gewebe protektiv. Eine Induktion HIF-1 α -abhängiger Zielgene konnte bei zahlreichen pathologischen Situationen, wie kardialer Hypertrophie, ischämischen Erkrankungen, Wundheilung sowie Wachstum und Metastasierung von Tumoren, beschrieben werden [39, 71, 112].

1.3 Regulation von HIF- α durch die PHD

1.3.1 Expression und Struktur der PHD

Die Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 zeichnen sich durch ihre gemeinsame Fähigkeit aus, die Stabilität von HIF- α zu regulieren [41, 80]. Sequenzanalysen führten zur Identifikation einer weiteren PHD-Isoform, PHD4, deren Funktion in der Regulation von HIF-1 jedoch nicht endgültig geklärt werden konnte [148]. PHD1 besteht aus 407 Aminosäuren, PHD2 aus 426 Aminosäuren und PHD3 aus 239 Aminosäuren. Sie zeigen eine 42-59 %ige Homologie [185]. Die PHD gehören zur Proteinfamilie der Dioxygenasen und hydroxylieren HIF-1 α an zwei spezifischen Prolinresten, P402 (N-terminale ODDD, NODDD) und P564 (C-terminale ODDD, CODDD). Die enzymatische Aktivität der PHD ist abhängig von den Kofaktoren α -Ketoglutarat (α -KG), zweiwertiges Eisen (Fe²⁺) und Ascorbinsäure. Als Kosubstrat benötigen sie für ihre Reaktion molekularen Sauerstoff, von dem ein Atom in das hydroxylierte Produkt und ein Atom in das Succinat-Koprodukt inkorporiert wird. Die konservierte Aminosäureerkennungssequenz der Substrate der PHD wurde als LXXLAP beschrieben [77, 80]. Dieses Sequenzmotiv liegt in den HIF- α -Untereinheiten evolutionär konserviert vor, wodurch die wichtige Bedeutung für die Bindung der PHD und pVHL unterstützt wird [77, 80].

Es konnte gezeigt werden, dass PHD1 und PHD2 *in vitro* und *in vivo* sowohl die NODDD als auch die CODDD von HIF-1 α hydroxylieren [101, 194]. Im Gegensatz dazu hydroxyliert PHD3 ausschließlich die CODDD [101, 194]. Alle drei PHD sind in der Lage, HIF-1 α *in vitro* zu hydroxylieren. Trotzdem übernimmt PHD2 die Funktion des HIF-1 α -Schlüsselregulators in normoxischen Zellen *in vitro* und wird daher unter normoxischen Bedingungen als kritischer Sauerstoffsensoren für die Aufrechterhaltung der niedrigen HIF-1 α -Expression *in vivo* diskutiert [2, 10]. Durch die Inaktivierung von PHD2 mithilfe von Ribonukleinsäure (RNA)-Interferenz konnte HIF-1 α in normoxischen Zellen stabilisiert werden [10]. Zudem ist die Expression von PHD2 in den meisten normoxischen Zellen höher als die der anderen PHD [2].

Verkürzte PHD2-Konstrukte konnten als Homotrimere mit intermolekularen Kontakten zwischen der C-terminalen α -Helix und dem aktiven Zentrum einer benachbarten Untereinheit kristallisiert werden [126]. Sie weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen Fe²⁺- und α -KG-abhängigen Dioxygenasen auf. Im N-terminalen Bereich von PHD1 und PHD2 befindet sich eine *Myeloid translocation protein 8/Nervy/Deaf-1* (MYND)-Zink-Finger-Proteindomäne. Die Deletion der PHD2-MYND-Zink-Finger-Domäne in *in vitro* und *in vivo* Experimenten führte zur Steigerung der PHD2-Aktivität. Diese Beobachtungen implizieren, dass die MYND-Zink-Finger-Domäne inhibitorisch auf die katalytische PHD2-Aktivität wirkt [25]. Die fingerähnliche Schleife zwischen den β -Strängen 2 und 3 (β 2/ β 3-Schleife) der PHD beinhaltet unkonservierte Sequenzmotive. Durch Mutationsanalysen wurde verdeutlicht, dass die β 2/ β 3-Schleife in PHD2 an der Substratbindung beteiligt ist und die Spezifität der PHD für die CODDD im Vergleich zur NODDD vermittelt [47, 194]. Das katalytische Zentrum der PHD2 befindet sich innerhalb der C-terminal lokalisierten Fe²⁺- und α -KG-Dioxygenasedomäne. Dort befindet sich in oktaedrischer Geometrie ein Fe²⁺-Ion. Die Bindung der Fe²⁺-Ionen wird durch die Aminosäuren H313, N315 und H374 koordiniert. Diese kritischen Aminosäuren repräsentieren ein Sequenzmotiv, das in den PHD-Isoformen zahlreicher Organismen (prokaryotische Pathogene bis *Homo sapiens*) konserviert vorliegt [41, 126].

Die drei PHD-Isoformen weisen Unterschiede in ihrer gewebe- und kompartimentspezifischen Expression auf. Unter normoxischen Bedingungen wird die Boten-RNA (mRNA) aller drei PHD-Isoformen in den untersuchten Geweben exprimiert, wobei PHD3 eine vergleichsweise verminderte Expression zeigt [148]. PHD2 kann vorrangig im Fettgewebe nachgewiesen werden. PHD3 zeigt das höchste Expressionsniveau im Herzen. Die mRNA der PHD1 zeigt eine eindeutige Präsenz im Hoden, während PHD2 und PHD3 hier kaum detektierbar sind [148, 117]. Auf Proteinebene konnte jedoch gezeigt werden, dass PHD2 die am weitesten verbreitete PHD-Isoform ist [2] (als Übersichtsartikel [48]). Die intrazelluläre Lokalisierung der PHD konnte durch die Expression fluoreszenzmarkierter PHD-Konstrukte charakterisiert werden. PHD1 kann im Zellkern detektiert werden, während PHD2 vorwiegend im Cytoplasma nachgewiesen werden kann und PHD3 in beiden Kompartimenten lokalisiert ist [133]. Durch spezifische Inhibierung des Kernexports konnte zudem gezeigt werden, dass PHD2 auch in den Zellkern importiert wird und nicht ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert ist [176]. Für PHD1 konnte kürzlich der Mechanismus des nukleären Imports aufgeklärt werden. PHD1 besitzt ein NLS-Sequenzmotiv, über das die Bindung an Kernimport-Rezeptoren ermöglicht wird [176].

Durch die Inhibierung der PHD kann HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen stabilisiert werden. Kobalt und Nickel wurden als Induktoren der Erythrozytose beschrieben und aktivieren HIF-1 in Normoxie [62]. Für diesen, auch für Kupfer zu

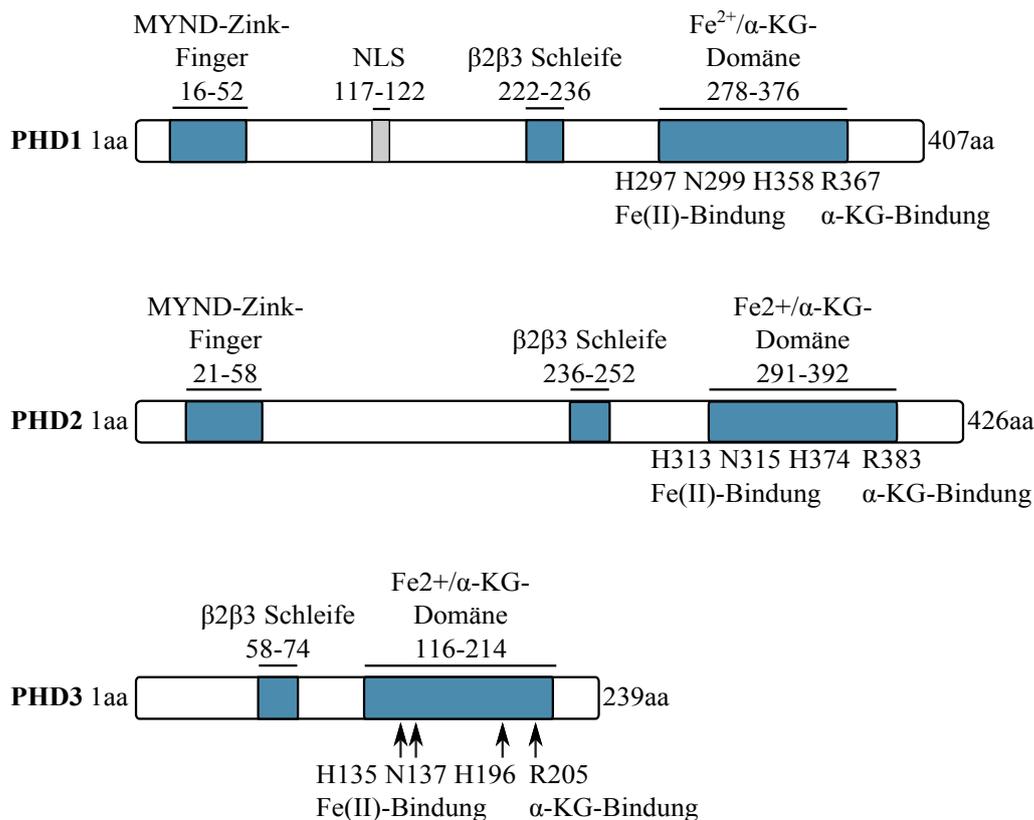


Abbildung 1.3: Domänenstruktur der drei PHD-Isoformen. PHD1, PHD2 und PHD3 gehören zur Proteinfamilie der Dioxygenasen und besitzen C-terminal eine inhibitorische Fe^{2+} - und $\alpha\text{-KG}$ -Dioxygenasedomäne. PHD1 und PHD2 besitzen eine N-terminale selbstinhibitorische MYND-Zink-Finger-Proteindomäne. Zur Substratselektion dient eine $\beta 2/\beta 3$ -Schleife, die in allen drei PHD identifiziert wurde. In der Aminosäuresequenz von PHD1 konnte ein NLS identifiziert werden, das den nukleären Import des Proteins ermöglicht. Die Aminosäurenlänge jeder Isoform ist neben der Domänenstruktur aufgeführt [126, 176, 194].

beobachtenden Effekt, wurden verschiedene HIF- α -Stabilisierungsmechanismen diskutiert. Zweiwertige Ionen können das Fe^{2+} im aktiven Zentrum der PHD substituieren und dadurch die katalytische Aktivität der PHD partiell inhibieren [124]. Zudem könnten Kobalt, Nickel und andere Metallionen zur Reduktion der intrazellulären Vorräte der Ascorbinsäure führen oder direkt an HIF- α binden und dadurch die Bindung des pVHL und die proteasomale Degradierung verhindern [69]. Der Kofaktor Fe^{2+} ist für die Hydroxylase-Aktivität der PHD essentiell, sodass auch Eisenchelatoren wie Desferrioxamin (DFO) oder Ciclopirox (CPX) die PHD hemmen und HIF-1 α in Normoxie stabilisieren. Die PHD können auch durch $\alpha\text{-KG}$ -imitierende Substanzen inhibiert werden. Das bekannteste Beispiel für ein $\alpha\text{-KG}$ -Analogon ist Dimethyloxalylglycin (DMOG), ein zellgängiger Diester [6]. Die Identifikation neuer $\alpha\text{-KG}$ -Analoge, die zur Aktivierung HIF-1-abhängiger Zielgene durch die Inhibie-

zung der PHD beitragen, ist für pharmazeutische Unternehmen unter anderem zur Behandlung von Anämien, ischämischen Krankheiten oder zur Neuroprotektion von großem Interesse. Verschiedene Substanzen konnten in den letzten Jahren entwickelt werden, von denen einige derzeit in klinischen Studien untersucht werden (als Übersichtsartikel [131]).

1.4 Rolle des zellulären Sauerstoffsensings in der Tumorbiologie

1.4.1 Abhängigkeit der Tumorentwicklung von der Sauerstoffversorgung

Die Ausbildung hypoxischer Geweberegionen ist ein charakteristisches Merkmal solider Tumore. In 50-60 % der soliden Tumore treten hypoxische Regionen auf und sind heterogen im gesamten Tumor verteilt. Durch experimentelle Studien konnte nachgewiesen werden, dass intratumorale Hypoxie mit der Metastasierung und der malignen Progression eines Tumors sowie der höheren Resistenz gegen konventionelle Therapien assoziiert ist [18, 70, 146]. Folglich wird Hypoxie in Tumorgewebe als Marker für schlechte Prognosen und verminderte Überlebenschancen des Patienten angesehen [150]. Die Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung wachsender Tumore (Durchmesser $> 1 \text{ mm}^3$) ist die pathophysiologische Konsequenz aus (i) der strukturell und funktionell gestörten Mikrozirkulation in Tumorgefäßen, (ii) der Überschreitung der Sauerstoffdiffusionsgrenze aufgrund einer Entfernung von $> 70 \mu\text{m}$ zu den Gefäßen oder (iii) Tumor-assoziierten Anämien (als Übersichtsartikel [193, 192]). Hypoxie hat in normalen Zellen den Zelltod zur Folge. Im Gegensatz dazu führt die verringerte Sauerstoffversorgung in Tumorzellen zu einem erhöhten Selektionsdruck für einen aggressiveren Phänotyp, da Signalwege, die für das Überleben der Tumorzellen essentiell sind, aktiviert werden. Für die Regulation dieser Signalwege nimmt der Transkriptionsfaktor HIF eine Schlüsselfunktion ein, da er die sauerstoffabhängige Genexpression aktiviert. In jedem kritischen Aspekt der Tumorbiologie spielt die Expression der HIF-1-abhängigen Zielgene eine wichtige Rolle, zu denen Angiogenese, Zellüberleben, Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie, genetische Instabilität, Immortalisation, Glukose- und Energiemetabolismus und Proliferation gehören (als Übersichtsartikel [168]). Ähnlich wie die Ausbildung hypoxischer Geweberegionen ist die Überexpression von HIF-1 α als Marker für die Tumorprogression charakterisiert und trägt positiv zum Tumorwachstum bei [11].

1.4.2 Einfluss der PHD-Expression auf die Tumorprogression

Aufgrund ihrer Funktion als Inhibitoren der HIF- α -Stabilität, wurden die PHD-Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3 zunächst als Tumorsuppressoren in einigen Tumorzellen diskutiert [16, 66, 179, 180]. Jedoch konnte durch verschiedene Studien gezeigt werden, dass die Rolle der PHD-Expression in Tumorzellen zelltypabhängig ist und eine Funktion als Tumorsuppressor nicht allgemein nachgewiesen werden kann (als Übersichtsartikel [84]). In normalen Zellen fungieren die PHD als Aktivatoren oder Inhibitoren der Zellproliferation und spielen zudem eine wichtige Rolle in der Regulation der Zelldifferenzierung [54, 57, 136]. Die drei PHD-Isoformen erfüllen dabei unterschiedliche Funktionen, die zusätzlich vom Zelltyp und den Expressionsbedingungen abhängen. Immunhistochemische Analysen haben ergeben, dass die Expression der PHD in humanen Tumorzellen erhöht ist und eine Zelltyp-spezifische Variabilität aufweist. Eine erhöhte Expression der drei PHD-Isoformen konnte mit der Aggressivität von Kopf-Hals-Karzinomen und pankreatischen endokrinen Tumoren assoziiert werden [31, 85]. Im Gegensatz dazu ist die Expression von PHD1, PHD2 und PHD3 in Bronchialkarzinomen, in Nierenzellkarzinomen und in follikulären Lymphomen leicht vermindert. Neben der allgemeinen Expression der drei PHD-Isoformen in verschiedenen Tumoren, ist die intrazelluläre Lokalisierung der PHD in den Fokus verschiedener Untersuchungen gerückt. In pankreatischen endokrinen Tumoren weist die erhöhte nukleäre PHD2-Expression auf besonders aggressive pankreatische endokrine Tumore hin, während die erhöhte nukleäre Translokation von PHD1 und PHD3 mit schlechteren Überlebenschancen der Patienten korreliert [31]. Dementsprechend konnte in Mammakarzinomen, Kopf-Hals-Karzinomen und Adenokarzinomen eine erhöhte PHD2-Expression in Verbindung mit einer nukleären Translokation des Proteins beschrieben werden, die mit einer verminderten Zelldifferenzierung und einer starken Proliferation der Tumorzellen assoziiert wird [83, 85]. Zudem wird das verankerungsunabhängige Wachstum von Adenokarzinomzellen durch Überexpression einer cytoplasmatisch-lokalisierten PHD2-Mutante inhibiert [83]. In der Zusammenschau spielt die Expression der drei PHD-Isoformen eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung, wobei dieser Effekt von vielen Faktoren, wie z. B. dem Zelltyp, abhängig ist. Bisher konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass der Einfluss der PHD-Expression auf die Tumorentwicklung mit der HIF-Hydroxylase-Aktivität der PHD verbunden ist.

1.4.3 Analyse der Strahlenresponsivität von Tumorzellen

Die Bedeutung des HIF-Signalweges für die Strahlensensitivität von Tumorzellen wurde in verschiedenen Studien beschrieben. Daher stellt die spezifische pharmako-

logische Modifikation einzelner Komponenten des HIF-Signalweges eine therapeutische Maßnahme in der Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen dar (als Übersichtsartikel [138]). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte HIF-1 α -Expression in Patienten mit Ösophaguskarzinom mit einer verminderten Sensibilität gegenüber Chemoradiotherapie korreliert [149]. Zudem führt der *knockdown* von HIF-1 α in verschiedenen Zellkulturmodellen zu einer erhöhten Strahlensensitivität unter hypoxischen sowie unter normoxischen Bedingungen [178]. Des Weiteren wurde in Kopf-Hals-Karzinomen von 48 Patienten die Assoziation der PHD2-Expression und Translokation in den Zellkern mit der Resistenz gegen radiotherapeutische Maßnahmen untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine geringe nukleäre PHD2-Expression im Primärtumor mit einer erhöhten Strahlenresponsivität einhergeht. Der Effekt einer PHD2-Inhibierung auf die Strahlenresponsivität von Kopf-Hals-Karzinomzellen sowie der kompartimentspezifischen PHD2-Expression wurde bisher jedoch nicht untersucht und sollte in einem *in vitro* Modell im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden.

1.5 Grundlagen des subzellulären Proteintransports

1.5.1 Proteintransport durch die Kernmembran

Eukaryotische Zellen besitzen mit Zellkern und Cytoplasma zwei Kompartimente, durch die Translation und Transkription physikalisch voneinander separiert sind. An den cytoplasmatischen Ribosomen werden die Proteine translatiert. Zahlreiche Proteine erfüllen jedoch wichtige Funktionen im Zellkern, zu denen die DNA-Replikation und -Reparatur, die Transkription und die RNA-Prozessierung gehören. Diese müssen aktiv in den Zellkern transportiert werden. Im Gegensatz dazu müssen verschiedene Proteine, die beispielsweise in die Signaltransduktion oder die Zellzykluskontrolle involviert sind, aus dem Zellkern ins Cytoplasma exportiert werden. Diese räumliche Trennung des genetischen Materials und der transkriptionellen Maschinerie von der translationalen und metabolischen Maschinerie machte die Evolution gerichteter Transportmechanismen notwendig [59]. Zudem ermöglichte die Kompartimentierung die Entwicklung komplexer regulatorischer Mechanismen, die bei der Genexpression, der Signaltransduktion sowie anderen zellulären Prozessen eine große Rolle spielen.

Das Innere des Zellkerns wird durch die Kernmembran vom Cytoplasma abgegrenzt. In die Lipid-Doppelschicht der Kernmembran sind in Zellen der Vertebraten etwa 2000-4000 Kernporen eingebettet, die sich aus etwa 30 Proteinen, den Nukleoporinen, zusammensetzen, und den Kernporen-Komplex ausbilden [32, 44]. Der Kernporen-Komplex ermöglicht den bidirektionalen Molekül-Austausch zwi-

schen Zellkern und Cytoplasma und trägt zudem zur Chromatin-Organisation und zur Genregulation in Differenzierung und Signaltransduktion bei. Mutationen in verschiedenen Nukleoporinen wurden mit Entwicklungsdefekten und Dysfunktionen assoziiert, die häufig auf spezifische Signalwege oder Zelltypen beschränkt sind [20].

Der Kernporen-Komplex der Vertebraten besitzt eine absolute Molekülmasse von 120 MDa und ist damit eines der größten zellulären Makromoleküle. Er weist eine achtfache rotationssymmetrische Struktur auf. Der ringförmige Zentralkörper ist in die Kernmembran eingebettet und Ausgangspunkt der nukleären (NF) und cytoplasmatischen (CF) filamentartigen Nukleoporin-Strukturen. Die nukleären Filamente formen im Zellkern durch ringartige Verknüpfung eine korbartige Struktur. Ionen, kleine Moleküle und Proteine mit einer absoluten Molekülmasse bis ~ 40 kDa diffundieren passiv entlang des Konzentrationsgradienten durch den Kernporen-Komplex (als Übersichtsartikel [119]). Um den Kernporen-Komplex zu passieren, müssen größere Proteine, RNA, RNP und andere Makromoleküle mithilfe von Transport-Rezeptoren aktiv importiert oder exportiert werden (Abbildung 1.4). Viele Nukleoporine besitzen hydrophobe Phenylalanin-Glycin-reiche (FG)-Motive, die eine gelartige Struktur ausbilden. Durch Bindung der FG-Motive durch die Transport-Rezeptoren wird der selektiv-gerichtete Transport zugelassen [55], wobei auch direkte spezifische Interaktionen zwischen Proteinen und Nukleoporinen das Passieren der Kernpore ermöglichen können [42]. Zusammen ergeben die FG-Motive der Nukleoporine eine dynamische funktionelle Einheit, die den Transportprozess durch den Kernporen-Komplex reguliert [34].

1.5.2 Nukleäre Transport-Rezeptoren

Der aktive geregelte nukleocytoplasmatische Proteintransport durch den Kernporen-Komplex wird durch Transport-Rezeptoren vermittelt, die zur evolutionär konservierten Familie der Karyopherine gehören. Neben ihrer Funktion als Transport-Rezeptoren werden Karyopherine auch als globale Regulatoren zellulärer Prozesse diskutiert. Zu den vielfältigen Aufgaben der Karyopherine gehören der mikrotubuläre Transport, der Aufbau der mitotischen Spindel und des Kernporen-Komplexes, immunologische Abwehrreaktionen sowie die neuronale Signalweiterleitung [27, 65]. Viele Karyopherine gehören zur Familie der Importin β -ähnlichen Proteine, von der bisher 19 humane Mitglieder identifiziert werden konnten [27]. Sie weisen absolute Molekülmassen von 90-150 kDa auf und setzen sich strukturell aus Wiederholungen helikaler HEAT-Domänen zusammen [27]. HEAT-Domänen bilden eine Struktur aus zwei beweglichen Bögen und wurden zuerst in den vier Proteinen Huntingtin, Elongationsfaktor 3, Untereinheit A der Protein-Phosphatase 2A und TOR1 iden-

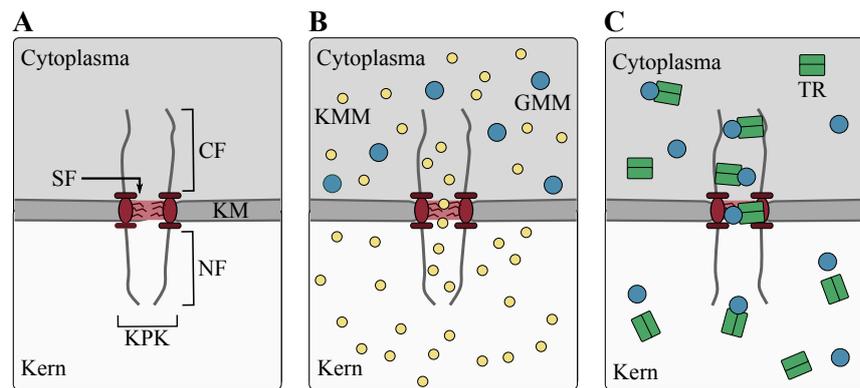


Abbildung 1.4: Translokation durch den Kernporen-Komplex. (A) Der Kernporen-Komplex (KPK) besteht aus Nukleoporinen und ist in die Kernmembran (KM) eingebettet. Vom Hauptkörper des KPK gehen CF- und NF-Filamente ab. Die selektive Translokation von Molekülen wird erreicht durch FG-Motive und den Selektivitätsfilter (SF), der sich aus ungefalteten hydrophilen Peptidketten zusammensetzt. (B) Ionen, kleine Moleküle und Proteine (KMM) mit einer absoluten Molekülmasse bis zu ~ 40 kDa diffundieren passiv durch den Kernporen-Komplex. (C) Die Translokation größerer Proteine, RNA, RNP und anderer Makromoleküle (GMM) wird durch Transport-Rezeptoren (TR) vermittelt, die an die Nukleoporine des Kernporen-Komplexes binden (modifiziert nach [154]).

tifiziert. In der zentralen Region der HEAT-Domäne kann RanGuanosintriphosphat (GTP) gebunden werden. HEAT-Domänen werden zudem häufig in Proteinen beschrieben, die am Zusammenbau von großen Multiproteinkomplexen beteiligt sind [1]. Die meisten Mitglieder der Proteinfamilie der Importin β -ähnlichen Proteine katalysieren unidirektional den Import (Importine) oder Export (Exportine) von Proteinen. Im Gegensatz dazu kann Importin 13 als Importin und als Exportin fungieren [137]. Für zehn Mitglieder der Importin β -ähnlichen Proteinfamilie konnte bisher nachgewiesen werden, dass sie Proteine in den Zellkern transportieren [140]. Die meisten Importin β -ähnlichen Proteine vermitteln die Translokation verschiedener Kargoproteine, wobei Substrate häufig auch durch unterschiedliche Homologe der Importin β -ähnlichen Proteinfamilie intrazellulär transportiert werden [27, 100]. Die Bindung der Kargoproteine erfolgt in Abhängigkeit von spezifischen Signalsequenzen, die als Kernlokalisierungssignal (NLS) und Kernexportsignal (NES) bezeichnet werden.

Die bidirektionale Translokation von Proteinen durch den Kernporen-Komplex wird durch die GTPase Ran kontrolliert, die die Interaktionen zwischen den Importin β -ähnlichen Proteinen und den Substraten reguliert [60]. Im Zellkern ist die Konzentration an RanGTP 100-fach höher als im Cytoplasma. Der Ran-Effektor Guaninnukleotid-Austauschfaktor *regulator of chromatin condensation 1* (RCC1) liegt Chromatin-gebunden im Zellkern vor und katalysiert dort durch Nukleotidaus-

tausch den Übergang von RanGuanosindiphosphat (GDP) zu RanGTP [14, 144]. Im Cytoplasma ist das GTPase-aktivierende Protein RanGAP lokalisiert, das mithilfe der Ran-Bindeproteine die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP katalysiert [13]. Die Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgradienten von nukleärem RanGTP und cytoplasmatischem RanGDP wird schließlich über den konstanten Kernimport von RanGDP über seinen spezifischen Import-Rezeptor NTF2 ermöglicht [155]. Die Import-Rezeptoren binden ihre Kargoproteine im Cytoplasma in Abwesenheit von RanGTP. Im Zellkern dissoziiert der Import-Komplex nach Bindung von RanGTP. Im Gegensatz dazu binden Export-Rezeptoren ihre Substrate und RanGTP simultan. Der Export-Komplex dissoziiert nach erfolgtem Export durch den Kernporen-Komplex im Cytoplasma durch die Aktivierung des Proteins RanGAP und der daraus resultierenden Hydrolyse des Ran-gebundenen GTP (als Übersichtsartikel [27, 59]).

1.5.3 Importin α/β -vermittelter Kernimport

In Abbildung 1.5 sind der klassische Importin α/β -abhängige Kernimport sowie der *chromosome region maintenance 1* (CRM1)-vermittelte Kernexport dargestellt. Der klassische Kernimport zeichnet sich dadurch aus, dass die Kargoproteine indirekt über die α -Importine (~ 60 kDa) transportiert werden. Die α -Importine sind am Kernimport beteiligte Adapter-Proteine, die nicht selbstständig mit den Nukleoporinen interagieren können. Bisher konnten sieben humane Importin α -Isoformen identifiziert werden ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$) [91, 98, 100, 186, 188]. Um den Kernimport zu vermitteln, bindet Importin α zusätzlich an Importin β (~ 90 kDa), da Importin β als eigentlicher Kerntransport-Rezeptor mit den Nukleoporinen interagiert und den Kernimport des ternären Proteinkomplexes ermöglicht [59]. Einige Proteine binden Importin β direkt und benötigen das Adapterprotein Importin α nicht [157]. Importin α besitzt eine N-terminale Importin β -Bindungsdomäne (IBB), die im Importin β -ungebundenen Zustand den NLS-Bindungsbereich von Importin α inhibiert. Daraus ergibt sich eine Autoinhibierung, die eine Bindung des Kargoproteins im NLS-Bindungsbereich von Importin α erst nach Heterodimerisierung mit Importin β an der IBB ermöglicht [96]. Die C-terminale Proteindomäne von Importin α besteht aus zehn hintereinander liegenden Armadillo (ARM)-Motiven, die für die Bindung des Kargoproteins über sein NLS verantwortlich sind [30]. Jedes ARM-Motiv setzt sich aus drei α -Helices zusammen, die von etwa 40 Aminosäuren kodiert werden. Insgesamt ergeben sich zwei NLS-Bindungsstellen in der Proteinstruktur von Importin α , wobei die N-terminale als größere und die C-terminale als kleinere NLS-Bindungsstelle bezeichnet wird [30].

1.5.4 CRM1-vermittelter Kernexport

Nach Translokation des ternären Proteinkomplexes, bestehend aus Importin α , Importin β und dem Kargoprotein, durch den Kernporen-Komplex führt die Bindung von RanGTP an Importin β im Zellkern zur Dissoziation. RanGTP-gebundenes Importin β kann den Zellkern im Folgenden durch den Kernporen-Komplex direkt verlassen, wobei RanGAP das Importin β -gebundene RanGTP hydrolysiert, sodass Importin β im Cytoplasma erneut für den Kernimport zur Verfügung steht [12, 79]. Im Gegensatz dazu ist der Kernexport von Importin α von dem RanGTP gebundenen Exportfaktor *cellular apoptosis susceptibility protein* (CAS) abhängig [106]. Zudem fördert die Bindung von CAS an Importin α die Freigabe des Kargoproteins im Anschluss an den nukleären Import [58]. Kargoproteine werden anhand verschiedener Export-Rezeptoren, die ebenfalls zur Proteinfamilie der Karyopherine gehören, aus dem Zellkern transportiert. Das am weitesten verbreitete Exportin (CRM1) transportiert das Kargoprotein in Abhängigkeit von gebundenem RanGTP durch den Kernporen-Komplex ins Cytoplasma [50]. CRM1 besteht aus 21 HEAT-Domänen, die in einer ringähnlichen Struktur angeordnet sind. Im Zellkern führt die Bindung von RanGTP an CRM1 zu globalen Konformationsänderungen, die eine höhere Affinität für die Bindung eines Kargoproteins bewirken. Die Interaktion zwischen Kargoprotein und CRM1 erfolgt über ein hydrophobes NES in der primären Aminosäuresequenz des Kargoproteins. CRM1 bindet das NES an seiner äußeren Oberfläche zwischen den α -Helices der HEAT-Domänen 11 und 12 [139, 38]. Im Cytoplasma sind neben RanGAP auch die Ran-Bindeproteine RanBP1 und RanBP2 an der Dissoziation des Proteinkomplexes aus CRM1, RanGTP und dem Kargoprotein beteiligt [9, 59]. Der nukleäre Export über CRM1 kann durch Behandlung mit dem antifungialen Antibiotikum Leptomycin B (LMB) spezifisch inhibiert werden. Ein einzelner CRM1-Cysteinrest (C528 in humanem CRM1) wird selektiv durch LMB alkyliert und führt zur Inaktivierung des Export-Rezeptors [104].

1.5.5 Kernlokalisierungs- und Kernexportsignale

Die intrazelluläre Lokalisierung von Proteinen wird durch spezifische Signalsequenzen determiniert. Der nukleäre Import von Proteinen ist von einem NLS abhängig, während der Kernexport vom NES abhängt. Der Importin α/β -regulierte Kerntransport hängt von der klassischen NLS ab, die bis heute am besten charakterisiert werden konnte [111]. Das Adapter-Protein Importin α kann das NLS erkennen und direkt binden. Polare und hydrophobe Wechselwirkungen sind an der NLS-Bindung zwischen Importin α und Kargoprotein beteiligt. Strukturanalysen von Peptiden und Proteinen in Komplex mit Importin α konnten zeigen, dass der

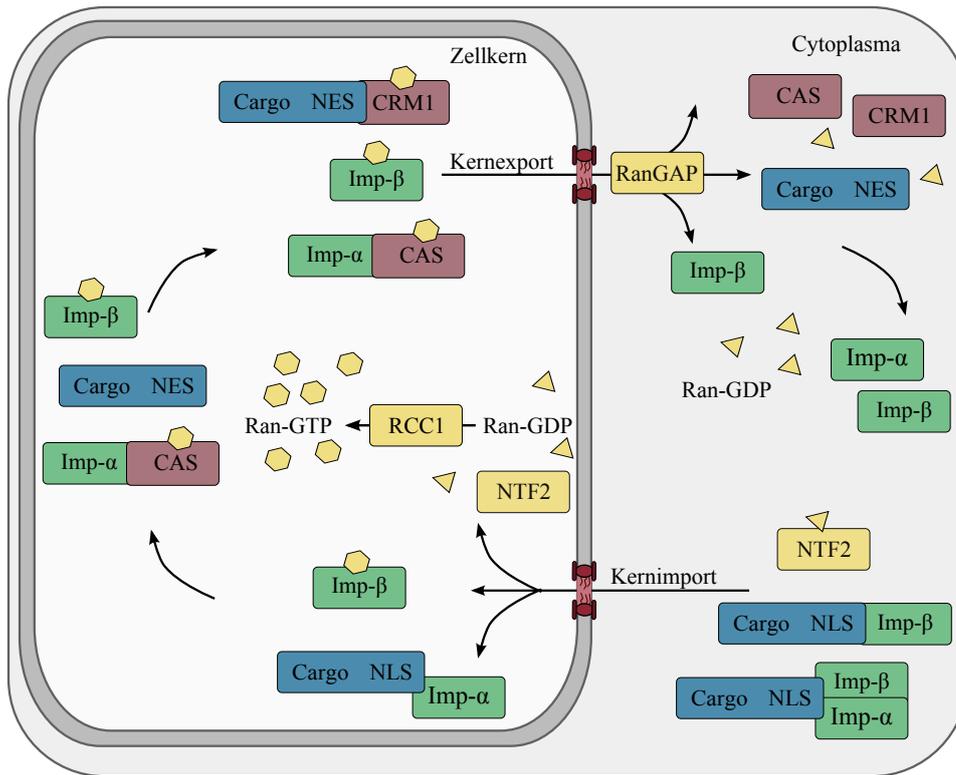


Abbildung 1.5: Komponenten des Kernimports und -exports von Proteinen.

Der nukleäre Import von Proteinen ist anhand des Importin α/β -abhängigen Transports dargestellt. Importin α und Importin β binden das NLS des Kargoproteins. Der Proteinkomplex dissoziiert im Zellkern in Abhängigkeit der RanGTP-Bindung an Importin β . An RanGTP gebundenes Importin β kann direkt aus dem Zellkern exportiert werden, während der Export von Importin α vom RanGTP-gebundenen Exportfaktor CAS abhängig ist. RanGTP-gebundenes CRM1 bindet ein NES des Kargoproteins und vermittelt den Kernexport durch den Kernporen-Komplex. Der Kerntransport ist abhängig von einem Konzentrationsgradienten von nukleärem RanGTP und cytoplasmatischem RanGDP. Der Austauschfaktor RCC1 wandelt im Zellkern RanGDP in RanGTP um, während im Cytoplasma RanGTP durch das GTPase-aktivierende Protein RanGAP zu RanGDP hydrolysiert wird. Zudem wird RanGDP konstant über den spezifischen Import-Rezeptor NTF2 in den Zellkern transportiert (modifiziert nach [43]).

Mechanismus der NLS-Erkennung zwischen Hefe, Maus und Mensch hochkonserviert ist (als Übersichtsartikel [123]). Die Spezifität der Substratbindung an die α -Importine ist neben der Aminosäuresequenz des klassischen NLS zusätzlich in hohem Maße vom Gesamtproteinkontext eines Substrates abhängig [56]. Klassische NLS enthalten einen (*monopartite* NLS) oder zwei (*bipartite* NLS) basische Sequenzabschnitte, die sich überwiegend aus Lysin (L)- und Argininresten (R) zusammensetzen [37]. *Monopartite* NLS können beide NLS-Bindungsstellen von Importin α binden. Die größere NLS-Bindungsstelle wird von typischen *monopartite* NLS jedoch mit höherer Affinität gebunden [49]. Der Prototyp der *monopartite* NLS konnte in der Proteinsequenz des großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) iden-

tifiziert werden ($^{126}\text{PKKKRRV}^{132}$) [87, 88]. Die *monopartite* NLS wurden entsprechend ihrer Konsensussequenzen in fünf Unterklassen unterteilt. Die Konsensussequenzen für jede Klasse der *monopartite* NLS-Motive sind: (1) KR(K/R)R, (2) (P/R)XXKR(\wedge DE)(K/R), (3) KRX(W/F/Y)XXAF, (4) (R/P)XXKR(K/R)(\wedge DE) und (5) LGKR(K/R)(W/F/Y). Dabei entspricht X einem beliebigen Aminosäurerest und (\wedge DE) einem Aminosäurerest außer Asparaginsäure (D) oder Glutaminsäure (E) [103]. Die *bipartite* NLS sind durch das Vorhandensein von zwei basischen Sequenzabschnitten charakterisiert, die durch 10-12 Aminosäuren voneinander separiert vorliegen. *Bipartite NLS* binden die größere und die kleinere NLS-Bindungsstelle der α -Importine, wobei der N-terminale basische Sequenzabschnitt die kleinere und der C-terminale basische Sequenzabschnitt die größere NLS-Bindungsstelle einnimmt. Daraus ergibt sich für das Substrat eine antiparallele Ausrichtung zu Importin α [29, 49]. Die NLS von Nukleoplasmin (NUC) wurde als Prototyp der *bipartite* NLS beschrieben ($^{155}\text{KRPAATKKAGQAKKKK}^{170}$) [158]. Für die Klasse der *bipartite* NLS wurde die Konsensussequenz (K/R)(K/RX_{10–12}(K/R)_{3/5} definiert, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt und (K/R)_{3/5} mindestens drei Lysin- oder Argininreste innerhalb von fünf konsekutiven Aminosäuren repräsentiert [103]. Zusätzlich zu den klassischen NLS-Konsensussequenzen, die von den Importin α/β -Rezeptoren gebunden werden, konnten zahlreiche nicht-kanonische NLS identifiziert werden, die von den Importinen erkannt werden. Die direkte Bindung von Importin β verläuft häufig über nicht-klassische NLS. Diese weisen meist eine längere und flexiblere Struktur auf und enthalten viele Argininreste [65]. Das Transportin, auch Importin $\beta 2$ genannt, bindet seine Substrate über ein kürzlich identifiziertes NLS. Dieses zeichnet sich durch ein Prolin-Tyrosin (PY)-Motiv aus und wurde durch die Konsensussequenz R/H/KX_{2–5}PY definiert, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt (als Übersichtsartikel [123]). Für die weiteren Importin β -ähnlichen Proteine konnte bisher keine NLS-Konsensussequenz definiert werden, da keine Übereinstimmungen in der NLS verschiedener Kargoproteine eines Import-Rezeptors gefunden wurden. Dies impliziert, dass das Spektrum an nukleären Signalsequenzen vermutlich größer ist als bisher angenommen, und dass viele nukleäre Proteine Signalsequenzen enthalten, die nicht als solche erkannt werden und nicht den bekannten Konsensussequenzen entsprechen [28].

Der Kernexport über den Transport-Rezeptor CRM1 hängt von einer NES in der primären Aminosäuresequenz des Kargoproteins ab. Bisher konnte nur eine NES-Konsensussequenz-Klasse identifiziert werden, die von CRM1 erkannt und gebunden wird. Dabei handelt es sich um kurze Leucin-reiche Sequenzmotive. Als Prototypen der Leucin-reichen NES gelten die NES des RNA-Transportproteins Rev des Humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV 1) ($^{75}\text{LPPLERLTL}^{83}$) [46] und des Protein-Kinase-Inhibitors A ($^{37}\text{LALKLAGLDI}^{46}$) [200]. Obwohl diese NES-Prototypen viele

Leucine enthalten, konnten auch NES identifiziert werden, die sich aus anderen hydrophoben Aminosäuren zusammensetzen und trotzdem zur Klasse der Leucinreichen NLS zählen. Die Konsensussequenz dieser NES-Klasse besteht aus einem Sequenzmotiv aus 10-15 Aminosäuren, das drei bis vier der hydrophoben Aminosäuren Leucin (L), Valin (V), Isoleucin (I), Phenylalanin (F) oder Methionin (M) enthält ($\Phi X_{2-3} \Phi X_{2-3} \Phi X \Phi$, wobei X eine beliebige Aminosäure beschreibt und Φ für L, V, I, F oder M steht) [107]. Zudem konnte gezeigt werden, dass neben der NES selbst auch die Sekundärstruktur, die Flexibilität und die Ausrichtung der NES sowie die flankierenden Sequenzbereiche von Bedeutung sind [107].

Nicht alle eine Signalsequenz enthaltenden Substrate werden konstitutiv aus dem Zellkern exportiert oder in den Zellkern importiert, da die nukleären Transportmechanismen weiteren Regulationsmechanismen unterliegen. Zu diesen Regulationsmechanismen gehören die Maskierung/Demaskierung des NLS oder des NES durch andere Proteine [116, 172, 177] und die Ausbildung von Disulfidbrücken durch Oxidation [105, 206]. Zudem spielt die Phosphorylierung von Aminosäureresten, die die Signalsequenz flankieren, häufig eine entscheidende Rolle bei der Regulation des geregelten Kerntransports [40, 127, 204]. Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass die Regulation intrazellulärer Transportmechanismen durch Phosphorylierungen im HIF-Signalweg von großer Bedeutung ist, da der CRM1-abhängige nukleäre Export von HIF-1 α durch spezifische Phosphorylierung der Serinreste S641 und S643 durch den MAPK-Signalweg blockiert wird [142].

1.5.6 Regulation des subzellulären Transports durch Phosphorylierungen

Der nucleocytoplasmatische Transport und die nukleäre Verfügbarkeit von Proteinen können durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen spezifischer Aminosäurereste reguliert werden. Dabei sind Serin (S), Threonin (T) und Tyrosin (Y) die am häufigsten modifizierten Aminosäuren. Unterschiedliche molekulare Mechanismen, wie z.B. die Maskierung spezifischer Transport-Signale des Kargoproteins oder die Erhöhung der Bindungsaffinität zwischen Transport-Rezeptor und Kargoprotein, spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation des Kerntransports (als Übersichtsartikel [143]). Auf diese Weise wird die Lokalisierung von Proteinen entsprechend der zellulären Signaltransduktion beeinflusst. Zudem kann auch die Aktivität der Komponenten der Kerntransport-Maschinerie durch Phosphorylierungen kontrolliert werden [95].

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die sauerstoffabhängige Genexpression hat eine große physiologische und pathophysiologische Bedeutung. Bei der Anpassung der Zelle an veränderte Sauerstoffbedingungen spielt der HIF-Signalweg eine entscheidende Rolle. In der Tumorentwicklung wird durch die Expression der HIF-abhängigen Zielgene die intratumorale Hypoxie begünstigt, die mit der Metastasierung und der malignen Progression des Tumors assoziiert wird. Die Stabilität von HIF-1 α wird unter normoxischen Bedingungen durch die PHD-Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3 reguliert, die variierende subzelluläre Verteilungsmuster zeigen. Die Charakterisierung des molekularen Sauerstoffsensings ermöglicht die Modulation der HIF-abhängigen Reaktionskaskade vor dem Hintergrund einer therapeutischen Anwendung für die Tumorthherapie und die Behandlung kardiovaskulärer und ischämischer Krankheiten. Die Modifikation des intrazellulären PHD-Transports bietet im Hinblick auf ihr therapeutisches Potential eine hohe Spezifität. Die intrazelluläre Lokalisierung der PHD-Isoformen wird über verschiedene molekulare Transportmechanismen reguliert, sodass spezifische PHD-Isoformen inhibiert bzw. aktiviert werden könnten. Zunächst soll der Kernimport der PHD-Isoformen PHD2 und PHD3 untersucht werden. Die Identifikation spezifischer Transport-Rezeptoren ermöglicht die Charakterisierung molekularer Mechanismen, die der subzellulären Lokalisierung der PHD zu Grunde liegen. Zudem sollen Signalsequenzen in der Aminosäuresequenz der PHD ermittelt werden, welche an der Bindung an Transport-Rezeptoren beteiligt sind und damit eine entscheidende Rolle für die intrazelluläre Lokalisierung der PHD übernehmen. Die Eingrenzung und Mutation putativer Signalsequenzen bietet die Möglichkeit der kompartimentspezifischen Expression der PHD. Am Beispiel von PHD2 soll dadurch im Folgenden der Effekt der intrazellulären PHD-Lokalisierung auf den HIF-1-Signalweg gezeigt werden. In einem *in vitro* Zellkulturmodell werden nukleäre bzw. cytoplasmatische PHD2-Konstrukte exprimiert. Über die Bestimmung der transkriptionellen HIF-Aktivität, der Expression HIF-1 α -abhängiger Zielgene und der HIF-1 α -Proteinexpression werden dadurch Rückschlüsse auf die enzymatische PHD2-Aktivität und die Auswirkungen auf den HIF-1-Signalweg gezogen. Klinische Studien konnten zeigen, dass die Malignität verschiedener Tumore mit einer nukleären Translokation der PHD2 assoziiert ist. Abschließend soll daher der Einfluss der PHD2-Expression auf die zellspezifische Tumorgenität analysiert werden. Durch *in vitro* Untersuchungen wird das klonogene Überleben von Tumorzellen nach Bestrahlung in Abhängigkeit der PHD2-Expression ermittelt. Die kompartimentspezifische PHD2-Expression ermöglicht zudem die Untersuchung der Bedeutung der subzellulären PHD2-Lokalisierung für die Strahlenresistenz von Tumorzellen.

2.1 Hersteller

Im Folgenden sind die Firmensitze der Lieferanten und Hersteller aufgeführt und werden im weiteren Verlauf nicht mehr angegeben, um Mehrfachnennungen zu vermeiden:

Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland), Air Liquide Deutschland (Düsseldorf, Deutschland), Applichem (Darmstadt, Deutschland), Artisan Scientific (Champaign, IL, USA), Bandelin electronic (Berlin), B. Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland), Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland), Biometra (Göttingen, Deutschland), Biomol (Hamburg, Deutschland), Bio-Rad (München, Deutschland), Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland), BMG Labtec (Ortenberg, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), Dako (Hamburg, Deutschland), Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), GATC Biotech (Konstanz, Deutschland), GE Healthcare (Freiburg, Deutschland), Gerbu Biotechnik (Wieblingen, Deutschland), Gerhardt (Königswinter, Deutschland), GraphPad Software (La Jolla, CA, USA), Hartmann Analytic (Braunschweig, Deutschland), Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland), Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland), Herolab Laborgeräte (Wiesloch, Deutschland), Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland), KNF Neuberger (Freiburg, Deutschland), Kodak (Stuttgart, Deutschland), Kryotec-Kryosafe (Hamburg, Deutschland), IKA-Werke (Staufen, Deutschland), Invitrogen (Darmstadt, Deutschland), Labinco BV (Breda, Niederlande), Leica (Wetzlar, Deutschland), Liebherr Hausgeräte (Ochsenhausen, Deutschland), Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), Medgenix Diagnostics (Ratingen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Millipore (Schwalbach am Taunus, Deutschland), New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland), Nexcelom Bioscience (Lawrence, MA, USA), Novus (Littleton, CO, USA),

Nunc (Wiesbaden, Deutschland), PAA Laboratories (Pasching, Österreich), Panasonic (Wiesbaden, Deutschland), Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland), Phase (Lübeck, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Raytest (Straubenhardt, Deutschland), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), Ruskinn Technology (Bridgend, United Kingdom), Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA), Sanyo (Leicestershire, United Kingdom), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Sartorius (Göttingen, Deutschland), Scotsman Ice Systems (Mailand, Italien), Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland), Siemens (München, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), SLT Labinstruments (Achterwehr, Deutschland), Sucofin (Zewen, Deutschland), Systec (Wettenberg, Deutschland), Thermo Scientific (Bonn, Deutschland), VLM (Bielefeld, Deutschland), Witeg Labortechnik (Wertheim, Deutschland), WTW (Weilheim, Deutschland), Zeiss (Jena, Deutschland).

2.2 Geräte

Name	Hersteller
Analysewaage AC120S	Sartorius
Autoklav V150	Systec
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments
Elektroblotter Semi-Dry Blotter Pegasus	Phase
Eraser für Bildplatte BAS-IP MS 2040	Raytest
Flockeneisbereiter	Scotsman Ice Systems
Fluoreszenzmikroskop Axiophan	Zeiss
Geldokumentationsanlage EASY Win32	Herolab Laborgeräte
Gelkammer Mini-Protean für Polyacrylamid-Gele	Bio-Rad
Gelkammer PerfectBlue Mini S	PeqLab Biotechnologie
Geltrockner Savant SGD2000	Artisan Scientific
Hypoxie-Werkbank <i>In vivo</i> ₂ 400	Ruskinn Technology
Kühl- Gefrierkombination	Liebherr
Lasermikroskop LSM TCS S5P	Leica
Linearbeschleuniger Mevatron 74	Siemens
Luminometer FluoStar OPTIMA	BMG Labtec
Luminometer Mithras LB940	Berthold Technologies
Luminometer SLT Rainbow	SLT Labinstruments
Magnetrührer RCT Basic	IKA Werke
Membran-Vakuumpumpe KNF Laboport	KNF Neuberger

Mikrotiterplattenschüttler EASIA	Medgenix Diagnostics
Mikrowelle	Panasonic
Netzgerät Consort E835	Sigma-Aldrich
Netzgerät Power Pac 3000	BioRad
Nukleinsäure Extraktionsstation ABI PRISM 6100	Applied Biosystems
PCR-Block T-Gradient	Biometra
pH-Meter 523	WTW
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments
Präzisionswaage BP2100S	Sartorius
Radioaktivitätsscanner CR 35 Bio	Raytest
Reinstwassersystem Ultra Clear	VLM
Rotor JA-10	Beckman Coulter
Rotor JA-25.50	Beckman Coulter
Schüttelinkubator Gallenkamp	Sanyo
Schüttelinkubator Wisd Wise Cube	Witeg Labortechnik
Sequenzdetektionssystem ABI PRISM 7000	Applied Biosystems
Spektrophotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie
Spektrophotometer SmartSpec TM 300	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank Lamin Air	Heraeus Instruments
Sicherheitswerkbank Microflow	Nunc
Thermocycler Primus 96 ^{plus}	Eurofins MWG
Thermocycler T-3	Biometra
Thermocycler T-Gradient	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tiefkälte-Lagertruhe Forma 86 C	Thermo Scientific
Tiefkälte-Lagertruhe KTL	Kryotec-Kryosafe
Ultraschall-Homogenisator SonoPlus HD3100	Bandelin electronic
Vortexer Power Mix L46	Labinco BV
Wasserbad Thermomix BU	B. Braun Melsungen
Zellzähler Cellometer TM Auto T4	Nexcelom Bioscience
Zentrifugen 5415R, 5810R	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter

2.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten, sofern es nicht anders angegeben ist, den Reinheitsgrad *pro analysi*.

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Biomol
[³⁵ S]-Methionin	Hartmann Analytic
Accutase	PAA Laboratories
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Carl Roth
Agar Agar	Applichem
Agarose	Serva Electrophoresis
Agarose LE GP	Biozym Scientific
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin-Natriumsalz (Amp)	Biomol
Adenosintriphosphat (ATP)	Biomol
Baktotrypton	Applichem
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Coomassie ^R Brilliant Blau G 250	Serva Electrophoresis
Desoxycholinsäure	Sigma-Aldrich
Dextran	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO) ((CH ₃) ₂ SO)	Sigma-Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DNA StainG	Serva Electrophoresis
dNTP Mix, je 10 mM	Fermentas
D(+)-Saccharose	Applichem
Eindeckelmedium ProLong ^R Gold with DAPI	Invitrogen
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Carl Roth
Formaldehydlösung (37 %)	Carl Roth
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Gase (N ₂ , CO ₂ , Druckluft)	Air Liquide Deutschland
Glukose	Applichem
Glycerin	Sigma-Aldrich

Glycin	Serva Electrophoresis
Harnstoff	Gerbu Biotechnik
Hefeextrakt	Applichem
Hepes	Carl Roth
Igepal ^R CA-630	Sigma-Aldrich
Imidazol	Applichem
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Applichem
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂ , KOAc)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kanamycinsulfat (Kan)	Carl Roth
LB-Agar (Luria-Müller)	Carl Roth
LB-Medium (Luria-Müller)	Carl Roth
Leptomycin B	Calbiochem
L-Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich
LY294002 (LY)	Sigma
Lysozym	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumacetat (C ₄ H ₆ MgO ₄ , MgOAc)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Methanol	Carl Roth
MOPS	Gerbu Biotechnik
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumdeoxycholat	Applichem
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS) granuliert	Applichem
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Temed)	Sigma-Aldrich
N-Z-Amine ^R YT	Sigma-Aldrich
PD98059 (PD)	Sigma
Penicillin/Streptomycin (100 %)	PAA Laboratories
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem
Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich

Protease-Inhibitor Cocktail Complete Mini	Roche Diagnostics
Rapamycin (Rap)	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Röntgenfilmentwickler LX24	Kodak
Röntgenfixierbad AL4	Kodak
Salzsäure (HCl) (25 %)	Merck
Säulenmaterial Glutathion Sepharose TM 4B	GE Healthcare
Säulenmaterial Talon ^R	BD Biosciences
Transfektionsreagenz GeneJuice ^R	Merck
Transfektionsreagenz Lipofectamine ^R 2000	Invitrogen
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth
Hydrochlorid	
Trishydroxymethylaminomethan (Tris) <i>ultra pure</i>	Biomol
Triton-X-100	Merck
Trypanblau Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA (1x)	PAA Laboratories
Tween ^R 20	Merck

2.4 Gebrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bildplatte BAS-IP MS 2040	Raytest
Blottingpapier Rotilabo ^R (0,35 mm)	Carl Roth
Deckgläser (12 mm)	Carl Roth
Dialyseschlauch Typ 20	Biomol
Einmalpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Einmalreaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Einmalröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner
Gewebekulturflaschen (75 cm ² , 25 cm ²)	Greiner
Gewebekulturplatten (6-, 24-, 96-Loch)	Greiner
Kryo-Röhrchen	Greiner
Mikrotiterplatte Luminunc TM weiß (96-Loch)	Nunc
Nitrocellulose-Membran Amersham Hybond TM ECL	GE Healthcare
Pasteurpipetten	Carl Roth
Petrischalen (10 cm, 15 cm)	Sarstedt
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 10 µl)	Sarstedt

Polypropylensäulen (5 ml)	Qiagen
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm TM MP	GE Healthcare
Ultrafiltrationsröhrchen Centriprep	Millipore
Zellschaber (1,7 cm, 3,1 cm)	Sarstedt
Zellzählkammern Cellometer TM Auto T4	Nexcelom Bioscience

2.5 Oligonukleotide

Die hier aufgeführten Nukleinsäuren wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Invitrogen synthetisiert. Die lyophilisierten und entsalzten Oligonukleotide wurden vor der Verwendung in entionisiertem Wasser gelöst und eine Stockkonzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt.

Primer für die Amplifikation von Klonierungsfragmenten

Primerpaar	Sequenz (5'- 3')	Amplikon (bp)
PHD2 (180-220)	<i>forward</i> AAAGTCGACCGGCCCAACGGGCAG	141
	<i>revers</i> CCCGGATCCCTGTCCGGTCTCCTT	
PHD3	<i>forward</i> AAAGAGCTCATGCCCTGGGACAC	737
	<i>revers</i> CCCGTGACAATCAGTCTTCAGTG	

Primer für die *real-time* PCR

Primer	Sequenz (5'- 3')	Amplikon (bp)
β -Aktin	<i>forward</i> AAGATCATTGCTCCTCCTGAGC	105
	<i>revers</i> CATACTCCTGCTTGCTGATCCA	
GLUT 1	<i>forward</i> GGCCTTTTCGTTAACCGCTT	115
	<i>revers</i> AGCATCTCAAAGGACTTGCCC	
MCT4	<i>forward</i> CGCCCGATCAGTGTTTTGA	100
	<i>revers</i> AGGATGCCTTGTAACCTTGCG	
VEGF	<i>forward</i> CGAGGCAGCTTGAGTTAAACG	157
	<i>revers</i> AGATCTGGTTCCCGAAACCCT	

Primer für die Sequenzierung von Plasmid-DNA

Primer	Sequenz (5'- 3')	Vektor
BGH-rev	CCTCGACTGTGCCTTCTA	pEGFP pcDNA3
CMV-for	CGCAAATGGCGGTAGGCGTG	pEGFP pcDNA3
pEEG-for2	GATAAGTACTTGAAATCCAGC	pEEG
pQE-for	CCCGAAAAGTGCCACCTG	pQE60
pQE-rev	GTTCTGAGGTCATTACTGG	pQE60

Primer für die sequenzgerichtete Mutagenese

Primer	Sequenz (5'- 3')
HIF1aK719A	<i>sense</i> ACTAGCTTTGCAGAATGCTCAGAGAGCGCGA AAAATGGAACATG <i>antisense</i> CATGTTCCATTTTTTCGCGCTCTCTGAGCA TTCTGCAAAGCTAGT
HIF1aK753A	<i>sense</i> CAGCTACTACATCACTTTCTTGGGCAGGTGT AAAAGGATGCAAATCTA <i>antisense</i> TAGATTTGCATCCTTTTACACGTGCCCAA GAAAGTGATGTAGTAGCTG
PHD1S234D	<i>sense</i> GCGATCCCGCCGCGCGATATCCGTGGGGACC AG <i>antisense</i> CTGGTCCCCACGGATATCGCGCGGGCGGGA TCGC
PHD2d6-20	<i>sense</i> TGGCCAATGACAGCTGCGAGCTGTGCGG <i>antisense</i> CCGCACAGCTCGCAGCTGTCATTGGCCA
PHD2d181-220	<i>sense</i> GGCGGCCTGCGGCAGATCGGGCAG <i>antisense</i> GTCGCCGATCTGCCGCAGGCCGCC
PHD2d188-195	<i>sense</i> GGCAGACGAAGCCCGAGTACATCGTGCC <i>antisense</i> GGCACGATGTACTCGGGCTTCGTCTGCC

PHD2d191-192	<i>sense</i> TCGAGCGCCAGCGCCGGCAGGG <i>antisense</i> CCCTGCCGGCGCTGGCGCTCGA
PHD2d191-195	<i>sense</i> CCCCTGCCGGCGGAGTACATCGTGC <i>antisense</i> GCACGATGTACTCCGCCGGCAGGGG
PHD2d196-205	<i>sense</i> CTGAAGCTGGCGCTCGGCATCTGTGTGGTG <i>antisense</i> CACCACACAGATGCCGAGCGCCAGCTTC AG
PHD2S5A	<i>sense</i> CTTATGGCCAATGACCCGGGCGGGCCCGGC <i>antisense</i> GCCGGGCCCGCCCGGGTCATTGGCCAT AAG
PHD2S12A	<i>sense</i> CCGGCGGGCCGGCCCCGAGCGAGC <i>antisense</i> GCTCGCTCGGGGCCGGCCCGCCGG
PHD2S14A	<i>sense</i> GGCCCGAGCCCGGCGGAGCGAGACCGG <i>antisense</i> CCGGTCTCGCTCCGCCGGGCTCGGGCC
PHD2S39D	<i>sense</i> GCCGCTGCCGCAGCGACTTCTACTGCTGCA <i>antisense</i> TGCAGCAGTAGAAGTCGCTGCGGCAGCG GC
PHD3d2-60	<i>sense</i> TTCGATTGCTCTAGAATGCTGGCGGGGCCG <i>antisense</i> CGGCCCCGCCAGCATTCTAGAGCAATCG AA
PHD3d61-120	<i>sense</i> GCGGGACGGCCAGATGGTGGCTTGCT <i>antisense</i> AGCAAGCCACCATCTGGCCGTCCCGC
PHD3d121-180	<i>sense</i> CAAGGAGAGGTCTAAGGCAATTTTGTGACAGA CTCCTGT <i>antisense</i> ACAGGAGTCTGTCAAAAATTGCCTTAGAC CTCTCCTTGC
PHD3d165-195	<i>sense</i> CATGGTGGGATCCTGCACGAAGTGCAGCCC <i>antisense</i> GGGCTGCACTTCGTGCAGGATCCCACC ATG
PHD3d181-238	<i>sense</i> ATGTGGAGCCCCCGCGGGCCCG <i>antisense</i> CGGGCCCGCGGGGGCTCCACAT
PHD3d222-226	<i>sense</i> GAAAGGGCAGAAGCCAATTTAACTAGGAAAC <i>antisense</i> GTTTCCTAGTTAAATTGGCTTCTGCCCTT TC

PHD3Trp189X	<i>sense</i> GACTCCTGTTCTTCTGATGAGATCGTAGGAA CCCACAG
	<i>antisense</i> CTGTGGGTTCCCTACGATCTCATCAGAAGA ACAGGAGTC

Small interfering RNA

Ziel	siRNA Sequenz (5'- 3')	Hersteller
hPHD2	GCGATAAGATCACCTGGAT	Thermo Scientific

2.6 Plasmide

Plasmid	Herkunft / Referenz	Resistenz
pcDNA3	Invitrogen	Amp
pcDNA3.1-HA-LIMD1	[171]	Amp
pcDNA3-PHD2	Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck	Amp
pcDNA3-PHD2 Δ 6-20	diese Arbeit	Amp
pcDNA3-PHD2 Δ 196-205	diese Arbeit	Amp
pcDNA3-PHD3	Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck	Amp
pcDNA3-PHD3 Δ 165-195	diese Arbeit	Amp
pcDNA3-PHD3 Δ 222-226	diese Arbeit	Amp
pcDNA3-PHD3W189X	diese Arbeit	Amp
pEGFP-EGFP-GST (pEEG)	[86]	Kan
pEEG-PHD2 (180-220)	Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck	Kan
pEGFP-N1	Clontech	Kan
pEGFP-PHD2	[133]	Kan
pEGFP-PHD2 Δ 6-20	diese Arbeit	Kan

pEGFP-PHD2 Δ 181-220	diese Arbeit	Kan
pEGFP-PHD2 Δ 191-195	diese Arbeit	Kan
pEGFP-PHD2 Δ 191-192	diese Arbeit	Kan
pEGFP-PHD2 Δ 196-205	diese Arbeit	Kan
pEGFP-PHD3	[133]	Kan
pEGFP-PHD3 Δ 2-60	diese Arbeit	Kan
pEGFP-PHD3 Δ 61-120	diese Arbeit	Kan
pEGFP-PHD3 Δ 121-180	diese Arbeit	Kan
pEGFP-PHD3 Δ 165-195	diese Arbeit	Kan
pEGFP-PHD3 Δ 181-239	diese Arbeit	Kan
pEGFP-PHD3 Δ 222-226	diese Arbeit	Kan
pGL4.75[hRluc/CMV]	Promega	Amp
pGL3[pH3SLV]	[161]	Amp
pJW10-Importin α 1	[130]	Amp
pJW10-Importin α 3	[130]	Amp
pJW10-Importin α 4	[56]	Amp
pJW10-Importin α 5	[56]	Amp
pJW10-Importin α 7	[56]	Amp
pJW10-Importin β	[56]	Amp
pQE70-Nukleoplasmin	[61]	Amp
pQE80L	Qiagen	Amp
pQE80L-PHD3	diese Arbeit	Amp

2.7 Zelllinien

Name	Ursprung	Medium	Herkunft / Referenz
Fadu	Hypopharynx- karzinom (human)	Medium mit Zusätzen	Institut für Gynäkologie, Technische Universität München
U2OS	Osteosarkom (human)	Medium mit Zusätzen	Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck

2.8 Zellkulturmedien

Alle Medien für die Zellkultur wurden bei 4°C gelagert und vor Verwendung auf 37°C erwärmt.

Name	Bestandteil	Hersteller
Medium mit Zusätzen	DMEM (<i>High Glucose, Pyruvate</i>) 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Invitrogen PAA Laboratories
Medium mit DMSO	DMEM (<i>High Glucose, Pyruvate</i>) 10 % FKS (v/v) 10 % (v/v) DMSO	Invitrogen Invitrogen Sigma-Aldrich
Transfektionsmedium	DMEM (<i>High Glucose, Pyruvate</i>) 10 % (v/v) FKS	Invitrogen Invitrogen
Opti-MEM ^R - Medium	Opti-MEM ^R (<i>Reduced Serum Media</i>)	Invitrogen

2.9 Bakterienstämme

Name	Verwendung	Herkunft / Referenz
BL21	Proteinexpression	Agilent Technologies
BL21 pREP4	Proteinexpression	Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck

JM101	Proteinexpression	Agilent Technologies
JM110	Plasmidpräparation	Agilent Technologies
XLI ^R	Plasmidpräparation	Agilent Technologies
XLGold ^R	Plasmidpräparation	Agilent Technologies

2.10 Bakterienkulturmedien

Name	Zusammensetzung	Hersteller
LB-Agar mit Ampicillin	40 g LB-Agar 1000 ml H ₂ O autoklavieren	Carl Roth
	100 µg/ml Amp	Biomol
LB-Agar mit Kanamycin	40 g LB-Agar 1000 ml H ₂ O autoklavieren	Carl Roth
	25 µg/ml Kan	Carl Roth
LB-Medium mit Ampicillin	25 g LB-Medium 1000 ml H ₂ O autoklavieren	Carl Roth
	100 µg/ml Amp	Biomol
LB-Medium mit Kanamycin	25 g LB-Medium 1000 ml H ₂ O autoklavieren	Carl Roth
	25 µg/ml Kan	Carl Roth
NZY ⁺ Medium	10 g N-Z-Amine YT	Sigma-Aldrich
	5 g Hefeextrakt	Applichem
	5 g NaCl	Sigma-Aldrich
	ad 1000 ml H ₂ O autoklavieren	
	pH 7,5	
	12,5 mM MgCl ₂	Merck
12,5 mM MgSO ₄	Merck	
20 mM Glukose	Applichem	

2.11 Kits

Name	Hersteller
Amersham ECL Plus TM Western Blotting Reagent	GE Healthcare
Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
Dual-Luciferase ^R Reporter Assay-System	Promega
GeneJET TM Gel Extraction Kit	Fermentas
GeneJET TM Plasmid Miniprep Kit	Fermentas
NucleoBond ^R Xtra Midi Kit	Macherey & Nagel
Platinum ^R SYBR ^R Green qPCR SuperMix	Invitrogen
ProteoJET TM Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit	Fermentas
QuikChange ^R Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
TNT ^R T7 Quick Coupled Transcription/Translation-System	Promega

2.12 Antikörper

Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller
Anti-HIF-1 α (Maus, monoklonal)	BD Biosciences
Anti-Penta-His (Maus, monoklonal)	Qiagen
Anti-Lamin A/C (Ziege, polyklonal)	Santa Cruz
Anti-PHD2 (Kaninchen, polyklonal)	Novus
Anti-PHD3 (Kaninchen, polyklonal)	Novus

Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
AlexaFluor ^R 594 Anti-Kaninchen (Ziege, polyklonal)	Invitrogen
HRP-Anti-Kaninchen (Ziege, polyklonal)	DAKO
HRP-Anti-Maus (Ziege, polyklonal)	DAKO
HRP-Anti-Ziege (Kaninchen, polyklonal)	DAKO

2.13 Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenz	Hersteller
GeneJuice ^R	Merck
Lipofectamine TM 2000	Invitrogen

2.14 Enzyme und Größenmarker

Alle Enzyme wurden bei -20°C gelagert und bei Verwendung auf Eis gekühlt.

Name	Hersteller
Dream Taq TM Green DNA-Polymerase (5000 U/ml)	Fermentas
GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler TM 1 kb DNA Ladder	Fermentas
FastDigest ^R BamHI-Restriktionsenzym (1000 U/ml)	Fermentas
FastDigest ^R SacI-Restriktionsenzym (1000 U/ml)	Fermentas
FastDigest ^R Sall-Restriktionsenzym (1000 U/ml)	Fermentas
PageRuler TM Prestanied Protein Ladder (10-170 kDa)	Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (1000 U/ml)	Promega
T4 DNA-Ligase (5000 U/ml)	Fermentas

2.15 Puffer und Lösungen

Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Das Ansetzen aller Lösungen und Puffer erfolgte mit hochreinem Wasser, das mithilfe einer Ionenaustauschkartusche aufbereitet wurde.

Name	Bestandteile
Blockierungspuffer	5 % (w/v) Milchpulver in 1x PBS
Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz I	0,4 % (w/v) Fischhaut Gelatine in 1x PBS

Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz II	0,2 % (w/v) Fischhaut Gelatine in 1x PBS
Bradfordreagenz	20 % (v/v) EtOH 0,06 mM Coomassie Brilliant Blau G 250 10 % (v/v) Phosphorsäure
Calciumchloridlösung	60 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin 10 mM MOPS
Coomassie-Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250
Denaturierungspuffer für His-Fusionsprotein Aufreinigung (Einschlusskörperchen) (pH 12)	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 2 M Urea
DEPC-H ₂ O	0,1 % (v/v) DEPC autoklavieren
Dialysepuffer für GST-Fusionsprotein-Aufreinigung	50 mM Hepes-KOH, pH 7,5 200 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerin
Dialysepuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung	50 mM Hepes-KOH, pH 7,5 200 mM NaCl 5 % (v/v) Glycerin
Dialysepuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Einschlusskörperchen) (pH 7,5)	50 mM Hepes-KOH, pH 7,5 200 mM NaCl 2 mM Urea
Elektrophoresepuffer für Agarose-Gele (1x)	1x TAE-Puffer, pH 8,5

Elektrophoresepuffer für SDS-Page (1x)	25 mM Tris-HCl, pH 7,4 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Elutionpuffer für GST-Fusionsprotein-Aufreinigung	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM reduziertes Glutathion 1x Protease-Inhibitor
Fixierlösung	3,7 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
Import (IP)-Puffer (pH 7,4)	20 mM HEPES-KOH, pH 7,5 37,5 mM NaCl 100 mM KOAc 5 mM MgOAc 0,5 mM EGTA 250 mM Saccharose 1x Protease-Inhibitor
Import (IP)-Puffer mit BSA	20 mM HEPES-KOH, pH 7,5 37,5 mM NaCl 100 mM KOAc 5 mM MgOAc 0,5 mM EGTA 250 mM Saccharose 1x Protease-Inhibitor 2 mg/ml BSA
Ladepuffer für SDS-Page (4x)	150 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerin 15 % β -Mercaptoethanol 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Lysispuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Einschlusskörperchen)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0 1 mM DTT 2 mM PMSF
Permeabilisierungspuffer (1x)	0,5 % (v/v) Triton-X-100 in 1x PBS
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)-Puffer (1x)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-KM-Puffer (1x)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 1 mM MgCl ₂ 3 mM KCl
PBS-KMT-Puffer (1x)	1 mM MgCl ₂ 3 mM KCl 1 mM EDTA 0,1 % (v/v) Tween20 1 mg/ml Lysozym 1x Protease-Inhibitor
PBS-T-Puffer (1x)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 0,1 % (v/v) Tween 20
Sammelgelpuffer (8x)	500 mM Tris-HCl, pH 6,8
Sonifikationspuffer für His-Fusionsprotein- Aufreinigung	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 5 mM MgOAc 5 mM β-Mercaptoethanol 1x Protease-Inhibitor

Trenngelpuffer (4x)	1500 mM Tris-HCl, pH 8,8
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50x) (pH 8,5)	50 mM EDTA 2000 mM Essigsäure
Tris-EDTA (TE)-Puffer (1x)	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 1 mM EDTA
Urea-Zelllysispuffer (1x)	10 mM Tris-HCl, pH 6,8 6,7 M Urea 10 M Glycerin 1 % (w/v) SDS 5 mM DTT 1x Protease-Inhibitor
Waschpuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 2 mM MgOAc 5 mM β -Mercaptoethanol
Waschpuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Einschlusskörperchen)	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 2 mM EDTA 500 mM NaCl 1 M Urea 0,05 % (v/v) Desoxycho- linsäure 1 mM DTT 1 mM PMSF
Western-Blot Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,5 200 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

Kommerzielle Puffer und Lösungen

Name	Hersteller
DNA Ladepuffer, 6x	NEB
Dream Taq TM Green Puffer	Fermentas
FastDigest ^R Green Puffer	Fermentas
Nucleic acid Purification Elution Solution	Applied Biosystems

Nucleic acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems
RNA Purification Wash solution 1	Applied Biosystems
RNA Purification Wash solution 2	Applied Biosystems
Shrimp Alkaline Phosphatase Reaktionspuffer	Promega
T4 DNA Ligasepuffer	Fermentas

2.16 Computerprogramme

Name	Hersteller
AIDA Image Analyzer Software 4.50	Raytest
GraphPad Prism 5 (Demoverision)	GraphPad Software
GraphPad InStat 3	GraphPad Software
Leica Application Suite (LAS) AF	Leica
NetPhos 2.0	[15]
Primer Express ^R	Applied Biosystems
PredictProtein	[73]
PSORT II Prediction	[72]
QuickChange ^R Primer Design	Agilent Technologies
Vector NTI Advance TM 9.0	Invitrogen

3.1 Zellbiologische Arbeiten

3.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die humanen Zelllinien U2OS (Osteosarkom) und Fadu (Kopf-Hals-Karzinom) verwendet (Abschnitt 2.7). Es handelt sich dabei um adhärent wachsende Zellen, die in T75-Zellkulturflaschen kultiviert wurden. Die Inkubation erfolgte gemäß ihrer Kulturbedingungen (Abschnitt 2.7) im Zellinkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Den jeweiligen Verdopplungszeiten entsprechend wurden die verwendeten Zelllinien alle 3-4 Tage, vor Ausbildung eines konfluenten Zellrasens, subkultiviert. Dazu wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA (1:250) bei 37 °C inkubiert. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 9 ml Medium mit Zusätzen (Abschnitt 2.8) gestoppt. Die Zellsuspension wurde für die Subkultivierung im Verhältnis 1:5 mit Medium mit Zusätzen (Abschnitt 2.8) verdünnt. Für die Verwendung in Zellkulturexperimenten wurde die Zellzahl mithilfe des Zellzählers *CellometerTM Auto T4* bestimmt und definierte Zellzahlen (Tabelle 3.1) in den jeweiligen Zellkulturgefäßen ausgebracht.

Tabelle 3.1: Aussaatbedingungen für verwendete Zelllinien.

Zellkulturgefäß	Fläche	Zellzahl
24-Loch-Platte	2 cm ²	1,5 x 10 ⁴ Zellen/Loch
6-Loch-Platte	10 cm ²	1,5 x 10 ⁵ Zellen/Loch
10 cm-Schale	60 cm ²	7,0 x 10 ⁵ Zellen/Schale
15 cm-Schale	140 cm ²	1,5 x 10 ⁶ Zellen/Schale

3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen

Zur Langzeitlagerung von Säugerzellen wurden Kryokulturen angelegt. Die Zellen wurden dazu aus der exponentiellen Wachstumsphase einer Kultur mit Trypsin/EDTA (1x) geerntet (Abschnitt 3.1.1) und durch Zentrifugation (1 Minute, 500 g) vom Überstand separiert. Die Zellen wurden im Folgenden in Medium mit DMSO (Abschnitt 2.8) aufgenommen, in Aliquots von je 1 ml aufgeteilt und in Kryoröhrchen überführt. In einem Isopropanol-Bad wurden die Zellen mit einer Temperaturreduktion von ungefähr 1 °C/min auf -80 °C gekühlt. Schließlich erfolgte die Lagerung in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank. Zum Auftauen wurden die in Medium mit DMSO eingefrorenen Zellen im Kryoröhrchen im 37 °C-Wasserbad inkubiert, bis die Zellen fast aufgetaut waren. Anschließend wurden die Zellen in T25-Zellkulturflaschen mit vorgewärmtem Medium mit Zusätzen (Abschnitt 2.8) überführt.

3.1.3 Zellaufschluss und Probenvorbereitung

Für den quantitativen Proteinnachweis durch Western-Blot-Analyse (Abschnitt 3.4.5) oder konventionelle Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) wurden aus den, wie jeweils angegeben behandelten, Zellen (Abschnitte 3.1.4 und 3.1.5) Gesamtzelllysate gewonnen. Um einer Degradierung der Proteine durch zelluläre Proteasen möglichst vorzubeugen, wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen, in Urea-Zelllysispuffer resuspendiert und sonifiziert (25 % *Output*, 20 sec). Durch Zentrifugation (4 °C, 16000 g, 10 min) wurden Überstand (Gesamtzelllysat) und Zelldebris voneinander getrennt. Anschließend wurde das Gesamtzelllysat bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

3.1.4 Transfektion von Säugerzellen

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen fremder DNA in eukaryotische Zellen. Eine Transfektion kann sowohl zeitweilig (transiente Transfektion) oder dauerhaft (stabile Transfektion) erfolgen. Es gibt verschiedene Transfektionsverfahren, die auf chemischen, physikalischen oder biologischen Methoden basieren. In dieser Arbeit wurde für den Transfer von Plasmid-DNA (Abschnitt 2.6) das Transfektionsreagenz *GeneJuice*^R (Abschnitt 2.13) verwendet, ein auf Polyamin basierendes Reagenz, bei dem die DNA in Form eines DNA-Dendrimer-Komplexes aufgenommen wird. *Small interfering RNA* (siRNA) (Abschnitt 2.5) wurde mithilfe von *Lipofectamine*TM 2000 (Abschnitt 2.13) in die Zielzelle eingeschleust, wobei eine kationische Lipidhülle um die negativ geladene DNA ausgebildet wird. Beide Rea-

genzien ermöglichen eine endocytische Aufnahme der DNA ins Cytoplasma. Für ein Transfektionsexperiment wurden die verwendeten Säugerzellen (Abschnitt 2.7) ihrer Verdopplungszeit entsprechend so ausgebracht, dass sie zum Transfektionsbeginn eine Konfluenz von 60 % aufwiesen (Tabelle 3.1).

Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion mit Plasmid-DNA erfolgte mit der Transfektionsreagenz *GeneJuice*^R (Abschnitt 2.13) gemäß den Angaben des Herstellers. Das Verhältnis zwischen *GeneJuice*^R und zu transfizierender Nukleinsäure wurde angewendet wie in Tabelle 3.2 gezeigt. Das Transfektionsreagenz wurde in *Opti-MEM*^R-Medium (Abschnitt 2.8) verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA zugegeben. Während der folgenden 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit Medium ohne Zusätze (Abschnitt 2.8) gewaschen und mit dem entsprechenden Volumen des Transfektionsmediums (Abschnitt 2.8) überschichtet. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Transfektionsgemisch versetzt und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 3.2: Transfektionsansatz *GeneJuice*^R.

Zellkulturgefäß (Platte/Schale)	Volumen Medium	Volumen <i>Opti-MEM</i> ^R	Volumen <i>GeneJuice</i> ^R	DNA
24-Loch-Platte	0,5 ml	25 µl	0,75 µl	0,25 µl
6-Loch-Platte	2 ml	100 µl	3 µl	1 µl
10 cm-Schale	10 ml	500 µl	18 µl	6 µl
15 cm-Schale	15 ml	1000 µl	30 µl	10 µl

Transfektion von Säugerzellen mit siRNA

Die Transfektion von Zellen mit siRNA wurde in 6-Loch-Platten mit *Lipofectamine*TM 2000 (Abschnitt 2.13) durchgeführt. Dabei wurden die Angaben des Herstellers und die in Tabelle 3.3 aufgeführten Mengenangaben berücksichtigt. Das Transfektionsreagenz und die zu transfizierende siRNA wurden getrennt voneinander in *Opti-MEM*^R-Medium (Abschnitt 2.8) verdünnt, nach 5-minütiger Präinkubation bei Raumtemperatur zu gleichen Teilen gemischt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit Medium ohne Zusätze (Abschnitt 2.8) gewaschen und mit 2 ml des Mediums ohne Zusätze überschichtet, bevor sie mit dem Transfektionsgemisch versetzt wurden. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C, fand ein Mediumwechsel zu Transfektionsmedium (Abschnitt 2.8) statt und die Zellen wurden für weitere 20 Stunden inkubiert.

Tabelle 3.3: Transfektionsansatz *LipofectamineTM 2000*.

Zellkulturgefäß (Platte/Schale)	Volumen Medium	Volumen <i>Opti-MEM^R</i>	Volumen <i>LipoTM 2000</i>	siRNA
6-Loch-Platte	2 ml	200 μ l	5 μ l	5 pmol

3.1.5 Behandlung von Säugerzellen

Inhibierung zellulärer Signalkaskaden

Die U2OS-Zellen wurden ausgebracht wie angegeben (Abschnitt 3.1.1), für 24 Stunden inkubiert und gegebenenfalls transfiziert (Abschnitt 3.1.4). Um den Einfluss von phosphorylierungsabhängigen Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD zu untersuchen, wurden die U2OS-Zellen mit spezifischen Inhibitoren der PI3K- und MAPK-Signalkaskaden und der Serin-/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A behandelt. Die Inkubation mit dem Kernexport-Inhibitor Leptomycin B (LMB) erfolgte, um den nukleären Proteinexport zu charakterisieren. Die Inhibitoren, die Inkubationszeiten, die eingesetzten Konzentrationen und ihre jeweiligen spezifischen Zielproteine sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.4: Verwendete Inhibitoren zellulärer Signalkaskaden.

Inhibitor	Zeit	Konz.	Zielprotein
Leptomycin B (LMB)	4 Std	20,00 μ M	Exportin 1 (CRM1)
LY294002 (LY)	4 Std	20,00 μ M	Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)
Okadainsäure (OA)	2 Std	0,25 μ M	Serin/Threonin Phosphatase 1, 2A, 2B (PP1, PP2CA, PP2CB)
PD98059 (PD)	4 Std	50,00 μ M	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)-Kinase (MEK1)
Rapamycin (Rap)	4 Std	0,10 μ M	<i>Mammalian target of Rapamycin</i> (mTOR)

Hypoxische Inkubation

Für Experimente unter hypoxischen Bedingungen wurden die Zellen für 16 Stunden im Zellinkubator bei 5 % CO₂, 3 % O₂ und 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Um der schnellen Degradierung von HIF-1 nach Reoxygenierung vorzubeugen [207], wurden alle Arbeitsschritte mit hypoxischen Zellen und Zelllysaten bei 4 °C durchgeführt.

3.1.6 Reporteragen-Assay

Reporteragen-Assays werden als Indikatoren angewendet, um die Aktivität eines spezifischen Promotors zu untersuchen. Üblicherweise wird dafür ein Reporteragen unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors in einen Expressionsvektor kloniert und in Zellen eingeschleust. Anschließend können die Zellen so behandelt bzw. inkubiert werden, dass der Promotor aktiviert und die Expression des Reporteragens induziert wird. Häufig werden Reporterogene verwendet, deren Gene produkte chemilumineszente Reaktionen katalysieren, wie z.B. Luziferasen. Dabei wird dem Zellysats das Substrat des Reporterproteins zugesetzt, sodass über die bei der Reaktion freiwerdende Chemilumineszenz die Expression des Reporterproteins im Zellysats bestimmt werden kann. Das hier verwendete Reporteragen kodiert für die Firefly-Luziferase, die D-Luziferin in einer biolumineszenten Reaktion oxidiert. Es wurde das Hypoxie-responsible Reporteragen-Konstrukt pH3SLV mit drei HIF-1-responsiblen Elementen (HRE) verwendet, deren Sequenz aus dem humanen Transferrin-Gen stammt [161]. Jedes HRE bindet zwei HIF-1-Proteine, sodass auf dem Plasmid sechs HIF-1-Bindungsstellen (HBS) vorliegen, die die Expression der Firefly-Luziferase regulieren. Die Expression der Firefly-Luziferase korreliert folglich mit der transkriptionellen HIF-Aktivität nach HIF-1-Stabilisierung. Zum Ausgleich von Transfektions- und Milieuschwankungen wurde ein dualer Reporteragen-Assay durchgeführt. Neben dem Reporteragenkonstrukt wird dabei ein zweites Konstrukt in die Zelle eingebracht, welches eine zweite Luziferase konstitutiv exprimiert. Dafür wurde das Renilla-Luziferase-kodierende Plasmid pGL4.75[hRluc/CMV] kotransfiziert. Da die Firefly- und Renilla-Luziferasen unterschiedliche Substrate spalten, kann eine selektive Unterscheidung ihrer Biolumineszenz-Reaktionen detektiert werden.

In dieser Arbeit wurde der duale Reporteragen-Assay unter Verwendung des *Dual-LuciferaseTM Reporter Systems* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. U2OS-Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert (Abschnitt 3.1.1) und nach 24 Stunden mit dem Firefly-Reporterplasmid, dem Renilla-Kontrollplasmid und dem jeweiligen PHD2-EGFP-Konstrukt kotransfiziert (Abschnitt 3.1.4). Nach 24 Stunden fand ein Mediumwechsel zu Transfektionsmedium (Abschnitt 2.8) statt. Schließlich wurden die Zellen für weitere 16 Stunden im Zellinkubator unter hypoxischen Bedingungen bei 5 % CO₂, 3 % O₂ und 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (Abschnitt 3.1.5) inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und entsprechend der Angaben des Herstellers mit 100 µl 1x Lysepuffer lysiert. 20 µl des Zellysats wurden in eine weiße 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Durch sukzessive Zugabe von je 50 µl des jeweiligen Substrats erfolgte anschließend die Messung der Firefly-Luziferase-Aktivität (FLU) bzw. der Renilla-Luziferase-Aktivität (RLU) am Luminometer *Mithras LB940* über einen Zeitraum von 10 Sekunden pro Pro-

be. Die Reaktions-Ratio, ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen FLU und RLU. Sie beschreibt die Promotor-Aktivität in den untersuchten Zellen und ist somit ein indirektes Maß für die transkriptionelle HIF-Aktivität.

3.1.7 Lokalisierungsstudien mit EGFP-markierten Fusionsproteinen

Lokalisierungsstudien mit fluoreszenzmarkierten Proteinen ermöglichen die Analyse der intrazellulären Lokalisierung von Proteinen. Dabei werden Fusionskonstrukte aus dem zu untersuchenden Protein und einem fluoreszierenden Protein, wie z. B. dem grün fluoreszierenden Protein (EGFP) rekombinant exprimiert und mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm detektiert. Durch die gerichtete Deletion spezifischer Sequenzbereiche eines EGFP-markierten Fusionsproteins und anschließender Fluoreszenzanalyse lassen sich spezifische Kerntransportsignale identifizieren.

Die auf Deckgläsern ausgebrachten U2OS-Zellen (Tabelle 3.1) wurden mit den EGFP-markierten PHD2-Konstrukten transfiziert (Abschnitt 3.1.4) und 24 Stunden inkubiert. Zur Zellfixierung wurden die Zellen auf Eis gekühlt, mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und für 15 Minuten mit kalter Fixierlösung (Abschnitt 2.15) inkubiert. Die quervernetzende Wirkung des in der Fixierlösung enthaltenen Paraformaldehyds wurde durch weitere Waschschrte mit PBS-Puffer und H₂O gestoppt. Die Deckgläser wurden im Folgenden mit dem Eindeckelmedium *ProLong^R Gold Antifade Reagent with DAPI* auf Objektträgern eingebettet. Das in dem Eindeckelmedium enthaltene DAPI interkaliert in doppelsträngige DNA und ermöglicht dadurch die Detektion des Zellkerns (Anregung 355 nm, Emission 465 nm). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte an dem inversen konfokalen Lasermikroskop *LSM TCS S5P*.

3.1.8 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Durch die indirekte Immunfluoreszenzfärbung lässt sich die intrazelluläre Lokalisierung unmarkierter Proteine mittels antigenspezifischer Primär- und fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper untersuchen (Tabelle 3.5). Die auf Objektträgern ausgebrachten U2OS-Zellen (Tabelle 3.1) wurden mit den PHD2-kodierenden Konstrukten transfiziert (Abschnitt 3.1.4). Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend in kalter Fixierlösung (Abschnitt 2.15) fixiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrte mit PBS-Puffer. Im Anschluss daran wurden die Zellen 5 Minuten in kaltem Permeabilisierungspuffer (Abschnitt 2.15) inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS-Puffer gewaschen,

bevor sie in Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz I (Abschnitt 2.15) für mindestens 2 Stunden bei 4 % inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper, entsprechend den Angaben in Tabelle 3.5, in Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz II (Abschnitt 2.15) verdünnt. Die Zellen wurden über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Anregung 590 nm, Emission 617 nm) wurde entsprechend (Tabelle 3.5) in Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz II (Abschnitt 2.15) verdünnt und für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Nach weiteren Waschschrritten mit PBS-Puffer wurden die Deckgläser mit dem Eindeckelmedium *ProLong^R Gold Antifade Reagent with DAPI* auf Objektträgern eingebettet. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Lasermikroskop *LSM TCS S5P*.

Tabelle 3.5: Antikörper-Verdünnungen in Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz II.

Antikörper	Verdünnung in Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz II
Alexa Fluor ^R 594-Anti-Kaninchen (Ziege, polyklonal)	1 : 200
Anti-PHD2 (Kaninchen, polyklonal)	1 : 50

3.1.9 Förster-Resonanzenergietransfer

Die Durchführung der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Messungen erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Fandrey (Institut für Physiologie, Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland). Die FRET-Messungen beinhalteten die Untersuchung der spezifischen Interaktion zwischen dem Donator-Molekül ECFP-HIF-1 α bzw. HIF-1 α K719AK753A und den Akzeptor-Molekülen EYFP-PHD2, EYFP-PHD2 Δ NLS oder EYFP-PHD2 Δ NES. Die für die FRET-Messungen benötigten Plasmide wurden teilweise im Rahmen dieser Arbeit generiert. Die im Cytoplasma lokalisierte doppelte Punktmutante ECFP-HIF-1 α -mut wurde durch ortsgerichtete Mutagenese (Abschnitt 3.3.7) hergestellt. Die Klonierung von EYFP-PHD2 erfolgte über die zwei Restriktionsschnittstellen HindIII und KpnI, während die Deletionsmutanten EYFP-PHD2 Δ NLS und EYFP-PHD2 Δ NES über die Restriktionsschnittstellen HindIII und SacII kloniert wurden (Abschnitt 3.3.9). HEK293-Zellen wurden mit ECFP-HIF-1 α oder ECFP-HIF-1 α -mut (HIF-1 α K719AK753A) und dem jeweiligen EYFP-PHD2-Konstrukt transfiziert. Zur Stabilisation von HIF-1 α wurde die Aktivität der PHD2 durch Zugabe von 2 mM Dimethylallylglycin (DMOG) für 24 Stunden inhibiert. Die FRET-Messungen wur-

den 48 Stunden nach der Transfektion entsprechend des etablierten Protokolls von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Fandrey durchgeführt [203].

3.1.10 Bestrahlung von Zellen mit Röntgenbremsstrahlung

Um durch Bestrahlung hervorgerufene Auswirkungen auf proliferierende vorbehandelte Zellpopulationen zu untersuchen, wurde ein Koloniebildungstest mit zuvor bestrahlten Tumorzellen durchgeführt. Die Bestrahlung der Zellen wurde mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Strahlentherapie der Universität zu Lübeck mit einem Linearbeschleuniger des Typs *Mevatron 74* durchgeführt. Dabei unterlagen Dosimetrie und Durchführung den Mitarbeitern der Abteilung für Strahlenmedizin. Die Zellen erhielten eine Gesamtstrahlendosis von 2 oder 4 Gray (Gy). Die Bestrahlungsdosen von 2 und 4 Gray wurden gewählt, da die Überlebensrate der Zellen hoch genug war, um Effekte nachweisen und auswerten zu können. Bei allen Bestrahlungen wurden unbestrahlte Zellen als Kontrollen mitgeführt, um die Vergleichbarkeit der Behandlungsbedingungen sicherzustellen. Für die Bestrahlung wurden Fadu-Zellen in 24-Loch-Platten ausgebracht (Abschnitt 3.1.1), für 24 Stunden inkubiert und mit Plasmid-DNA bzw. siRNA transfiziert (Abschnitt 3.1.4). Vor der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel zu Medium mit Zusätzen (Abschnitt 2.8). Die Bestrahlung der mit Plasmid-DNA transfizierten Zellen erfolgte nach 24 Stunden, während die mit siRNA behandelten Zellen nach 48 Stunden bestrahlt wurden.

3.1.11 Bestimmung der klonogenen Wachstumsfraktion nach Bestrahlung

Der Koloniebildungstest dient der Ermittlung der klonogenen Wachstumsfraktion einer Zellpopulation. Der Koloniebildungstest wurde durchgeführt, um die Abtötungseffizienz der zuvor durchgeführten Bestrahlung (Abschnitt 3.1.10) zu untersuchen. Alle vitalen Fadu-Zellen erzeugten nach 12 Tagen eine makroskopisch detektierbare Zellkolonie, und konnten auf diese Weise von durch die Bestrahlung letal geschädigten Zellen separiert werden. Für den Koloniebildungstest wurden die Fadu-Zellen im direkten Anschluss an die Bestrahlung mit 100 μ l Accutase für 15 Minuten suspendiert, die Zellzahl mithilfe des Zellzählers *CellometerTM Auto T4* bestimmt und 500 Zellen in 6-Loch-Platten im Medium mit Zusätzen (Abschnitt 2.8) ausgebracht. Die 6-Loch-Platten wurden für 12 Tage unter Standardbedingungen kultiviert (Abschnitt 3.1.1). Die gebildeten Zellkolonien wurden mit PBS-Puffer gewaschen und für 15 Minuten mit kalter Fixierlösung (Abschnitt 2.15) und für 10 Minuten mit Ethanol (70 %) inkubiert. Um die Kolonien makroskopisch erken-

nen zu können, wurden die Kolonien für 2 Minuten mit Coomassie-Färbelösung (Abschnitt 2.15) inkubiert. Schließlich wurde erneut mit PBS-Puffer gewaschen, bevor die Zellkolonien ausgezählt werden konnten. Um die ermittelte Kolonienanzahl der bestrahlten Zellen zu normieren, wurden die Daten auf die Kolonienanzahl der unbestrahlten Kontrollen bezogen.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E.coli*-Zellen

Die Kultivierung der *E.coli*-Zellen erfolgte aerob in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten (Abschnitt 2.10). Alle Arbeiten mit *E.coli*-Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Für Übernachtskulturen wurde 2 ml LB-Medium mit Einzelkulturen von LB-Agar-Platten inokuliert und bei 37°C und 180 U/min unter guter Belüftung über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) wurden für die Resistenzselektion zugesetzt. Für die Kultivierung auf festen Nährböden wurden Einzelkolonien oder Transformationsansätze in Petrischalen mit LB-Agar, welche ebenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt worden waren, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. LB-Agar-Platten mit Einzelkolonien konnten bei 4°C für etwa einen Monat gelagert werden.

3.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli*-Zellen

Die Kompetenz von Bakterienzellen ist die Fähigkeit, doppelsträngige DNA-Moleküle aus der Umgebung an der Oberfläche zu binden. Da *E.coli*-Zellen nicht auf natürliche Weise kompetent vorliegen, wurden sie in dieser Arbeit mittels der Calciumchlorid-Methode chemisch-kompetent gemacht. Für die Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen wurde die Hauptkultur (400 ml LB-Medium) mit einer Übernachtskultur (Abschnitt 3.2.1) angeimpft und inkubiert (37°C, 180 U/min), bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,375 erreicht wurde. Die Bakteriensuspension wurde nun in Zentrifugenbecher überführt und es erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Durch Zentrifugation (4°C, 1600 g, 7 min) wurden die Zellen pelletiert und vorsichtig in 40 ml kalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nun wurden die Bakterienzellen erneut durch Zentrifugation (4°C, 1100 g, 5 min) pelletiert. Die sedimentierten Bakterien wurden wieder schonend in 40 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde erneut zentrifugiert (4°C, 1100 g, 5 min), bevor das Zellpellet in einem Volumen von 8 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen wurde. Die nun chemisch kompetenten *E.coli*-

Bakterien wurden in 200 μl Aliquots verteilt, mittels Flüssigstickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Die Kompetenz der Bakterienzellen wurde durch Transformation (Abschnitt 3.2.3) überprüft.

3.2.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung freier, löslicher DNA in ein Bakterium, wobei man sich die Kompetenz des Bakteriums zunutze macht. Pro Reaktion wurde ein Aliquot des jeweiligen chemisch-kompetenten *E. coli*-Bakterienstammes auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 20 μl des Ligationsansatzes (Abschnitt 3.3.9) bzw. 500 μg der Plasmid-DNA (Abschnitt 2.6) wurden die Bakterien 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C wurden die Bakterien erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurde 1 ml 37°C -warmes LB-Medium (Abschnitt 2.10) zugesetzt und für 1 Stunde bei 37°C und 180 U/min inkubiert. Der Transformationsansatz wurde schließlich auf LB-Agarplatten mit Ampicillin bzw. Kanamycin (Abschnitte 2.6 und 2.10) ausgestrichen und über Nacht im Zellinkubator bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

3.2.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Minipräparation

Kleine Mengen Plasmid-DNA (bis 7 μg) wurden mithilfe des *GeneJETTM Plasmid Miniprep Kits* (Abschnitt 2.11) aus rekombinanten *E. coli*-Zellkulturen aufgereinigt, welches auf der DNA-Bindung an eine Silikamembran basiert. Die Plasmide wurden aus einer 2 ml-Übernachtskultur in LB-Medium (Abschnitt 3.2.1) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurden mithilfe des Spektrophotometers *Nanodrop ND-1000* überprüft (Abschnitt 3.3.2).

Midipräparation

Um große Mengen Plasmid-DNA (bis 1 mg) zu isolieren, wurde das *NucleoBond^R Xtra Midi Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wird das Prinzip der Anionenaustausch-Chromatographie angewendet. Für eine Midipräparation wurden 200 ml einer Übernachtskultur (Abschnitt 3.2.1) in LB-Medium eingesetzt und die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurden mithilfe des Spektrophotometers *Nanodrop ND-1000* überprüft (Abschnitt 3.3.2).

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Alkoholpräzipitation von Nukleinsäuren

Die Alkoholpräzipitation wird zur Reinigung und Konzentrierung von DNA bzw. RNA genutzt. Nukleinsäuren in Ethanol oder Isopropanol bilden in Gegenwart von monovalenten Kationen einen unlöslichen Niederschlag, der sich durch Zentrifugation abtrennen lässt [120]. Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 des Volumens Natriumacetat und dem doppelten des Volumens kalten 100 % Ethanol 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde 30 Minuten bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit $500\ \mu\text{l}$ 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in $20\ \mu\text{l}$ TE-Puffer (Abschnitt 2.15) resuspendiert.

3.3.2 Bestimmung der Konzentration von DNA in Lösung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit wurde mittels photometrischer Bestimmung der Absorption bei 260 nm an dem Spektrophotometer *Nanodrop ND-1000* mit einem Messvolumen von $2\ \mu\text{l}$ durchgeführt. Der Quotient der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionsmaxima ($A_{260\ \text{nm}}/A_{280\ \text{nm}}$) wurde ermittelt, um die Reinheit der DNA zu überprüfen. Bei einer proteinfreien DNA-Präparation sollte sich der ermittelte Quotient im Bereich von 1,8 bis 2,0 befinden, da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt.

3.3.3 Isolation von RNA aus Zellkulturen

Zelluläre Gesamt-RNA wurde mithilfe der *6100 Nucleic acid Prepstation* im *RNACell*-Programm unter Verwendung der vom Hersteller angegebenen kommerziellen Puffer (Abschnitt 2.15) isoliert. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, in 24-Loch-Platten ausgebracht (Tabelle 3.1). Nach Transfektion (Abschnitt 3.1.4) und gegebenenfalls 16-stündiger hypoxischer Induktion (Abschnitt 3.1.5) wurden die Zellen mit PBS-Puffer (Abschnitt 2.15) gewaschen und in $500\ \mu\text{l}$ 1x Lysepuffer in PBS-Puffer (Abschnitt 2.15) lysiert. Die RNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

3.3.4 Reverse Transkription von RNA

Die zelluläre RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das *Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Abschnitt 2.11) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Inkubation des Präinkubations- und Reaktionsansatzes erfolgte im Thermocycler *T3*. Der folgende Präinkubationsansatz

für die cDNA-Synthese wurde für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert:

Tabelle 3.6: Präinkubationsansatz für die cDNA-Synthese.

Bestandteil	Menge
Oligo(dT) ₂ (50 μM)	1 μl
dNTP Mix (10 mM)	2 μl
zelluläre Gesamt-RNA	9 μl

Im Folgenden wurden 8 μl des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese zugegeben und für 1 Stunde bei 55 °C inkubiert.

Tabelle 3.7: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

Bestandteil	Menge
<i>cDNA Synthesis</i> Puffer (5x)	4 μl
DTT (0,1 M)	1 μl
DEPC-H ₂ O	1 μl
<i>RNaseOut</i> TM	1 μl
<i>Cloned AMV RT</i>	1 μl

Durch eine 10-minütige Inkubation bei 85 °C wurde die cDNA-Synthesereaktion gestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde 1:1 mit DEPC-H₂O (Abschnitt 2.15) verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der *in vitro*-Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte, die zwischen zwei bekannten Oligonukleotidsequenzen (Primern) liegen, und beruht auf einem sich wiederholenden Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Hybrdisierung und Elongation [141]. Die Standard-PCR wurde nach Angaben des Herstellers mit der *Dream Taq*TM *Green* DNA-Polymerase (Abschnitt 2.14) im Thermocycler *Primus 96^{plus}* durchgeführt (Tabellen 3.8 und Tabelle 3.9) und diente der Amplifikation von Klonierungsfragmenten. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.5 beschrieben und wurden anhand der kodierenden DNA-Sequenzen konzipiert.

Tabelle 3.8: Reaktionsansatz für Standard-PCR.

Komponente	Menge
<i>Dream TaqTM Green</i> Puffer (10x)	5 μ l
dNTP Mix, je 10 mM	1 μ l (je 0,2 mM)
Oligonukleotid f (10 μ M)	1 μ l
Oligonukleotid r (10 μ M)	1 μ l
Plasmid-DNA (10 ng/ μ l)	1 μ l
<i>Dream TaqTM Green</i> DNA-Polymerase	0,5 μ l
H ₂ O	9 μ l

Tabelle 3.9: Standard-PCR-Programm.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	2 min	1
95 °C	30 sec	
Tm-5	30 sec	35
72 °C	1 min/kb	
72 °C	10 min	1

3.3.6 Quantitative *real-time* PCR

Die Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der initial eingesetzten Kopienanzahl des untersuchten Gens. Die Expression der HIF-1 α -Zielgene Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Monocarboxylattransporter 4 (MCT4) und Glukosetransporter 1 (GLUT1) wurde analysiert. Die qRT-PCR wurde mit dem *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix* (Abschnitt 2.14) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Tabelle 3.10 und Tabelle 3.13). Die für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.5 aufgeführt und wurden mithilfe der entsprechenden mRNA-Sequenzen und dem Programm *Primer Express^R* (Abschnitt 2.16) konzipiert. Pro Reaktionsansatz wurden jeweils 2 μ l cDNA-Lösung (Abschnitt 3.3.4) eingesetzt. Als Referenz wurde jeweils eine genspezifische Standardreihe mit 10³-10⁷ Kopien des jeweiligen Zielgens mitgeführt. Anhand dieser konnte für jede Probe die eingesetzte Kopienzahl des Zielgens errechnet werden. Die Messwerte wurden auf die Expression des konstitutiv exprimierten β -Aktin-Gens normiert.

Tabelle 3.10: Reaktionsansatz für qRT-PCR.

Bestandteil	Menge
<i>Platinum SYBR Green qPCR Supermix</i>	12,5 μ l
Oligonukleotid f (10 μ M)	0,75 μ l
Oligonukleotid r (10 μ M)	0,75 μ l
cDNA	2 μ l
H ₂ O	9 μ l

Tabelle 3.11: qRT-PCR-Programm mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.

Temperatur	Zeit	Zyklen
50 °C	2 min	1
95 °C	2 min	
95 °C	15 sec	40
60 °C	1 min	
95 °C	15 sec	1
60 °C	20 sec	1
95 °C	15 sec	1

3.3.7 Sequenzgerichtete Mutagenese

Die sequenzgerichtete Mutagenese dient der gezielten Einführung von Mutationen in DNA-Sequenzen. Das in dieser Arbeit verwendete *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Abschnitt 2.11) basiert auf dem Prinzip der PCR-vermittelten Mutagenese, wobei die Sequenzveränderungen durch Oligonukleotide eingeführt werden, welche die Mutation tragen [76]. Die Oligonukleotide hybridisieren mit der Ausgangs-DNA und dienen der verwendeten DNA-Polymerase als Primer für die Elongation des DNA-Stranges. Die sequenzgerichtete Mutagenese wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die für die Mutagenese-PCR verwendeten Oligonukleotide (Abschnitt 2.5) wurden mithilfe der entsprechenden DNA-Sequenz und des Programmes *QuikChange^R Primer Design* (Abschnitt 2.16) entworfen. Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels DNA-Sequenzierung (Abschnitt 3.3.10) überprüft.

Tabelle 3.12: Reaktionsansatz für Mutagenese-PCR.

Bestandteil	Menge
<i>QuikChange Lightning Reaction</i> Puffer (10x)	5 μ l
Oligonukleotid f (10 μ M)	1 μ l
Oligonukleotid r (10 μ M)	1 μ l
Plasmid-DNA (10 ng/ μ l)	3 μ l
<i>QuikChange Lightning Quick Solution</i>	1,5 μ l
H ₂ O	38,5 μ l

Tabelle 3.13: Programm für Mutagenese-PCR.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	2 min	1
95 °C	20 sec	
60 °C	10 sec	18
68 °C	30 sec/kb	
68 °C	5 min	1

3.3.8 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für die Auftrennung von langkettigen Nukleinsäuren verwendet. Die Agarosekonzentration wurde dabei an die Größe der langkettigen Nukleinsäuren angepasst. Für DNA-Fragmente zwischen 100 und 2000 bp wurde eine Agarosekonzentration von 2 % eingesetzt, während Nukleinsäureketten mit einer Länge von 500-10000 bp mithilfe von 1-%igen Agarose-Gelen analysiert wurden. Die Agarose-Gele hatten eine Größe von 70 x 80 x 5 mm. Die Agarose wurde unter Aufkochen in 1x TAE-Puffer (Abschnitt 2.15) gelöst und mit 2 % *DNA StainG* versetzt. *DNA StainG* ist ein Farbstoff, der bei Bindung an Nukleinsäuren ein Fluoreszenzsignal emittiert. Dadurch konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente im Agarose-Gel in der Geldokumentationsanlage *EASY Win32* analysiert werden. Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer (Abschnitt 2.15) für Agarose-Gele versetzt. Auf die Zugabe von Ladepuffer konnte verzichtet werden, wenn PCR-Produkte oder Produkte eines Restriktionsverdau aufgetrennt wurden, für deren Amplifikation bzw. Restriktionsverdau zuvor die Puffer *DreamTaqTM Green* bzw. *FastDigest^R Green* (Abschnitt 2.15) verwendet wurden. Die Gelelektrophorese wurde in einer horizontalen Gelkammer bei 10 V/cm² in 1x TAE-Puffer (Abschnitt 2.15) unter Verwendung eines

adäquaten Größenmarkers (Abschnitt 2.14) durchgeführt.

3.3.9 Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten

Restriktionsverdau von DNA-Plasmiden

Doppelsträngige DNA wurde durch Hydrolyse mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen für Klonierungszwecke bearbeitet. An definierten Positionen wurden beide DNA-Stränge gespalten, wodurch in der Regel DNA-Fragmente mit 3'-Hydroxylenden und 5'-Phosphatenden entstehen [120]. Der Restriktionsverdau wurde mithilfe verschiedener *FastDigestTM* Restriktionsendonukleasen (Abschnitt 2.14) in einem 20 μ l Reaktionsansatz nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden 1000 ng der Vektor- und Insert-DNA mit 1 μ l der jeweils angegebenen Restriktionsendonuklease mit *FastDigest^R Green* Puffer (Abschnitt 2.15) für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsendonukleasen wurden mithilfe der DNA-Elution aus Agarose-Gelen (Abschnitt 3.3.9) entfernt.

DNA-Elution aus Agarose-Gelen

Durch Gelelution wurden PCR-Produkte (Abschnitt 3.3.5) oder DNA-Fragmente eines Restriktionsverdaus (Abschnitt 3.3.9) für eine Klonierung aufgereinigt. Die Nukleotide wurden dafür, wie unter Abschnitt 3.3.8 beschrieben, mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden die aufzureinigenden Banden identifiziert und ausgeschnitten. Die Banden wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und mithilfe des *GeneJETTM Gel Extraction Kit* (Abschnitt 2.11) eluiert.

Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Inkubation linearisierter Plasmide mit alkalischer Phosphatase der Eismeergarnele (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP) (Abschnitt 2.14) erfolgte, um die 5'-Phosphatenden der linearisierten Plasmide zu hydrolysieren und die Religation zu verhindern. Die Dephosphorylierungs-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die katalytische Aktivität der SAP wurde durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

Ligation von DNA

Die T4 DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verbindung zwischen Vektor-Plasmid und Insert-Fragment und dient der Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen benachbarten 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatgruppen [198]. Im Rahmen einer Klonierung wurde die Ligation im Anschluss an die DNA-Elution aus Agarose-Gelen (Abschnitt 3.3.8) und die Dephosphorylierung des 5'-Phosphatendes linearisierter

Plasmide (Abschnitt 3.3.9) durchgeführt. Die Effizienz der Ligation ist abhängig von dem Verhältnis der Anzahl der Fragmenttermini zur Anzahl der Vektortermini. Für jeden Ligationsansatz wurden 50 ng der linearisierten Vektor-DNA verwendet. Die einzusetzende Menge der Fragment-DNA wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}}[\text{ng}] = \text{Masse}_{\text{Vektor}}[\text{ng}] \times 5 \times \text{Länge}_{\text{Fragment}}[\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}}[\text{bp}]$$

Der Ligationsansatz wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 μl über Nacht bei 4°C inkubiert. Schließlich wurde der Ligationsansatz komplett transformiert (Abschnitt 3.2.3), positive Klone durch Restriktionsverdau (Abschnitt 3.3.9) und anschließende Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.3.8) selektiert und mittels DNA-Sequenzierung (Abschnitt 3.3.10) verifiziert.

3.3.10 DNA-Sequenzierung

Die Protein-kodierenden Sequenzen der durch Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten (Abschnitt 3.3.9) oder sequenzgerichtete Mutagenese (Abschnitt 3.3.7) generierten Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft. Die für die DNA-Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide (Abschnitt 2.5) wurden entweder anhand der entsprechenden DNA-Sequenz entworfen oder von der Firma GATC Biotech zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen wurden mithilfe des Programmes *Vector NTI AdvanceTM 9.0* (Abschnitt 2.16) ausgewertet. Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech durchgeführt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Zellysaten und aufgereinigten Proteinen wurde mithilfe der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt [17]. Sie basiert darauf, dass der in der Bradford-Reagenz enthaltende Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G 250 durch die Komplexbildung mit Proteinen in seiner blauen Sulfonatform stabilisiert wird und sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt. Eine Standardreihe mit BSA (0 - 10,5 μg) und die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden in einer 24-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein Endvolumen von 21 μl verdünnt. Nach Zugabe von 200 μl Bradford-Reagenz (Abschnitt 2.15) und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Absorption bei 595 nm im Luminometer *SLT Rainbow* gemessen und die Proteinkon-

zentration der jeweiligen Proteinlösung ermittelt werden.

3.4.2 Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Gesamtzelllysate wurden, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, vorbereitet und mit 4x Ladepuffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) (Abschnitt 2.15) versetzt. Das Säulenmaterial der Bindungsassays (Abschnitt 3.4.11) wurde ebenfalls in der entsprechenden Menge 4x Ladepuffer für SDS-Page (Abschnitt 2.15) aufgenommen. Alle Proben für die SDS-Page (Abschnitt 3.4.3) wurden für 5 Minuten bei 96 °C denaturiert.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Page erfolgte in einem diskontinuierlichen System nach Laemmli [109] und diente der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse. Die dabei verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele hatten eine Größe von 83 x 73 x 1,5 mm und setzten sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen (Tabelle 3.14). Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wurde entsprechend der Größe des zu untersuchenden Proteins gewählt. Als Laufpuffer diente 1x Elektrophoresepuffer für SDS-Page (Abschnitt 2.15). Die Proben wurden vor dem Auftrag denaturiert (Abschnitt 3.4.2). Pro Probe wurden 20 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelkammer bei 15 V/cm unter Verwendung eines adäquaten Größenmarkers (Abschnitt 2.14). Die Analyse der aufgetrennten Proteine erfolgte mithilfe der konventionellen Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) oder der Western-Blot-Analyse (Abschnitt 3.4.5).

3.4.4 Coomassie-Färbung

Proteine wurden in SDS-Polyacrylamid-Gelen mithilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G 250 sichtbar gemacht. Das Gel wurde zu diesem Zweck für 20 Minuten in Coomassie-Färbelösung (Abschnitt 2.15) geschwenkt und anschließend für mindestens 3 Stunden mit Coomassie-Entfärbelösung (Abschnitt 2.15) entfärbt. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird Coomassie Brilliant Blau G 250 in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert, sodass Proteine als blaue Banden identifiziert werden konnten. Die Auswertung der Gele fand in der Geldokumentationskammer *EASY Win32* statt.

Tabelle 3.14: Sammel- und Trenngel-Zusammensetzung für die SDS-Page.

Bestandteil	Sammelgel 4,0 % (v/v)	Trenngel 7,5 % (v/v)	Trenngel 10,0 % (v/v)	Trenngel 12,5 % (v/v)
H ₂ O	6,1 ml	12,13 ml	10,25 ml	7,95 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	1,3 ml	6,25 ml	8,35 ml	10,43 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	6,25 ml	6,25 ml	6,25 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml	-	-	-
10 % (w/v) SDS	250 μ l	250 μ l	250 μ l	250 μ l
10 % (w/v) APS	125 μ l	125 μ l	125 μ l	125 μ l
TEMED	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l

3.4.5 Western-Blot-Analyse

Elektrotransfer von Proteinen

Der Elektrotransfer von Proteinen von einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine *Amersham HybondTM ECL* Nitrocellulose-Membran erfolgte in einem vertikalen Elektrobloetter im *semi-dry* Verfahren. Die Nitrocellulose-Membran und das Blotpapier wurden in 1x Transferpuffer (Abschnitt 2.15) äquilibriert. Das Gel wurde auf der Nitrocellulose-Membran platziert und zwischen jeweils 3 Lagen Blotpapier nach folgender Anordnung bei 1 mA/cm² für 60 Minuten geblottet:

(+) Kathode

3 Lagen in 1x Transferpuffer getränktes Blotpapier

Nitrocellulose-Membran

SDS-Polyacrylamid-Gel

3 Lagen in 1x Transferpuffer getränktes Blotpapier

(-) Anode

Immunologische Detektion von Proteinen

Die immunologische Detektion der immobilisierten Proteine auf einer Nitrocellulose-Membran erfolgte mithilfe von antigenspezifischen Primär- und enzymgekoppelten Sekundärantikörpern (Abschnitt 2.12). Nach dem Elektrotransfer wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst für 1 Stunde in Blockierungspuffer (Abschnitt 2.15) inkubiert, um freie, unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran mit dem in Blockierungspuffer verdünnten Primärantikörper (Tabelle 3.15) auf einem Schüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zur

Entfernung von unspezifisch gebundenen Primärantikörpern wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal mit PBS-Puffer (Abschnitt 2.15) gewaschen und für 1 Stunde mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper (Tabelle 3.16) inkubiert. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Der indirekte Proteinnachweis erfolgte mithilfe der *Amersham ECL PlusTM Western Blotting*-Reagenz (Abschnitt 2.11) nach Angaben des Herstellers. Das angewendete Verfahren basiert auf der Umsetzung von Acridin in Acridiniumester, der mit Peroxid reagiert, wobei ein chemilumiszendes Signal emittiert wird. Die Lumineszenz wurde durch Exposition eines Röntgenfilmes auf der Nitrocellulose-Membran detektiert und manuell in einer Dunkelkammer entwickelt. Zur Quantifizierung der Banden wurde das Programm *Image J* (Abschnitt 2.16) verwendet. Alle Proben wurden auf die entsprechenden Proteinmengen des konstitutiv exprimierten Gens Lamin A/C normalisiert.

Tabelle 3.15: Primärantikörper-Verdünnungen in Blockierungspuffer.

Primärantikörper	Verdünnung in Blockierungspuffer
Anti-HIF-1 α (Maus, monoklonal)	1 : 1000
Anti-Penta-His (Maus, monoklonal)	1 : 1000
Anti-Lamin A/C (Ziege, polyklonal)	1 : 1000
Anti-PHD2 (Kaninchen, polyklonal)	1 : 500

Tabelle 3.16: Sekundärantikörper-Verdünnungen in Blockierungspuffer.

Antikörper	Verdünnung in Blockierungspuffer
HRP-Anti-Kaninchen (Ziege, polyklonal)	1 : 2000
HRP-Anti-Maus (Ziege, polyklonal)	1 : 2000
HRP-Anti-Ziege (Kaninchen, polyklonal)	1 : 2000

3.4.6 Überexpression von GST- und His-Fusionsproteinen

Glutathion-S-Transferase (GST)- und Polyhistidin (His)-Fusionsproteine wurden in den *E. coli*-Expressionsstämmen BL21/pREP4 und JM101 (Abschnitt 2.9) überexprimiert, um sie anschließend anhand der GST- oder His-Markierung und des entsprechenden Säulenmaterials aufzureinigen. Für die Überexpression wurde mit dem jeweiligen Antibiotikum versetztes LB-Medium (Abschnitt 2.10) verwendet. Das je-

weilige Plasmid (Abschnitt 2.6) wurde zunächst, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, in die *E. coli*-Bakterien transformiert. Der Transformationsansatz wurde für die Inokulation einer 50 ml-Übernachtskultur verwendet (37 °C, 200 U/min). Mit der Übernachtskultur wurde am nächsten Tag die 800 ml-Überexpressionskultur bis zu einer $OD_{600nm}=0,1$ inokuliert. Diese wurde bei 37 °C und 200 U/min inkubiert, bis eine $OD_{600nm}=1,0$ erreicht wurde und die Expression des jeweiligen Fusionsproteins durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert werden konnte. Zusätzlich wurden der Überexpressionskultur 2 % Ethanol zugefügt, um die Ausbildung von intrazellulären Einschlusskörperchen zu inhibieren und die Löslichkeit des Fusionsproteins zu erhöhen. Die Bakterienkultur wurden im Anschluss bei 30 °C und 200 U/min für 4-16 Stunden bebrütet. Durch SDS-Page (Abschnitt 3.4.3) und anschließende Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) wurde die Überexpression der Fusionsproteine überprüft. Die *E. coli*-Bakterien wurden durch 15-minütige Zentrifugation (4 °C, 1600 g) geerntet und bei -20 °C bis zur Proteinaufreinigung (Abschnitte 3.4.7, 3.4.8 und 3.4.9) gelagert.

3.4.7 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die pelletierten *E. coli*-Bakterien mit überexprimiertem GST-Fusionsprotein (Abschnitt 3.4.6) wurden in 20 ml/L PBS-KMT (Abschnitt 2.15) resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und sonifiziert (25 % *Output*, 5 Min). Anschließend wurde die Proteinlösung durch Zentrifugation (4 °C, 20000 g) von Zelldebris und unlöslichen Proteinen separiert. Die Proteinlösung wurde auf 3 ml Säulenmaterial *Glutathion SepharoseTM 4B* gegeben, das zuvor durch dreimalige Waschzentrifugation (4 °C, 1000 g, 5 min) äquilibriert worden war. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an das Säulenmaterial erfolgte durch Inkubation auf einer rotierenden Plattform bei 4 °C über Nacht. Die Sepharose wurde zweimal mit PBS-KMT gewaschen. Das Säulenmaterial wurde schließlich in 15 ml PBS-KM (Abschnitt 2.15) resuspendiert, auf eine Polypropylensäule gebracht und erneut zweimal mit PBS-KM gewaschen. Die Elution des GST-Fusionsproteins erfolgte durch sechsmalige Inkubation des sedimentierten Säulenmaterials in 1 ml Elutionspuffer für GST-Fusionsprotein-Aufreinigung (Abschnitt 2.15). Die Eluatfraktionen wurden dabei in Reaktionsgefäße aufgenommen und anschließend auf ihren Proteingehalt überprüft. Dafür wurde je 1 μ l des Eluats auf eine Nitrocellulose-Membran überführt, die im Anschluss in *Ponceau S*-Lösung inkubiert wurde, um proteinhaltige Fraktionen zu identifizieren. Die proteinhaltigen Eluatfraktionen wurden in einem Dialyseschlauch vereint und über Nacht in Dialysepuffer für GST-Fusionsprotein-Aufreinigung (Abschnitt 2.15) dialysiert. Die dialysierte Proteinlösung wurde in einem Ultrafiltrationsröhrchen *Centriprep* nach Angaben des Herstellers eingeeengt, aliquotiert, in flüssigem

Stickstoffschockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurde durch SDS-Page (Abschnitt 3.4.3) und anschließende Western-Blot-Analyse (Abschnitt 3.4.5) bzw. Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) überprüft. Der Proteingehalt wurde mit der Proteinbestimmung nach Bradford (Abschnitt 3.4.1) untersucht.

3.4.8 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen

Für die Aufreinigung von His-Fusionsproteinen wurden die pelletierten *E.coli*-Bakterien mit überexprimiertem His-Fusionsprotein (Abschnitt 3.4.6) in Sonifikationspuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Abschnitt 2.15) resuspendiert, für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und sonifiziert (25 % *Output*, 5 Min). Durch Zentrifugation wurden Zelldebris und unlösliche Proteine von der die His-Fusionsproteine enthaltenden Proteinlösung separiert (4°C , 15000 g, 2 Std). Währenddessen wurden 3 ml Säulenmaterial *Talon^R* durch Waschzentrifugation mit Sonifikationspuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Abschnitt 2.15) äquilibriert (4°C , 1000 g, 5 min). Der das His-Fusionsprotein enthaltende Überstand wurde mit dem äquilibrierten Säulenmaterial über Nacht auf einer rotierenden Plattform bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Säulenmaterial einmal mit Sonifikationspuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Abschnitt 2.15) gewaschen und auf eine Polypropylen-säule gebracht. Das Säulenmaterial wurde mit Waschpuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Abschnitt 2.15) in 4 Fraktionen zu je 1 ml gewaschen, bevor die His-Fusionsproteine über einen Imidazol-Gradienten eluiert wurden. Die Elution erfolgte durch 4 Fraktionen Waschpuffer zu je 1 ml mit 50 mM, 100 mM, 150 mM und 250 mM Imidazol. Der Proteingehalt der Eluatfraktionen wurde über SDS-Page (Abschnitt 3.4.3) und anschließende Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) analysiert. Die proteinhaltigen Eluatfraktionen wurden in einem Dialyseschlauch vereint und über Nacht in Dialysepuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Abschnitt 2.15) dialysiert. Die dialysierte Proteinlösung wurde in einem Ultrafiltrationsröhrchen *Centriprep* nach Angaben des Herstellers eingengt und aliquotiert. Nachdem der Proteingehalt mithilfe der Proteinbestimmung nach Bradford (Abschnitt 3.4.1) bestimmt wurde, konnten die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

3.4.9 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen aus Einschlusskörperchen

Die exzessive Überexpression (Abschnitt 3.4.6) des Fusionsproteins His-PHD3 führte zur Aggregation des Fusionsproteins im Cytoplasma und zur Ausbildung von

intrazellulären Einschlusskörperchen. Die Aufreinigung des sich in Einschlusskörperchen befindlichen Fusionsproteins kann nicht nach der konventionellen Aufreinigung von His-Fusionsproteinen erfolgen, sondern wird über die Anwendung hochmolarer Urea-Puffer erreicht. Im Anschluss an die Aufreinigung von His-PHD3 aus den Einschlusskörperchen erfolgt zusätzlich die konventionelle Aufreinigung von His-Fusionsproteinen (Abschnitt 3.4.8). Bei der Aufreinigung aus Einschlusskörperchen wird der Überstand nach jedem Zentrifugationsschritt gesammelt und bis zur Analyse des Proteingehalts der verschiedenen Fraktionen bei 4 °C gelagert. Die pelletierten *E. coli*-Bakterien wurden in 10 ml Lysispuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Einschlusskörperchen) (Abschnitt 2.15) resuspendiert und sonifiziert (25 % *Output*, 5 Min). Durch Zentrifugation wurde das sich in Einschlusskörperchen befindliche Protein pelletiert (4 °C, 4000 g, 25 min). Das Pellet wurde im Folgenden mit 10 ml Waschpuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Einschlusskörperchen) (Abschnitt 2.15) für 1 Stunde inkubiert, wobei der Ansatz alle 15 Minuten invertiert und anschließend zentrifugiert wurde (4 °C, 4000 g, 25 min). Das Pellet wurde zweimal in Denaturierungspuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Einschlusskörperchen) (Abschnitt 2.15) resuspendiert und durch Zentrifugation pelletiert (4 °C, 4000 g, 25 min). Der Proteingehalt der Überstandfraktionen wurde durch SDS-Page (Abschnitt 3.4.3) und anschließende Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) überprüft. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden in einem Dialyseschlauch vereint und über Nacht bei 4 °C in Dialysepuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Einschlusskörperchen) (Abschnitt 2.15) dialysiert. Im Anschluss erfolgte eine 90-minütige Dialyse in Sonifikationspuffer für His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Abschnitt 2.15), bevor die im Dialyseschlauch gesammelte Proteinlösung für die konventionelle Aufreinigung von His-Fusionsproteinen eingesetzt werden konnte.

3.4.10 Radioaktive Markierung von Proteinen mit [³⁵S]

Durch *in vitro* Transkription und Translation wurden Proteine radioaktiv mit dem Isotop [³⁵S] markiert, um eine Detektion durch Autoradiographie zu ermöglichen. Die *in vitro* Transkription und Translation erfolgte mithilfe des *TNT^R T7 Quick Coupled Transcription/Translation*-Systems (Abschnitt 2.11) nach Angaben des Herstellers. Neben [³⁵S]-Methionin wird dabei ein Kaninchen-Retikulozytenlysate verwendet, das die zur Transkription und Translation essentiellen Enzyme enthält. Die zu exprimierenden Gene mussten dafür in Plasmiden vorliegen, in denen sie unter der Kontrolle eines T7 Promotors stehen (Abschnitt 2.6). Die Reaktion wurde, wie im Folgenden beschrieben, angesetzt und für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert.

Tabelle 3.17: Reaktionsansatz für radioaktive Proteinmarkierung mit [³⁵S].

Komponente	Menge
Kaninchen-Retikulozytenlysat	20 μ l
Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l)	1 μ l
[³⁵ S]-Methionin (0,37 MBq/ μ l)	2 μ l
H ₂ O	9 μ l

3.4.11 Importin α/β -GST-Bindungsstudien

Um die Bindung von Proteinen an die Importin α -Isoformen 1, 3, 4, 5 und 7 und Importin β zu untersuchen, wurden *in vitro* Importin α -GST-Bindungsstudien durchgeführt. In dieser Arbeit wurden, neben den in diesem Institut bereits etablierten GST-Bindungsstudien mit radioaktiv-markierten Zielproteinen, GST-Bindungsstudien mit rekombinant aufgereinigter PHD3 erstmalig etabliert. Für die Bindungsstudien wurden die Importin α -Isoformen und Importin β als GST-Fusionsproteine zunächst überexprimiert (Abschnitt 3.4.6) und anschließend aufgereinigt (Abschnitt 3.4.7). Als Negativkontrolle wurde außerdem GST überexprimiert (Abschnitt 3.4.6) und aufgereinigt (Abschnitt 3.4.7). Zusätzlich wurden Importin β und gegebenenfalls Nukleoplasmin als His-Fusionsproteine überexprimiert (Abschnitt 3.4.6) und aufgereinigt (Abschnitt 3.4.8). Das zu untersuchende Protein wurde entweder *in vitro* transkribiert, translatiert und radioaktiv markiert (Abschnitt 3.4.10) oder als His-Fusionsprotein rekombinant aufgereinigt (Abschnitte 3.4.9 und 3.4.9). Für die GST-Bindungsstudien wurden zunächst 100 μ l des Säulenmaterials *Glutathion SepharoseTM 4B* in IP-Puffer (Abschnitt 2.15) äquilibriert (4 °C, 1200 g, 2 min) und in 800 μ l IP-Puffer aufgenommen. Zur Immobilisierung an das Säulenmaterial wurden 15 μ l der GST-Importin-Fusionsproteine und GST als Negativkontrolle über Nacht mit dem äquilibrierten Säulenmaterial auf einer rotierenden Plattform bei 4 °C inkubiert. Das Säulenmaterial wurde am nächsten Tag zweimal mit IP-Puffer gewaschen (4 °C, 1200 g, 2 min), um ungebundene GST-Importin-Fusionsproteine bzw. ungebundenes GST zu entfernen. Nun wurde das Säulenmaterial in 800 μ l IP-Puffer mit 2 mg/ml BSA aufgenommen und mit His-Importin β in 1,5-fach molarem Überschuss versetzt (mit Ausnahme des Importin β -GST-Ansatzes). Bei Verdrängungsexperimenten mit Nukleoplasmin wurde His-markiertes Nukleoplasmin in vierfach molarem Überschuss 30 Minuten vor Beginn der Bindungsreaktion zu den immobilisierten Importinen gegeben. Für die Spezifitätsuntersuchung mithilfe von Antikörpern wurden 5 μ g des Antikörpers, der das zu untersuchende Protein spezifisch

bindet, direkt zu der Bindungsreaktion gegeben. Für die Bindungsreaktion des zu untersuchenden Proteins wurden entweder 10 μl des radioaktiv-markierten Proteins (Abschnitt 3.4.10) oder 30 μg der rekombinant aufgereinigten His-PHD3 (Abschnitte 3.4.6, 3.4.8 und 3.4.9) zum Säulenmaterial gegeben und für 2 Stunden auf einer rotierenden Plattform bei 4 °C inkubiert. Wurde die parallele Bindung von zwei Proteinen mithilfe von GST-Bindungsstudien untersucht, so wurde zunächst eines der radioaktiv-markierten Proteine für 1 Stunde an dem Säulenmaterial vorinkubiert, bevor das zweite Protein für 2 weitere Stunden zugegeben wurde. Ungebundenes Protein wurde nach der Bindungsreaktion durch fünfmalige Waschzentrifugation mit IP-Puffer (4 °C, 1200 g, 2 min) entfernt, wobei das Säulenmaterial nach dem vierten Waschschrift in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Das Säulenmaterial wurde schließlich in 60 μl Ladepuffer für SDS-Page (Abschnitt 2.15) aufgenommen und 5 Minuten bei 96 °C denaturiert. Nach der Denaturierung wurden die Säulenmaterial enthaltenden Proben durch Zentrifugation (2 min, 1200 g) vom Säulenmaterial separiert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-Page (Abschnitt 3.4.3) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) detektiert. Das mit Coomassie gefärbte Polyacrylamid-Gel wurde getrocknet und mittels Autoradiographie (Abschnitt 3.4.12) analysiert. Für GST-Bindungsstudien mit rekombinant aufgereinigter PHD3 wurden die Importine durch Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) und die gebundenen Proteine durch Western-Blot-Analyse (Abschnitt 3.4.5) visualisiert.

3.4.12 Autoradiographie

Durch Autoradiographie wurden die radioaktiv-markierten Proteine mithilfe eines Laser-Scanners bildhaft sichtbar gemacht. Dazu wurden getrocknete Polyacrylamid-Gele nach der SDS-Page (Abschnitt 3.4.3) und Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) für 24 Stunden auf einer Bildplatte exponiert. Diese wurde anschließend im *Laser Scanner CR 35 Bio* ausgelesen und mit dem Programm *Image J* (Abschnitt 2.16) ausgewertet.

3.5 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. In den Auswertungen steht "n" für die Anzahl der unabhängig durchgeführten Wiederholungen, während "m" die Anzahl der insgesamt generierten Messwerte angibt. Die Auszählung der klonogenen Assays (Abschnitt 3.1.11) erfolgte verblindet, um Beeinflussbarkeiten auszuschließen. Die graphische und statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programmes *GraphPad*

Prism 5 (Abschnitt 2.16). Die Ergebnisse werden in dieser Arbeit als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) dargestellt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant behandelt: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die densitometrische Auswertung erfolgte mithilfe des Programmes *Image J* (Abschnitt 2.16). Für die Darstellung der Western-Blot-Analyse (Abschnitt 3.4.5) und der GST-Bindungsstudien (Abschnitt 3.4.11) sind jeweils repräsentative Bilder dargestellt. Die densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen bezieht sich jeweils auf mindestens drei unabhängig durchgeführte Experimente, während sich die densitometrische Auswertung der GST-Bindungsstudien auf das repräsentativ abgebildete Experiment bezieht.

Ergebnisse

4.1 Regulation des Kernimports der PHD3

4.1.1 Vorarbeiten

Die Lokalisierung im Zellkern, als Funktionsraum der Transkriptionsregulation, ist für Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung. Die geregelte nukleocytoplasmatische Verteilung von Proteinen ist daher ein effizienter Mechanismus, um die Genexpression an die zelluläre Umwelt anzupassen. In Vorarbeiten von Dr. Reinhard Depping [35] und Dr. Amrei Steinhoff [176] wurde die Bedeutung intrazellulärer Transportmechanismen für die Regulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) und der PHD (PHD1, -2 und -3) bereits teilweise charakterisiert. Wie in den Abschnitten 1.2.2 und 1.3.1 dargestellt, spielt der klassische Kernimport über die Importin α/β -Rezeptoren eine entscheidende Rolle beim Kerntransport von HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-1 β und PHD1. In den jeweiligen Aminosäuresequenzen der Proteine konnten zudem Transportsignale identifiziert werden.

Untersuchungen bezüglich der intrazellulären Lokalisierung der PHD3 ergaben, dass das Protein in beiden Kompartimenten lokalisiert ist [133]. Die absolute Molekülmasse der PHD3 ist mit 27 kDa so gering, dass ein passiver Kernimport des Proteins nicht auszuschließen ist [118]. In Vorarbeiten mithilfe von GST-Bindungsstudien konnte eine Bindung der PHD3 an verschiedene Importin α -Isoformen oder Importin β bislang nicht eindeutig detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Möglichkeit eines aktiv regulierten Kernimports der PHD3 anhand von GST-Bindungsstudien und fluoreszenzanalytischen Lokalisierungsstudien untersucht.

4.1.2 Spezifische Bindung der PHD3 an α -Importine

Da sich die Untersuchung des Importin α/β -Bindungsverhaltens von PHD3 in Vorarbeiten als schwierig herausstellte, sollten in dieser Arbeit GST-Bindungsstudien nach unterschiedlichen Protokollen durchgeführt werden. Zum einen wurde eine GST-Bindungsstudie mit rekombinant aufgereinigter PHD3 und Western-Blot-Analyse

etabliert, zum anderen wurde eine GST-Bindungsstudie mit radioaktiv-markierter PHD3 und anschließender Autoradiographie durchgeführt.

GST-Bindungsstudien mit rekombinant aufgereinigter PHD3

PHD3 wurde als His-Fusionsprotein in *E. coli*-Bakterien überexprimiert (Abschnitt 3.4.6) und anschließend durch His-Fusionsprotein-Aufreinigung (Abschnitte 3.4.8 und 3.4.9) isoliert. Die Proteinaufreinigung erfolgte anhand eines modifizierten Protokolls, da die überexprimierte PHD3 vorwiegend in Einschlusskörperchen akkumulierte. Die Durchführung der GST-Bindungsstudie erfolgte wie in Abschnitt 3.4.11 beschrieben. Für die Bindungsreaktion wurden 30 μg rekombinant aufgereinigte PHD3 verwendet, die Visualisation der Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.4.4) und Western-Blot-Analyse (Abschnitt 3.4.5). Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, wurde eine starke Bindung von PHD3 an Importin $\alpha 5$ detektiert. Darüber hinaus konnte eine sehr schwache Bindung zwischen PHD3 und Importin $\alpha 7$ bzw. Importin β visualisiert werden.

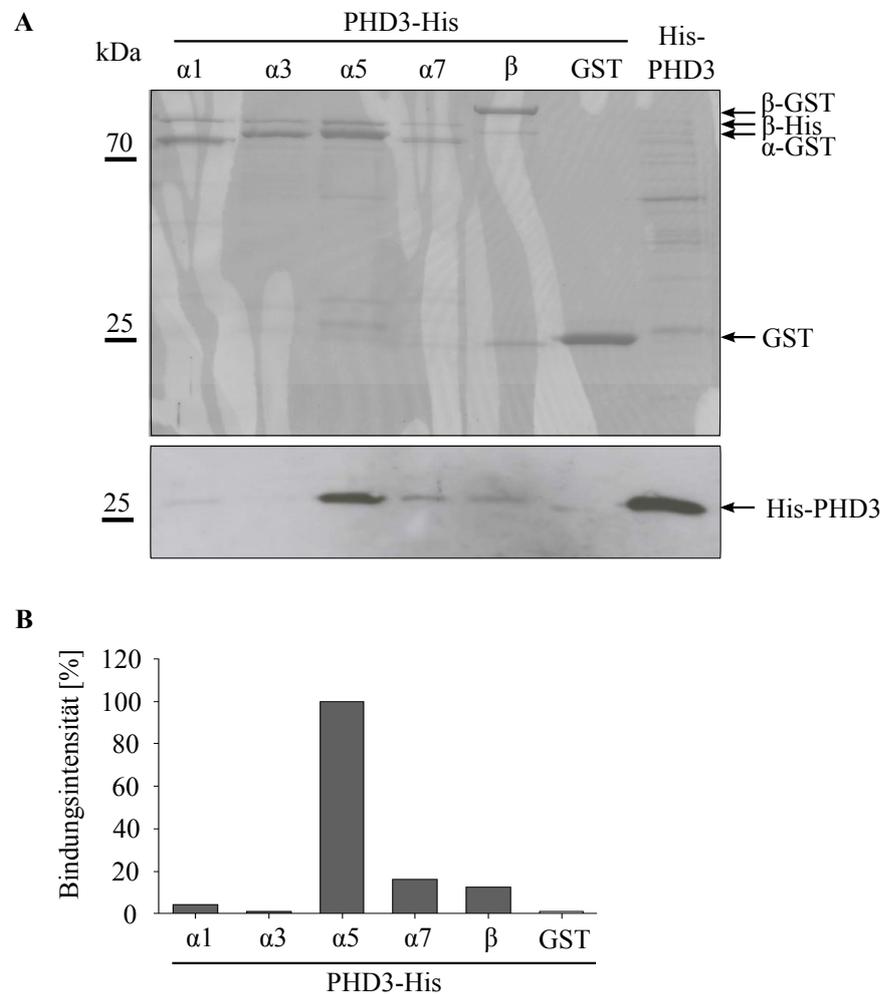


Abbildung 4.1: Importin α/β -Bindungsverhalten von rekombinant aufgereinigter PHD3. (A) His-markierte PHD3 wurde in *E.coli*-Zellen überexprimiert und rekombinant aufgereinigt. Pro Ansatz wurden 30 μg His-PHD3 eingesetzt. Durch Coomassie-Färbung (A, oben) wurden die immobilisierten Importine visualisiert, die Detektion des gebundenen His-PHD3 erfolgte mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen Anti-Penta-His-Antikörpers (A, unten). 10 μg des aufgereinigten His-PHD3 wurden als Positivkontrolle verwendet. Der Bindungsansatz mit immobilisiertem GST stellt die Negativkontrolle dar. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Bindungsstudien. (B) Die in der Bindungsstudie ermittelten Bindungsintensitäten zwischen PHD3 und den untersuchten Importinen wurden densitometrisch ausgewertet. Die Bindungsintensitäten wurden normalisiert auf die Intensität der PHD3/Importin $\alpha 5$ -Bindung (100 %). α , Importin α ; β , Importin β .

Die identifizierte Bindungsaktivität zwischen PHD3 und verschiedenen Kernimport-Rezeptoren weist möglicherweise darauf hin, dass PHD3 zusammen mit Importin α und Importin β einen trimeren Kernimport-Komplex ausbildet. Um die Spezifität dieser Protein-Protein-Interaktionen und die Ähnlichkeit zum Kernimport bereits identifizierter Substrate des Importin α/β -Systems zu untersuchen, wurden Verdrängungsexperimente unter Verwendung von rekombinant aufgereinigtem His-Nukleoplasmin durchgeführt. Nukleoplasmin besitzt ein NLS, das als Prototyp des *bipartite* NLS bezeichnet wird [158], und bindet mit hoher Affinität an verschiedene α -Importin-Isoformen [100]. Bei einer spezifischen Bindung der PHD3 an Importin $\alpha 5$ sollte die Bindung durch Zugabe des Nukleoplasmins in vierfach molarem Überschuss verdrängt bzw. abgeschwächt werden, wobei das Ausmaß der Inhibierung von der Intensität der PHD3/Importin $\alpha 5$ -Bindung abhängig ist. Die Spezifität der Bindung von PHD3 an Importin $\alpha 5$ wurde zusätzlich durch Zugabe eines Anti-PHD3-Antikörpers untersucht. Es wird angenommen, dass es durch die Zugabe des Anti-PHD3-Antikörpers zu sterischen Effekten kommt, die einen Einfluss auf die spezifischen Protein-Interaktionen der PHD3 haben können. Wie in Abbildung 4.2 dargestellt, konnte die Bindung von PHD3 an Importin $\alpha 5$ zunächst reproduziert werden. Nach Zugabe von Nukleoplasmin konnte keine Bindung zwischen PHD3 und Importin $\alpha 5$ detektiert werden, während eine starke Bindung von Nukleoplasmin an das untersuchte Importin visualisiert wurde. Die Bindung des spezifischen Anti-PHD3-Antikörpers an PHD3 führte zu einer starken Inhibierung der Intensität der PHD3/Importin $\alpha 5$ -Bindung. Zusammenfassend zeigen die in den Abbildungen 4.1 und 4.2 dargestellten Ergebnisse, dass rekombinant aufgereinigte PHD3 an Importin $\alpha 5$ bindet, und dass die Spezifität dieser Bindung durch Verdrängungs- und Antikörper-Spezifitätsuntersuchungen belegt werden kann.

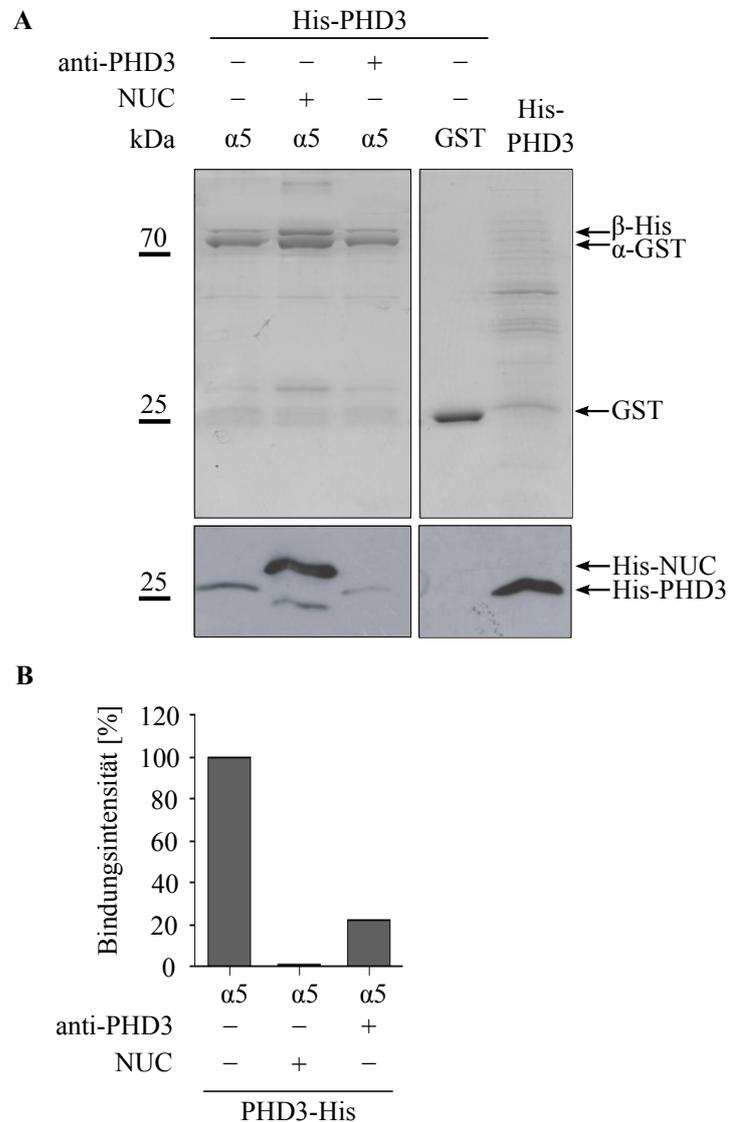


Abbildung 4.2: Importin $\alpha 5$ -Bindungsspezifität von rekombinant aufgereinigter PHD3. (A) PHD3 wurde als His-Fusionsprotein in *E.coli*-Bakterien überexprimiert und rekombinant aufgereinigt. 30 μg des His-PHD3-Fusionsproteins wurden pro Ansatz eingesetzt. Entsprechend der Angaben (+/-) erfolgte die Zugabe von 15,54 μg des als His-Fusionsprotein aufgereinigte Nukleoplasmins oder 5 μg des Anti-PHD3-Antikörpers. Die Auswertung erfolgte mittels Coomassie-Färbung (A, oben) und Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen Anti-Penta-His-Antikörpers (A, unten). 10 μg der aufgereinigten His-PHD3 wurden als Positivkontrolle verwendet, der Bindungsansatz mit immobilisiertem GST diente als Negativkontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Bindungsstudien. (B) Die in der Bindungsstudie ermittelten Intensitäten der Bindung zwischen PHD3 und Importin $\alpha 5$ wurden densitometrisch ausgewertet und dargestellt. Die Bindungsintensitäten wurden normalisiert auf die Intensität der PHD3/Importin $\alpha 5$ -Bindung (100 %), ohne Zugabe von Nukleoplasmin oder des Anti-PHD3-Antikörpers. α , Importin α ; β , Importin β ; NUC, Nukleoplasmin; Anti-PHD3, Anti-PHD3-Antikörper.

GST-Bindungsstudien mit radioaktiv-markierter PHD3

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt Importin $\alpha 5$ als spezifischer Bindungspartner von PHD3 identifiziert werden konnte (Abbildungen 4.1 und 4.2), sollte dieses Ergebnis durch GST-Bindungsstudien mit radioaktiv-markiertem Protein verifiziert werden. Dazu wurde PHD3 in Gegenwart von [^{35}S]-haltigem Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert. Die radioaktiv-markierte PHD3 wurde im Folgenden mit an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST bzw. den verschiedenen GST-Importin-Isoformen inkubiert. Importin-assoziierte PHD3 wurde durch Autoradiographie detektiert. Abbildung 4.3 bestätigt, dass [^{35}S]-PHD3 an Importin $\alpha 5$ und mit geringerer Intensität an Importin $\alpha 7$ sowie Importin β bindet. Zusätzlich können schwache Interaktionen zwischen PHD3 und den Importinen $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ visualisiert werden.

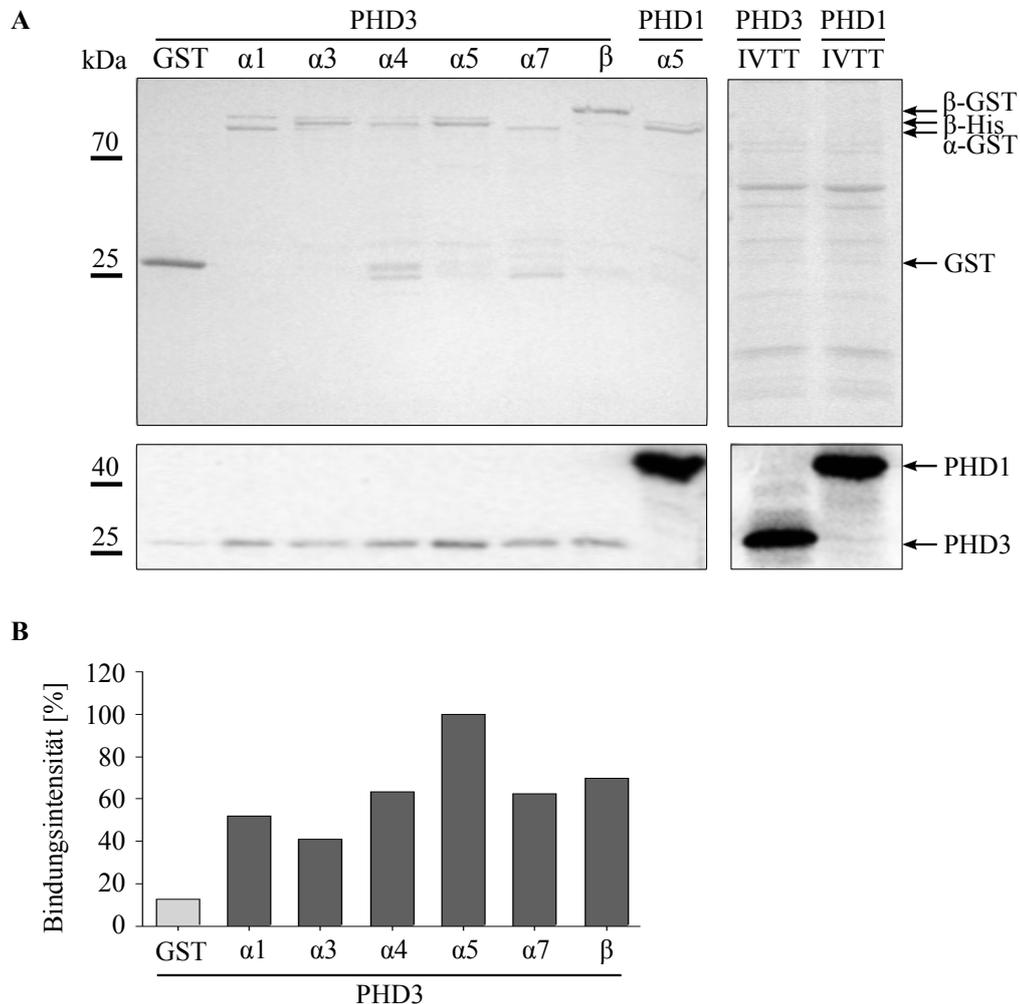
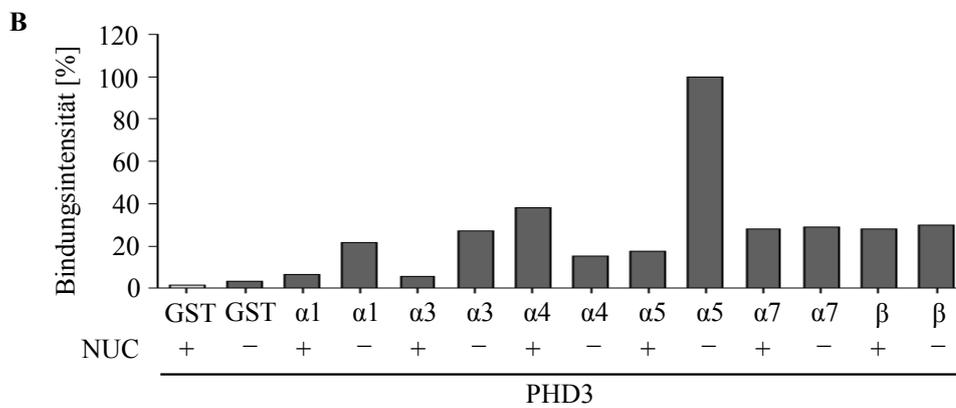
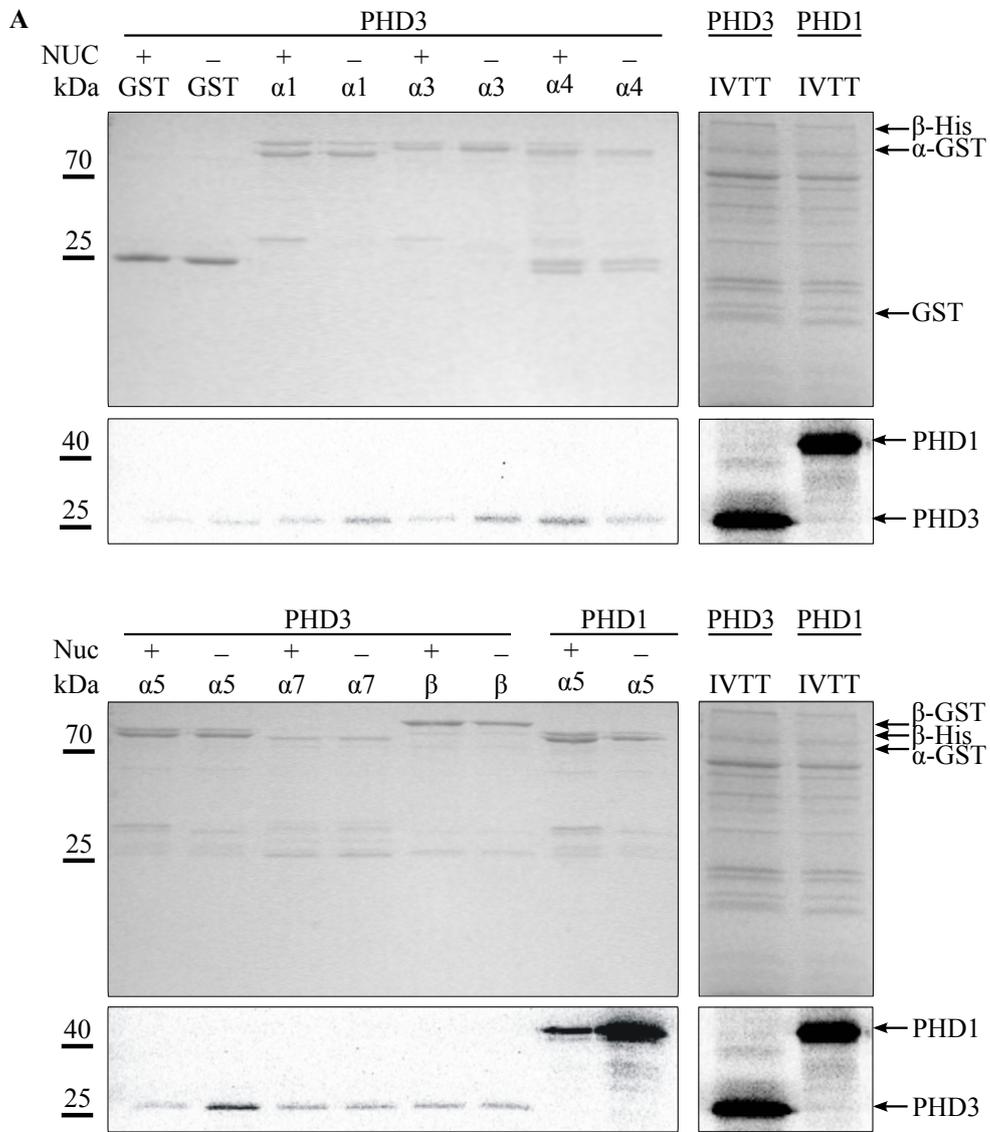


Abbildung 4.3: Analyse der Importin α/β -Bindungsverhalten von radioaktiv-markierter PHD3. (A) PHD3 wurde in Gegenwart von [^{35}S]-haltigem Methionin *in vitro* exprimiert und in GST-Bindungsstudien eingesetzt. Die Analyse der gebundenen Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbung (A, oben) und Autoradiographie (A, unten). Als Positivkontrolle diente der PHD1/Importin $\alpha 5$ -Bindungsansatz, der Bindungsansatz mit immobilisiertem GST stellt die Negativkontrolle dar. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Bindungsstudien. Zur Überprüfung der radioaktiven Proteinmarkierung wurden zusätzlich die [^{35}S]-markierten Proteine PHD3 und PHD1 aufgetragen. (B) Die in der Bindungsstudie ermittelten Bindungsintensitäten zwischen PHD3 und den untersuchten α -Importin-Isoformen wurden densitometrisch ausgewertet. Die Bindungsintensitäten wurden normalisiert auf die Intensität der PHD3/Importin $\alpha 5$ -Bindung (100 %). α , Importin α ; β , Importin β .

Schließlich sollte auch für die in diesen GST-Bindungsstudien ermittelten Bindungsaktivitäten die Spezifität durch Verdrängungsexperimente mit His-markiertem Nukleoplasmin bestätigt werden. Dazu wurden die Bindungsreaktionen, wie oben beschrieben, durch Zugabe von Nukleoplasmin, ein hochaffin bindendes Substrat verschiedener Importin α -Isoformen, modifiziert. Diese Studien ergaben wiederum eine spezifische Interaktion zwischen PHD3 und Importin $\alpha 5$, die durch Nukleoplasmin-Zugabe und der damit verbundenen Proteinverdrängung in ihrer Intensität inhibiert wird (Abbildung 4.4). Zudem zeigte sich, dass auch die Bindung von PHD3 an die Importine $\alpha 1$ und $\alpha 3$ durch Nukleoplasmin inhibiert wurde. Im Gegensatz dazu werden die Bindungsintensitäten zwischen PHD3 und den Importinen $\alpha 4$, $\alpha 7$ und β durch Zugabe von Nukleoplasmin nicht beeinflusst. Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt 4.1.2 gezeigt werden, dass PHD3 mit verschiedenen Importin α -Isoformen spezifisch interagiert, wobei Importin $\alpha 5$ von den hier untersuchten Importinen als stärkster PHD3-Bindungspartner hervorzuheben ist.

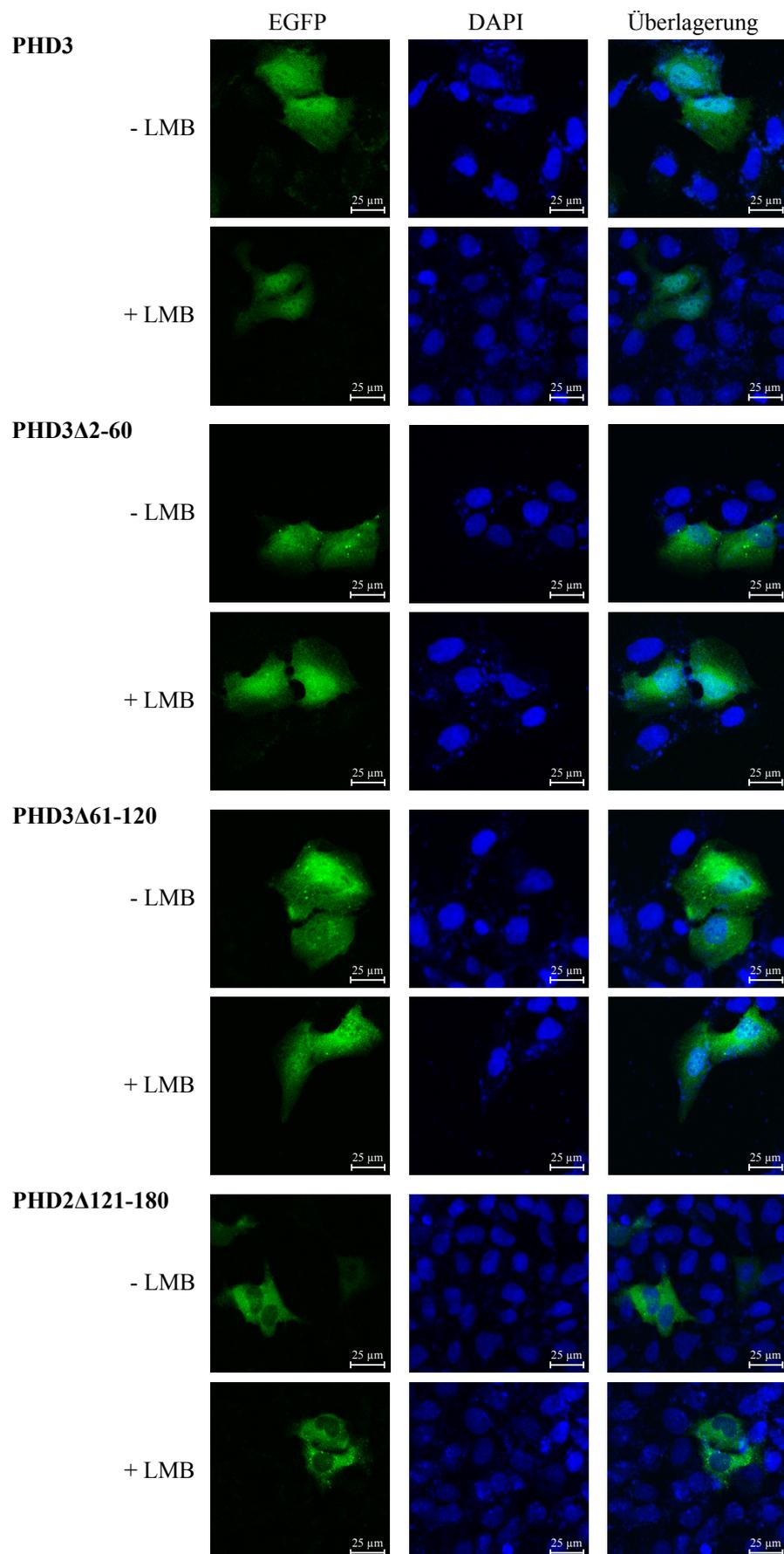
Abbildung 4.4 (gegenüberliegende Seite): Importin α/β -Bindungsspezifität von radioaktiv-markierter PHD3. (A) PHD3 wurde durch *in vitro* Transkription und Translation radioaktiv markiert und in GST-Bindungsstudien eingesetzt. Entsprechend der Angaben (+/-) erfolgte die Zugabe von rekombinant aufgereinigtem Nukleoplasmin in vierfach molarem Überschuss. Die Analyse erfolgte mithilfe von Coomassie-Färbung (A, oben) und Autoradiographie (A, unten). Als Positivkontrolle wurde der PHD1/Importin $\alpha 5$ -Bindungsansatz mit und ohne Nukleoplasmin-Zugabe mitgeführt, der Bindungsansatz mit immobilisiertem GST stellt die Negativkontrolle dar. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Bindungsstudien. Zur Überprüfung der radioaktiven Proteinmarkierung wurden die [^{35}S]-markierten Proteine PHD3 und PHD1 aufgetragen. (B) Die in der Bindungsstudie ermittelten Bindungsintensitäten zwischen PHD1 und den untersuchten Importinen wurden densitometrisch ausgewertet und dargestellt. Die Bindungsintensitäten wurden normalisiert auf die Intensität der PHD3/Importin $\alpha 5$ -Bindung ohne Nukleoplasmin-Zugabe (100 %). α , Importin α ; β , Importin β ; NUC, Nukleoplasmin; Anti-PHD3, Anti-PHD3-Antikörper.



4.1.3 Eingrenzung eines nicht-klassischen NLS in PHD3

Lokalisierungsstudien mit EGFP-markierter PHD3

Wie in Abschnitt 1.5.5 beschrieben, erkennen und binden die Transport-Rezeptoren des Importin α/β -Systems ein spezifisches NLS in der Sequenz ihrer Kargoproteine. Um die Regulation des Kernimports der PHD3 über die Importin α/β -Rezeptoren näher zu charakterisieren, sollten für den Kernimport essentielle Aminosäuren in der primären Aminosäuresequenz von PHD3 identifiziert werden. Es wurde ein Fusionskonstrukt aus PHD3 und dem grün-fluoreszierenden Protein (EGFP) exprimiert und seine intrazelluläre Lokalisierung fluoreszenzmikroskopisch (Abschnitt 3.1.7) untersucht. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass das Fusionsprotein PHD3-EGFP in Cytoplasma und Zellkern detektiert werden kann [133]. Da verschiedene Datenbanken (Abschnitt 2.16) kein NLS-Sequenzmotiv vorhersagten, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese (Abschnitt 3.3.7) spezifische Aminosäurebereiche deletiert, deren Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisierung von PHD3-EGFP anschließend analysiert wurde. Die PHD3-EGFP-Deletionsmutanten wurden in U2OS-Zellen transfiziert (Abschnitt 3.1.4). Die Inhibierung des CRM1-abhängigen Kernexports durch LMB diente der Verdeutlichung der Effekte auf die Kernimporteffizienz nach Deletion spezifischer Aminosäuresequenz-Bereiche. Es wurde die intrazelluläre Lokalisierung der vier Deletionsmutanten PHD3 Δ 2-60, PHD3 Δ 61-120, PHD3 Δ 121-180 und PHD3 Δ 181-238 in U2OS-Zellen analysiert. Wie in Abbildung 4.5 (Seiten 79 und 80) dargestellt, konnten die PHD3-EGFP-Deletionsmutanten PHD3 Δ 2-60 und PHD3 Δ 61-120 wie PHD3 Wild-Typ in Zellkern und Cytoplasma detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren die Deletionsmutanten PHD3 Δ 121-180 und PHD3 Δ 181-238 sowohl vor als auch nach Inhibierung des CRM1-vermittelten Kernexports überwiegend im Cytoplasma lokalisiert (Abbildung 4.5, Seiten 79 und 80). Für weiterführende Untersuchungen, die dazu dienen sollten, ein putatives NLS näher einzugrenzen, wurden die PHD3-EGFP-Deletionsmutanten PHD3 Δ 165-195 und PHD3 Δ 222-226 generiert. In fluoreszenzanalytischen Lokalisierungsstudien zeigte sich, dass PHD3 Δ 165-195 - vor und nach Zugabe von LMB - vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert war. PHD3 Δ 222-226 war hingegen, genau wie PHD3 Wild-Typ, vor und nach Inhibierung des CRM1-abhängigen Kernexports in Zellkern und Cytoplasma lokalisiert (Abbildung 4.5, Seiten 79 und 80). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse in diesem Abschnitt darauf hin, dass der Kernimport der PHD3 von den Aminosäuren L165 bis P195 abhängig ist und in diesem Sequenzbereich ein putatives NLS lokalisiert ist.



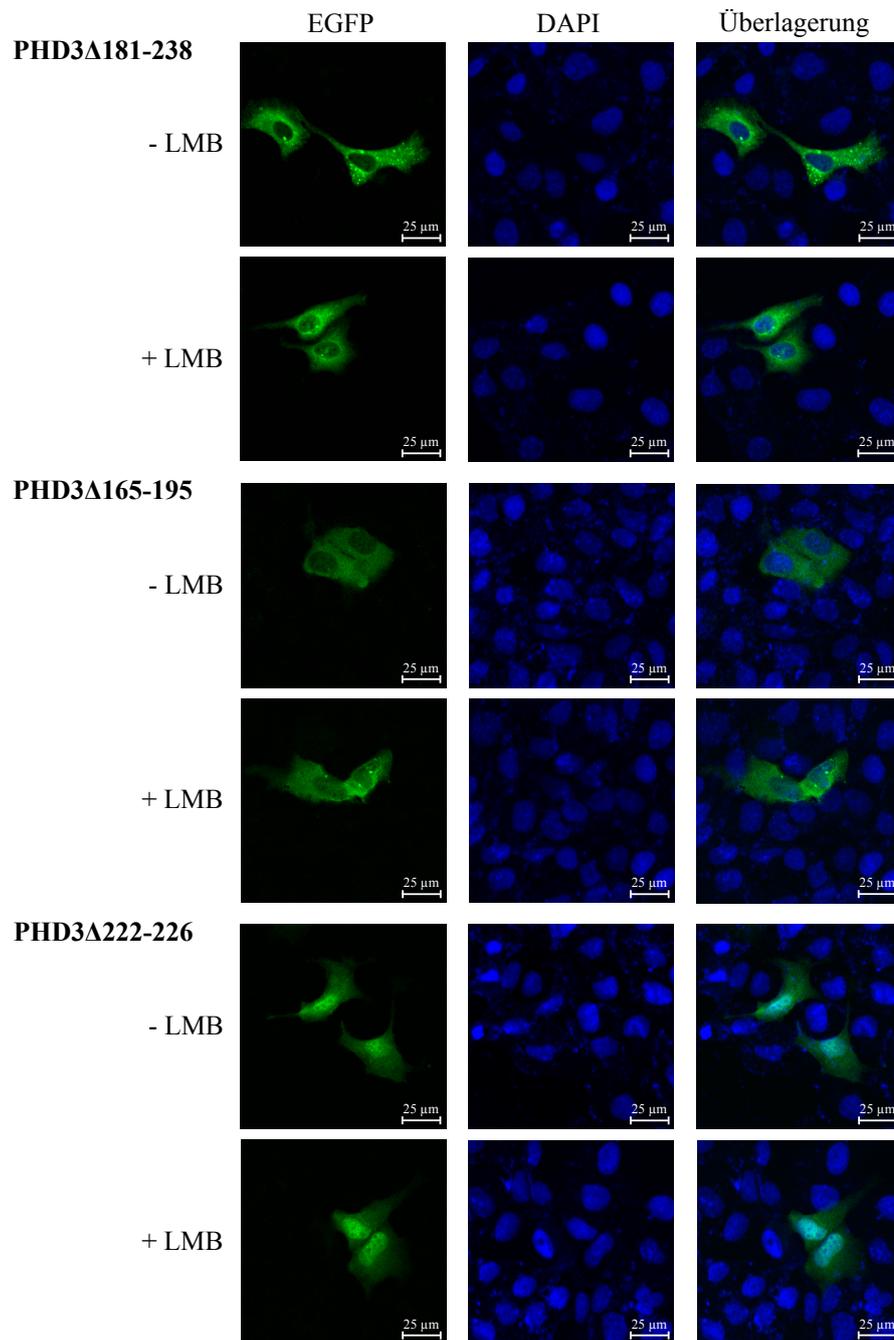


Abbildung 4.5: Intrazelluläre Lokalisierung verschiedener PHD3-EGFP-Deletionsmutanten. Die angegebenen PHD3-EGFP-Deletionsmutanten wurden mithilfe von ortsgerechter Mutagenese generiert. U2OS-Zellen wurden mit den PHD3-EGFP-Fusionskonstrukten transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht, um die intrazellulären Expressionsmuster der PHD3-EGFP-Deletionskonstrukte zu beurteilen. Die Experimente erfolgten mit oder ohne Addition des Kernexportinhibitors LMB. In allen Ansätzen wurden die Zellkerne (blau) mittels DAPI-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Lasermikroskop *LSM TCS S5P*. Gezeigt ist ein beispielhaftes Experiment aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils mindestens 30 analysierten Zellen. Der weiße Balken unten rechts $\hat{=}$ 25 μ m.

Importin α/β -GST-Bindungsstudien

Basierend auf den im letzten Abschnitt gewonnenen Ergebnissen sollte die Importin α/β -Bindungsaktivität des eingegrenzten NLS-Sequenzbereiches in GST-Bindungsstudien überprüft werden. Dazu wurden die PHD3-Deletionsmutanten PHD3W189X, PHD3 Δ 165-195 und PHD3 Δ 222-226 in ein PHD3-kodierendes Plasmid mit einem T7-Promotor eingebracht und durch *in vitro* Transkription und Translation radioaktiv markiert (Abschnitt 3.4.10). Die Bindung der [³⁵S]-markierten Deletionsproteine und PHD3 Wild-Typ an Importin α 3 und Importin α 5 wurde anschließend in GST-Bindungsstudien (Abschnitt 3.4.11) untersucht, wobei His-markiertes Importin β als zusätzliche Komponente zugegeben wurde. Bei der Deletionsmutante PHD3W189X ist Aminosäure 189 (Tryptophan) durch ein Stoppcodon ersetzt, wodurch die Proteinsynthese an dieser Position frühzeitig terminiert wird. Die Analyse der Importin α/β -Bindung der C-terminal verkürzten PHD3-Deletionsmutante ergab, dass der N-terminale Bereich des Proteins (Aminosäuren 1-188) nicht an die untersuchten Importine gebunden hatte. Zur näheren Eingrenzung des putativen NLS wurde die Bindung der Deletionsmutanten PHD3 Δ 165-195 und PHD3 Δ 222-226 an Importin α 3 und Importin α 5 untersucht. Dabei konnte eine Bindung zwischen PHD3 Δ 165-195 und Importin α 5 nachgewiesen werden. Im Vergleich zu PHD3 Wild-Typ war diese Bindung jedoch um ~60 % inhibiert. Zwischen PHD3 Δ 222-226 und den untersuchten α -Importin-Isoformen konnten nur Bindungen nahe dem Detektionslimit detektiert werden. Die Ergebnisse aus den GST-Bindungsstudien zeigen, dass der Importin α/β -abhängige Kernimport der PHD3 vom C-terminalen Bereich des Proteins abhängt. Ferner wurde gezeigt, dass neben dem Sequenzbereich zwischen den Aminosäuren L165 und P195 auch das Sequenzmotiv K222 bis R226 am nukleären Import der PHD3 beteiligt ist.

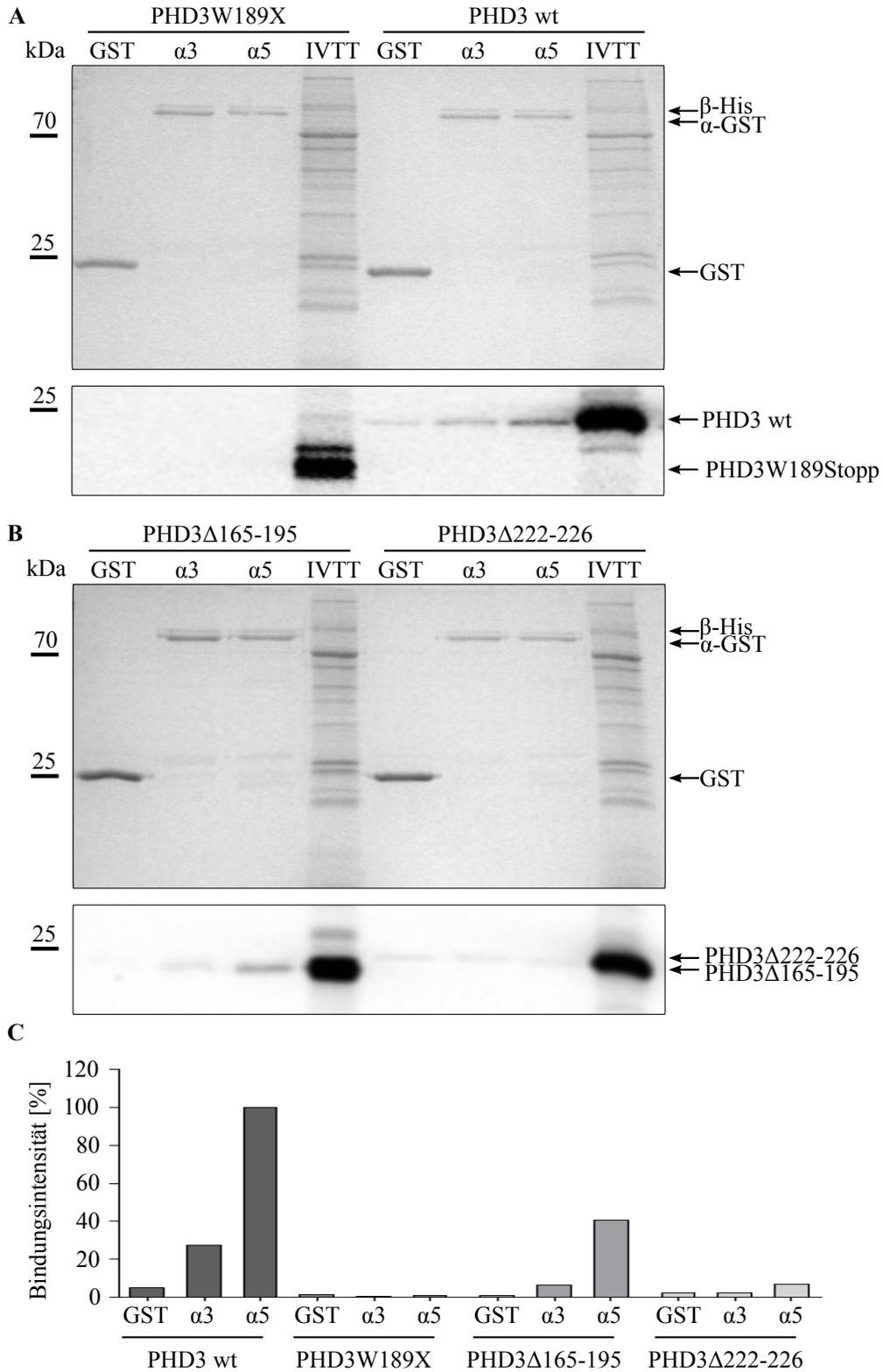


Abbildung 4.6 (gegenüberliegende Seite): Importin $\alpha 3$ / $\alpha 5$ -Bindungsverhalten verschiedener PHD3-Deletionsmutanten. (A und B) PHD3 Wild-Typ, PHD3W189X (beide A), PHD3 Δ 165-195 und PHD3 Δ 222-226 (beide B) wurden durch *in vitro* Transkription und Translation mit [35 S] markiert und in GST-Bindungsstudien eingesetzt. Die Auswertung der GST-Bindungsstudien von PHD3 Wild-Typ bzw. den PHD3-Deletionsmutanten an Importin $\alpha 3$ und Importin $\alpha 5$ wurde durch Coomassie-Färbung (A,B, oben) und Autoradiographie (A, B, unten) visualisiert. Als Negativkontrolle wurde der Bindungsansatz mit immobilisiertem GST mitgeführt. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Bindungsstudien. Zur Überprüfung der radioaktiven Markierung wurden die [35 S]-markierten Proteine PHD3 Wild-Typ, PHD3W189X (beide A), PHD3 Δ 165-195 und PHD3 Δ 222-226 (beide B) aufgetragen. (C) Die in der Bindungsstudie ermittelten Bindungsintensitäten zwischen PHD3 Wild-Typ bzw. den PHD3-Deletionsmutanten und den untersuchten Importinen wurden densitometrisch ausgewertet und dargestellt. Die Bindungsintensitäten wurden normalisiert auf die Intensität der PHD3/Importin $\alpha 5$ -Bindung (100 %). α , Importin α ; β , Importin β .

4.2 Regulation des subzellulären PHD2-Transports

4.2.1 Vorarbeiten

Die PHD2 spielt bei der HIF-1 α -Hydroxylierung *in vitro* eine zentrale Rolle. Der intrazelluläre Transport dieser Prolyl-4-Hydroxylase könnte daher für die Regulation der molekularen Sauerstoffsensitivität von besonderer Bedeutung sein. Lokalisierungsstudien mit EGFP-markierten Proteinen ergaben, dass PHD2 sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert ist und subzellulär zwischen den Kompartimenten transportiert wird [133, 176]. In Vorarbeiten konnte mithilfe von GST-Bindungsstudien keine *in vitro* Interaktion zwischen PHD2 und verschiedenen Importin α -Isoformen oder Importin β nachgewiesen werden [176]. Mit einer absoluten Molekülmasse von 46 kDa kann PHD2 wahrscheinlich nicht passiv in den Zellkern diffundieren, sondern muss über einen aktiven Transport-Mechanismus in den Zellkern importiert werden [118]. In dieser Arbeit sollte der nukleäre Import der PHD2 näher charakterisiert und dafür essentielle Signalsequenzen identifiziert werden.

4.2.2 PHD2-Kernimport über Huckepack-Mechanismus

Alternativ zur Bindung an Mitglieder der Proteinfamilie der Karyopherine könnte PHD2 über einen Huckepack-Mechanismus aktiv in den Zellkern transportiert werden. Dabei könnte ein bereits identifizierter Interaktionspartner der PHD2 als Adapterprotein zwischen PHD2 und den Importin α/β -Rezeptoren fungieren. Daher wurde die Bindung ausgewählter PHD2-Interaktionspartner an Mitglieder der Importin α/β -Rezeptorfamilie sowie der gekoppelte PHD2-Kernimport über einen Interaktionspartner in GST-Bindungsstudien (Abschnitt 3.4.11) untersucht. Sowohl die PHD2 als auch die zu untersuchenden Interaktionspartner LIM-Domäne enthaltendes Protein 1 (LIMD1) und HIF-1 α wurden zu diesem Zwecke radioaktiv markiert (Abschnitt 3.4.10). Protein-Protein-Interaktionen wurden durch Autoradiographie nachgewiesen (Abschnitt 3.4.12).

Der Tumorsuppressor LIMD1

Für das Tumorsuppressorprotein LIMD1 konnte gezeigt werden, dass es an der Regulation von HIF-1 α beteiligt ist und zusammen mit PHD2 und VHL einen Proteinkomplex bildet, der die effiziente Degradierung von HIF-1 α ermöglicht [52]. Die intrazelluläre Lokalisierung von LIMD1, das eine absolute Molekülmasse von 72 kDa aufweist, wird als cytoplasmatisch mit geringen nukleären Anteilen beschrieben [171].

Während der Kernexport von LIMD1 über den Export-Rezeptor CRM1 verläuft [171], konnte bislang nicht gezeigt werden, wie LIMD1 in den Zellkern transportiert wird. Mithilfe verschiedener Datenbanken (*PredictProtein*, *PSORT II Prediction*) (Abschnitt 2.16) wurde zunächst die LIMD1-Aminosäuresequenz auf das Vorhandensein putativer NLS-Motive untersucht. In der gesamten Sequenz konnten keine Sequenzbereiche mit NLS-Aktivität identifiziert werden. Abbildung 4.7 zeigt, dass LIMD1 in den durchgeführten GST-Importin-Bindungsstudien nicht an die untersuchten Importine bindet. Dies impliziert, dass der Kernimport von LIMD1 nicht über den klassischen Importin α/β -abhängigen Kernimport verläuft.

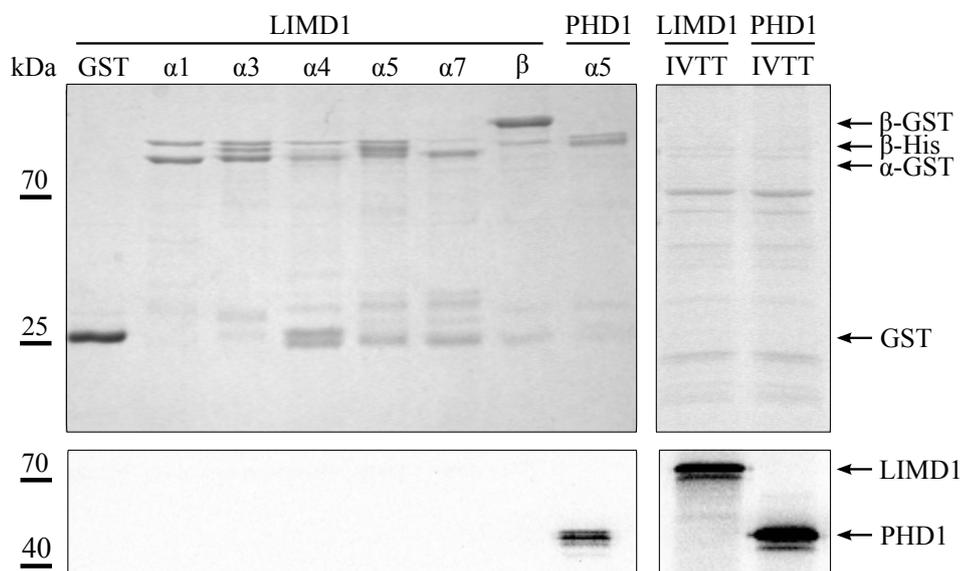


Abbildung 4.7: Importin α/β -Bindungsverhalten von LIMD1. LIMD1 wurde durch *in vitro* Transkription und Translation radioaktiv markiert. Das Importin α/β -Bindungsverhalten von LIMD1 wurde mittels GST-Bindungsstudien analysiert und mithilfe von Coomassie-Färbung (oben) und Autoradiographie (unten) analysiert. Es konnte keine Bindung von LIMD1 an die untersuchten α -Importin-Isoformen visualisiert werden. Die Positivkontrolle, das an Importin $\alpha 5$ gebundene $[^{35}\text{S}]$ -PHD1, wurde detektiert (unten). Die eingesetzten radioaktiv-markierten Proteine LIMD1 und PHD1 konnten ebenfalls durch Autoradiographie visualisiert werden (unten). Der Bindungsansatz mit immobilisiertem GST dient als Negativkontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Bindungsstudien. α , Importin α ; β , Importin β .

Auch die simultane Inkubation von radioaktiv-markiertem LIMD1, radioaktiv-markierter PHD2 und den an Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-Importin-Fusionsproteinen resultierte nicht in dem Nachweis einer Interaktion zwischen LIMD1, PHD2 und den untersuchten α -Importin-Isoformen (Abbildung 4.8). Weder LIMD1 noch ein Substratkomplex, bestehend aus LIMD1 und PHD2, binden *in vitro* an die untersuchten Importine. Zusammenfassend zeigen diese Bindungsstudien, dass PHD2 nicht durch einen Huckepack-Mechanismus, an dem der Tu-

morsuppressor LIMD1 beteiligt ist, und den klassischen Importin α/β -vermittelten Kernimport in den Zellkern transportiert wird.

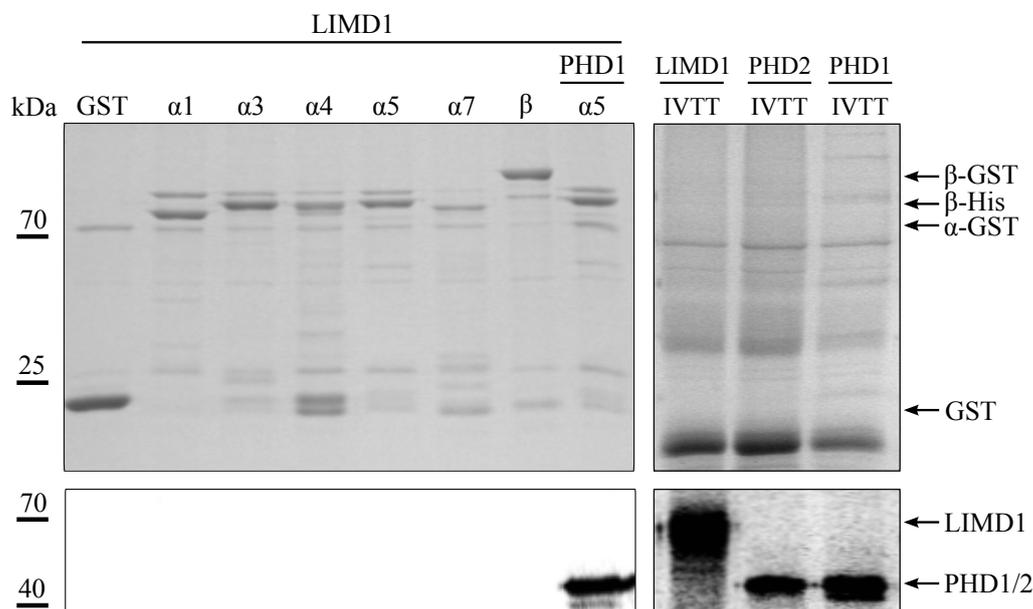


Abbildung 4.8: Importin α/β -Bindungsverhalten von PHD2 und LIMD1. Radioaktiv-markiertes LIMD1 wurde mit den an Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-Importin-Fusionsproteinen bzw. GST vorinkubiert, bevor radioaktiv-markierte PHD2 zugegeben wurde. Die GST-Bindungsstudie wurde mittels Coomassie-Färbung (oben) und Autoradiographie (unten) analysiert. Es lässt sich keine Interaktion zwischen LIMD1, PHD2 und den untersuchten Importinen nachweisen. Als Positivkontrolle wurde die Bindung zwischen [35 S]-markierter PHD1 und Importin $\alpha 5$ visualisiert, als Negativkontrolle diente ein Bindungsansatz mit immobilisiertem GST. Durch Autoradiographie wurden zusätzlich die eingesetzten [35 S]-markierten Proteine LIMD1, PHD2 und PHD1 sichtbar gemacht (unten). Die hier gezeigte GST-Bindungsstudie ist repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. α , Importin α ; β , Importin β .

Der Transkriptionsfaktor HIF-1

Die Stabilität der α -Untereinheiten des Transkriptionsfaktors HIF wird post-translational durch die PHD-Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3 reguliert. In Vorarbeiten konnte Dr. Reinhard Depping [35] zeigen, dass HIF-1 α und HIF-2 α Substrate des Importin α/β -vermittelten Kernimports sind. In der vorliegenden Arbeit wurde der gekoppelte Kernimport von PHD2 über HIF-1 α untersucht. Die radioaktiv-markierten Proteine HIF-1 α und PHD2 wurden zeitgleich mit den an Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-Importin-Fusionsproteinen inkubiert. Die bereits beschriebene Bindung von HIF-1 α an die untersuchten Importin-Isoformen [35] wurde durch Autoradiographie visualisiert, während eine PHD2-Bindung an den HIF-1 α -Importin α/β -Komplex nicht detektiert werden konnte (Abbildung 4.9). Diese Ergebnisse implizieren, dass PHD2 nicht durch die direkte Bindung an das

Import-Substrat HIF-1 α über den Importin α/β -Transportweg in den Zellkern importiert wird.

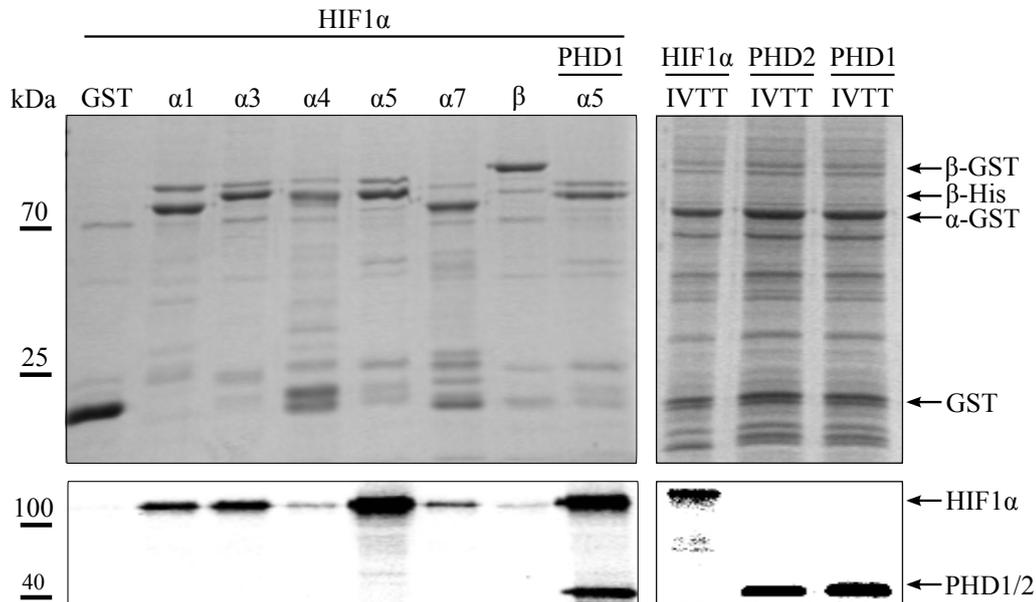


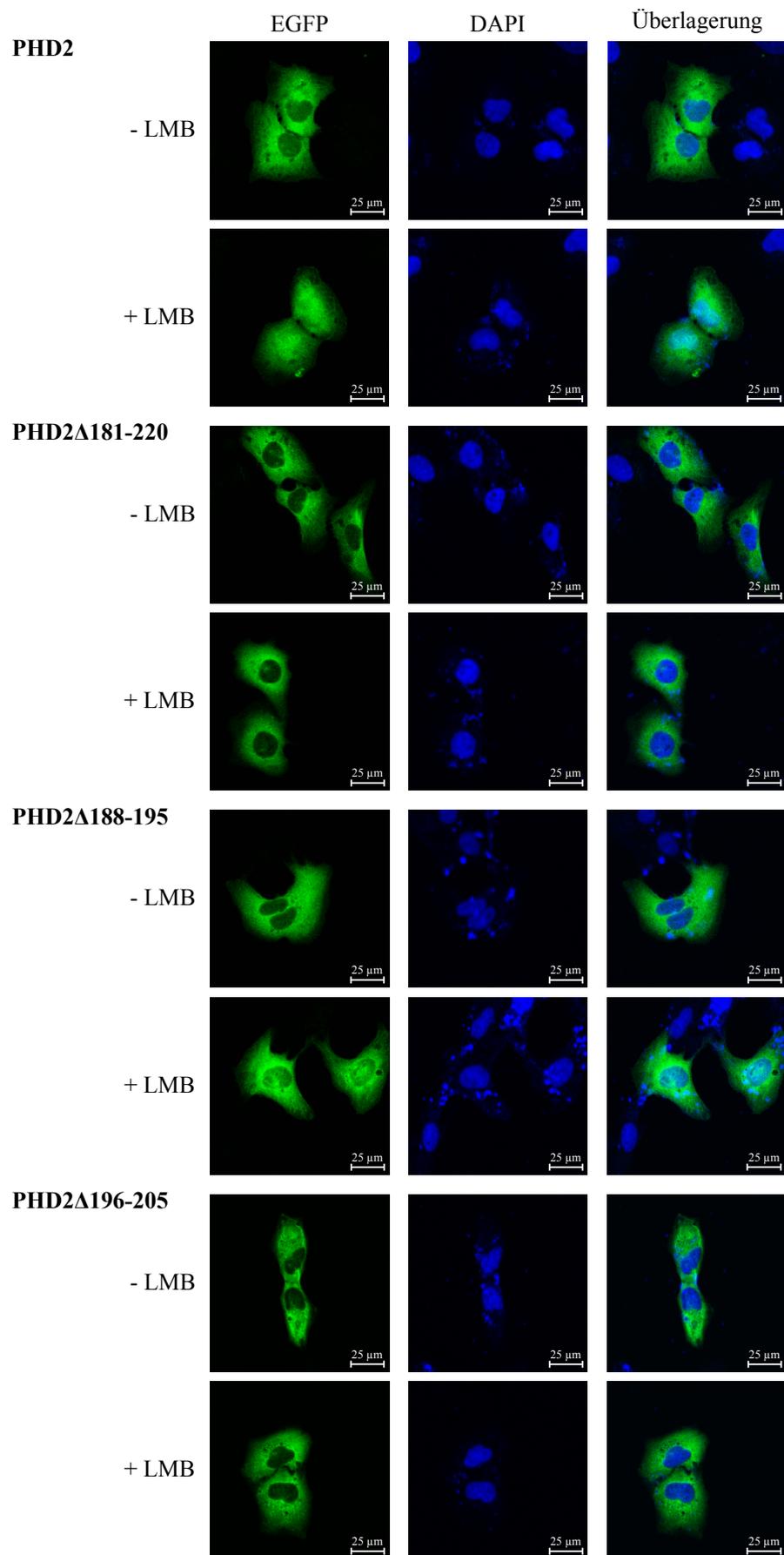
Abbildung 4.9: Importin α/β -Bindungsverhalten von PHD2 und HIF-1 α . Radioaktiv-markiertes HIF-1 α wurde mit den an Glutathion-Sepharose immobilisierten GST-Importin-Fusionsproteinen bzw. GST vorinkubiert, bevor radioaktiv-markierte PHD2 zugegeben wurde. Die Analyse der GST-Bindungsstudie erfolgte mittels Coomassie-Färbung (oben) und Autoradiographie (unten). HIF-1 α interagiert mit den untersuchten Importinen, während PHD2 nicht an den HIF-1 α /Importin-Komplex bindet. Als Positivkontrolle dienen die Bindungen zwischen Importin α 5 und [35 S]-markiertem HIF-1 α sowie [35 S]-markierter PHD1. Der Bindungsansatz mit immobilisiertem GST diente als Negativkontrolle. Durch Autoradiographie wurde die radioaktive Markierung der Proteine HIF-1 α , PHD2 und PHD1 untersucht. Die abgebildete GST-Bindungsstudie ist repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. α , Importin α ; β , Importin β .

4.2.3 Identifikation eines nicht-klassischen Kernlokalisierungssignals in PHD2

Nachdem die am Kernimport von PHD2 beteiligten Import-Rezeptoren nicht näher charakterisiert werden konnten und mit verschiedenen Datenbanken (*Predict-Protein*, *PSORT II Prediction*) (Abschnitt 2.16) keine spezifischen NLS-Konsensussequenzen in der Aminosäuresequenz von PHD2 vorhergesagt wurden, sollten durch die Eingrenzung eines NLS in PHD2 weitere Erkenntnisse über den nukleären Import des Proteins gewonnen werden. Dazu wurde zunächst die intrazelluläre Lokalisierung eines Fusionskonstruktes aus PHD2 und EGFP untersucht. In Vorarbeiten von Dr. Amrei Steinhoff [176] konnte anhand dieses Fusionskonstruktes bereits gezeigt werden, dass PHD2 mithilfe des Kernexport-Rezeptors CRM1 aus dem Zellkern ins

Cytoplasma transportiert wird. Die Zugabe von LMB, einem spezifischen Inhibitor des CRM1-vermittelten Kernexports, resultiert in der Akkumulation von PHD2 in Zellkern und Cytoplasma. Der Kernimport von PHD2 wurde nach Behandlung der Zellen mit LMB analysiert, da durch die Inhibierung des nukleären Exports eine Verminderung der Kernimporteffizienz verdeutlicht werden konnte. Durch ortsgerichtete Mutagenese (Abschnitt 3.3.7) wurden spezifische Aminosäuresequenzbereiche von PHD2 mutiert und der Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisierung des Fusionskonstruktes fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

PHD2-EGFP wurde in U2OS-Zellen transfiziert, sodass die intrazelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins fluoreszenzmikroskopisch (Abschnitt 3.1.7) analysiert werden konnte. In Übereinstimmung mit früheren Publikationen [133, 176] zeigte sich, dass das Fusionskonstrukt vorwiegend im Cytoplasma detektiert werden kann. Die Inhibition des CRM1-abhängigen Kernexports durch Zugabe von LMB führt zur cytoplasmatischen und nukleären Anreicherung des Wild-Typ-Konstruktes (Abbildung 4.10, Seiten 89 und 90). In dieser Arbeit wurde für die Eingrenzung des NLS zunächst das PHD2-EGFP-Deletionskonstrukt PHD2 Δ 181-220 generiert. Dabei zeigte sich, dass die Deletion der Aminosäuren Y181 bis R220 zu einem veränderten Expressionsmuster führt und die Expression von PHD2 Δ 181-220 auch nach Inhibierung des Kernexports auf das Cytoplasma begrenzt ist (Abbildung 4.10, Seiten 89 und 90). Um ein möglicherweise in diesem Aminosäuresequenzbereich lokalisiertes NLS näher einzugrenzen, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese vier weitere PHD2-EGFP-Fusionskonstrukte mit verschiedenen Aminosäuredeletionen generiert: PHD2 Δ 188-195, PHD2 Δ 191-195, PHD2 Δ 191-192 und PHD2 Δ 196-205. Die anschließende Fluoreszenzanalyse ergab unterschiedliche Expressionsmuster für die PHD2-EGFP-Konstrukte innerhalb der Zellen. Wie in Abbildung 4.10 (Seiten 89 und 90) zu sehen, führte die Deletion der PHD2-Sequenzbereiche Y188 bis D195 und I191 bis D195 dazu, dass das Konstrukt nach LMB-Addition vorwiegend im Cytoplasma und in geringem Maße im Zellkern visualisiert werden konnte. Der Kernimport wurde durch die Deletion der Sequenzbereiche Y188 bis D195 und I191 bis D195 jedoch nicht so stark inhibiert wie durch Deletion der Aminosäuren Y181 bis R220. Die Fluoreszenzanalyse ergab für das Fusionskonstrukt PHD2 Δ 191-192 ein dem Wild-Typ entsprechendes subzelluläres Expressionsmuster (Abbildung 4.10, Seiten 89 und 90). In dem PHD2-EGFP-Deletionskonstrukt PHD2 Δ 196-205 wurde der Sequenzbereich zwischen den Aminosäuren E196 und H205 deletiert. In Übereinstimmung mit dem intrazellulären Expressionmuster des Fusionskonstruktes PHD2 Δ 181-220 war auch die PHD2 Δ 196-205-Deletionsmutante ausschließlich im Cytoplasma detektierbar, unabhängig davon, ob der Kernexport durch LMB-Zugabe inhibiert wurde (Abbildung 4.10, Seiten 89 und 90). Diese Beobachtungen zeigen, dass sich zwischen den Aminosäuren E196 und H205 (¹⁹⁶EYIVPCM²⁰⁵NKH) ein putatives NLS befindet.



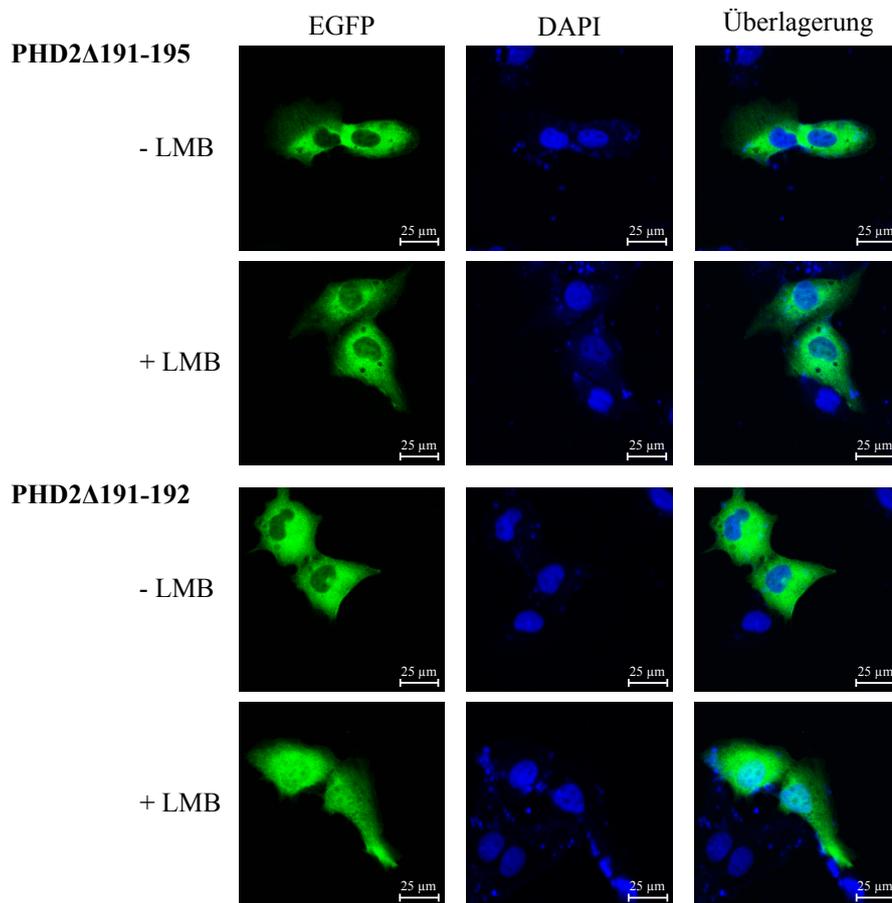


Abbildung 4.10: Intrazelluläre Lokalisierung verschiedener PHD2-EGFP-Deletionskonstrukte. U2OS-Zellen wurden mit einem PHD2-EGFP-Fusionskonstrukt und den angegebenen, durch ortsgerichtete Mutagenese generierten, Deletionsmutanten des PHD2-EGFP-Konstruktes transfiziert. Es wurde eine fluoreszenzmikroskopische Lokalisierungsstudie der PHD2-EGFP-Fusionskonstrukte durchgeführt. Die Experimente erfolgten mit oder ohne Zugabe des Kernexportinhibitors LMB. In allen Ansätzen wurden die Zellkerne (blau) mittels DAPI-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am konfokalen Lasermikroskop *LSM TCS S5P*. Gezeigt ist ein beispielhaftes Experiment aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 30 analysierten Zellen. Der weiße Balken unten rechts $\cong 25 \mu\text{m}$.

4.2.4 Kernimport-Aktivität des PHD2-NLS-Motives

Anschließend sollte untersucht werden, ob der identifizierte putative NLS-Sequenzbereich in der primären Aminosäuresequenz von PHD2 die Proteintranslokation vom Cytoplasma in den Zellkern regulieren kann. Zu diesem Zweck wurden weitere fluoreszenzmikroskopische Lokalisierungsstudien unter Verwendung eines EGFP-EGFP-GST-Konstruktes (EEG) [86] durchgeführt. Wie in Abbildung 4.11 zu sehen, zeigt das ~ 80 kDa große EEG-Konstrukt in U2OS-Zellen eine cytoplasmatische Lokalisierung, da eine passive Diffusion durch die Kernporen nicht möglich ist. Die PHD2-Aminosäuren 180-220 wurden über SalI/BamHI in das EEG-Konstrukt kloniert. Das Fusionskonstrukt EEG-PHD2(180-220) konnte vor und nach Zugabe von LMB im Zellkern visualisiert werden und wird aktiv in den Zellkern importiert (Abbildung 4.11). Dies impliziert, dass der identifizierte NLS-Bereich in der Aminosäuresequenz von PHD2 funktionelle NLS-Aktivität zeigt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der eingegrenzte PHD2-Sequenzbereich zwischen den Aminosäuren E196 bis H205 als funktionsfähiges NLS aktiv ist. Auf diesen Ergebnissen basierend wurde die Deletionsmutante PHD2 Δ 196-205 im Folgenden als PHD2 Δ NLS bezeichnet.

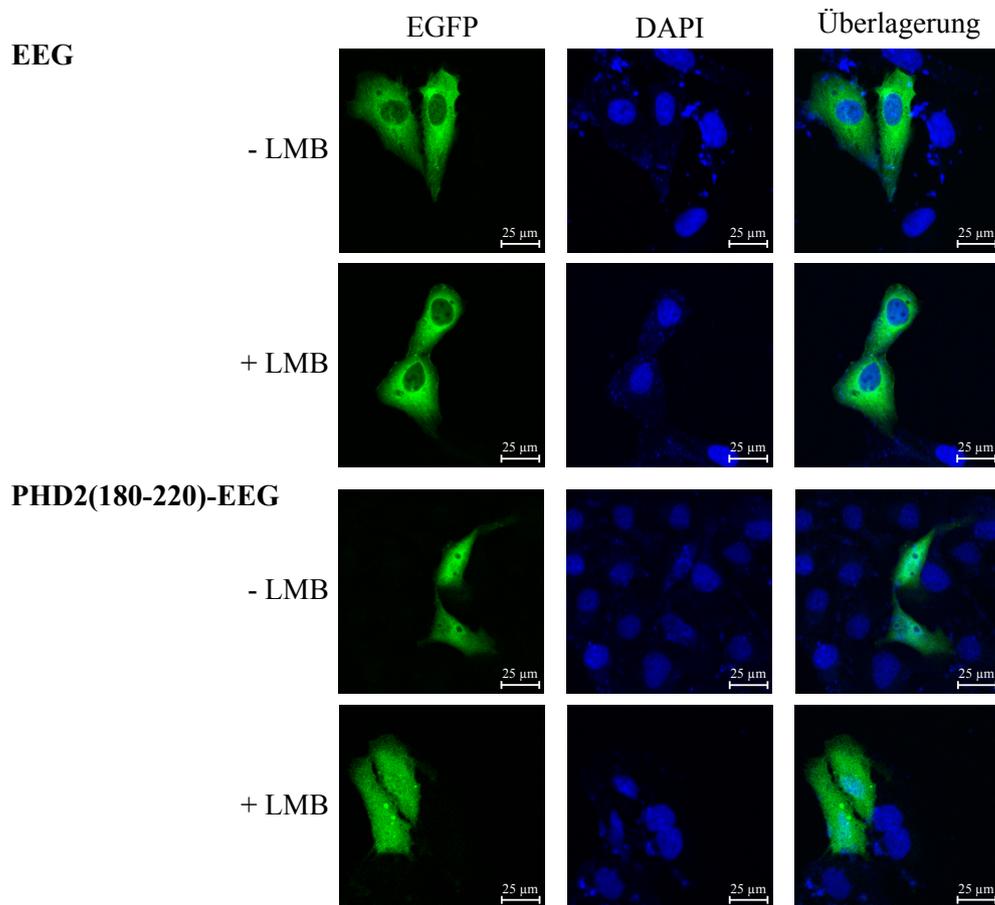


Abbildung 4.11: Aktivität des eingegrenzten PHD2-Sequenzbereiches als funktionsfähiges NLS. U2OS-Zellen wurden mit den Fusionskonstrukten EGFP-EGFP-GST (EEG) bzw. PHD2(180-220)-EEG transfiziert. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde die intrazelluläre Lokalisierung der Fusionskonstrukte vor und nach Inhibierung des Kernexports durch LMB untersucht. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Lasermikroskop *LSM TCS S5P*. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils mindestens 30 analysierten Zellen. Der weiße Balken unten rechts $\hat{=}$ 25 μm .

4.2.5 Eingrenzung eines nicht-klassischen NES-Motives in PHD2

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt ein putatives NLS in der Aminosäuresequenz der PHD2 identifiziert werden konnte, sollte anschließend ein Sequenzbereich eingegrenzt werden, der eine wichtige Rolle für den Kernexport des Proteins spielt. In Vorarbeiten von Dr. Amrei Steinhoff [176] konnte ein vorhergesagtes NES zwischen den Aminosäuren L188 und I198 nicht belegt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der N-terminale, die Aminosäuren 1-100 umschließende Proteinbereich in den Kernexport involviert ist. Darauf basierend wurde in dieser Arbeit das PHD2-EGFP-Fusionskonstrukt PHD2 Δ 6-20 generiert und in U2OS-Zellen transfiziert. Wie in Abbildung 4.12 dargestellt, konnte in anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Lokalisierungsstudien beobachtet werden, dass die Mutante PHD2 Δ 6-20 in beiden Kompartimenten lokalisiert ist, unabhängig davon, ob der CRM1-abhängige Kernexport durch LMB-Zugabe inhibiert wurde. Diese Analyse ergab, dass der Kernexport von PHD2 Δ 6-20, im Vergleich zu PHD2 Wild-Typ, inhibiert und der N-terminale Proteinbereich für den Kernexport von entscheidender Bedeutung ist. Daraus abgeleitet wird die Deletionsmutante PHD2 Δ 6-20 im Folgenden als PHD2 Δ NES bezeichnet. Die identifizierten Transportsignale und ihre Position innerhalb der Domänenstruktur der PHD2 sind in Abbildung 4.13 schematisch dargestellt.

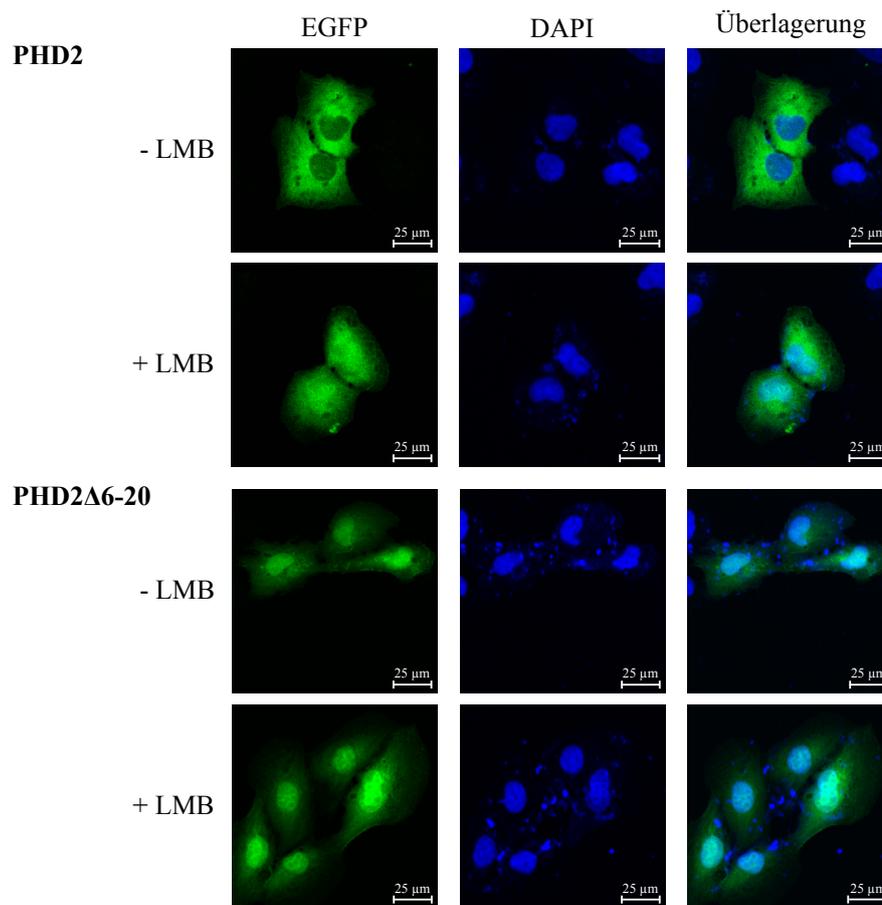


Abbildung 4.12: Eingrenzung einer NES in der primären PHD2-Aminosäuresequenz. U2OS-Zellen wurden mit den Fusionskonstrukten EGFP-PHD2 und EGFP-PHD2 Δ 6-20 transfiziert. Fluoreszenzanalysen wurden durchgeführt, um die intrazelluläre Lokalisierung der Konstrukte vor und nach Inhibierung des Kernexports durch LMB zu untersuchen. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Lasermikroskop *LSM TCS S5P*. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Pro Experiment wurden mindestens 30 Zellen analysiert. Der weiße Balken in der rechten unteren Ecke $\cong 25 \mu\text{m}$.

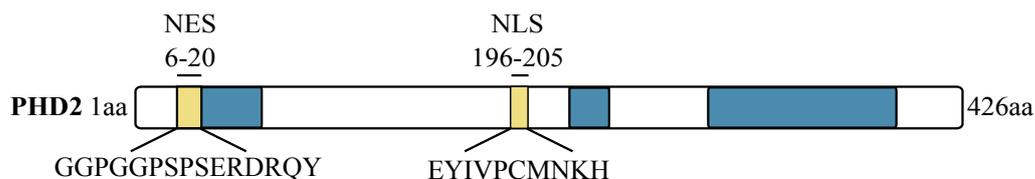


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung der identifizierten Transportsignale. Innerhalb der PHD2-Aminosäuresequenz konnten ein NLS zwischen den Aminosäuren E196 und H205 und ein NES im Sequenzbereich G6 bis Y20 identifiziert werden. Die Länge des Proteins ist neben der Domänenstruktur abgebildet.

4.2.6 Effekt der EGFP-Markierung auf die subzelluläre PHD2-Lokalisierung

Da gezeigt werden konnte, dass EGFP-Markierungen, die eine absolute Molekülmasse von ~ 27 kDa haben, die intrazelluläre Lokalisierung von Proteinen beeinflussen können [175], wurden zusätzlich zu den Lokalisierungsstudien mit EGFP-markierten Fusionsproteinen indirekte Immunfluoreszenzfärbungen (Abschnitt 3.1.8) durchgeführt. Dazu wurden PHD2 Wild-Typ bzw. die PHD2-Deletionsmutanten ohne EGFP-Markierung in U2OS-Zellen exprimiert und mit einem spezifischen Anti-PHD2-Primärantikörper detektiert (Abschnitt 2.12). In Abbildung 4.14 ist dargestellt, dass PHD2 Wild-Typ vor LMB-Zugabe vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist und nach Behandlung mit LMB in beiden Kompartimenten detektiert werden kann. Im Gegensatz dazu ist der Kernimport der Deletionsmutante PHD2 Δ 196-205 inhibiert, sodass das Protein weder vor noch nach LMB-Zugabe im Zellkern akkumuliert. Die Deletionsmutante PHD2 Δ 6-20 hingegen wird schon vor LMB-Behandlung im Zellkern exprimiert und ist in ihrem Kernexport inhibiert. Die Befunde implizieren, dass die Ergebnisse der Lokalisierungsstudien mit fluoreszenzmarkierten Proteinen (Abbildungen 4.10 und 4.12) durch die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden konnten.

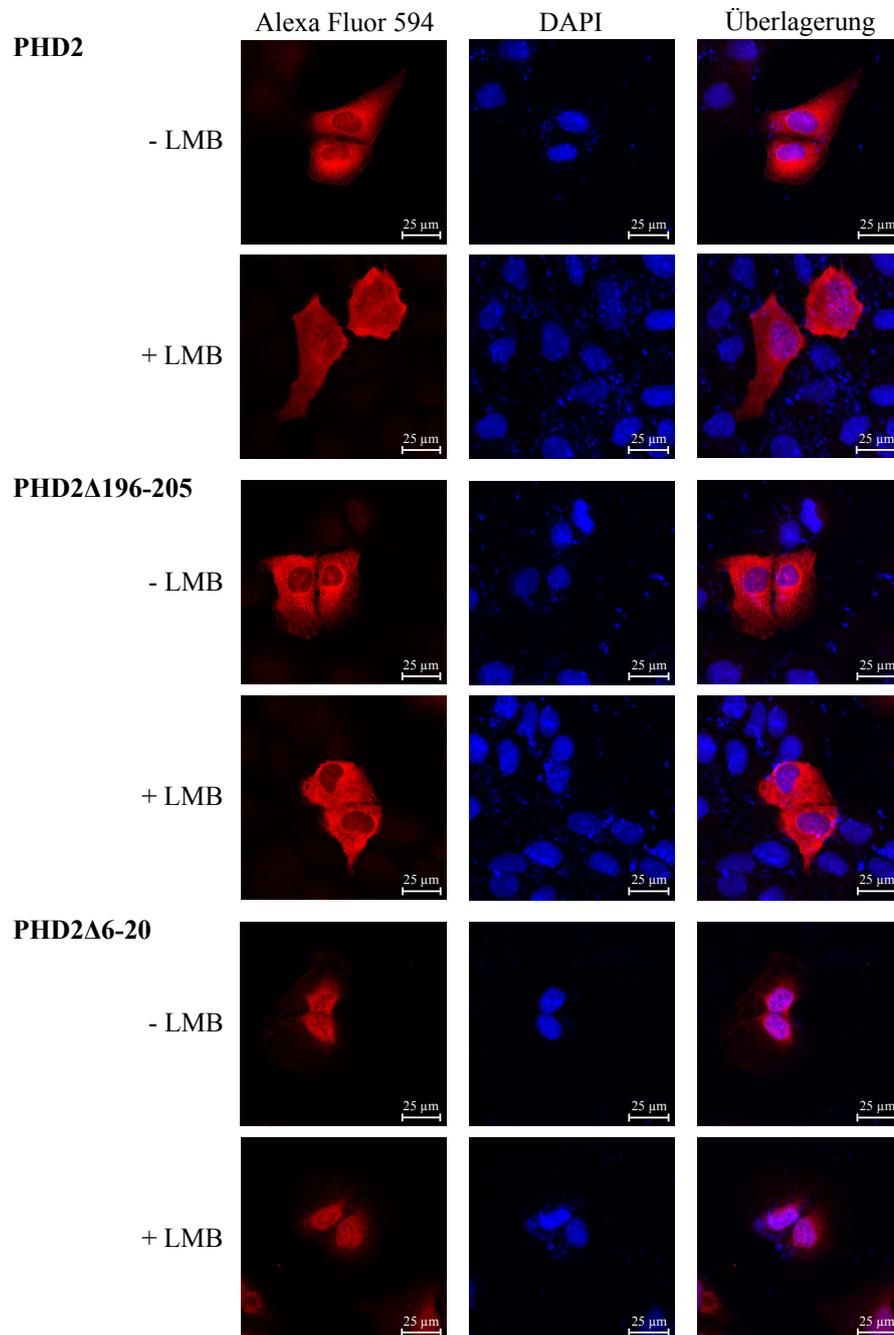


Abbildung 4.14: Indirekte Detektion der PHD2-Deletionsmutanten. U2OS-Zellen wurden mit PHD2 Wild-Typ oder den Deletionsmutanten PHD2Δ196-205 und PHD2Δ6-20 transfiziert. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen wurden durchgeführt, um die intrazelluläre Lokalisierung der Konstrukte vor und nach Inhibierung des Kernexports durch LMB zu untersuchen. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Lasermikroskop *LSM TCS S5P*. Abgebildet ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Pro Experiment wurden mindestens 30 Zellen analysiert. Der weiße Balken in der rechten unteren Ecke $\hat{=}$ 25 μm .

4.3 Regulation des Kerntransports der PHD durch posttranslationale Modifikationen

Wie in Abschnitt 1.5.6 erwähnt, kann der Kerntransport von Proteinen durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen reguliert werden (als Übersichtsartikel [143]). Mithilfe von Lokalisierungsstudien mit EGFP-markierten Proteinen wurde in dieser Arbeit der Einfluss von phosphorylierungsabhängigen Signaltransduktionskaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD-Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3 untersucht. Zudem wurden spezifische Serinreste im N-terminalen Sequenzbereich der PHD2 modifiziert, um die Bedeutung dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen für den Kernexport des Proteins zu untersuchen.

4.3.1 Subzelluläre PHD-Lokalisierung nach Inhibierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden

Die Bedeutung von Phosphorylierungen für die Regulation der molekularen Sauerstoffsensitivität konnte vielfach gezeigt werden [26, 93, 142]. Interessanterweise wird HIF-1 α an spezifischen Serinresten phosphoryliert, wodurch der Transkriptionsfaktor im Zellkern akkumulieren kann [142]. Um den Einfluss von phosphorylierungsabhängigen Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD zu untersuchen, wurden U2OS-Zellen mit der jeweiligen EGFP-markierten PHD-Isoform transfiziert und mit spezifischen Kinase- und Phosphataseinhibitoren behandelt: LY294002, Rapamycin (beide Inhibitoren der PI3K-Signalkaskade) und PD98059 (Inhibitor der MAPK-Signalkaskade) (Abschnitt 3.1.5). Da gezeigt werden konnte, dass der nukleäre Import über Importin β und Transportin 1 von der Aktivität der Serin-/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A abhängig ist [95], wurde die intrazelluläre Lokalisierung zusätzlich nach deren Inhibierung durch Okadainsäure analysiert. Die Inhibitoren wurden entsprechend der Angaben in Tabelle 3.4 verwendet. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab keine Veränderung des intrazellulären Expressionsmusters der PHD-Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3 nach Behandlung mit den spezifischen Kinase- und Phosphataseinhibitoren (Abbildungen 4.15, 4.16 und 4.17). Die intrazelluläre Lokalisierung der drei PHD-Isoformen wird, anders als die von HIF-1 α , nicht von den untersuchten posttranslationalen Modifikationen beeinflusst.

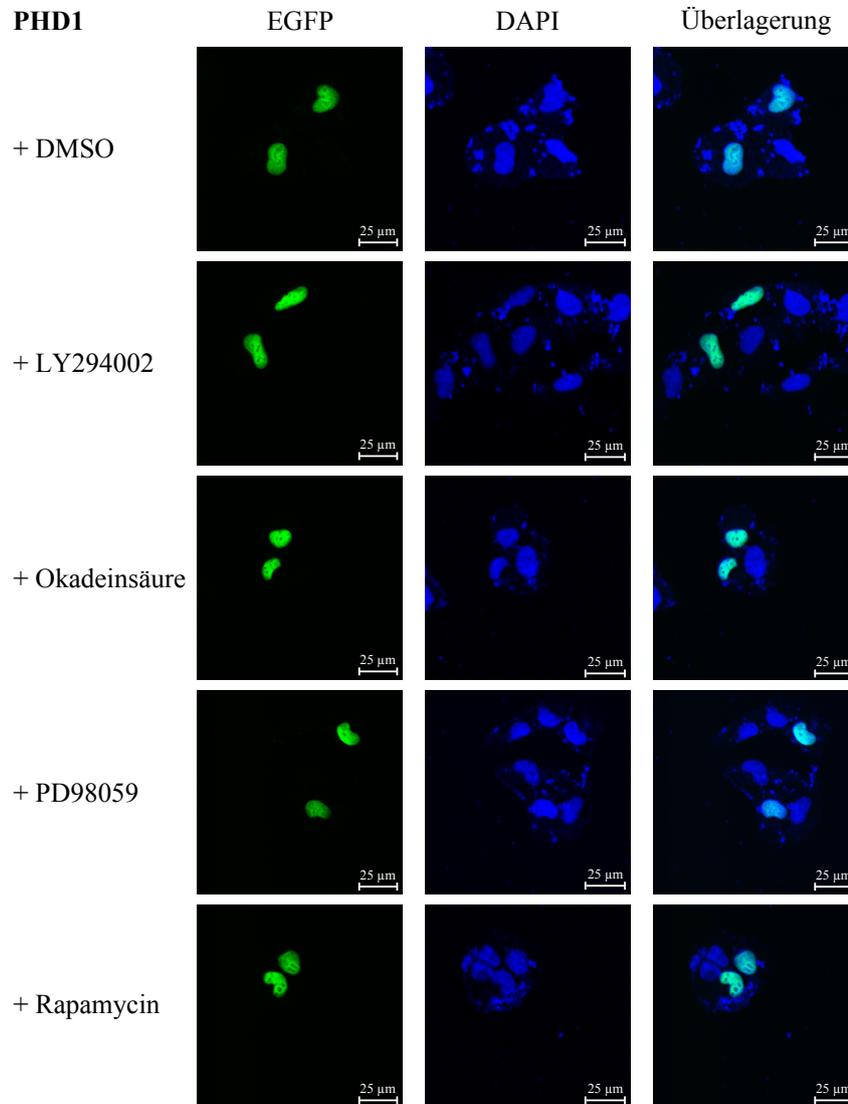


Abbildung 4.15: Einfluss phosphorylierungsabhängiger Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD1. U2OS-Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt PHD1-EGFP transfiziert. Durch Addition spezifischer Kinase- und Phosphataseinhibitoren wurde der Einfluss phosphorylierungsabhängiger Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD1 untersucht. In allen Ansätzen wurden die Zellkerne (blau) mittels DAPI-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Lasermikroskop *LSM TCS S5P*. Gezeigt ist ein beispielhaftes Experiment aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 30 analysierten Zellen. Der weiße Balken unten rechts $\cong 25 \mu\text{m}$.

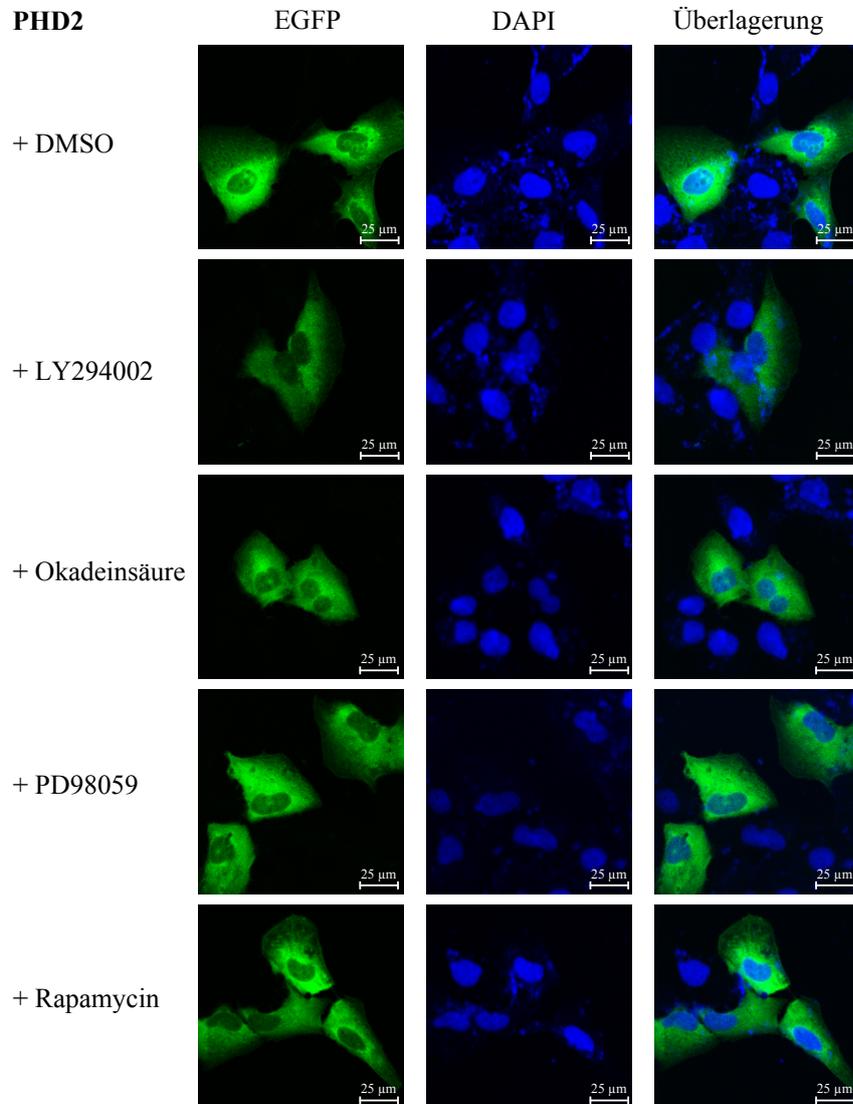


Abbildung 4.16: Einfluss phosphorylierungsabhängiger Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD2. U2OS-Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt PHD2-EGFP transfiziert. Die Zugabe von spezifischen Kinase- und Phosphataseinhibitoren diente der Untersuchung des Einflusses phosphorylierungsabhängiger Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD2. Die Zellkerne (blau) wurden mittels DAPI-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Lasermikroskop *LSM TCS S5P*. Gezeigt ist ein beispielhaftes Experiment aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 30 analysierten Zellen. Der weiße Balken unten rechts $\cong 25 \mu\text{m}$.

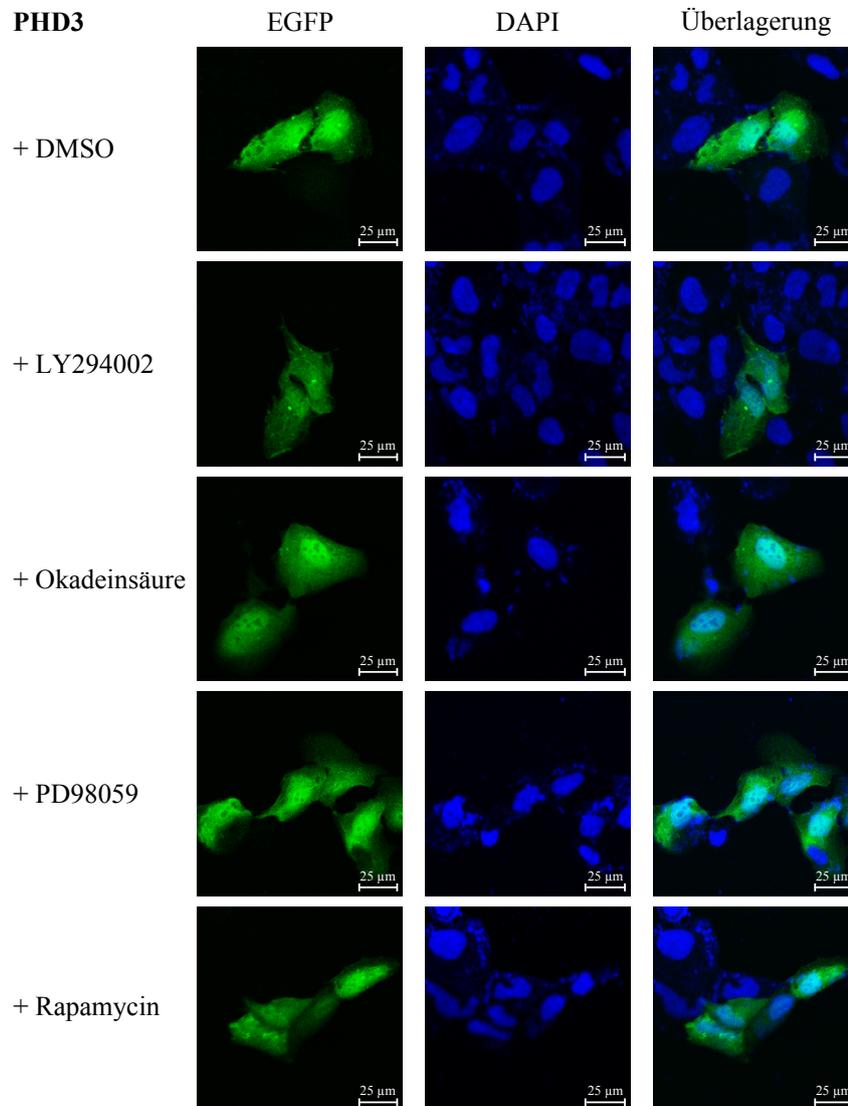
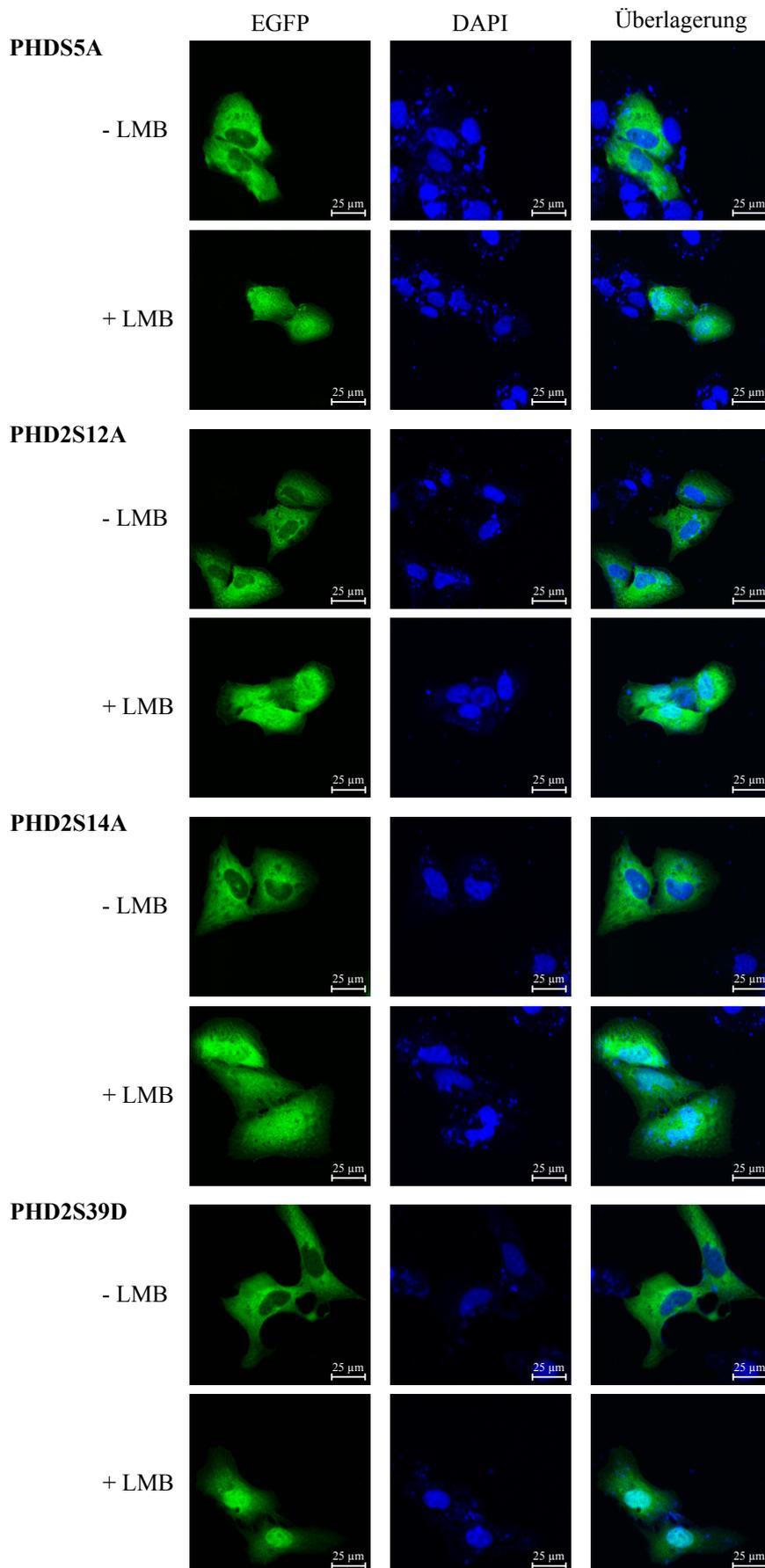


Abbildung 4.17: Einfluss phosphorylierungsabhängiger Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD3. U2OS-Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt PHD3-EGFP transfiziert. Durch die Behandlung mit spezifischen Kinase- und Phosphataseinhibitoren wurde der Einfluss phosphorylierungsabhängiger Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD3 untersucht. Die Zellkerne (blau) wurden mittels DAPI-Färbung visualisiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Lasermikroskop *LSM TCS S5P*. Gezeigt ist ein beispielhaftes Experiment aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 30 analysierten Zellen. Der weiße Balken unten rechts $\hat{=} 25 \mu\text{m}$.

4.3.2 Intrazellulärer PHD2-Transport nach Mutation vorhergesagter Phosphorylierungsstellen

Um die Bedeutung von Phosphorylierungen für den PHD2-Kernexport beurteilen zu können, wurde der N-terminale Bereich der Aminosäuresequenz, in dem ein putatives NES identifiziert werden konnte (Abbildung 4.12), auf mögliche Phosphorylierungsstellen untersucht. Dabei konnten drei Serinreste innerhalb des putativen NES an den Positionen S5, S12 und S14 identifiziert werden. Des Weiteren wurde durch das Programm *NetPhos 2.0* (Abschnitt 2.16) an der Position S39 eine potentielle Phosphorylierungsstelle prognostiziert, die in räumlicher Nähe zum identifizierten NES-Motiv liegt. Um die Rolle der vier potentiellen Phosphorylierungsstellen für die intrazelluläre PHD2-Lokalisierung zu überprüfen, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese (Abschnitt 3.3.7) Punktmutationen an diesen Positionen gesetzt und die Serine durch Alanine ersetzt. Die intrazelluläre Lokalisierung der EGFP-markierten PHD2-Punktmutanten wurde anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Lokalisierungsstudien ergaben, dass alle vier PHD2-Mutanten vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert waren, während Zugabe von LMB zu einer Akkumulation in Zellkern und Cytoplasma führte (Abbildung 4.18). Das beobachtete intrazelluläre Expressionsmuster der Punktmutanten impliziert, dass die untersuchten Serinreste nicht am Kernexport des Proteins beteiligt sind.



4.4 Einfluss der Kompartimentierung auf die molekulare Sauerstoffsensitivität

Das Zusammenspiel von Kernimport und Kernexport eines Proteins und die Verschiebung der intrazellulären Lokalisierung vom einen ins andere Kompartiment werden von eukaryotischen Zellen als Regulationsmechanismus für unterschiedliche Signalwege ausgenutzt [132, 191]. PHD2 Wild-Typ ist sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert und pendelt zwischen beiden Kompartimenten, wobei die Rolle des Kerntransports bislang ungeklärt blieb. Die Identifikation der putativen NLS- und NES-Sequenzbereiche in der PHD2-Aminosäuresequenz in Abschnitt 4.2 war die Voraussetzung dafür, in diesem Abschnitt die Rolle der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die Sauerstoffsensitivität zu untersuchen. Anhand der PHD2-Deletionsmutanten PHD2 Δ NLS und PHD2 Δ NES wurde die Sauerstoffsensitivität in dieser Arbeit erstmals in einem zellulären Umfeld untersucht, in dem PHD2 kompartimentspezifisch exprimiert wurde. Dadurch konnte die Hydroxylase-Aktivität der cytoplasmatisch exprimierten PHD2 mit der der nukleär exprimierten verglichen werden. In FRET-Messungen wurde die spezifische Interaktion zwischen HIF-1 α und PHD2 bzw. den kompartimentspezifisch exprimierten PHD2-Deletionsmutanten untersucht. Um den Effekt der Kompartimentierung auf die Sauerstoffsensitivität zu untersuchen, wurden die transkriptionelle HIF-Aktivität, die Expression HIF-1 α -abhängiger Zielgene und die HIF-1 α -Proteinexpression in Zellen ermittelt, die zuvor mit PHD2 Wild-Typ oder der jeweiligen PHD2-Deletionsmutante transient transfiziert wurden.

4.4.1 Kompartimentspezifische Interaktion zwischen HIF-1 α und PHD2

Die FRET-Messungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Fandrey (Institut für Physiologie, Universität Duisburg-Essen, Essen,

Abbildung 4.18 (gegenüberliegende Seite): Einfluss potentieller Phosphorylierungsstellen auf die intrazelluläre PHD2-Lokalisierung. U2OS-Zellen wurden mit PHD2-EGFP-Punktmutanten transfiziert. In die PHD2-Aminosäuresequenz wurden durch ortsgerichtete Mutagenese spezifische Punktmutationen gesetzt. Die Serine an den Positionen S5, S12, S14 und S39 wurden durch Alanine ersetzt. Durch fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Lasermikroskop *LSM TCS S5P* die Analyse der intrazellulären Lokalisierung der Punktmutanten. Zellkerne (blau) wurden mittels DAPI-Färbung visualisiert. Gezeigt ist ein beispielhaftes Experiment aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens 30 analysierten Zellen. Der weiße Balken unten rechts $\hat{=}$ 25 μ m.

Deutschland) durchgeführt, um den Einfluss der Kompartimentierung auf die Interaktion zwischen HIF-1 α und PHD2 zu untersuchen. Diese Technik eignet sich besonders gut zur Analyse von dynamischen Protein-Protein-Interaktionen und ermöglicht deren Untersuchung in Zeit und Raum. Die für diese FRET-Messungen benötigten Konstrukte ECFP-HIF-1 α -mut, EYFP-PHD2, EYFP-PHD2 Δ NLS und EYFP-PHD2 Δ NES wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert (Abschnitte 3.3.7 und 3.3.9), wobei die FRET-Messungen von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Fandrey durchgeführt wurden. HEK 293-Zellen wurden mit dem Donor-Molekül ECFP-HIF-1 α und dem Akzeptor-Molekül EYFP-PHD2 transfiziert. Nach Stabilisation von HIF-1 α durch Zugabe von DMOG konnten hohe FRET-Effizienzen in beiden Kompartimenten gemessen werden (Abbildung 4.19). Demnach findet die Interaktion zwischen HIF-1 α und PHD2 in Zellkern und Cytoplasma statt. Die Bedeutung der intrazellulären PHD2-Lokalisierung wurde anschließend durch Kotransfektion von ECFP-HIF-1 α und den Deletionsmutanten EYFP-PHD2 Δ NLS und PHD2 Δ NES analysiert. Wie in Abbildung 4.19 gezeigt, konnte keine Interaktion zwischen ECFP-HIF-1 α und der cytoplasmatisch lokalisierten Deletionsmutante EYFP-PHD Δ NLS detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden hohe FRET-Effizienzen nach Kotransfektion von ECFP-HIF α und EYFP-PHD2 Δ NES gemessen. Obwohl ECFP-HIF α und EYFP-PHD2 Δ NES in beiden Kompartimenten interagieren, konnten die höchsten FRET-Effizienzen im Zellkern ermittelt werden (Abbildung 4.19). Das Donor-Molekül ECFP-HIF-1 α -mut weist die Punktmutationen K719A und K753A auf, wodurch der Kernimport des Konstruktes inhibiert wird und das Konstrukt vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist [35]. Nach Transfektion des Donor-Moleküls ECFP-HIF-1 α -mut und der Akzeptor-Moleküle EYFP-PHD2, EYFP-PHD2 Δ NLS und EYFP-PHD2 Δ NES wurden hohe FRET-Effizienzen im Cytoplasma gemessen (Abbildung 4.19).

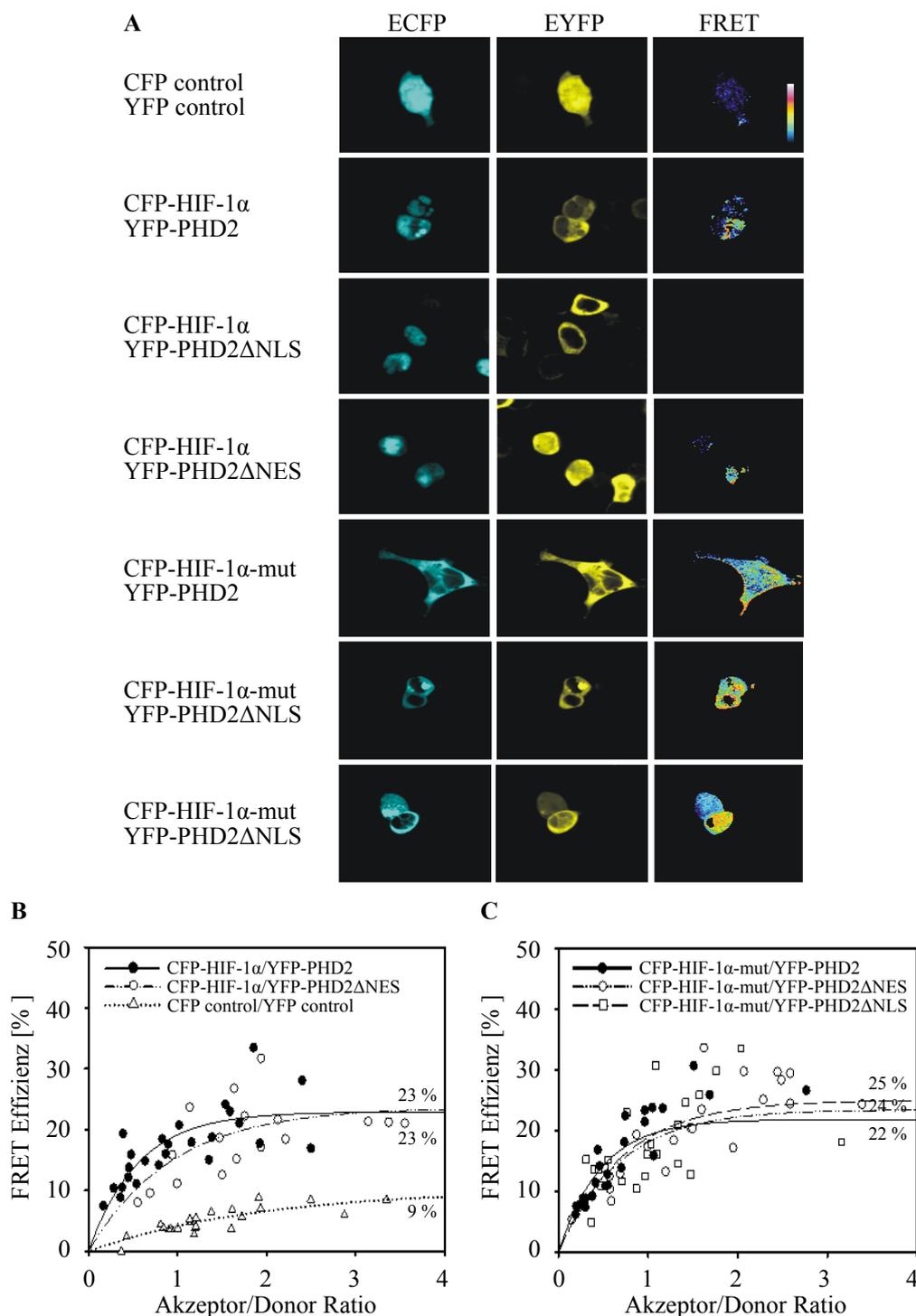


Abbildung 4.19: Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die Hydroxylierung von HIF-1 α . FRET-Messungen wurden durchgeführt, um den Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die Interaktion zwischen HIF-1 α und PHD2 zu untersuchen. HEK293-Zellen wurden mit ECFP-HIF-1 α oder ECFP-HIF-1 α -mut und EYFP-PHD2 Wild-Typ oder den Deletionsmutanten EYFP-PHD2 Δ NLS und EYFP-PHD2 Δ NES kotransfiziert. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit den Leervektoren ECFP und EYFP transfiziert wurden. (A) Repräsentative Fluoreszenzbilder der transfizierten Zellen zeigen die Zellen im ECFP-Kanal (blau), im EYFP-Kanal (gelb) und im FRET-Kanal in 400-facher Vergrößerung. (B) Die FRET-Effizienzen [%] der mit ECFP-HIF1 α und den EYFP-markierten PHD2-Konstrukten kotransfizierten Zellen wurden berechnet. (C) Die FRET-Effizienzen [%] der mit ECFP-HIF1 α -mut (HIF-1 α K719AK753A) und den EYFP-markierten PHD2-Konstrukten kotransfizierten Zellen wurden ermittelt.

4.4.2 Einfluss der PHD2-Lokalisierung auf die transkriptionelle HIF-Aktivität

Mithilfe eines Reporter-gen-Assays wurde die HIF- α -Hydroxylase-Aktivität der PHD2 bestimmt, die durch die Inhibierung der transkriptionellen HIF- α -Aktivität repräsentiert wurde. Dazu wurden U2OS-Zellen mit einem Hypoxie-responsiblen Reporterkonstrukt, einem Renilla-Luziferase-kodierenden Plasmid und dem jeweiligen PHD2-EGFP-Konstrukt (PHD2 Wild-Typ, PHD2 Δ NLS, PHD2 Δ NES) bzw. dem Leervektor pEGFP-N1 kotransfiziert (Abschnitt 3.1.4) und hypoxisch inkubiert (3 % O₂, 16 Stunden) (Abschnitt 3.1.5). Durch Messung der Firefly-Luziferase-Aktivität konnte die transkriptionelle HIF-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt werden (Abschnitt 3.1.6). Auf die hypoxische Inkubation reagierte die HIF-abhängige Firefly-Luziferase, in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen [161], mit einer fünffach höheren transkriptionellen Aktivität (Abbildung 4.20). Während der Analyse der hypoxischen Induzierbarkeit wurde eine höhere relative Luziferase-Aktivität gemessen als bei den anschließenden Untersuchungen zur Rolle der intrazellulären PHD2-Lokalisierung. Diese Schwankungen können durch den Gebrauch unterschiedlicher Chargen der Transfektionsreagenz oder Schwankungen im Zellwachstum erklärt werden.

Es konnte eine signifikante Inhibierung der transkriptionellen HIF-Aktivität durch Überexpression von PHD2 Wild-Typ, im Vergleich zu Kontrolltransfektionen mit dem EGFP-kodierenden Kontrollvektor pEGFP-N1, reproduziert werden (Abbildung 4.20) [133]. Um im Folgenden die Rolle der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die Reporter-Aktivität zu evaluieren, wurde die Deletionsmutante PHD2 Δ NLS überexprimiert. Wie in Abschnitt 4.2.3 dargestellt, beeinträchtigt die Deletion der Aminosäuren E196 bis H205, einer putativen NLS-Sequenz, den nukleären Import von PHD2 und führt zur cytoplasmatischen Retention des Proteins. Die Überexpression von PHD2 Δ NLS hatte, im Vergleich zur Überexpression von PHD2 Wild-Typ, einen signifikant geringeren Einfluss auf die transkriptionelle HIF-Aktivität (Abbildung 4.20). Im Gegensatz dazu führte die Überexpression des im Kernexport inhibierten Plasmids PHD2 Δ NES zu einer Inhibierung der HIF-Reporter-Aktivität, die mit der durch Überexpression von PHD2 Wild-Typ beobachteten vergleichbar war (Abbildung 4.20). Für PHD2 Wild-Typ und PHD2 Δ NES ergibt sich eine signifikant höhere Aktivität für die HIF- α -Hydroxylierung als für PHD2 Δ NLS.

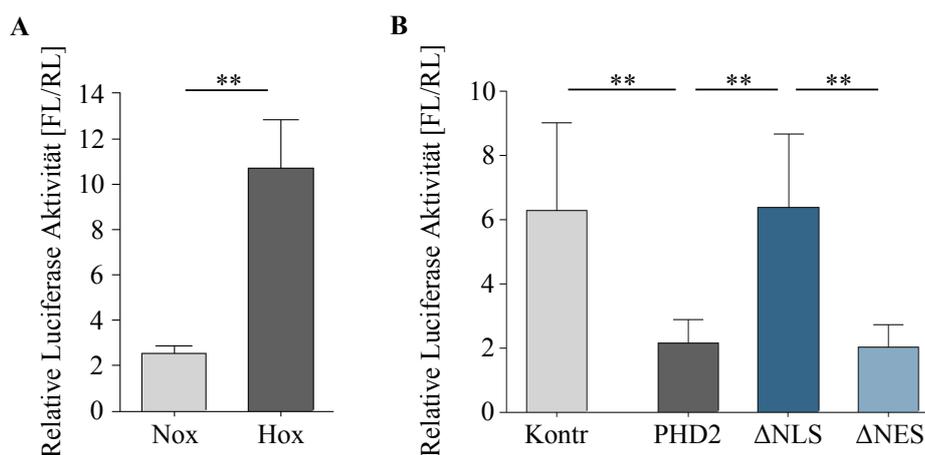


Abbildung 4.20: Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die transkriptionelle HIF-Aktivität. Ein Reporter-gen-Assay unter Verwendung eines Hypoxie-responsiblen Reporterkonstruktes wurde zur Ermittlung der transkriptionellen HIF-Aktivität nach hypoxischer Induktion durchgeführt, um die HIF-1 α -Hydroxylierung durch PHD2 Wild-Typ, PHD2 Δ NLS und PHD2 Δ NES zu beschreiben. (A) Zur Überprüfung der hypoxischen Induzierbarkeit wurden U2OS-Zellen mit dem Reporterkonstrukt, einem Renilla-Luziferase Konstrukt und dem Kontrollvektor pEGFP-N1 transient transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die hypoxische Inkubation (3 % O₂, 16 Stunden). (B) U2OS-Zellen wurden mit den Luziferase-Konstrukten und dem jeweiligen PHD2-Konstrukt bzw. dem Kontrollvektor pEGFP-N1 transient transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die hypoxische Inkubation (3 % O₂, 16 Stunden). Die Firefly-Luziferase-Aktivität (FL) wurde auf die Renilla-Luziferase-Aktivität (RL) normalisiert. Nox, Normoxie; Hox, Hypoxie; RL, Renilla-Luziferase; FL, Firefly-Luziferase; Kontr, Kontrolle; PHD2, PHD2-EGFP; Δ NLS, PHD2 Δ NLS-EGFP; Δ NES, PHD2 Δ NES-EGFP. Mittelwert \pm SD (Student's t-test (A) bzw. One-way-ANOVA-Analyse, korrigiert nach Bonferroni (B)), n = 6 (m = 18), **p < 0,01.

4.4.3 Einfluss der PHD2-Lokalisierung auf die Expression HIF-1 α -abhängiger Zielgene

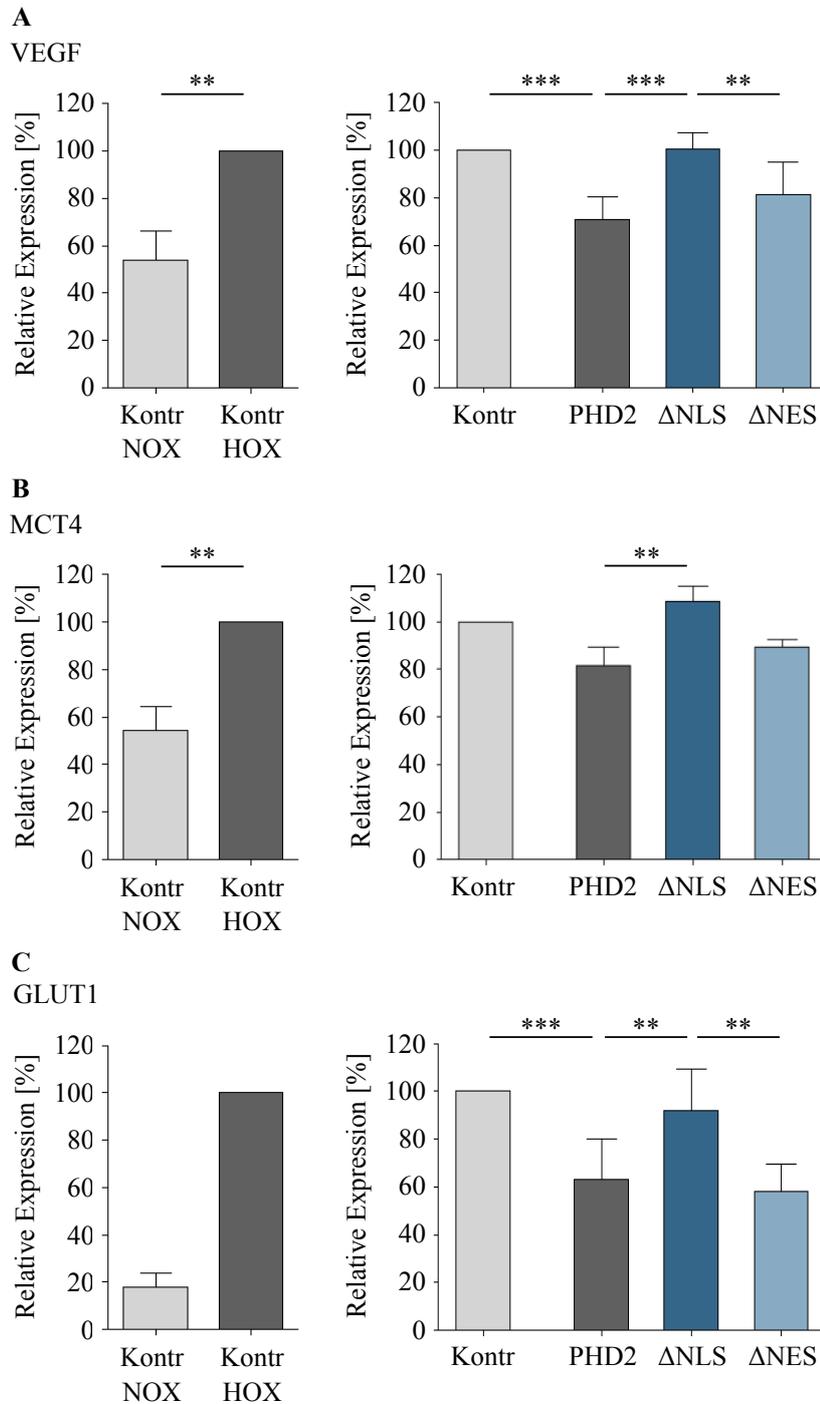
Um die Rolle der subzellulären PHD2-Lokalisierung auf die Hypoxie-induzierte HIF-1 α -abhängige Genexpression zu analysieren, wurde die Genexpression der HIF-1 α -Zielgene VEGF, MCT4 und GLUT1 bestimmt. Die RNA wurde aus mit dem Kontrollvektor pEGFP-N1 oder den EGFP-markierten PHD2-Konstrukten transfizierten Zellen isoliert. Durch quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR)-Analyse (Abschnitt 3.3.6) wurde die mRNA-Expression der untersuchten HIF-1 α -Zielgene unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen ermittelt. Die Expression der HIF-1 α -Zielgene wurde durch hypoxische Inkubation induziert (Abbildung 4.21). Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich, dass die Genexpression von VEGF und GLUT1 durch die Überexpression von PHD2 signifikant inhibiert wurde (Abbildung 4.21). Durch die Überexpression der cytoplasmatischen Deletionsmutante PHD2 Δ NLS wurde die Genexpression von VEGF, MCT4 und GLUT1 nicht inhibiert (Abbildung

4.21). Im Unterschied dazu führte die Überexpression der im Kernexport inhibierten Mutante PHD2 Δ NES zur Inhibierung der relativen VEGF- und GLUT1-Expression (Abbildung 4.21). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR bestätigen, dass die kompartimentspezifische PHD2-Expression einen Einfluss auf die HIF-1 α -abhängige Genexpression hat.

4.4.4 Einfluss der PHD2-Lokalisierung auf die HIF-1 α -Proteinexpression

Nachdem in den vorherigen Abschnitten gezeigt werden konnte, dass die subzelluläre PHD2-Lokalisierung einen Einfluss auf die transkriptionelle HIF-Aktivität und die Expression HIF-1 α -abhängiger Zielgene hat, wurde schließlich der Zusammenhang zwischen HIF-1 α -Proteinexpression und subzellulärer PHD2-Lokalisierung durch Western-Blot-Analyse (Abschnitt 3.4.5) untersucht. U2OS-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor pEGFP-N1 bzw. dem jeweiligen PHD2-Konstrukt transient transfiziert. Begründet durch die vergleichbar niedrige Sensitivität der Western-Blot-Analyse und die Hemmung der enzymatischen PHD2-Aktivität durch verminderte zelluläre Sauerstoffbedingungen, wurde eine HIF-1 α -Stabilisierung durch hypoxische Inkubation in diesem Experiment durch die Transfektion eines HIF-1 α -kodierenden Plasmids ersetzt. Die Western-Blot-Analyse ergab, dass die Expression aller PHD2-Konstrukte zu einer Inhibierung der HIF-1 α -Proteinexpression führte (Abbildung 4.22). Interessanterweise wurde die HIF-1 α -Proteinexpression durch Expression von PHD2 Wild-Typ oder PHD2 Δ NES signifikant stärker inhibiert als durch Expression der vorwiegend im Cytoplasma lokalisierten Deletionsmutante PHD2 Δ NLS (Abbil-

Abbildung 4.21 (gegenüberliegende Seite): Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die Expression HIF-1 α -abhängiger Zielgene. Die HIF-1 α -Zielgenexpression wurde bestimmt, um Rückschlüsse auf die HIF-1 α -Hydroxylierung durch PHD2 Wild-Typ, PHD2 Δ NLS und PHD2 Δ NES zu ziehen. (A) Zur Untersuchung der hypoxischen Induzierbarkeit wurden U2OS-Zellen mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfiziert. Nach hypoxischer Inkubation (3 % O₂, 16 Stunden) wurden die Expressionsniveaus der HIF-1 α -Zielgene VEGF (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor), MCT4 (Monocarboxylattransporter 4) und GLUT1 (Glukosetransporter 1) untersucht. (B) U2OS-Zellen wurden mit dem jeweiligen PHD2-Konstrukt bzw. dem Kontrollvektor pEGFP-N1 transient transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die hypoxische Inkubation (3 % O₂, 16 Stunden). Um die Expressionsniveaus der HIF-1 α -Zielgene zu ermitteln, wurden Gen-spezifische Oligonukleotide und eine Standardreihe des jeweiligen Gen-spezifischen Amplikons mittels qRT-PCR analysiert. Die Expressionsniveaus der HIF-1 α -Zielgene wurden auf die β -Aktin-Expression normalisiert. Die relativen Expressionsniveaus wurden normalisiert auf die relative Expression des jeweiligen Zielgens unter Transfektion des Kontrollvektors pEGFP-N1 (100 %). Kontr, Kontrolle; PHD2, PHD2-EGFP; Δ NLS, PHD2 Δ NLS-EGFP; Δ NES, PHD2 Δ NES-EGFP. Mittelwert \pm SD (One-way-ANOVA-Analyse, korrigiert nach Bonferroni), n = 6 (m = 18), **p < 0,01, ***p < 0,001.



dung 4.22).

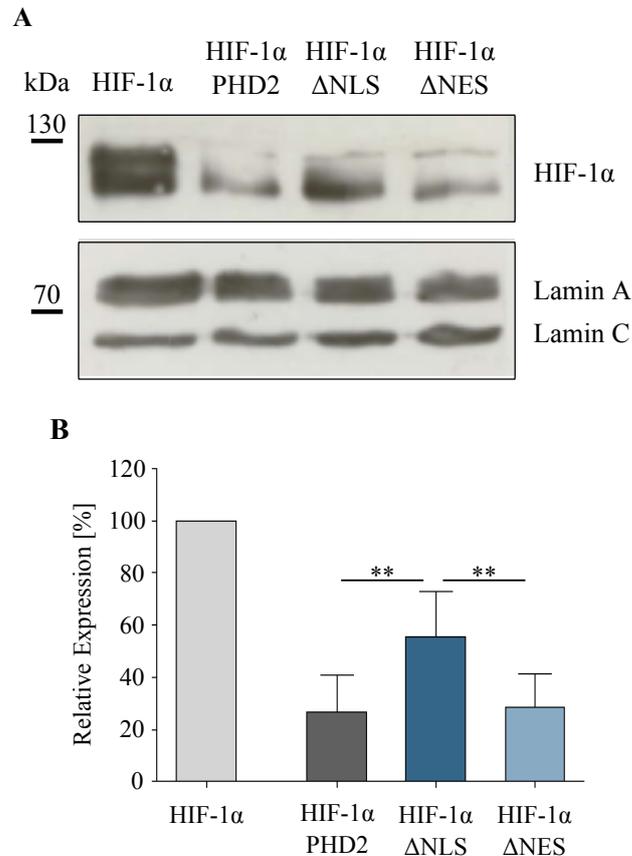


Abbildung 4.22: Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die HIF-1 α -Proteinexpression. Um den Einfluss der kompartimentspezifischen PHD2-Lokalisation auf die HIF-1 α -Proteinexpression beurteilen zu können, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. U2OS-Zellen wurden mit den PHD2-EGFP-Konstrukten PHD2 Wild-Typ, PHD2 Δ NLS und PHD2 Δ NES und einem HIF-1 α -kodierenden Plasmid (HIF-1 α -pcDNA3) kotransfiziert. Der Nachweis des HIF-1 α -Proteins im Gesamtzelllysate basiert auf dessen Visualisierung mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung des spezifischen Primärkörpers Anti-HIF-1 α und des passenden HRP-gekoppelten Anti-Maus-Sekundärantikörpers sowie des Primärantikörpers Anti-Lamin A/C und des passenden Anti-Ziege-Sekundärantikörpers. (A) Dargestellt sind die HIF-1 α - und Lamin A/C-spezifischen Banden in einem repräsentativen Western-Blot. (B) Die relativen Signalintensitäten wurden mittels *Image J* ermittelt. Die relativen HIF-1 α -Signalintensitäten wurden normalisiert auf die relative Signalintensität unter Transfektion des Kontrollvektors pEGFP-N1 (100 %). Kontr, Kontrolle; PHD2, PHD2-EGFP; Δ NLS, PHD2 Δ NLS-EGFP; Δ NES, PHD2 Δ NES-EGFP. Mittelwert \pm SD (One-way-ANOVA-Analyse, korrigiert nach Bonferroni), n = 6, **p < 0,01.

4.5 Einfluss der PHD2-Expression auf die Strahlenresponsivität von Tumorzellen

Das Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf führt in Tumorgewebe häufig zur Ausbildung hypoxischer Regionen und zur Aktivierung Hypoxie-abhängiger Signalwege. Die Expression des Transkriptionsfaktors HIF korreliert dabei invers mit der verstärkten Radioresistenz hypoxischer Tumore. Auch die Überexpression und nukleäre Translokation des HIF- α -Regulators PHD2 wurden mit erhöhter Tumoraggressivität in Kopf-Hals-Karzinomen assoziiert [85]. Dabei konnte bisher nicht gezeigt werden, ob der Einfluss der PHD2 auf das Tumorstadium von ihrer Hydroxylase-Aktivität abhängig ist. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Inhibierung der PHD2-Expression einen Einfluss auf die Strahlenresponsivität von Kopf-Hals-Karzinomzellen hat. Zusätzlich sollte in diesem Zusammenhang die Bedeutung der kompartimentspezifischen PHD2-Expression analysiert werden.

4.5.1 Inhibierung der Strahlenresistenz durch PHD2

knockdown

Für den transienten PHD2 *knockdown* wurden humane Kopf-Hals-Karzinomzellen der Zelllinie Fadu mit PHD2-spezifischer siRNA über 48 Stunden transfiziert (Abschnitt 3.1.4). Anschließend wurde die Expression der PHD2 durch Western-Blot-Analyse (Abschnitt 3.4.5) untersucht. Wie in Abbildung 4.23 dargestellt, konnte durch die siRNA-Behandlung ein signifikanter PHD2 *knockdown* erreicht werden.

Die Zellen wurden - wie in der Klinik üblich - mit Einzeldosen von 2 Gy bestrahlt. Zudem wurden Einzeldosen von 4 Gy verabreicht, um einen Kurvenverlauf zu verdeutlichen. Auf die Bestrahlung mit höheren Strahlendosen wurde verzichtet, da die hier verwendete Zelllinie in Vorarbeiten zu stark darauf reagierte und die Bestimmung der relativen Überlebensrate nach Bestrahlung mit höheren Strahlendosen nicht möglich war. Normoxisch inkubierte Kontrollen und PHD2 *knockdown* Tumorzellen wurden nach 48-stündiger Behandlung mit siRNA am Linearbeschleuniger Mevatron 74 bestrahlt (Abschnitt 3.1.10). Anschließend wurde die klonogene Wachstumsfraktion der Zellpopulationen mithilfe des Koloniebildungstests bestimmt (Abschnitt 3.1.11). Abbildung 4.24 stellt den Einfluss der PHD2-Defizienz auf das klonogene Überleben der Kopf-Hals-Karzinomzellen dar. Die Inhibierung der PHD2-Expression resultiert in einer signifikanten Strahlensensibilisierung unter normoxischen Bedingungen.

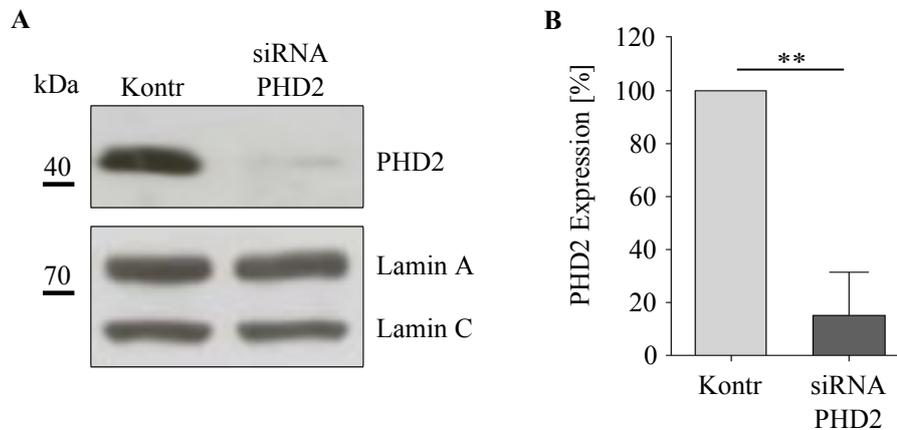


Abbildung 4.23: siRNA-vermittelter PHD2 *knockdown*. Fadu-Zellen wurden über 48 Stunden mit PHD2-spezifischer siRNA behandelt. Die Expression von PHD2 im Gesamtzelllysate wurde durch Western-Blot-Analyse untersucht. (A) Gezeigt sind die PHD2- und Lamin A/C-spezifischen Banden in einem repräsentativen Western-Blot. (B) Mithilfe des Programmes *Image J* wurden die Signalintensitäten ermittelt. Die relative PHD2-Signalintensität wurde auf die relative Signalintensität der Kontrolle (100 %) normalisiert. Kontr, Kontrolle. Mittelwert \pm SD (Student's t-test), $n = 3$, $**p < 0,01$.

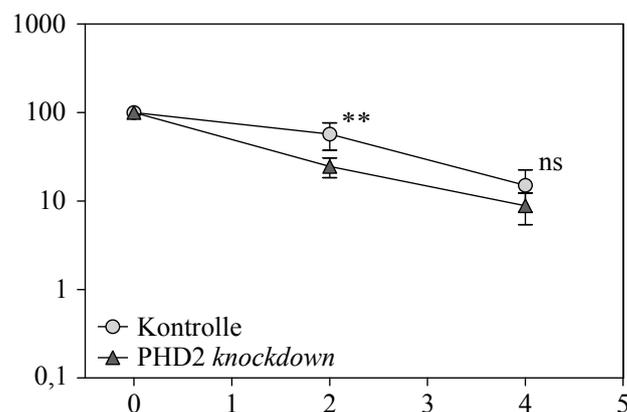


Abbildung 4.24: Strahlensensibilisierung nach PHD2 *knockdown*. Fadu-Zellen wurden über 48 Stunden mit PHD2-spezifischer siRNA behandelt, unter normoxischen Bedingungen inkubiert und mit 2 oder 4 Gy bestrahlt. In einem Koloniebildungstest wurde das klonogene Überleben der Wild-Typ und PHD2 *knockdown* Zellen bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil gewachsener Zellkolonien bestrahlter Wild-Typ oder PHD2-defizienter Zellen gegenüber deren unbestrahlten Kontrollzellen (normalisierte Daten). Mittelwert \pm SD (Two-way-ANOVA-Analyse, korrigiert nach Bonferroni), $n = 4$ ($m = 8$), $**p < 0,01$, ns = nicht signifikant).

4.5.2 Einfluss der subzellulären PHD2-Lokalisierung auf die Strahlensensibilität

Die Identifikation spezifischer Kerntransportsignale in der PHD2-Aminosäuresequenz (Abbildungen 4.10 und 4.12) ermöglicht die Untersuchung der Wirkung der kompartimentspezifischen PHD2-Expression auf die Strahlenresponsivität der Tumorzellen. Die Tumorzellen wurden dafür mit dem jeweiligen EGFP-fusionierten PHD2-Konstrukt (PHD2 Wild-Typ, PHD2 Δ NLS, PHD2 Δ NES) transfiziert (Abschnitt 3.1.4), für 24 Stunden normoxisch inkubiert und anschließend mit 2 oder 4 Gy bestrahlt (Abschnitt 3.1.10). Es erfolgte die Analyse der klonogenen Wachstumsfraktion der Zellpopulationen mithilfe des Koloniebildungstests (Abschnitt 3.1.11). Die Auswertung der normalisierten Daten ergab keine signifikanten Unterschiede in der Strahlenresponsivität der mit PHD2 Wild-Typ transfizierten Zellen und den Zellen, die mit den EGFP-markierten PHD2-Deletionsmutanten PHD2 Δ NLS und PHD2 Δ NES transfiziert wurden (Abbildung 4.25).

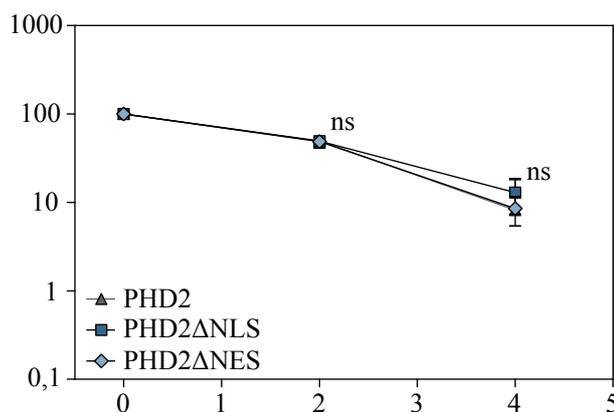


Abbildung 4.25: Einfluss der subzellulären PHD2-Lokalisierung auf die Strahlenresponsivität. Fadu-Zellen wurden über 24 Stunden mit den PHD2-EGFP-Konstrukten PHD2 Wild-Typ, PHD2 Δ NLS und PHD2 Δ NES transfiziert, in Normoxie inkubiert und mit 2 oder 4 Gy bestrahlt. Durch den Koloniebildungstest wurde das klonogene Überleben der Zellen bestimmt und der Einfluss der PHD2-Lokalisierung ermittelt. Der prozentuale Anteil gebildeter Zellkolonien bestrahlter Tumorzellen wurde auf deren unbestrahlten Kontrollzellen normalisiert. Kontr, Kontrolle; PHD2, PHD2-EGFP; Δ NLS, PHD2 Δ NLS-EGFP; Δ NES, PHD2 Δ NES-EGFP. Mittelwert \pm SD (Two-way-ANOVA-Analyse, korrigiert nach Bonferroni), $n = 3$ ($m = 6$), ns = nicht signifikant.

Diskussion

Bei Vertebraten spielen die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) eine zentrale Rolle für die Regulation der Sauerstoffhomöostase. Die Stabilität dieser Transkriptionsfaktoren wird in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit durch die Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD) reguliert. Die PHD sind als zelluläre Sauerstoffsensoren potentielle Kandidatenmoleküle für die Modulation der zellulären Sauerstoffversorgung im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung, z.B. bei kardiovaskulären und ischämischen Krankheiten und in der Behandlung von Tumoren. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der präzisen Lokalisierung des molekularen Sauerstoffsensings und der Rolle der intrazellulären Transportprozesse der HIF-modifizierenden PHD. Im ersten Teil wurden die Mechanismen des nukleären Imports der PHD-Isoformen PHD2 und PHD3 untersucht und molekulare Determinanten für deren Translokation identifiziert. In anschließenden Untersuchungen wurde der Fokus auf die Bedeutung der kompartimentspezifischen PHD2-Expression für die Regulation des HIF-1-Signalweges gelegt. Anhand verschiedener Zellkulturmodelle wurde der Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf das HIF-abhängige Sauerstoffsensing untersucht. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde in Kopf-Hals-Karzinomzellen *in vitro* die Abhängigkeit der Strahlenresistenz von der PHD2-Expression und deren intrazellulärer Lokalisierung untersucht.

5.1 Regulation des nucleocytoplasmatischen Transports von PHD2 und PHD3

Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren aktivieren die Expression spezifischer Zielgene, die direkt zur systemischen und zellulären Anpassung an verminderte Sauerstoffbedingungen beitragen, wodurch das Überleben der Zelle gesichert wird. HIF- α muss in den Zellkern, als Funktionsraum der Genregulation, transloziert werden, um dort mit HIF- β heterodimerisieren und an die DNA binden zu können. Die Modifikation des intrazellulären Transports der HIF- α -Untereinheit bietet somit die Möglichkeit, die HIF-abhängige Transkriptionsregulation zu beeinflussen. In früheren

Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Transport verschiedener Mitglieder der HIF-abhängigen Signalkaskade aktiv reguliert und durch das Importin α/β -System vermittelt wird. Mithilfe von GST-Bindungsstudien wurden spezifische Interaktionen zwischen den HIF-1 α , HIF-1 β und HIF-2 α und den nukleären Transport-Rezeptoren der Importin α/β -Familie nachgewiesen [35]. HIF-1 α wird zudem über die Importin β -ähnlichen Transport-Rezeptoren Importin 4 und Importin 7 in den Zellkern transportiert [22]. Somit wird deutlich, dass der nukleäre Import von HIF- α ein komplexer, effektiv regulierter Prozess ist, an dem verschiedene nukleäre Transport-Rezeptoren beteiligt sind.

Die intrazelluläre Lokalisierung der PHD wurde 2003 erstmals von Metzen *et al.* mithilfe von EGFP-markierten Fusionsproteinen in U2OS-Zellen untersucht [133]. Interessanterweise zeigen die drei PHD-Isoformen trotz ihrer übereinstimmenden enzymatischen HIF- α -Hydroxylase-Aktivität spezifische intrazelluläre Lokalisierungsmuster. Während PHD1 ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist, wird PHD3 in beiden Kompartimenten nachgewiesen. Für die PHD1 konnte gezeigt werden, dass sie aktiv über das Importin α/β -System in den Zellkern importiert wird und dieser Translokationsprozess von einem NLS abhängt [176]. Die intrazelluläre Lokalisierung der PHD2 konnte zunächst nicht eindeutig geklärt werden. Während Metzen *et al.* eine vorwiegend cytoplasmatische Lokalisierung der PHD2 beschrieben [133], wurde in weiteren Studien eine teilweise Translokation in den Zellkern beobachtet [8]. Durch Inhibierung des Kernexport-Rezeptors CRM1 mithilfe des Cytotoxins LMB konnte kürzlich die intrazelluläre Lokalisierung der PHD2 näher charakterisiert werden. PHD2 pendelt zwischen Zellkern und Cytoplasma und wird CRM1-abhängig aus dem Zellkern exportiert [176].

Die Bedeutung des geregelten Kerntransports der drei PHD-Isoformen konnte bislang nicht geklärt werden. Möglicherweise wird HIF- α nicht im Cytoplasma, sondern im Zellkern durch die PHD modifiziert, für den proteasomalen Abbau markiert und durch das 26S-Proteasom degradiert. In diesem Modell würde dem intrazellulären Transport der PHD eine essentielle, regulatorische Funktion mit großer Bedeutung für die Feinanpassung der Hypoxie-abhängigen Signaltransduktion und des molekularen Sauerstoffsensings zukommen. Um diese Frage weiterführend zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Mechanismus des intrazellulären Transports der PHD-Isoformen PHD2 und PHD3 näher charakterisiert. Der klassische Kernimport von Proteinen wird über die Importin α/β -Rezeptoren vermittelt. Importin α erkennt und bindet dabei die NLS des Substrats. Importin β bindet an die Kernporen der Kernmembran und ermöglicht die Translokation des Proteinkomplexes.

Potentiell kann die Lokalisierung der PHD3 in Zellkern und Cytoplasma durch ihre absolute Molekülmasse von 27 kDa erklärt werden, da Proteine mit einer ab-

soluten Molekülmasse von bis zu ~ 40 kDa passiv durch die Kernporen diffundieren können (als Übersichtsartikel [119]). Trotzdem werden auch kleinere Proteine, wie z. B. Nukleoplasmin, mit einer absoluten Molekülmasse von ~ 33 kDa, über die Importin α/β -Rezeptoren in den Zellkern transportiert [100]. Für das Matrix-Protein des Respiratorischen Synzytial-Virus (RSVM) und die HIV-1-Integrase konnte kürzlich gezeigt werden, dass die passive Diffusion und die Bindung an nukleäre Komponenten zwar zur Anreicherung der Proteine im Zellkern beiträgt, aber eine maximale nukleäre Akkumulation erst durch konventionelle Mechanismen über Transport-Rezeptoren erreicht werden kann. Um ein ähnliches Modell für die PHD3 zu untersuchen, wurden GST-Bindungsstudien mit rekombinant aufgereinigter und radioaktiv-markierter PHD3 durchgeführt (Abbildungen 4.1 und 4.3). Es konnte hier erstmalig eine spezifische Bindung zwischen Importin $\alpha 5$ und PHD3 identifiziert und somit die Abhängigkeit der nukleären PHD3-Lokalisation vom Importin α/β -Transportsystem bewiesen werden. Zudem wurde eine schwache Bindung von PHD3 an die Importine $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ und Importin β detektiert. Die Spezifität dieser Interaktionen wurde, wie schon für PHD1 beschrieben, mithilfe von Verdrängungsexperimenten mit rekombinant aufgereinigtem Nukleoplasmin für die Importin-Isoformen $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ bestätigt (Abbildungen 4.2 und 4.4). Im Vergleich zu HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-1 β und PHD1, zeigt PHD3 eine größere Importin α -Spezifität, da diese Komponenten des HIF-Signalweges von allen hier untersuchten Importin α -Isoformen erkannt und gebunden werden [35, 176]. Durch die Bindung an verschiedene Importin α -Isoformen findet der Kernimport von HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-1 β und PHD1 kontinuierlich statt und ist unabhängig von der Expression einer spezifischen Importin α -Isoform. Dadurch ergibt sich ein Vorteil für den kontinuierlichen Kernimport der Kargosubstrate, da die Expression der Importine während des Zellzyklus und der Differenzierung unterschiedlich reguliert werden [99]. Da die PHD3 möglicherweise jedoch durch passive Diffusion in den Zellkern translozieren kann, ist lediglich die maximale nukleäre Akkumulation von der Expression spezifischer Importin α -Isoformen abhängig. Die auffällig starke Bindungsintensität zwischen PHD3 und Importin $\alpha 5$, ist darauf zurückzuführen, dass Kargoproteine häufig mit unterschiedlicher Effizienz von den Importin α -Isoformen transportiert werden. Für diese unterschiedlichen Substrat-Spezifitäten der Importin α -Isoformen ist die NLS zwar erforderlich, aber nicht ausreichend, da auch der Gesamtproteinkomplex eines Substrates maßgeblich zur spezifischen Importin α -Bindung beiträgt [56].

Ferner wurde durch die Expression fluoreszenzmarkierter PHD3-Deletionskonstrukte und die Durchführung von GST-Bindungsstudien mit radioaktiv-markierten PHD3-Deletionskonstrukten gezeigt, dass der C-terminale Bereich des Proteins eine wichtige Rolle für den nukleären Import spielt. Durch Lokalisierungsstudien mit EGFP-markierten Proteinen wurde ein erstmals putatives NLS zwischen den Ami-

nosäuren L165 und P195 eingegrenzt (Abbildung 4.5, Seiten 79 und 80). Die Deletion dieses Sequenzmotives führt in GST-Bindungsstudien zu einer Verminderung der Bindungsaffinität von PHD3 Δ 165-195 an die untersuchten Importin-Isoformen $\alpha 3$ und $\alpha 5$ (Abbildung 4.6). Die trotz der Deletion des putativen NLS verbleibende Bindungsaffinität weist auf die Existenz eines zusätzlichen funktionellen NLS in PHD3 hin, dessen Funktion und Importin $\alpha 3/\alpha 5$ -Bindungsaffinität auch nach Deletion der Aminosäuren L165 bis P195 erhalten bleibt. Da der Kernimport durch Deletion der Aminosäuren L165 bis P195 stark inhibiert wird, das PHD3/Importin α/β -Bindungsverhalten durch diese Deletion aber nur geringfügig beeinflusst wird, wäre ein alternativer Kernimport-Mechanismus, der Importin α/β -unabhängig verläuft und PHD3 mit hoher Effizienz in den Zellkern transportiert, eine Erklärung für diesen Befund. Als mögliche Kernimport-Rezeptoren kämen dafür beispielsweise die Importin β -ähnlichen Proteine in Frage. In zukünftigen Untersuchungen sollte die Bindung der PHD3-Aminosäuren L165 bis P195 an verschiedene Kernimport-Rezeptoren untersucht werden. Während für die Import-Rezeptoren Importin β und Transportin 1 kanonische NLS-Konsensussequenzen definiert wurden, bleiben die Eigenschaften der Signalsequenzen anderer Mitglieder der Importin β -ähnlichen Proteinfamilie bislang unbekannt [28]. Die Tatsache, dass der eingegrenzte NLS-Sequenzbereich der PHD3 zwischen den Aminosäuren L165 und P195 keiner bekannten kanonischen NLS-Konsensussequenz entspricht, erhöht die Wahrscheinlichkeit eines alternativen Kernimports über Importin β -ähnliche Proteine.

Im Gegensatz dazu beeinflusst die Deletion der PHD3-Aminosäuren K222 bis R226 in fluoreszenzmikroskopischen Lokalisierungsstudien das intrazelluläre Expressionsmuster der Prolyl-4-Hydroxylase nicht (Abbildung 4.5, Seiten 79 und 80). Unerwarteterweise wird die Importin $\alpha 3/\alpha 5$ -Bindung durch Deletion dieses Aminosäurebereiches jedoch sehr stark inhibiert (Abbildung 4.6). Diese konträren Befunde deuten darauf hin, dass die Aminosäuren K222 bis R226 den Importin α/β -abhängigen Kerntransport vermitteln. Der Sequenzbereich zwischen den Aminosäuren K222 und R226 entspricht zwar nicht den fünf Konsensusklassen der klassischen *monopartite* Importin α/β -abhängigen NLS-Motive (Abschnitt 1.5.5), weist jedoch einen auffällig hohen Anteil an basischen Aminosäuren auf (²²²KKKFR²²⁶). In Lokalisierungsstudien mit EGFP-markiertem Fusionsprotein hat die Deletion der Aminosäuren K222 bis R226 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisierung des Proteins, da PHD3 zusätzlich durch Importin α/β -unabhängige Transportwege in den Zellkern transloziert und diese Transportwege die Effizienz des Importin α/β -vermittelten Kernimports der PHD3 scheinbar übersteigen. Der Importin α/β -unabhängige Kernimport der PHD3 wird in dem hier aufgestellten Modell durch die Aminosäuren L165 bis P195 und/oder durch passive Diffusion vermittelt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zum Kernimport der PHD3 sind im Einklang mit früheren

Modellen, die den Kernimport von Proteinen über mehr als einen Signalweg und die Existenz verschiedener Transportsignale beschreiben [22, 53]. Diese komplexen Prozesse könnten dazu dienen, die effektive Regulation des Kerntransports zu steigern. Dementsprechend konnte für die α -Untereinheit von HIF-1 gezeigt werden, dass der Importin α/β -abhängige nukleäre Import von einer klassischen NLS im C-terminalen Bereich des Proteins abhängig ist [35]. Darüber hinaus konnte ein zusätzlicher Kernimport-Mechanismus über die Importine 4 und 7 identifiziert werden, der durch eine N-terminale NLS vermittelt wird [22]. Der Kernimport des ligandenaktivierten Glukokortikoid-Rezeptors ist ebenfalls abhängig von verschiedenen NLS-Motiven. Während die eine NLS einer klassischen *monopartite* NLS entspricht und an Importin $\alpha 2$ bindet, konnte die zweite NLS bislang nur unzureichend charakterisiert werden. Jedoch wurde eine Bindung der Importine 7 und 8, die zur Familie der Importin β -ähnlichen Proteine gehören und direkt an ihre Kargoproteine binden, an beide NLS-Motive beschrieben [53].

Der Kernimport der PHD2 wurde bereits in früheren Studien untersucht [176]. Die Identifikation des Kernimport-Mechanismus der PHD2 ist für die präzise Charakterisierung der intrazellulären Lokalisierung des molekularen Sauerstoffsensings von großer Bedeutung, da PHD2 als Hauptregulator der HIF-1-Stabilität gilt [10]. In GST-Bindungsstudien konnte bisher keine Bindung von PHD2 an die Importin α/β -Rezeptoren detektiert werden [176]. Prinzipiell kann der Kernimport von Proteinen auch durch Interaktionspartner vermittelt werden, indem diese das Substrat binden und durch einen Huckepack-Mechanismus in den Zellkern transportieren. Der Tumorsuppressor *breast cancer gene 1* (BRCA1) wird aktiv über die Importin α/β -Rezeptoren in den Zellkern transportiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass BRCA1 über einen Huckepack-Mechanismus in den Zellkern transportiert wird, bei dem der Interaktionspartner *BRCA1-associated RING domain protein 1* (BARD1) eine Rolle spielt [187]. Auch für den transregulatorischen Faktor Sof1 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, der an der ribosomalen Biogenese beteiligt ist, wurde ein nukleärer Import über einen Huckepack-Mechanismus nachgewiesen. Die Interaktion zwischen Sof1 und Kap121, das Importin 5-Homolog der Hefe, wird über den transregulatorischen Faktor Nop1 vermittelt, der direkt an Kap121 bindet [113].

In dieser Arbeit wurde der Kernimport der PHD2 über einen Huckepack-Mechanismus untersucht. Dafür wurde erstmals die Bindung der PHD2 an die Importin α/β -Rezeptoren über die Interaktionspartner LIMD1 und HIF-1 α untersucht. Wie einleitend erwähnt (Abschnitt 1.2.2), ist HIF-1 α ein Kargoprotein des Importin α/β -Transportsystems [35]. Unter normoxischen Bedingungen weist HIF-1 α eine Halbwertszeit von $t_{1/2} < 5$ min auf [195]. Daraus resultierend lässt sich auf eine sehr schnelle Interaktion zwischen den PHD und HIF- α schließen, deren Kurzlebigkeit in Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Messungen verdeut-

licht wurde [203]. Der gekoppelte Kernimport von PHD2 über HIF-1 α ist aufgrund dieser kurzlebigen Interaktion unwahrscheinlich und konnte auch in dieser Arbeit folgerichtig in Importin α/β -Bindungsstudien nicht demonstriert werden (Abbildung 4.9). Im Gegensatz zu HIF-1 α konnte für den Tumorsuppressor LIMD1 der nukleäre Import bisher nicht näher charakterisiert werden. Es ist jedoch bekannt, dass LIMD1 mit PHD2 interagiert und zwischen Zellkern und Nukleus pendelt [52, 171]. Der nukleäre Export von LIMD1 ist vom Export-Rezeptor CRM1 abhängig [171]. In GST-Bindungsstudien konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Interaktion zwischen LIMD1 und den Importin α/β -Rezeptoren detektiert werden (Abbildung 4.7). Auch der Proteinkomplex bestehend aus LIMD1 und PHD2 zeigte keine Bindungsaktivität an die untersuchten Importine (Abbildung 4.8). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass LIMD1 über einen alternativen Kernimport-Mechanismus transportiert wird und PHD2 nicht im Komplex mit LIMD1 an die Importin α/β -Rezeptoren bindet.

Für den Kernimport von PHD2 käme, neben einem Huckepack-Mechanismus, die nukleäre Translokation über andere Mitglieder der Proteinfamilie der Karyopherine in Frage. Für zehn humane Karyopherine konnte bisher gezeigt werden, dass sie Proteine in den Zellkern transportieren. In den letzten Jahren konnten für Importin β und Transportin 1 zahlreiche Substrate identifiziert werden, während der Import über andere Importin β -ähnliche Proteine nur für eine geringe Anzahl an Proteinen nachgewiesen werden konnte [123]. Die Beteiligung der Importin β -ähnlichen Proteine Importin 4 und Importin 7 am subzellulären Transport der Komponenten des HIF-abhängigen Sauerstoffsensings konnte bereits demonstriert werden, da die HIF-1 α -Untereinheit über diese und andere Import-Rezeptoren in den Zellkern importiert wird [22]. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Vorversuche weisen jedoch nicht darauf hin, dass der Kernimport von PHD2 über Importin 4 und Importin 7 vermittelt wird. Allerdings konnten die dazu durchgeführten His-Bindungsstudien aufgrund mangelnder Qualität und Quantität der aufgereinigten His-markierten Importine nicht final ausgewertet werden. Trotzdem stellt der Kernimport der PHD2 über einen Importfaktor der Proteinfamilie der Karyopherine einen vielversprechenden Ansatz dar, der in Zukunft mithilfe von optimierten Bindungsstudien weiter untersucht werden sollte. Da der durch Importin β -ähnliche Proteine vermittelte Kernimport typischerweise durch die kleine GTPase Ran reguliert wird, könnten zudem durch Perturbation des Ran-Konzentrationsgradienten Rückschlüsse auf den nukleären Import der PHD2 gezogen werden. Oxidativer Stress führt zu einer Verminderung der Transporteffizienz des Ran-vermittelten Kernimports und zur Delokalisierung der Transport-Rezeptoren [67, 97]. Im Falle eines Kernimports der PHD2 in Abhängigkeit von Importin β -ähnlichen Proteinen, könnte oxidativer Stress daher zu einer verminderten nukleären Anreicherung der PHD2 führen.

In den letzten Jahren wurden zudem zahlreiche Variationen zum konventionellen Karyopherin-vermittelten Kernimport diskutiert, die auch für den Kernimport der PHD2 eine Rolle spielen könnten. Einige Transkriptionsfaktoren der *high mobility group* (HMG)-Box-Familie, wie z. B. SOX9, werden über das Calcium-bindende Protein Calmodulin in den Zellkern transportiert. Genau wie für PHD2 konnte auch für SOX9 gezeigt werden, dass es ein direktes Zielgen von HIF-1 ist [134, 208]. Es kann daher spekuliert werden, dass weitere HIF-1-Zielgene mit Calmodulin interagieren und Calcium-abhängig von einem Kompartiment in das andere transportiert werden. Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre der Kernimport der PHD2 über direkte Interaktionen mit Nukleoporinen des Kernporen-Komplexes. Das prominenteste Beispiel für diesen Importin-unabhängigen Kernimport-Mechanismus ist β -Catenin, das kein klassisches NLS enthält und direkt mit Komponenten der Nukleoporine interagiert.

Obwohl der Kernimport-Mechanismus der PHD2 nicht näher charakterisiert werden konnte, sollten in dieser Arbeit durch Identifikation spezifischer Signalsequenzen innerhalb der Aminosäuresequenz von PHD2 Rückschlüsse auf die Regulation der intrazellulären Lokalisierung gezogen werden. Viele NLS-Motive weisen geringe Sequenzähnlichkeiten auf und zeigen auch strukturell eine hohe Variabilität, so dass die Vorhersage spezifischer NLS-Konsensussequenzen sehr schwierig ist [123]. Mit verschiedenen Datenbanken (PredictProtein, PSORT II Prediction) wurde keine NLS-Konsensussequenz in der Aminosäuresequenz von PHD2 vorhergesagt. Daher wurden EGFP-markierte PHD2-Deletionskonstrukte generiert und ihre intrazelluläre Lokalisierung fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dadurch konnte hier erstmalig gezeigt werden, dass der Kernimport von PHD2 von einem intakten Sequenzmotiv zwischen den Aminosäuren E196 und H205 (¹⁹⁶EYIVPCM²⁰⁵NKH) abhängt (Abbildungen 4.10, Seiten 89 und 90). Bisher konnten lediglich für den klassischen Kernimport über die Importin α/β -Rezeptoren und für den Transportin 1-vermittelten Kernimport kanonische Konsensussequenzen identifiziert werden. Wie einleitend beschrieben (Abschnitt 1.5.5), erkennen die Importin α -Adapterproteine vorwiegend kanonische NLS-Motive, die aus einem (*monopartite*) oder zwei (*bipartite*) basischen Aminosäureclustern bestehen [103]. Das in dieser Arbeit identifizierte NLS in der Aminosäuresequenz von PHD2 weist mit K203 nur einen basischen Aminosäurerest auf. Zusammen mit früheren Befunden, in denen keine Interaktion zwischen PHD2 und verschiedenen Importin α -Isoformen oder Importin β identifiziert werden konnte [176], bestätigt die Identifikation einer nicht-klassischen NLS in PHD2, dass PHD2 kein Import-Substrat des klassischen Importin α/β -vermittelten Kernimports ist.

Kürzlich konnte neben der klassischen NLS der Importin α/β -Rezeptoren zudem der intrazelluläre Transport über den Rezeptor Transportin 1 näher beschrieben und ein korrespondierendes NLS, das Prolin-Tyrosin (PY)-NLS, identifiziert werden.

Die Klasse der PY-NLS-Motive zeichnet sich strukturell durch ein N-terminales hydrophobes oder basisches Motiv, einen zentralen Argininrest und die C-terminale PY-Sequenz aus [181]. Das in dieser Arbeit erstmalig identifizierte putative NLS weicht strukturell von der beschriebenen PY-NLS ab und weist darauf hin, dass PHD2 nicht über Transportin 1 in den Zellkern importiert wird. Obwohl dieses NLS keinem klassischen Konsensmuster bereits identifizierter Lokalisierungssignale entspricht, kann der nukleäre Import über Transportin 1 nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da in seltenen Fällen nicht-klassische NLS-Motive von den Transportrezeptoren erkannt und gebunden werden können. Beispiele für Proteine mit nicht-klassischem NLS sind das Parathormon-verwandte Protein, das direkt an Importin β bindet [110] und die Phospholipid-Scramblase 1, deren nicht-klassische NLS von Importin α erkannt und gebunden wird [24]. Auch für Transportin 1 konnten in den primären Aminosäuresequenzen der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine H und F NLS-Motive in einer Glycin-Tyrosin-Arginin-reichen Domäne beschrieben werden, die nicht mit der PY-NLS-Sequenz übereinstimmen [190].

Neben dem Kernimport stellt der Kernexport den zweiten wichtigen Schritt für die geregelte intrazelluläre Lokalisierung von Proteinen dar. Obwohl mit CRM1 bereits der nukleäre Export-Rezeptor der PHD2 identifiziert wurde [176], konnte bisher kein putatives Transportsignal für den nukleären Export in der primären Aminosäuresequenz von PHD2 beschrieben werden. Durch Lokalisierungsstudien mit einem EGFP-markierten PHD2-Deletionskonstrukt gelang in dieser Arbeit erstmals die Identifikation eines NES im N-terminalen Bereich des Proteins. Das NES wurde auf ein Sequenzmotiv zwischen den Aminosäuren G6 und Y20 eingegrenzt (⁶GGPGGPPSERDRGY²⁰) (Abbildung 4.12). Für Kargoproteine des CRM1-abhängigen Kernexports wurden vorwiegend kurze, Leucin-reiche Konsensusmotive beschrieben [46], die häufig auch andere hydrophobe Aminosäuren enthalten [200] (als Übersichtsartikel [205]). Darauf basierend wurde eine NES-Konsensussequenz etabliert [107]. Das CRM1-abhängige NES ist jedoch ein komplexes und diverses Signal, dessen Beschreibung durch eine einzige Konsensussequenz nicht ausreichend ist [102]. Die Identifikation neuer funktioneller NES-Konsensussequenzen zeigt, dass bisher beschriebene CRM1-abhängige Exportsignale in ihrer Struktur variabler sind als zunächst angenommen [102]. Trotzdem passt das in dieser Arbeit identifizierte NES nicht zu den bis heute beschriebenen kanonischen Konsensussequenz-Klassen, da in diesem Motiv keine hydrophoben Aminosäuren enthalten sind. Bis heute konnten nur vereinzelt CRM1-abhängige, nicht-kanonische NES identifiziert werden, deren chemisch-physikalischer Charakter nicht von hydrophoben Aminosäuren geprägt ist. Die Affinität der CRM1-Bindung des Kernimport-Rezeptors Snurprotein-1 hängt von einer N-terminalen Leucin-reichen und einer großen nicht-kanonischen Sequenzdomäne des Proteins ab, die nicht den hydrophoben Konsensussequenzen entspricht.

Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass dieses nicht-kanonische NES-Motiv eine um ein Vielfaches stärkere Bindung von Snurprotein-1 an CRM1 vermittelt als die Prototyp-NES des RNA-Transportproteins Rev des HIV-1 [151]. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass der CRM1-abhängige nukleäre Export auch durch nicht-kanonische NES-Motive vermittelt werden kann. In dieser Arbeit wurde eines der wenigen bisher beschriebenen nicht-klassischen NES-Motive identifiziert.

Zusätzlich zu CRM1 gibt es einige andere nukleäre Export-Rezeptoren, wie z. B. CAS, Exportin-4, Exportin-5, Exportin-6 und Exportin-7 (als Übersichtsartikel [205]). Trotzdem konnten neben dem klassischen CRM1-abhängigen NES bis heute keine Konsensussequenzen für den Kernexport identifiziert werden. Die Identifikation eines nicht-kanonischen Exportsignals lässt vermuten, dass PHD2 auch über einen CRM1-abhängigen Huckepack-Mechanismus aus dem Zellkern transportiert werden könnte. In diesem Modell würde PHD2 über den Sequenzbereich zwischen den Aminosäuren G6 bis Y20 an einen Interaktionspartner binden. Durch Bindung des Interaktionspartners an CRM1 könnte der heterotrimere Proteinkomplex aus dem Zellkern exportiert werden. In einigen Arbeiten konnten komplexe Huckepack-Kernexport-Mechanismen beschrieben werden, von denen einige CRM1-abhängig verlaufen. Prozessierte mRNA wird über einen heterodimeren Transport-Rezeptor NXF1/p15 aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert. NXF1/p15 interagiert dabei direkt mit den Nukleoporinen des Kernporen-Komplexes. Im Gegensatz dazu wird der Kernexport der großen ribosomalen Untereinheit (60S) über einen CRM1-abhängigen Huckepack-Mechanismus vermittelt, bei dem das Adapterprotein NMD3 eine wichtige Rolle spielt [82]. Für PHD2 wäre zudem das Vorhandensein zweier NES-Motive in der primären Aminosäuresequenz der PHD2 denkbar, die den Kernexport über alternative Transportwege vermitteln. Dabei wäre das in dieser Arbeit identifizierte NES am CRM1-unabhängigen Kernexport beteiligt, während der CRM1-abhängige Kernexport von einem bislang unbekanntem NES abhinge.

5.2 Nukleus-spezifische HIF-1 α -Hydroxylierung durch PHD2

PHD2 spielt die Schlüsselrolle in der Regulation der HIF-1 α -Stabilität und ist der kritische Sauerstoffsensor unter normoxischen Bedingungen *in vitro* [10]. In den letzten Jahren verdeutlichten zudem verschiedene Studien die essentielle Rolle der Hydroxylase-abhängigen Aktivität der PHD2 für das zelluläre Überleben, die Proliferation, das Zellwachstum und die Tumorgenese. Zudem untersuchten Takeda *et al.* den Einfluss der Phd-Expression auf die Embryogenese von Mäusen *in vivo* [184]. Phd2-defiziente Mäuse überleben durch schwere Defekte der Plazenta und des Her-

zens das Embryonalstadium nicht, während sich $\text{Phd1}^{-/-}$ und $\text{Phd3}^{-/-}$ Mäuse offensichtlich normal entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig spezifische Transportsignale in der primären Aminosäuresequenz von PHD2 identifiziert. Dadurch wurde die Analyse der PHD2-Hydroxylase-Aktivität in einem zellulären Modell ermöglicht, in dem die Aktivität von PHD2 Δ NLS auf das Cytoplasma begrenzt und die von PHD2 Δ NES auf beide Kompartimente verteilt ist. Bei den Analysen im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die Überexpression von PHD2 Wild-Typ und PHD2 Δ NES die transkriptionelle HIF-Aktivität, die Expression HIF-1-abhängiger Zielgene und die HIF-1 α -Proteinexpression inhibiert (Abbildungen 4.20, 4.21 und 4.22). Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression der cytoplasmatisch lokalisierten PHD2 Δ NLS-Deletionsmutante nur geringe Effekte auf die transkriptionelle HIF-Aktivität und die Expression der HIF-1-abhängigen Zielgene (Abbildungen 4.20 und 4.21). Auch die HIF-1 α -Proteinexpression war nach Überexpression von PHD2 Δ NLS signifikant höher als nach Überexpression von PHD2 Wild-typ und PHD2 Δ NES (Abbildung 4.22). Diese Ergebnisse implizieren eine kritische Rolle der intrazellulären PHD2-Lokalisierung im Bezug auf ihre Funktion als Regulator der HIF-1 α -Stabilität *in vitro*. Die Hydroxylase-Aktivität der PHD2 im nukleären Kompartiment ist größer als im Cytoplasma. Die höhere PHD2-Aktivität im Zellkern könnte durch eine differentielle Komplexbildung der PHD2 in Zellkern und Cytoplasma begründet sein. In Kopf-Hals-Karzinomzellen weist das PHD2-EGFP-Fusionskonstrukt im nukleären Kompartiment eine höhere Mobilität auf als im Cytoplasma, die durch Unterschiede in der kompartimentspezifischen Komplexbildung begründet sein könnte [85]. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich ein Modell, in dem das molekulare Sauerstoffsensing durch PHD2 im Zellkern lokalisiert ist, der Transkriptionsfaktor HIF-1 α im Zellkern durch PHD2 hydroxyliert und durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert wird. Da gezeigt werden konnte, dass PHD2 *in vitro* der Hauptregulator von HIF-1 α ist, während PHD3 vorwiegend zur Hydroxylierung von HIF-2 α beiträgt [2, 10], sollte zukünftig die Bedeutung der intrazellulären Lokalisierung der zwei PHD-Isoformen PHD1 und PHD3 für die molekulare Sauerstoffsensitivität, besonders in Hinblick auf die Hydroxylierung von HIF-2 α , untersucht werden.

In Anbetracht dessen, dass die katalytische Aktivität der PHD2 von den Aminosäuren H313, D315 und H374 abhängt, ist es unwahrscheinlich, dass die Deletion der Aminosäuren E196 bis H205 die enzymatische Aktivität der PHD2 direkt beeinflusst. Die Aminosäure C201 wurde als zweite Metall-Bindestelle der PHD diskutiert, da sie Zink und Cadmium cheliiert [128]. Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Punktmutation C201S die Hydroxylase-Aktivität der PHD2 steigert [147]. Im Gegensatz dazu hat die Mutation P200Q einen geringen inhibitorischen Einfluss auf die Hydroxylase-Aktivität der PHD2. Während die transkrip-

tionelle HIF- α -Aktivität durch die PHD2-Mutation P200Q nicht beeinflusst wird, konnte in PHD-Aktivitätsassays mit dieser Mutante ein geringer Zeitverzug der HIF-1 α -Hydroxylierung beobachtet werden [108]. Eindeutig konnte dennoch nicht geklärt werden, ob der Aminosäurerest C201 und sein flankierender Sequenzbereich relevant sind für die Rolle der PHD2 als Sauerstoffsensor. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Joachim Fandrey werden derzeit PHD-Aktivitätsassays durchgeführt, um die Modifikation der Hydroxylase-Aktivität durch die eingebrachten Deletionen der Aminosäuren E196 bis H205 (PHD2 Δ 196-205) und G6 bis Y20 (PHD2 Δ 6-20) auszuschließen. Vorläufige Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivität der PHD2 für die Hydroxylierung von HIF-1 α durch die Mutationen nicht beeinflusst wird. In FRET-Messungen, die ebenfalls in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Fandrey durchgeführt wurden, konnte eine Interaktion zwischen HIF-1 α und PHD2 bzw. PHD2 Δ NES in beiden Kompartimenten detektiert werden, wobei die höchste FRET-Effizienz im Zellkern gemessen wurde (Abbildung 4.19). Zudem wurde deutlich, dass die Interaktion von HIF-1 α mit PHD2 durch die Deletion der putativen NLS zwischen den Aminosäuren E196 bis H205 inhibiert wird. Im Gegensatz dazu findet eine Interaktion zwischen einer cytoplasmatisch lokalisierten HIF-1 α -Mutante und der Deletionsmutante PHD2 Δ NLS statt. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Inhibierung der HIF-1 α /PHD2-Interaktion vornehmlich auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD2-Deletionsmutante zurückzuführen ist und nicht auf die Deletion eines für die HIF-1 α -Hydroxylierung essentiellen Sequenzmotives der PHD2. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Hydroxylase-Aktivität der PHD2 von ihrer intrazellulären Lokalisierung abhängt und durch Deletion der Aminosäuren E196 bis H205 nicht inhibiert wird.

Die präzise intrazelluläre Lokalisierung des molekularen Sauerstoffsensors wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. In Reporter-gen-Assays, qRT-PCR Experimenten und Western-Blot-Analysen (Abbildungen 4.20, 4.21 und 4.22) konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PHD2-Deletionsmutante PHD2 Δ NLS, deren Kernimport stark inhibiert ist, eine geringere HIF-1 α -Hydroxylase-Aktivität aufweist als PHD2 Wild-Typ. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnten Berchner-Pfannschmidt *et al.* durch Zellfraktionierung und anschließende PHD-Aktivitätsassays bereits verdeutlichen, dass von nukleären Zellextrakten eine größere PHD2-Aktivität ausgeht als von cytoplasmatischen Zellextrakten [8]. Inkubation der Zellen unter hypoxischen Bedingungen oder im Gegenwart von NO führte zur Induktion der PHD-Aktivität. Obwohl der Anstieg der PHD-Aktivität in beiden Kompartimenten stattfand, war er überwiegend in nukleären Extrakten detektierbar [8].

Die Ubiquitinierung und Degradierung nukleärer Proteine ist abhängig von der intrazellulären Lokalisierung des Substratproteins und der Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Die Untereinheiten des 26S-Proteasoms können in

Zellkern und Cytoplasma nachgewiesen werden und regulieren in beiden Kompartimenten die Degradierung Zellkern-lokalisierter Proteine [129, 153]. In dem hier vorgeschlagenen Modell induziert PHD2 vorwiegend im Zellkern die Hydroxylierung von HIF-1 α , die die Voraussetzung für die Ubiquitinierung durch das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) darstellt. Die Befunde von Groulx und Lee unterstützen die Annahme, dass der Kernimport eine kritische Rolle für das molekulare Sauerstoffsensing einnimmt. Sie diskutierten, dass der nukleo-cytoplasmatische Transport des pVHL eine wichtige Voraussetzung ist für die sauerstoffabhängige Ubiquitinierung und Degradierung der HIF- α -Untereinheiten [64]. Zudem konnten Groulx und Lee durch Inhibierung der drei PHD-Isoformen zeigen, dass die nukleäre Ubiquitinierung von HIF- α von der nukleären Lokalisierung der PHD abhängig ist [64].

In früheren Studien wurde die Bedeutung der nukleären PHD2-Lokalisierung für die Proliferation und das Wachstum verschiedener Tumore diskutiert. Wie einleitend bereits erwähnt (Abschnitt 1.4.2), wurde in verschiedenen Tumorzelllinien gezeigt, dass eine Verschiebung der subzellulären PHD2-Lokalisierung in den Zellkern mit einem bösartigeren Krankheitsbild einhergeht [31, 83, 85]. In pankreatischen endokrinen Tumoren wird eine erhöhte nukleäre Expression der PHD2 mit einem besonders aggressiven Phänotyp assoziiert [31]. Dementsprechend wird eine erhöhte PHD2-Expression im Zellkern in Kopf-Hals-Karzinomen mit verminderter Zelldifferenzierung, erhöhter Proliferation und schlechten Prognosen in Verbindung gebracht [83, 85]. Bisher bleibt jedoch unklar, ob der Effekt der PHD2-Expression auf die Tumorentwicklung von ihrer Hydroxylase-Aktivität abhängig ist. Durch Experimente in Osteosarkomzellen konnte in dieser Arbeit die Bedeutung des nucleocytoplasmatischen Transports und der kompartimentspezifischen PHD2-Expression hervorgehoben werden (Abbildungen 4.20, 4.21 und 4.22). Die dadurch gewonnenen Ergebnisse sind im völligen Einklang mit Jokilehto *et al.* und demonstrieren eine kritische Rolle der nukleären PHD2-Expression für die Hydroxylierung von HIF-1 α [84].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Mechanismus des geregelten Kerntransports der PHD-Isoformen PHD2 und PHD3 tragen dazu bei, den Mechanismus des molekularen Sauerstoffsensings und der HIF- α -Hydroxylierung unter normoxischen Bedingungen zu verstehen. Abbildung 5.1 zeigt die Wege des Kerntransports der Komponenten des HIF-abhängigen Sauerstoffsensings. HIF-1 α , HIF-2 α , PHD1 und PHD3 werden über den klassischen Importin α/β -Transportweg in den Zellkern transportiert. Der Kerntransport der PHD2 hängt von spezifischen Motiven in der primären Aminosäuresequenz des Proteins ab. Zudem konnte durch die Identifikation molekularer Determinanten der intrazellulären Lokalisierung der PHD2 gezeigt werden, dass die nukleäre Lokalisierung der PHD2 im Hinblick auf ihre HIF-1 α -Hydroxylase-Aktivität eine zentrale Rolle spielt. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 α , entgegen früheren Annahmen, im Zellkern

durch die PHD hydroxyliert. Nach Bindung an pVHL wird der Transkriptionsfaktor HIF- α im Zellkern, dem Funktionsraum der Transkriptionsregulation, durch das proteasomale System degradiert. Zusätzlich kann HIF- α nach pVHL-Bindung auch CRM1-abhängig ins Cytoplasma exportiert und dort degradiert werden.

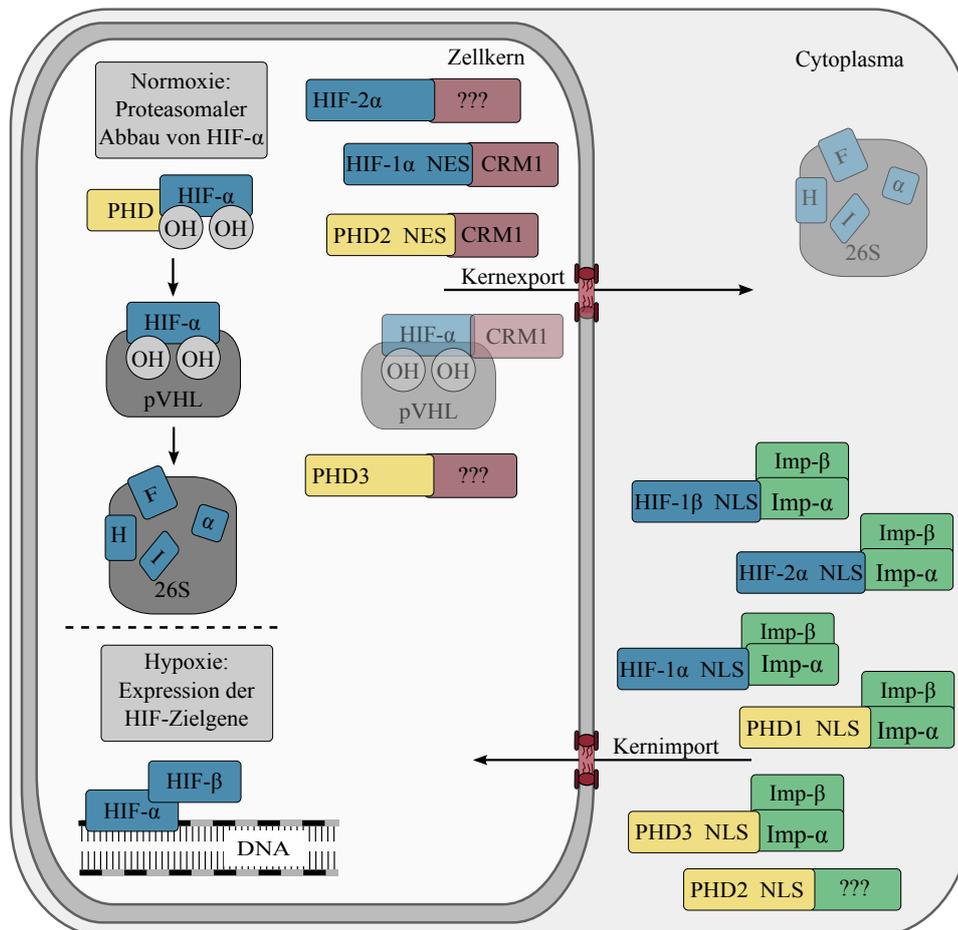


Abbildung 5.1: Kerntransport der Komponenten der molekularen Sauerstoffsensoren. Der Kernimport der HIF-Untereinheiten sowie der PHD-Isoformen PHD1 und PHD3 verläuft über das Importin α/β -System und konnte in früheren Arbeiten [35, 176] bzw. in dieser Arbeit aufgeklärt werden. Für PHD2 konnte eine Signalsequenz identifiziert werden, die den Kernimport vermittelt. Der Kernexport von HIF-1 α und der PHD2 wird von CRM1 vermittelt und ist von spezifischen NES-Motiven abhängig. Bislang ungeklärte Transport-Mechanismen sind durch drei Fragezeichen gekennzeichnet. Im Zellkern wird HIF- α unter normoxischen Bedingungen durch die PHD hydroxyliert und proteasomal degradiert. Unter hypoxischen Bedingungen aktiviert HIF im Zellkern die Expression der HIF-abhängigen Zielgene.

5.3 Steigerung der Strahlenresistenz von Tumorzellen durch PHD2-Expression

Diesem Ansatz lag die Beobachtung zugrunde, dass hypoxische Verhältnisse in Tumorzellen die maligne Progression begünstigen und die Strahlenresistenz erhöhen, wodurch der Therapieerfolg in der Klinik stark beeinträchtigt wird. Die Ausbildung hypoxischer Regionen gilt daher als Marker für schlechte Prognosen und verminderte Überlebenschancen des Patienten [150]. Um die Therapierbarkeit hypoxischer Tumore zu steigern, ist es vielversprechend, Signalwege, die für das Überleben der Tumorzellen essentiell sind, zu inhibieren. Da HIF eine entscheidende Rolle in der Regulation der sauerstoffabhängigen Genexpression einnimmt, sind Substanzen, die auf die Inaktivierung von HIF abzielen, in den Fokus der Tumorforschung gerückt. HIF-1 gilt heute als aussichtsreicher therapeutischer Angriffspunkt in der Tumorthherapie, da dieser Transkriptionsfaktor positiv mit der metastatischen Ausbreitung von Tumoren und einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie korreliert [11, 178].

Neben einer erhöhten HIF-Expression ist in den letzten Jahren auch die erhöhte Expression der drei PHD-Isoformen vermehrt mit einem maligneren Tumorphänotyp assoziiert worden. Wie in Abschnitt 1.4.2 erwähnt, ist neben der zellulären PHD-Expression dabei besonders die Untersuchung der Bedeutung der nukleären PHD2-Lokalisierung ein zentrales Ziel der Forschung. Luukkaa *et al.* gelang es, in Kopf-Hals-Karzinomen eine Korrelation zwischen der nukleären PHD2-Expression und der Therapierbarkeit der entarteten Zellen herzustellen [122]. Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der PHD2-Expression das Wachstum und die Strahlenresistenz von Tumorzellen steigern kann. Die Identifikation spezifischer Transport-Signale in der Aminosäuresequenz von PHD2 (Abbildungen 4.10 und 4.12) ermöglichte es zudem erstmals, den Einfluss der kompartimentspezifischen PHD2-Expression auf die zelltypspezifische Tumorgenität, die Strahlensensibilität und die Therapierbarkeit von Tumorzellen zu untersuchen.

Die in einem *in vitro* Modell gewonnenen Ergebnisse basieren auf einem siRNA-vermittelten *knockdown* der PHD2. Die aus den klonogenen Assays mit PHD2-defizienten Zellen gewonnenen Erkenntnisse bestätigen den Einfluss von PHD2 auf die Strahlensensibilität von Kopf-Hals-Karzinomzellen unter normoxischen Bedingungen. In Übereinstimmung mit aus der Klinik stammenden Beobachtungen [85, 122] trägt der selektive PHD2 *knockdown* zur Erhöhung der Strahlensensibilität von Kopf-Hals-Karzinomzellen bei. Die Blockierung des zellulären Sauerstoffsensors PHD2 kann daher als aussichtsreich beurteilt werden, um die Erfolgchancen einer Strahlentherapie zu verbessern.

Die identifizierten kompartimentspezifisch exprimierten PHD2-Deletionsmutanten wurden in Kopf-Hals-Karzinomzellen transfiziert, um den Einfluss der PHD2-Lokalisierung auf die Strahlensensibilität *in vitro* zu untersuchen. Überraschenderweise ergaben sich aus den klonogenen Assays keine Erkenntnisse über eine Assoziation zwischen intrazellulärer PHD2-Lokalisierung und Strahlenresistenz der Kopf-Hals-Karzinomzellen. Diese Daten implizieren, dass die kanzerogene Wirkung der PHD2 in Kopf-Hals-Karzinomzellen unabhängig ist von ihrer HIF-1 α -Hydroxylase-Aktivität, da in den vorigen Abschnitten dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die PHD2-Aktivität für die Hydroxylierung von HIF-1 α vorwiegend im Zellkern induziert wird. Diese Ergebnisse gehen konform mit früheren Untersuchungen von Jokilehto *et al.*, in denen gezeigt werden konnte, dass die PHD2 das verankerungsunabhängige Wachstum von Zervixkarzinomzellen fördert, wobei dieser Effekt unabhängig ist von ihrer HIF-1 α -Hydroxylase-Aktivität [83].

Neben ihrer Rolle in der Tumorentwicklung sind die PHD zusätzlich in zahlreiche Hypoxie-unabhängige Zellsignalwege involviert und gelten als zelluläre Sauerstoffsensoren, da sie durch spezifische Hydroxylierungen den proteasomalen Abbau der HIF- α -Untereinheiten regulieren [33, 80, 135]. Die Inhibierung der PHD2 kann daher die Stabilität von HIF- α in Tumorzellen begünstigen. Eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors HIF wurde jedoch mit dem Überleben, der Invasion, der Proliferation und der metastatischen Ausbreitung von Tumorzellen assoziiert (als Übersichtsartikel [165]). HIF-1 α -defiziente Tumore sind daher besser durch Radiotherapie zu behandeln als solche mit funktionellem HIF [202]. Sowohl die drei PHD-Isoformen als auch HIF sind an Hypoxie-unabhängigen Zellsignalwegen beteiligt. Aus diesen Gründen müssen eventuelle Konsequenzen einer PHD-Inhibierung, insbesondere im Hinblick auf die Stabilisierung von HIF, in verschiedenen Geweben bedacht werden.

Zuletzt sollte ein weiterer Aspekt nicht unberücksichtigt bleiben. Die Wirkungsweise der therapeutischen PHD-Inhibierung weist häufig eine nicht ausreichende Selektivität auf, sodass weitreichende Konsequenzen für den gesamten Organismus nicht ausgeschlossen werden können. Durch die Verwendung von α -KG-Analoga werden die PHD in ihrer enzymatischen Aktivität inhibiert, da α -KG ein essentieller Kofaktor der PHD ist. Ein Beispiel ist DMOG, ein zellpermeables α -KG-Analogon, das *in vitro* häufig zur HIF-Stabilisierung eingesetzt wird. Weitere α -KG-Analoga konnten in hoher Anzahl synthetisiert werden und wurden teilweise bereits in pharmakologischen Studien eingesetzt [4, 5] (als Übersichtsartikel [68]). Zu diesem Zeitpunkt kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch den Einsatz der α -KG-Analoga, nicht nur die Aktivität der PHD inhibiert wird. Der Einfluss der α -KG-Analoga auf die Aktivität zusätzlicher, bisher nicht identifizierter Enzyme der Familie der α -KG-abhängigen Oxygenasen, bleibt dabei zu berücksichtigen. Die Hemmung der PHD

durch Eisenchelatoren, wie z.B. Desferrioxamin (DFO), kann die Einschränkung anderer Biomoleküle bewirken. Neben Hämoglobin und Myoglobin hängt auch die Aktivität verschiedener Enzyme, wie z.B. Cytochrome und Peroxidasen, von der Eisenverfügbarkeit ab. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass in der Entwicklung von Substanzen, die den molekularen Sauerstoffsensor PHD2 blockieren, für die Tumorforschung großes Potential liegt. Jedoch ist die Komplexität der molekularen Sauerstoffsensoren in der Tumorentwicklung größer als bisher angenommen und bringt daher große experimentelle Herausforderungen mit sich.

5.4 Ausblick

Bisher konnten zahlreiche Fragen zur Regulation der molekularen Sauerstoffsensoren nicht abschließend geklärt werden: Welche Rolle spielt der nukleäre Import der PHD-Isoformen PHD1 und PHD3 im Hinblick auf die Regulation der HIF-2 α -Stabilität? In welchem Bezug steht der nukleäre Export der PHD zur Regulation der molekularen Sauerstoffsensoren? Welche nukleären Transport-Rezeptoren sind, außer dem Importin α/β -vermittelten Kernimport und dem CRM1-abhängigen Kernexport, an intrazellulären Transportmechanismen der PHD beteiligt? Können die in den *in vitro* Studien gewonnenen Erkenntnisse in Osteosarkomzellen auf weitere *in vitro* und *in vivo* Modelle übertragen werden? Welche Rolle spielen PHD-Modulatoren zukünftig in der Entwicklung neuer Tumorthérapien?

Durch siRNA-vermittelten *knockdown* wurde der Einfluss der PHD2-Expression auf die Strahlenresponsivität von Tumorzellen untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse basieren jedoch lediglich auf *in vitro* Experimenten in Kopf-Hals-Karzinomzellen. Um Rückschlüsse auf grundlegende Mechanismen der Ausbildung einer Strahlenresistenz ziehen zu können und die zelltypspezifische Tumorgenität zu analysieren, müssen in zukünftigen Untersuchungen übereinstimmende Resultate aus der Gegenüberstellung von verschiedenen Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs gewonnen werden. Da gezeigt werden konnte, dass die PHD die zelluläre Sauerstoffsensoren regulieren und auch an HIF-unabhängigen Zellsignalkaskaden beteiligt sind, ist genauestes Verständnis über Effekte der PHD-Inhibierung unerlässlich für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten in der Tumorthérapie. Zeitfenster und Art der Behandlung müssen vor einem potentiellen Einsatz von PHD-Inhibitoren in der Klinik genauestens untersucht werden, da die komplette Inhibierung der PHD Konsequenzen für den gesamten Organismus mit sich bringt.

Der nukleäre Import der PHD-Isoformen PHD2 und PHD3 wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse beweisen zusammen mit früheren Untersuchungen, dass neben der intrazellulären Lokalisierung der PHD1 auch

die der PHD-Isoformen PHD2 und PHD3 geregelten Kerntransport-Mechanismen unterliegt [176]. Die Bedeutung des Kernimports und -exports der PHD für die HIF-abhängige Genexpression sollte des Weiteren isoformspezifisch untersucht werden. Die Erstellung eines umfassenden Bildes aller subzellulären Transportprozesse in der HIF-abhängigen Sauerstoffsensorik würde eine Einordnung ins physiologische Gesamtsystem ermöglichen.

Für die Regulation der molekularen Sauerstoffsensorik in Osteosarkomzellen ist der nukleäre Import der PHD2 von großer Bedeutung. Wie auch die vorliegende Arbeit, konzentrieren sich die meisten bisherigen Analysen auf diesem Gebiet auf die HIF-Hydroxylase-Aktivität der PHD in einem bestimmten Zelltyp [8, 83]. Zur Ergründung der regulatorischen Prozesse ist es essentiell, Variationen in Abhängigkeit von der Spezies, dem Gewebe und dem zellulären Umfeld in Betracht zu ziehen. Tatsächlich gilt es, zu untersuchen, ob es sich bei der Hydroxylierung der HIF-1 α -Untereinheit durch PHD2 im nukleären Kompartiment um einen grundlegenden regulatorischen Mechanismus handelt. Alternativ könnten zelltypspezifische Unterschiede zur Feinregulierung der zellulären Anpassung an die gegebenen Sauerstoffbedingungen in den Geweben dienen. Weitere *in vitro* Experimente in immortalisierten Zelllinien und Primärzellkulturen verschiedener Gewebe sind unerlässlich, um die Kenntnisse über die Bedeutung intrazellulärer Transportmechanismen für die dynamische Regulation der molekularen Sauerstoffsensorik zu erweitern.

Ferner ermöglichen die hier gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung der kompartimentspezifischen PHD2-Expression, zusammen mit der Identifikation eines funktionellen NLS in der Aminosäuresequenz der PHD2, möglicherweise die spezifische Inhibierung einer einzelnen PHD-Isoform. Bisher identifizierte PHD-Inhibitoren weisen eine unspezifische Wirkungsweise auf und vermitteln ihre inhibitorischen Effekte meist durch Substitution oder Chelation der für die PHD-Aktivität essentiellen Cofaktoren (als Übersichtsartikel [68]). Die siRNA- oder Peptid-vermittelte Blockierung des identifizierten NLS könnte die nukleäre PHD2-Lokalisierung inhibieren, ohne dabei die subzelluläre Expression der anderen PHD-Isoformen zu modifizieren. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die PHD differentielle Funktionen in der Regulation der HIF- α -Untereinheiten besitzen und PHD2 *in vitro* als Schlüsselregulator der HIF-1 α -Stabilität gilt. Die Unterbindung der nukleären PHD2-Lokalisierung und die damit einhergehende Inhibierung der PHD2-Aktivität könnte eine spezifische Stabilisierung der HIF-1 α -Untereinheit in Normoxie bewirken. Zukünftig gilt es zu untersuchen, welchen Effekt die intrazelluläre Lokalisierung der PHD-Isoformen PHD1 und PHD3 für die Regulation der sauerstoffabhängigen Genexpression spielt. Da gezeigt werden konnte, dass PHD1 und PHD3 einen größeren Effekt auf HIF-2 α als auf HIF-1 α haben [2], sollte dabei insbesondere der Einfluss auf HIF-2 α im Fokus stehen. Die umfassende Kenntnis der Regulati-

on der PHD und des molekularen Sauerstoffsensings ermöglicht neue Strategien in der Behandlung von Anämien oder für die proangiogene Therapie nach ischämischen Krankheiten, bei der die Steigerung der transkriptionellen HIF-Aktivität zur Verbesserung der Sauerstoffverfügbarkeit im Fokus steht. In diesem Zusammenhang ist die zukünftige Entwicklung hochselektiver PHD-Inhibitoren essentiell und birgt hohes therapeutisches Potential.

Zusammenfassung

Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF) regulieren mehr als 200 Gene, die an der zellulären Anpassung an verminderte Sauerstoffbedingungen beteiligt sind. HIF sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus einer von drei sauerstofflabilen α -Untereinheiten und einer konstitutiven β -Untereinheit bestehen. Unter normoxischen Bedingungen hydroxylieren die Prolyl-4-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 die HIF- α -Untereinheiten an zwei spezifischen Prolinresten. Durch diese Hydroxylierung wird die Affinität für das von-Hippel-Lindau-Protein erhöht, welche zur Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau der HIF- α -Untereinheiten führt. PHD2 gilt als Schlüsselregulator der HIF-1 α -Stabilität *in vitro* und *in vivo*. In früheren Studien konnten Unterschiede in der gewebe- und kompartimentspezifischen Expression der PHD-Isoformen verdeutlicht werden. PHD1 ist im Zellkern lokalisiert und wird Importin α/β -abhängig in den Zellkern transportiert. Im Gegensatz dazu kann PHD2 überwiegend im Cytoplasma detektiert werden und pendelt zwischen Zellkern und Cytoplasma. PHD3 wird in beiden Kompartimenten exprimiert, wobei der intrazelluläre Transport dieser Isoform ungeklärt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der intrazelluläre Transport der PHD-Isoformen PHD2 und PHD3 mithilfe von GST-Bindungsstudien und Lokalisierungsstudien mit fluoreszenzmarkierten Fusionsproteinen charakterisiert. PHD3 bindet an verschiedene Importin α -Isoformen und wird über die Importin α/β -Rezeptoren in den Zellkern transportiert. Diese Transportvorgänge werden von einem Kernlokalisierungssignal (NLS) im C-terminalen Proteinbereich der PHD3 vermittelt. Im Gegensatz dazu konnte der nukleäre Import-Mechanismus der PHD2 nicht vollständig aufgeklärt werden. Dennoch konnten Transportsignale in der Aminosäuresequenz der PHD2 identifiziert werden. Der Kernimport ist von einem NLS zwischen den Aminosäuren E196 und H205 abhängig. Im Gegensatz dazu wird der Kernexport von einem NES im N-terminalen Proteinbereich vermittelt. Die Ergebnisse aus den Lokalisierungsstudien mit fluoreszenzmarkierten PHD2-Deletionsmutanten wurden durch indirekte Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt, um auszuschließen, dass die subzelluläre Expression der PHD2 durch die Fusion an die EGFP-Markierung be-

einflusst wird. Die intrazelluläre Lokalisierung der molekularen Sauerstoffsensorik wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Die Deletion der identifizierten Transportignale in der Aminosäuresequenz der PHD2 machte es erstmals möglich, den Einfluss der kompartimentspezifischen PHD2-Expression auf die Regulation der HIF-1 α -Untereinheit zu untersuchen. Mithilfe von FRET-Messungen konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α und PHD2 in beiden Kompartimenten interagieren, diese Interaktion jedoch vorwiegend im Zellkern zu beobachten ist. Die Retention der PHD2 im Cytoplasma durch Deletion des NLS führt zu einer Inhibierung der PHD2-HIF- α -Hydroxylase-Aktivität, die sich auf die transkriptionelle HIF-Aktivität, die Expression HIF-1-abhängiger Zielgene und die HIF-1 α -Proteinexpression auswirkt.

Hypoxische Verhältnisse steigern in Tumoren die maligne Progression und die Resistenz gegenüber radiotherapeutischen Behandlungsmöglichkeiten. Die Komponenten der molekularen Sauerstoffsensorik regulieren die Hypoxie-abhängige Genexpression und sind daher in den Fokus der Tumorforschung gerückt. In verschiedenen Tumorzelllinien können eine erhöhte PHD2-Expression und eine nukleäre Translokation des Proteins beobachtet werden. *In vitro* Experimente ergaben eine Verminderung der Strahlenresistenz von Kopf-Hals-Karzinomzellen nach siRNA-vermitteltem *knockdown* der PHD2. Jedoch hat die intrazelluläre Lokalisierung der PHD2 keinen Einfluss auf die Strahlensensibilität der untersuchten Zellen.

Insgesamt ergibt sich ein Modell, in dem die PHD2 geregelten Kerntransport-Mechanismen unterliegt und die HIF-Hydroxylase-Aktivität der PHD2 überwiegend im Zellkern induziert wird. Damit stellt die intrazelluläre Lokalisierung der PHD2 eine weitere Möglichkeit zur Feinregulierung der molekularen Sauerstoffsensorik dar. Ferner trägt die PHD2 durch einen unbekanntem, hydroxylaseunabhängigen Mechanismus fundamental zur Strahlenresistenz von Tumorzellen bei.

Literaturverzeichnis

- [1] M. A. Andrade and P. Bork. HEAT repeats in the huntington's disease protein. *Nat Genet*, 11(2):115–116, 1995.
- [2] R. J. Appelhoff, Y. M. Tian, R. R. Raval, H. Turley, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and J. M. Gleadle. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, 279(37):38458–38465, 2004.
- [3] Z. Arany, L. E. Huang, R. Eckner, S. Bhattacharya, C. Jiang, M. A. Goldberg, H. F. Bunn, and D. M. Livingston. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23):12969–12973, 1996.
- [4] T. M. Asikainen, A. Ahmad, B. K. Schneider, W. B. Ho, M. Arend, M. Brenner, V. Guenzler, and C. W. White. Stimulation of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 38(8):1002–1013, 2005.
- [5] T. M. Asikainen, B. K. Schneider, N. S. Waleh, R. I. Clyman, W. B. Ho, L. A. Flippin, V. Guenzler, and C. W. White. Activation of hypoxia-inducible factors in hyperoxia through prolyl 4-hydroxylase blockade in cells and explants of primate lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(29):10212–10217, 2005.
- [6] E. Baader, G. Tschank, K. H. Baringhaus, H. Burghard, and V. Guenzler. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase by oxalyl amino acid derivatives in vitro, in isolated microsomes and in embryonic chicken tissues. *Biochem J*, 300:525–530, 1994.
- [7] Y. Ben-Yosef, N. Lahat, S. Shapiro, H. Bitterman, and A. Miller. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res*, 90(7):784–791, 2002.
- [8] U. Berchner-Pfannschmidt, S. Tug, B. Trinidad, F. Oehme, H. Yamac, C. Wotzlaw, I. Flamme, and J. Fandrey. Nuclear oxygen sensing: induction of endogenous prolyl-hydroxylase 2 activity by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*, 283(46):31745–31753, 2008.

- [9] R. Bernad, H. van der Velde, M. Fornerod, and H. Pickersgill. Nup358/ranBP2 attaches to the nuclear pore complex via association with nup88 and nup214/CAN and plays a supporting role in CRM1-mediated nuclear protein export. *Mol Cell Biol*, 24(6):2373–2384, 2004.
- [10] E. Berra, E. Benizri, A. Ginouves, V. Volmat, D. Roux, and J. Pouyssegur. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J*, 22(16):4082–4090, 2003.
- [11] P. Birner, M. Schindl, A. Obermair, C. Plank, G. Breitenecker, and G. Oberhuber. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*, 60(17):4693–4696, 2000.
- [12] F. R. Bischoff and D. Goerlich. RanBP1 is crucial for the release of ranGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett*, 419(2-3):249–254, 1997.
- [13] F. R. Bischoff, C. Klebe, J. Kretschmer, A. Wittinghofer, and H. Ponstingl. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(7):2587–2591, 1994.
- [14] F. R. Bischoff and H. Ponstingl. Catalysis of guanine nucleotide exchange of Ran by RCC1 and stimulation of hydrolysis of Ran-bound GTP by Ran-GAP1. *Methods Enzymol*, 257:135–144, 1995.
- [15] N. Blom, S. Gammeltoft, and S. Brunak. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*, 294(5):1351–1362, 1999.
- [16] M. R. Bordoli, D. P. Stiehl, L. Borsig, G. Kristiansen, S. Hausladen, P. Schraml, R. H. Wenger, and G. Camenisch. Prolyl-4-hydroxylase PHD2 and hypoxia-inducible factor 2-dependent regulation of amphiregulin contributes to breast tumorigenesis. *Oncogene*, 30(5):548–560, 2011.
- [17] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.
- [18] D. M. Brizel, S. P. Scully, J. M. Harrelson, L. J. Layfield, J. M. Bean, L. R. Prosnitz, and M. W. Dewhirst. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res*, 56(5):941–943, 1996.

- [19] R. K. Bruick. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(16):9082–9087, 2000.
- [20] M. Capelson and M. W. Hetzer. The role of nuclear pores in gene regulation, development and disease. *EMBO Rep*, 10(7):697–705, 2009.
- [21] P. Carrero, K. Okamoto, P. Coumailleau, S. O'Brien, H. Tanaka, and L. Poellinger. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*, 20(1):402–415, 2000.
- [22] G. Chachami, E. Paraskeva, J. M. Mingot, G. G. Braliou, D. Goerlich, and G. Simos. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem Biophys Res Commun*, 390(2):235–240, 2009.
- [23] C. Chen, N. Pore, A. Behrooz, F. Ismail-Beigi, and A. Maity. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*, 276(12):9519–9525, 2001.
- [24] M. H. Chen, I. Ben-Efraim, G. Mitrousis, N. Walker-Kopp, P. J. Sims, and G. Cingolani. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin alpha. *J Biol Chem*, 280(11):10599–10606, 2005.
- [25] K. O. Choi, T. Lee, N. Lee, J. H. Kim, E. G. Yang, J. M. Yoon, J. H. Kim, T. G. Lee, and H. Park. Inhibition of the catalytic activity of hypoxia-inducible factor-1alpha-prolyl-hydroxylase 2 by a MYND-type zinc finger. *Mol Pharmacol*, 68(6):1803–1809, 2005.
- [26] Y. K. Choi, C. K. Kim, H. Lee, D. Jeoung, K. S. Ha, Y. G. Kwon, K. W. Kim, and Y. M. Kim. Carbon monoxide promotes VEGF expression by increasing HIF-1alpha protein level via two distinct mechanisms, translational activation and stabilization of HIF-1alpha protein. *J Biol Chem*, 285(42):32116–32125, 2010.
- [27] Y. M. Chook and K. E. Suel. Nuclear import by karyopherin-s: recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta*, 1813(9):1593–1606, 2011.
- [28] D. Christophe, C. Christophe-Hobertus, and B. Pichon. Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell Signal*, 12(5):337–341, 2000.
- [29] E. Conti and J. Kuriyan. Crystallographic analysis of the specific yet versa-

- tile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure*, 8(3):329–338, 2000.
- [30] E. Conti, M. Uy, L. Leighton, G. Blobel, and J. Kuriyan. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, 94(2):193–204, 1998.
- [31] A. Couvelard, L. Deschamps, V. Rebours, A. Sauvanet, K. Gatter, F. Pezzella, P. Ruzsniwski, and P. Bedossa. Overexpression of the oxygen sensors PHD-1, PHD-2, PHD-3, and FIH is associated with tumor aggressiveness in pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res*, 14(20):6634–6639, 2008.
- [32] J. M. Cronshaw, A. N. Krutchinsky, W. Zhang, B. T. Chait, and M. J. Matunis. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 158(5):915–927, 2002.
- [33] E. P. Cummins, E. Berra, K. M. Comerford, A. Ginouves, K. T. Fitzgerald, F. Seeballuck, C. Godson, J. E. Nielsen, P. Moynagh, J. Pouyssegur, and C. T. Taylor. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates ikappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(48):18154–18159, 2006.
- [34] M. A. D'Angelo and M. W. Hetzer. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol*, 18(10):456–466, 2008.
- [35] R. Depping, A. Steinhoff, S. G. Schindler, B. Friedrich, R. Fagerlund, E. Metzzen, E. Hartmann, and M. Koehler. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1783(3):394–404, 2008.
- [36] E. Y. Dimova and T. Kietzmann. Hypoxia-inducible factors: post-translational crosstalk of signaling pathways. *Methods Mol Biol*, 647:215–236, 2010.
- [37] C. Dingwall and R. A. Laskey. Nuclear targeting sequences—a consensus? *Trends Biochem Sci*, 16(12):478–481, 1991.
- [38] X. Dong, A. Biswas, K. E. Suel, L. K. Jackson, R. Martinez, H. Gu, and Yuh M. Chook. Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature*, 458(7242):1136–1141, 2009.
- [39] D. A. Elson, H. E. Ryan, J. W. Snow, R. Johnson, and J. M. Arbeit. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res*, 60(21):6189–6195, 2000.

- [40] K. Engel, A. Kotlyarov, and M. Gaestel. Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J*, 17(12):3363–3371, 1998.
- [41] A. C. Epstein, J. M. Gleadle, L. A. McNeill, K. S. Hewitson, J. O'Rourke, D. R. Mole, M. Mukherji, E. Metzen, M. I. Wilson, A. Dhanda, Y. M. Tian, N. Masson, D. L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, C. J. Schofield, and P. J. Ratcliffe. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1):43–54, 2001.
- [42] F. Fagotto, U. Glueck, and B. M. Gumbiner. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol*, 8(4):181–190, 1998.
- [43] R. S. Faustino, T. J. Nelson, A. Terzic, and C. Perez-Terzic. Nuclear transport: target for therapy. *Clin Pharmacol Ther*, 81(6):880–886, 2007.
- [44] C. M. Feldherr, E. Kallenbach, and N. Schultz. Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol*, 99(6):2216–2222, 1984.
- [45] D. Feldser, F. Agani, N. V. Iyer, B. Pak, G. Ferreira, and G. L. Semenza. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, 59(16):3915–3918, 1999.
- [46] U. Fischer, J. Huber, W. C. Boelens, I. W. Mattaj, and R. Luehrmann. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, 82(3):475–483, 1995.
- [47] E. Flashman, E. A. L. Bagg, R. Chowdhury, J. Mecinovic, C. Loenarz, M. A. McDonough, K. S. Hewitson, and C. J. Schofield. Kinetic rationale for selectivity toward N- and C-terminal oxygen-dependent degradation domain substrates mediated by a loop region of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases. *J Biol Chem*, 283(7):3808–3815, 2008.
- [48] G. H. Fong and K. Takeda. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ*, 15(4):635–641, 2008.
- [49] M. R. Fontes, T. Teh, and B. Kobe. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol*, 297(5):1183–1194, 2000.

- [50] M. Fornerod, M. Ohno, M. Yoshida, and I. W. Mattaj. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, 90(6):1051–1060, 1997.
- [51] J. A. Forsythe, B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos, and G. L. Semenza. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16(9):4604–4613, 1996.
- [52] D. E. Foxler, K. S. Bridge, V. James, T. M. Webb, M. Mee, S. C. K. Wong, Y. Feng, D. Constantin-Teodosiu, T. E. Petursdottir, J. Bjornsson, S. Ingvarsson, P. J. Ratcliffe, G. D. Longmore, and T. V. Sharp. The LIMD1 protein bridges an association between the prolyl hydroxylases and VHL to repress HIF-1 activity. *Nat Cell Biol*, 14(2):201–208, 2012.
- [53] N. D. Freedman and K. R. Yamamoto. Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol Biol Cell*, 15(5):2276–2286, 2004.
- [54] C. Frei and B. A. Edgar. Drosophila cyclin D/Cdk4 requires Hif-1 prolyl hydroxylase to drive cell growth. *Dev Cell*, 6(2):241–251, 2004.
- [55] S. Frey and D. Goerlich. A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. *Cell*, 130(3):512–523, 2007.
- [56] B. Friedrich, C. Quensel, T. Sommer, E. Hartmann, and M. Koehler. Nuclear localization signal and protein context both mediate importin alpha specificity of nuclear import substrates. *Mol Cell Biol*, 26(23):8697–8709, 2006.
- [57] J. Fu and M. B. Taubman. Prolyl hydroxylase EGLN3 regulates skeletal myoblast differentiation through an NF-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem*, 285(12):8927–8935, 2010.
- [58] D. Gilchrist, B. Mykytka, and M. Rexach. Accelerating the rate of disassembly of karyopherin cargo complexes. *J Biol Chem*, 277(20):18161–18172, 2002.
- [59] D. Goerlich and U. Kutay. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15:607–660, 1999.
- [60] D. Goerlich, N. Pante, U. Kutay, U. Aebi, and F. R. Bischoff. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J*, 15(20):5584–5594, 1996.
- [61] D. Goerlich, S. Prehn, R. A. Laskey, and E. Hartmann. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*, 79(5):767–778, 1994.

- [62] M. A. Goldberg, S. P. Dunning, and H. F. Bunn. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, 242(4884):1412–1415, 1988.
- [63] K. K. Graven, Q. Yu, D. Pan, J. S. Roncarati, and H. W. Farber. Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta*, 1447(2-3):208–218, 1999.
- [64] I. Groulx and S. Lee. Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*, 22(15):5319–5336, 2002.
- [65] A. Harel and D. J. Forbes. Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol Cell*, 16(3):319–330, 2004.
- [66] A. T. Henze, J. Riedel, T. Diem, J. Wenner, I. Flamme, J. Pouyssegur, K. H. Plate, and T. Acker. Prolyl hydroxylases 2 and 3 act in gliomas as protective negative feedback regulators of hypoxia-inducible factors. *Cancer Res*, 70(1):357–366, 2010.
- [67] J. Heo. Redox regulation of Ran GTPase. *Biochem Biophys Res Commun*, 376(3):568–572, 2008.
- [68] K. S. Hewitson and C. J. Schofield. The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug Discov Today*, 9(16):704–711, 2004.
- [69] M. Hirsilae, P. Koivunen, L. Xu, T. Seeley, K. I. Kivirikko, and J. Myllyharju. Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *FASEB J*, 19(10):1308–1310, 2005.
- [70] M. Hockel, K. Schlenger, B. Aral, M. Mitze, U. Schaffer, and P. Vaupel. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*, 56(19):4509–4515, 1996.
- [71] M. Hoekel and P. Vaupel. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 93(4):266–276, 2001.
- [72] <http://psort.hgc.jp/form2.html>, March 2010.
- [73] <http://www.predictprotein.org>, March 2010.
- [74] J. Hu, D. J. Discher, N. H. Bishopric, and K. A. Webster. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible

- factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(3):894–899, 1998.
- [75] Z. J. Huang, I. Edery, and M. Rosbash. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*, 364(6434):259–262, 1993.
- [76] W. Ito, H. Ishiguro, and Y. Kurosawa. A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene*, 102(1):67–70, 1991.
- [77] M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane, and W. G. Kaelin, Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 292(5516):464–468, 2001.
- [78] N. V. Iyer, L. E. Kotch, F. Agani, S. W. Leung, E. Laughner, R. H. Wenger, M. Gassmann, J. D. Gearhart, A. M. Lawler, A. Y. Yu, and G. L. Semenza. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev*, 12(2):149–162, 1998.
- [79] E. Izaurralde, U. Kutay, C. von Kobbe, I. W. Mattaj, and D. Goerlich. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J*, 16(21):6535–6547, 1997.
- [80] P. Jaakkola, D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516):468–472, 2001.
- [81] J. W. Jeong, M. K. Bae, M. Y. Ahn, S. H. Kim, T. K. Sohn, M. H. Bae, M. A. Yoo, E. J. Song, K. J. Lee, and K. W. Kim. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111(5):709–720, 2002.
- [82] A. W. Johnson, E. Lund, and J. Dahlberg. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci*, 27(11):580–585, 2002.
- [83] T. Jokilehto, H. Hoegel, P. Heikkinen, K. Rantanen, K. Elenius, J. Sundstroem, and P. M. Jaakkola. Retention of prolyl hydroxylase PHD2 in the cytoplasm prevents PHD2-induced anchorage-independent carcinoma cell growth. *Exp Cell Res*, 316(7):1169–1178, 2010.

- [84] T. Jokilehto and P. M. Jaakkola. The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. *J Cell Mol Med*, 14(4):758–770, 2010.
- [85] T. Jokilehto, K. Rantanen, M. Luukkaa, P. Heikkinen, R. Grenman, H. Minn, P. Kronqvist, and P. M. Jaakkola. Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res*, 12(4):1080–1087, 2006.
- [86] J. Kahle, E. Piaia, S. Neimanis, M. Meisterernst, and D. Doenecke. Regulation of nuclear import and export of negative cofactor 2. *J Biol Chem*, 284(14):9382–9393, 2009.
- [87] D. Kalderon, W. D. Richardson, A. F. Markham, and A. E. Smith. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, 311(5981):33–38, 1984.
- [88] D. Kalderon, B. L. Roberts, W. D. Richardson, and A. E. Smith. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39(3 Pt 2):499–509, 1984.
- [89] P. J. Kallio, W. J. Wilson, S. O’Brien, Y. Makino, and L. Poellinger. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 274(10):6519–6525, 1999.
- [90] A. Kalousi, I. Mylonis, A. S. Politou, G. Chachami, E. Paraskeva, and G. Simos. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *J Cell Sci*, 123(Pt 17):2976–2986, 2010.
- [91] Y. Kamei, S. Yuba, T. Nakayama, and Y. Yoneda. Three distinct classes of the alpha-subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin-alpha) are differentially expressed in adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem*, 47(3):363–372, 1999.
- [92] T. Kamura, S. Sato, K. Iwai, M. Czyzyk-Krzeska, R. C. Conaway, and J. W. Conaway. Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19):10430–10435, 2000.
- [93] K. Kasuno, S. Takabuchi, K. Fukuda, S. Kizaka-Kondoh, J. Yodoi, T. Adachi, G. L. Semenza, and K. Hirota. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem*, 279(4):2550–2558, 2004.

- [94] Q. Ke and M. Costa. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, 70(5):1469–1480, 2006.
- [95] R. H. Kehlenbach and L. Gerace. Phosphorylation of the nuclear transport machinery down-regulates nuclear protein import in vitro. *J Biol Chem*, 275(23):17848–17856, 2000.
- [96] B. Kobe. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol*, 6(4):388–397, 1999.
- [97] M. Kodiha, A. Chu, N. Matusiewicz, and U. Stochaj. Multiple mechanisms promote the inhibition of classical nuclear import upon exposure to severe oxidative stress. *Cell Death Differ*, 11(8):862–874, 2004.
- [98] M. Koehler, S. Ansieau, S. Prehn, A. Leutz, H. Haller, and E. Hartmann. Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett*, 417(1):104–108, 1997.
- [99] M. Koehler, A. Fiebeler, M. Hartwig, S. Thiel, S. Prehn, R. Kettritz, F. C. Luft, and E. Hartmann. Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 12(5-6):335–344, 2002.
- [100] M. Koehler, C. Speck, M. Christiansen, F. R. Bischoff, S. Prehn, H. Haller, D. Goerlich, and E. Hartmann. Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol*, 19(11):7782–7791, 1999.
- [101] P. Koivunen, M. Hirsilae, K. I. Kivirikko, and J. Myllyharju. The length of peptide substrates has a marked effect on hydroxylation by the hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem*, 281(39):28712–28720, 2006.
- [102] S. Kosugi, M. Hasebe, M. Tomita, and H. Yanagawa. Nuclear export signal consensus sequences defined using a localization-based yeast selection system. *Traffic*, 9(12):2053–2062, 2008.
- [103] S. Kosugi, M. Hasebe, M. Tomita, and H. Yanagawa. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(25):10171–10176, 2009.

- [104] N. Kudo, N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, and S. Horinouchi. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16):9112–9117, 1999.
- [105] S. Kuge, M. Arita, A. Murayama, K. Maeta, S. Izawa, Y. Inoue, and A. Nomoto. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol*, 21(18):6139–6150, 2001.
- [106] U. Kutay, F. R. Bischoff, S. Kostka, R. Kraft, and D. Goerlich. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*, 90(6):1061–1071, 1997.
- [107] T. la Cour, L. Kiemer, A. Moelgaard, R. Gupta, K. Skriver, and S. Brunak. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*, 17(6):527–536, 2004.
- [108] C. Ladroue, D. Hoogewijs, S. Gad, R. Carcenac, F. Storti, M. Barrois, A. P. Gimenez-Roqueplo, M. Leporrier, N. Casadevall, O. Hermine, J. J. Kiladjian, A. Baruchel, F. Fakhoury, B. Bressac-de Paillerets, J. Feunteun, N. Mazure, J. Pouyssegur, R. H. Wenger, and B. Richard, S. and Gardie. Distinct deregulation of the hypoxia inducible factor by PHD2 mutants identified in germline DNA of patients with polycythemia. *Haematologica*, 97(1):9–14, 2012.
- [109] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- [110] M. H. Lam, W. Hu, C. Y. Xiao, M. T. Gillespie, and D. A. Jans. Molecular dissection of the importin beta1-recognized nuclear targeting signal of parathyroid hormone-related protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 282(2):629–634, 2001.
- [111] R. E. Lanford and J. S. Butel. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell*, 37(3):801–813, 1984.
- [112] S. H. Lee, P. L. Wolf, R. Escudero, R. Deutsch, S. W. Jamieson, and P. A. Thistlethwaite. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*, 342(9):626–633, 2000.
- [113] D. M. Leslie, W. Zhang, B. L. Timney, B. T. Chait, M. P. Rout, R. W. Wozniak, and J. D. Aitchison. Characterization of karyopherin cargoes re-

- veals unique mechanisms of kap121p-mediated nuclear import. *Mol Cell Biol*, 24(19):8487–8503, 2004.
- [114] F. Li, P. Sonveaux, Z. N. Rabbani, S. Liu, B. Yan, Q. Huang, Z. Vujaskovic, M. W. Dewhirst, and C. Y. Li. Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Mol Cell*, 26(1):63–74, 2007.
- [115] J. Li, X. Zhang, D. P. Sejas, G. C. Bagby, and Q. Pang. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem*, 279(40):41275–41279, 2004.
- [116] Y. Li, Y. Yamakita, and R. M. Krug. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9):4864–4869, 1998.
- [117] M. E. Lieb, K. Menzies, M. C. Moschella, R. Ni, and M. B. Taubman. Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol*, 80(4):421–426, 2002.
- [118] R. Y. Lim, U. Aebi, and B. Fahrenkrog. Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex. *Histochem Cell Biol*, 129(2):105–116, 2008.
- [119] R. Y. Lim and B. Fahrenkrog. The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol*, 18(3):342–347, 2006.
- [120] F. Lottspeich and J. W. Engels. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2 edition, 2006.
- [121] J. C. Luo and M. Shibuya. A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1 α , 2 α and 3 α). *Oncogene*, 20(12):1435–1444, 2001.
- [122] M. Luukkaa, T. Jokilehto, P. Kronqvist, T. Vahlberg, R. Grenman, P. Jaakola, and H. Minn. Expression of the cellular oxygen sensor PHD2 (EGLN-1) predicts radiation sensitivity in squamous cell cancer of the head and neck. *Int J Radiat Biol*, 85(10):900–908, 2009.
- [123] M. Marfori, A. Mynott, J. J. Ellis, A. M. Mehdi, N. F. W. Saunders, P. M. Curmi, J. K. Forwood, M. Boden, and B. Kobe. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*, 1813(9):1562–1577, 2011.
- [124] F. Martin, T. Linden, D. M. Katschinski, F. Oehme, I. Flamme, C. K. Mukho-

- padhyay, K. Eckhardt, J. Troeger, S. Barth, G. Camenisch, and R. H. Wenger. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood*, 105(12):4613–4619, 2005.
- [125] S. P. Mathupala, A. Rempel, and P. L. Pedersen. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type ii hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem*, 276(46):43407–43412, 2001.
- [126] M. A. McDonough, V. Li, E. Flashman, R. Chowdhury, C. Mohr, B. M. Lilenard, J. Zondlo, N. J. Oldham, I. J. Clifton, J. Lewis, L. A. McNeill, R. J. M. Kurzeja, K. S. Hewitson, E. Yang, S. Jordan, R. S. Syed, and C. J. Schofield. Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(26):9814–9819, 2006.
- [127] T. A. McKinsey, C. L. Zhang, and E. N. Olson. Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class ii histone deacetylases. *Mol Cell Biol*, 21(18):6312–6321, 2001.
- [128] J. Mecinovic, R. Chowdhury, E. Flashman, and C. J. Schofield. Use of mass spectrometry to probe the nucleophilicity of cysteinyl residues of prolyl hydroxylase domain 2. *Anal Biochem*, 393(2):215–221, 2009.
- [129] J. Mehlhase and T. Grune. Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells. *Biol Chem*, 383(3-4):559–567, 2002.
- [130] K. Melen, R. Fagerlund, J. Franke, M. Koehler, L. Kinnunen, and I. Julkunen. Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem*, 278(30):28193–28200, 2003.
- [131] I. Melnikova. Anaemia therapies. *Nat Rev Drug Discov*, 5(8):627–628, 2006.
- [132] T. Merkle. Nucleo-cytoplasmic transport of proteins and RNA in plants. *Plant Cell Rep*, 30(2):153–176, 2011.
- [133] E. Metzen, U. Berchner-Pfannschmidt, P. Stengel, J. H. Marxsen, I. Stolze, M. Klinger, W. Q. Huang, C. Wotzlaw, T. Hellwig-Buergel, W. Jelkmann, H. Acker, and J. Fandrey. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*, 116(Pt 7):1319–1326, 2003.
- [134] E. Metzen, D. P. Stiehl, K. Doege, J. H. Marxsen, T. Hellwig-Buergel, and W. Jelkmann. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2

- (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J*, 387(Pt 3):711–717, 2005.
- [135] O. Mikhaylova, M. L. Ignacak, T. J. Barankiewicz, S. V. Harbaugh, Y. Yi, P. H. Maxwell, M. Schneider, K. Van Geyte, P. Carmeliet, M. P. Revelo, M. Wyder, K. D. Greis, J. Meller, and M. F. Czyzyk-Krzeska. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and Egl-9-type proline hydroxylases regulate the large subunit of RNA polymerase ii in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 28(8):2701–2717, 2008.
- [136] J. Milosevic, I. Adler, A. Manaenko, S. C. Schwarz, G. Walkinshaw, M. Arend, L. A. Flippin, A. Storch, and J. Schwarz. Non-hypoxic stabilization of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha): relevance in neural progenitor/stem cells. *Neurotox Res*, 15(4):367–380, 2009.
- [137] J. M. Mingot, S. Kostka, R. Kraft, E. Hartmann, and D. Goerlich. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J*, 20(14):3685–3694, 2001.
- [138] B. J. Moeller, R. A. Richardson, and M. W. Dewhirst. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 26(2):241–248, 2007.
- [139] T. Monecke, T. Guettler, P. Neumann, A. Dickmanns, D. Goerlich, and R. Ficner. Crystal structure of the nuclear export receptor CRM1 in complex with Snurportin1 and RanGTP. *Science*, 324(5930):1087–1091, 2009.
- [140] N. Mosammaparast and L. F. Pemberton. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol*, 14(10):547–556, 2004.
- [141] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263–273, 1986.
- [142] I. Mylonis, G. Chachami, M. Samiotaki, G. Panayotou, E. Paraskeva, A. Kalousi, E. Georgatsou, S. Bonanou, and G. Simos. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*, 281(44):33095–33106, 2006.
- [143] J. D. Nardozzi, K. Lott, and G. Cingolani. Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun Signal*, 8:32, 2010.

- [144] M. E. Nemergut, C. A. Mizzen, T. Stukenberg, C. D. Allis, and I. G. Macara. Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science*, 292(5521):1540–1543, 2001.
- [145] H. Nishi, T. Nakada, S. Kyo, M. Inoue, J. W. Shay, and K. Isaka. Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol*, 24(13):6076–6083, 2004.
- [146] M. Nordmark, M. Hoeyer, J. Keller, O. S. Nielsen, O. M. Jensen, and J. Overgaard. The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 35(4):701–708, 1996.
- [147] K. J. Nytko, N. Maeda, P. Schlaefli, P. Spielmann, R. H. Wenger, and D. P. Stiehl. Vitamin C is dispensable for oxygen sensing in vivo. *Blood*, 117(20):5485–5493, 2011.
- [148] F. Oehme, P. Ellinghaus, P. Kolkhof, T. J. Smith, S. Ramakrishnan, J. Huetter, M. Schramm, and I. Flamme. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 296(2):343–349, 2002.
- [149] K. Ogawa, I. Chiba, T. Morioka, H. Shimoji, W. Tamaki, R. Takamatsu, T. Nishimaki, N. Yoshimi, and S. Murayama. Clinical significance of HIF-1 α expression in patients with esophageal cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. *Anticancer Res*, 31(6):2351–2359, 2011.
- [150] S. Osinsky, M. Zavelevich, and P. Vaupel. Tumor hypoxia and malignant progression. *Exp Oncol*, 31(2):80–86, 2009.
- [151] E. Paraskeva, E. Izaurralde, F. R. Bischoff, J. Huber, U. Kutay, E. Hartmann, R. Luehrmann, and D. Goerlich. CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol*, 145(2):255–264, 1999.
- [152] N. Pescador, Y. Cuevas, S. Naranjo, M. Alcaide, D. Villar, M. O. Landazuri, and L. Del Peso. Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem J*, 390(Pt 1):189–197, 2005.
- [153] J. M. Peters, W. W. Franke, and J. A. Kleinschmidt. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*, 269(10):7709–7718, 1994.

- [154] R. Peters. Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality. *Traffic*, 6(5):421–427, 2005.
- [155] K. Ribbeck, G. Lipowsky, H. M. Kent, M. Stewart, and D. Goerlich. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J*, 17(22):6587–6598, 1998.
- [156] D. E. Richard, E. Berra, E. Gothie, D. Roux, and J. Pouyssegur. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, 274(46):32631–32637, 1999.
- [157] G. Riddick and I. G. Macara. The adapter importin-alpha provides flexible control of nuclear import at the expense of efficiency. *Mol Syst Biol*, 3:118, 2007.
- [158] J. Robbins, S. M. Dilworth, R. A. Laskey, and C. Dingwall. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, 64(3):615–623, 1991.
- [159] M. Robiolio, W. L. Rumsey, and D. F. Wilson. Oxygen diffusion and mitochondrial respiration in neuroblastoma cells. *Am J Physiol*, 256(6 Pt 1):C1207–C1213, 1989.
- [160] S. Rogers, R. Wells, and M. Rechsteiner. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 234(4774):364–368, 1986.
- [161] A. Rolfs, I. Kvietikova, M. Gassmann, and R. H. Wenger. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem*, 272(32):20055–20062, 1997.
- [162] H. E. Ryan, J. Lo, and R. S. Johnson. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*, 17(11):3005–3015, 1998.
- [163] L. Schaeffer, A. Scheid, P. Spielmann, C. Breymann, R. Zimmermann, M. Meuli, M. Gassmann, H. H. Marti, and R. H. Wenger. Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta*, 24(10):941–950, 2003.
- [164] R. F. Schmidt, F. Lang, and M. Heckmann. *Physiologie des Menschen*. Springer Medizin Verlag, 31 edition, 2010.
- [165] G. L. Semenza. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(10):721–732, 2003.

- [166] G. L. Semenza. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol*, 91(5):803–806, 2006.
- [167] G. L. Semenza. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 29(5):625–634, 2010.
- [168] G. L. Semenza. Oxygen homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(3):336–361, 2010.
- [169] G. L. Semenza, B. H. Jiang, S. W. Leung, R. Passantino, J. P. Concordet, P. Maire, and A. Giallongo. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271(51):32529–32537, 1996.
- [170] G. L. Semenza, P. H. Roth, H. M. Fang, and G. L. Wang. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 269(38):23757–23763, 1994.
- [171] T. V. Sharp, F. Munoz, D. Bourbouli, N. Presneau, E. Darai, H. W. Wang, M. Cannon, D. N. Butcher, A. G. Nicholson, G. Klein, S. Imreh, and C. Boshoff. LIM domains-containing protein 1 (LIMD1), a tumor suppressor encoded at chromosome 3p21.3, binds pRB and represses E2F-driven transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(47):16531–16536, 2004.
- [172] F. Shirakawa and S. B. Mizel. In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biol*, 9(6):2424–2430, 1989.
- [173] S. Silbernagel and A. Despopoulos. *Taschenatlas Physiologie*. Georg Thieme Verlag, 7 edition, 2007.
- [174] D. U. Silverthorn. *Physiologie*. Pearson Studium, 4 edition, 2009.
- [175] S. B. Skube, J. M. Chaverri, and H. V. Goodson. Effect of GFP tags on the localization of EB1 and EB1 fragments in vivo. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(1):1–12, 2010.
- [176] A. Steinhoff, F. K. Pientka, S. Moeckel, A. Kettelhake, E. Hartmann, M. Koehler, and R. Depping. Cellular oxygen sensing: Importins and exportins are mediators of intracellular localisation of prolyl-4-hydroxylases PHD1 and PHD2. *Biochem Biophys Res Commun*, 387(4):705–711, 2009.

- [177] J. M. Stommel, N. D. Marchenko, G. S. Jimenez, U. M. Moll, T. J. Hope, and G. M. Wahl. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J*, 18(6):1660–1672, 1999.
- [178] M. Stroefel, W. Jelkmann, E. Metzen, U. Brockmeier, J. Dunst, and R. Deping. Stabilisation and knockdown of HIF—two distinct ways comparably important in radiotherapy. *Cell Physiol Biochem*, 28(5):805–812, 2011.
- [179] Y. Su, M. Loos, N. Giese, O. J. Hines, I. Diebold, A. Goerlach, E. Metzen, S. Pastorekova, H. Friess, and P. Buechler. PHD3 regulates differentiation, tumour growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 103(10):1571–1579, 2010.
- [180] Y. Su, M. Loos, N. Giese, E. Metzen, M. W. Buechler, H. Friess, A. Kornberg, and P. Buechler. Prolyl hydroxylase-2 (PHD2) exerts tumor-suppressive activity in pancreatic cancer. *Cancer*, 118(4):960–972, 2012.
- [181] K. E. Suel, H. Gu, and Y. M. Chook. Modular organization and combinatorial energetics of proline-tyrosine nuclear localization signals. *PLoS Biol*, 6(6):e137, 2008.
- [182] V. V. Sumbayev, A. Budde, J. Zhou, and B. Bruene. HIF-1 alpha protein as a target for S-nitrosation. *FEBS Lett*, 535(1-3):106–112, 2003.
- [183] Y. Takahashi, S. Takahashi, Y. Shiga, T. Yoshimi, and T. Miura. Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (i) in cultured cells. *J Biol Chem*, 275(19):14139–14146, 2000.
- [184] K. Takeda, V. C. Ho, H. Takeda, L. J. Duan, A. Nagy, and G. H. Fong. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol*, 26(22):8336–8346, 2006.
- [185] M. S. Taylor. Characterization and comparative analysis of the EGLN gene family. *Gene*, 275(1):125–132, 2001.
- [186] J. Tejomurtula, K. B. Lee, S. K. Tripurani, G. W. Smith, and J. Yao. Role of importin alpha8, a new member of the importin alpha family of nuclear transport proteins, in early embryonic development in cattle. *Biol Reprod*, 81(2):333–342, 2009.
- [187] M. E. Thompson. BRCA1 16 years later: nuclear import and export processes. *FEBS J*, 277(15):3072–3078, 2010.

- [188] L. Tsuji, T. Takumi, N. Imamoto, and Y. Yoneda. Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS Lett*, 416(1):30–34, 1997.
- [189] M. S. Ullah, A. J. Davies, and A. P. Halestrap. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 281(14):9030–9037, 2006.
- [190] C. M. Van Dusen, L. Yee, L. M. McNally, and M. T. McNally. A glycine-rich domain of hnRNP H/F promotes nucleocytoplasmic shuttling and nuclear import through an interaction with transportin 1. *Mol Cell Biol*, 30(10):2552–2562, 2010.
- [191] M. Vandromme, C. Gauthier-Rouviere, N. Lamb, and A. Fernandez. Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression. *Trends Biochem Sci*, 21(2):59–64, 1996.
- [192] P. Vaupel. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*, 9 Suppl 5:10–17, 2004.
- [193] P. Vaupel, F. Kallinowski, and P. Okunieff. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*, 49(23):6449–6465, 1989.
- [194] D. Villar, A. Vara-Vega, M. O. Landazuri, and L. Del Peso. Identification of a region on hypoxia-inducible-factor prolyl 4-hydroxylases that determines their specificity for the oxygen degradation domains. *Biochem J*, 408(2):231–240, 2007.
- [195] G. L. Wang, B. H. Jiang, E. A. Rue, and G. L. Semenza. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12):5510–5514, 1995.
- [196] G. L. Wang and G. L. Semenza. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*, 82(12):3610–3615, 1993.
- [197] G. L. Wang and G. L. Semenza. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270(3):1230–1237, 1995.
- [198] B. Weiss, A. Thompson, and C. C. Richardson. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VII. properties of the enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. *J Biol Chem*, 243(17):4556–4563, 1968.

- [199] C. Weiss. [normoxia ?]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 39 Suppl 1:S32–S37, 2004.
- [200] W. Wen, J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien, and S. S. Taylor. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*, 82(3):463–473, 1995.
- [201] R. H. Wenger, D. P. Stiehl, and G. Camenisch. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*, 2005(306):re12, 2005.
- [202] K. J. Williams, B. A. Telfer, D. Xenaki, M. R. Sheridan, I. Desbaillets, H. J. W. Peters, D. Honess, A. L. Harris, G. U. Dachs, A. van der Kogel, and I. J. Stratford. Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiother Oncol*, 75(1):89–98, 2005.
- [203] C. Wotzlaw, S. Gneuss, R. Konietzny, and J. Fandrey. Nanoscopy of the cellular response to hypoxia by means of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and new FRET software. *PMC Biophys*, 3(1):5, 2010.
- [204] C. Y. Xiao, S. Huebner, and D. A. Jans. SV40 large tumor antigen nuclear import is regulated by the double-stranded DNA-dependent protein kinase site (serine 120) flanking the nuclear localization sequence. *J Biol Chem*, 272(35):22191–22198, 1997.
- [205] D. Xu, A. Farmer, and Y. M. Chook. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- α proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 20(6):782–790, 2010.
- [206] C. Yan, L. H. Lee, and L. I. Davis. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J*, 17(24):7416–7429, 1998.
- [207] A. Y. Yu, M. G. Frid, L. A. Shimoda, C. M. Wiener, K. Stenmark, and G. L. Semenza. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 1):L818–L826, 1998.
- [208] C. Zhang, F. Yang, C. Reuel, W. Tang, S. Swisher, and H. Kim. Hypoxia-inducible factor-1 is a positive regulator of sox9 activity in femoral head osteonecrosis. *Bone*, 48(3):507–513, 2011.

A.1 Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen erläutert. Bei englischsprachigen Abkürzungen ist die Erläuterung ebenfalls in englischer Sprache angegeben und, soweit diese im deutschen Sprachgebrauch vorhanden ist, durch eine deutsche Übersetzung ergänzt. Die verwendeten Maßeinheiten entsprechen der SI-Nomenklatur, für Abkürzungen für Aminosäuren gilt die IUPAC-Nomenklatur.

4-PH α	Prolyl-4-Hydroxylase α
26S	26S-Proteasom
60S	große ribosomale Untereinheit
α-KG	α -Ketoglutarat
ALD A	Aldolase A
ALD C	Aldolase C
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARD1	<i>arrest defective protein 1 homologue</i>
AKT	Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
ARM	Armadillo
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BARD1	<i>BRCA1-associated RING domain protein 1</i>
bp	Basenpaar
bHLH	basische Helix-loop-Helix-Domäne
BPB	Bromphenolblau
BRCA1	<i>breast cancer gene 1</i>
BSA	<i>bovin serum albumin</i> , Rinderserumalbumin

CAD	C-terminale Transaktivierungsdomäne
CAS	<i>cellular apoptosis susceptibility protein</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	cytoplasmatische Filamente
C₂H₃KO₂	Kaliumacetat
C₄H₆MgO₄	Magnesiumacetat
C₂H₃NaO₂	Natriumacetat
CK1δ	Casein-Kinase 1 δ
CO₂	Kohlenstoffdioxid
cm	<i>centimeter</i> , Zentimeter
CODDD	<i>C-terminal oxygen dependent degradation domain</i> , C-terminale sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne
CPX	Cyclopirox
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
D	Asparaginsäure
DAPI	6-Diamidino-2-phenylindol
^DE	Aminosäurerest außer Asparaginsäure oder Glutaminsäure
DFO	Desferrioxamin
DMOG	Dimethyloxalylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
ECFP	<i>enhanced cyano fluorescent protein</i> , cyan fluoreszierendes Protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	EGFP-EGFP-GST
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EPO	Erythropoetin
ET1	Endothelin 1
et al.	<i>et alli/ et alliae</i> , und andere
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein
F	Phenylalanin
Fe²⁺	zweiwertiges Eisen
FIH1	<i>factor inhibiting HIF-1</i> , HIF-inhibierender Faktor
FKS	fötales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer

g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GLUT1	Glukosetransporter 1
GLUT2	Glukosetransporter 2
GLUT3	Glukosetransporter 3
GMM	große Makromoleküle und Proteine
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HK1	Hexokinase 1
HK2	Hexokinase 2
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i> , Hypoxie-induzierbarer Faktor
His	Poly-Histidin
HIV1	Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1
HMG	<i>high mobility group</i>
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HOX	Hypoxie
H₂O	Wasser
HRE	<i>hypoxia responsive element</i> , Hypoxie-responsives Element
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
I	Isoleucin
IBB	Importin β -Bindungsdomäne
IGF 2	<i>Insulin-like growth factor 2</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 2
Imp α	Importin α
Imp β	Importin β
IP	Import
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IVTT	<i>in vitro</i> Transkription und Translation
K	Lysin
K	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Kernmembran
KMM	kleine Moleküle und Proteine
KPK	Kernporen-Komplex

L	Leucin
LB	Luria-Müller
LIMD1	LIM-Domäne enthaltendes Protein 1
LMB	Leptomycin B
LY	LY290049
m	Meter
M	Mol pro Liter
M	Methionin
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MCT4	Monocarboxylattransporter 4
MDa	Megadalton
MEK1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i> Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-Kinase
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MMP2	Matrix-Metalloproteinase 2
mol	Mol
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> , Ziel des Rapamycins im Säugetier
MYND	<i>Myeloid translocationprotein 8/Nervy/Deaf-1</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
NAD	N-terminale Transaktivierungsdomäne
Na₂HPO₄	Natriumhydrogenphosphat
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kernexportsignal
NF	nukleäre Filamente
ng	Nanogramm
NIP 3	<i>nineteen kD interacting protein 3</i> , 19 kDa-interagierendes protein
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , Kernlokalisierungssignal
nmol	Nanomol
nM	Nanomol pro Liter

NO	Stickstoffmonoxid
NODDD	<i>N-terminal oxygen dependent degradation domain</i> , N-terminale sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne
NOX	Normoxie
NPM	Nucleophosmin
NUC	Nukleoplasmin
O₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ODDD	<i>oxygen dependent degradation domain</i> , sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD	PD98059
PHD	Prolyl-4-Hydroxylase
PHD1	Prolyl-4-Hydroxylase 1
PHD2	Prolyl-4-Hydroxylase 2
PHD 3	Prolyl-4-Hydroxylase 3
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKM	Pyruvat-Kinase M
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
pVHL	von-Hippel-Lindau-Protein
qRT-PCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	Arginin
Rap	Rapamycin
RCC1	<i>regulator of chromatin condensation 1</i>
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> , ribosomale-RNA
RSVM	Matrixprotein des Respiratorischen Synzytial-Virus
RT	reverse Transkription
s	Sekunde
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> , alkalische Phosphatase der Eismeergarnele

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SF	Selektivitäts-Filter
SV40	Simian Virus 40
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
ss	<i>single-stranded</i> , einzelsträngig
Std	Stunde
t_{1/2}	Halbwertszeit eines Stoffes
TAD	<i>transactivation domain</i> , Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Temed	Tetramethylethylendiamin
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TF	Transferrin
TGF-β3	<i>transforming growth factor-β3</i> , transformierender Wachstumsfaktor-β3
TR	Transport-Rezeptor
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
tRNA	<i>transfer RNA</i> , Transfer-RNA
U	Umdrehung
ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V	Valin
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
X	beliebiger Aminosäurerest
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer
μM	Mikromol pro Liter
μmol	Mikromol

A.2 Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktureller Aufbau der HIF-Untereinheiten	4
1.2	Sauerstoffabhängige Regulation von HIF- α	5
1.3	Domänenstruktur der drei PHD-Isoformen	10
1.4	Translokation durch den Kernporen-Komplex	15
1.5	Komponenten des Kernimports und -exports von Proteinen	18
4.1	Importin α/β -Bindungsverhalten von rekombinant aufgereinigter PHD3.	71
4.2	Importin $\alpha 5$ -Bindungsspezifität von rekombinant aufgereinigter PHD3.	73
4.3	Importin α/β -Bindungsverhalten von radioaktiv-markierter PHD3.	75
4.4	Importin α/β -Bindungsspezifität von radioaktiv-markierter PHD3.	76
4.5	Intrazelluläre Lokalisierung verschiedener PHD3-EGFP-Deletionsmutanten.	80
4.6	Importin $\alpha 3/\alpha 5$ -Bindungsverhalten verschiedener PHD3-Deletionsmutanten.	83
4.7	Importin α/β -Bindungsverhalten von LIMD1	85
4.8	Importin α/β -Bindungsverhalten von PHD2 und LIMD1	86
4.9	Importin α/β -Bindungsverhalten von PHD2 und HIF-1 α	87
4.10	Intrazelluläre Lokalisierung verschiedener PHD2-EGFP-Deletionskonstrukte	90
4.11	Aktivität des eingegrenzten PHD2-Sequenzbereiches als funktionsfähiges NLS	92
4.12	Eingrenzung einer NES in der primären PHD2-Aminosäuresequenz.	94
4.13	Schematische Darstellung der identifizierten Transportsignale	94
4.14	Indirekte Detektion der PHD2-Deletionsmutanten	96
4.15	Einfluss phosphorylierungsabhängiger Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD1	98
4.16	Einfluss phosphorylierungsabhängiger Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD2	99
4.17	Einfluss phosphorylierungsabhängiger Signalkaskaden auf die intrazelluläre Lokalisierung der PHD3	100

4.18 Einfluss potentieller Phosphorylierungsstellen auf die intrazelluläre PHD2-Lokalisierung	103
4.19 Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die Hydroxylierung von HIF-1 α	105
4.20 Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die transkriptionelle HIF-Aktivität.	107
4.21 Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die Expression HIF-1 α -abhängiger Zielgene.	108
4.22 Einfluss der intrazellulären PHD2-Lokalisierung auf die HIF-1 α -Proteinexpression.	110
4.23 siRNA-vermittelter PHD2 <i>knockdown</i>	112
4.24 Strahlensensibilisierung nach PHD2 <i>knockdown</i>	112
4.25 Einfluss der subzellulären PHD2-Lokalisierung auf die Strahlenresponsivität.	113
5.1 Kerntransport der Komponenten der molekularen Sauerstoffsensoren.	127

A.3 Tabellenverzeichnis

1.1	Einteilung der Gewebehypoxien	2
1.2	Auswahl an HIF-1-Zielgenen	7
3.1	Aussaatbedingungen für verwendete Zelllinien.	43
3.2	Transfektionsansatz <i>GeneJuice</i> ^R	45
3.3	Transfektionsansatz <i>Lipofectamine</i> TM 2000.	46
3.4	Verwendete Inhibitoren zellulärer Signalkaskaden.	46
3.5	Antikörper-Verdünnungen in Blockierungspuffer für Immunfluoreszenz II.	49
3.6	Präinkubationsansatz für die cDNA-Synthese.	54
3.7	Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.	54
3.8	Reaktionsansatz für Standard-PCR.	55
3.9	Standard-PCR-Programm.	55
3.10	Reaktionsansatz für qRT-PCR.	56
3.11	qRT-PCR-Programm mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.	56
3.12	Reaktionsansatz für Mutagenese-PCR.	57
3.13	Programm für Mutagenese-PCR.	57
3.14	Sammel- und Trenngel-Zusammensetzung für die SDS-Page.	61
3.15	Primärantikörper-Verdünnungen in Blockierungspuffer.	62
3.16	Sekundärantikörper-Verdünnungen in Blockierungspuffer.	62
3.17	Reaktionsansatz für radioaktive Proteinmarkierung mit [³⁵ S].	66
A.1	Verwendete Gefahrstoffe	167

A.4 Aminosäuresequenzen

A.4.1 PHD2

MDSPCQPQPLSQALPQLPGSSSEPLEPEPGRARMGVESYLPCLLPSYHCP
GVPSEASAGSGTPRATATSTTASPLRDGFGGQDGGELRPLQSEGAAALVTK
GCQRLAAQGARPEAPKRKWAEDGGDAPSPSKRPWARQENQEAEREGGMS
CSCSSGSGEASAGLMEEALPSAPERLALDYIVPCMRYYGICVKDSFLGAALG
GRVLAEVEALKRGGRLRDGQLVSQRAIPPRSIRGDQIAWVEGHEPGCRSIGA
LMAHVDAVIRHCAGRLGSYVINGRTKAMVACYPGNGLGYVRHVDNPHGDG
RCITCIYYLNQNWVVKVHGGLLQIFPEGRPVVANIEPLFDRLILFWSDRRNP
HEVKPAYATRYAITVWYFDAKERA AAKDKYQLASGQKGVQVPVVSQPPTPT

A.4.2 PHD3

MPLGHIMRLDLEKIALEYIVPCLHEVGF CYLDNFLGEVVGDCVLERVKQLH
CTGALRDGQLAGPRAGVSKRHLRGDQITWIGGNEEGCEAISFLSLIDRLV
LYCGSRLGKYVVKERSKAMVACYPGNGTGYVRHVDNPNGDGRRCITCIYYL
NKNWDAKLHGILRIFPEGKSFIA DVEPIFDRLILFWSDRRNPHEVQPSYAT
RYAMTVWYFDAEERAEAKKKFRNLTRKTESALTED

A.4.3 LIMD1

MDKYDDLGLEASKFIEDLNMYEASKDGLFRVDKGAGNNPEFEETR RVFAT
KMAKIHLLQQQQQQLLQEETLPRGSRGPVNGGGRLGPQARWEVVGSKLTV
DGAAKPPLAASTGAPGAVTTLAAGQPPYPPQEQRSRPYLHGTRHGSQDC
GSRESLATSEMSAFHQPGPCEDPSC LTHGDYYDNLSLSPKWGDKPGVSPSI
GLSVGSGWPSSPGSDPPLPKPCGDHPLNHRQLSLSSRSSEGLGGQNSGIG
GRSSEKPTGLWSTASSQRVSPGLPSNLENGAPAVGPVQPRTPSVSAPLALS
CPRQGG LPRNSGLGGEVSGVMSKPNVDPQPFQDGPKSYLSSSAPSSSPA
GLDGSQQGAVPGLGPKPGCTDLGTGPKLSPTSLVHPVMSTLPELSCKEGL
GWSSDGLSVLLDSPSSPRVRLPCQPLVPGPELRPSAAELKLEALTQRLER
EMDAHPKADYFGACVKCSKGVFGAGQACQAMGNLYHDTCF TCAACSRKL
RGKAFYFVNGKVFCEEDFLYSGFQQSADRCFLCGHLIMDMILQALGKSYHP
GCFRCVICNECLDGVPFTV DSENKIYCVRDYHKVLAPKCAACGLPILPPEGS
DETIRVVSMDRDYHVECYHCEDCGLELNDEDGHRCPLEDHLFCHSCHVK
RLEKRPSSTALHQHFF

A.5 Gefahrstoffe

Für im Rahmen dieser Arbeit behandelte, besonders relevante Gefahrstoffe sind die Symbole, Gefahrenmerkmale und Sicherheitshinweise nach dem "Global Harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien" (*Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals*, GHS) angegeben.

Tabelle A.1: Verwendete Gefahrstoffe. H: *Hazard Statements*, P: *Precautionary Statements*.

Chemikalien	CAS-Nr.	Symbole	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	79-06-1	GHS07, GHS08	340, 350, 372, 361f, 302, 312, 315, 319, 317	280h, 201, 302+352, 305+351+338, 308+313, 405
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	7727-54-0	GHS03, GHS07, GHS08	272, 302, 315, 319, 335, 334, 317	280, 305+351+338, 302+352, 304+341, 342+311
Ampicillin-Natriumsalz	69-52-3	GHS07, GHS08	315, 317, 319, 334, 335	261, 280, 305+351+338, 342+311
Desoxycholinsäure	83-44-3	GHS07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
Dithiothreitol (DTT)	7634-42-6	GHS07	302, 315, 319	302+352, 305+351+338
Essigsäure	64-19-7	GHS02, GHS05	226, 314	280, 301+330+331, 305+351+338
Ethanol	64-17-5	GHS02	225	210
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	60-00-4	GHS07	319	305+351+338
Igepal ^R CA-630	9036-19-5 6	GHS07	318	280, 305+351+338
Imidazol	288-32-4	GHS05, GHS07, GHS08	302, 314, 360D	201, 280, 305+351+338, 310
Isopropanol	67-63-0	GHS03, GHS07	225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
Kanamycinsulfat	64013-70-3	GHS08	360	201, 308+313
Leptomycin B	87081-35-4	GHS03, GHS06, GHS08	225, 301, 311, 331, 370	210, 260, 280, 301+310, 311
LY294002	154447-36-6	GHS07	302, 315, 319, 335	261, 280, 305, 351, 338, 321, 405, 501

Methanol	67-56-1	GHS02, GHS06, GHS08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352
MOPS	1132-61-2	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Natriumcarbonat	497-19-8	GHS07	319	260, 305+351+338
Natriumdeoxycholot	302-95-4	GHS07	302	261
Natriumdodecylsulfat (SDS)	151-21-3	GHS02, GHS06	228, 311, 302, 335, 315, 319	210, 280, 304+340, 305+351+338, 309+310
Natriumhydroxid	1310-73-2	GHS05	314	280, 301+330+331, 309, 310, 305+351+338
N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	110-18-9	GHS02, GHS05, GHS07	225, 332, 302, 314	210, 233, 280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310
Paraformaldehyd	30525-89-4	GHS02, GHS07, GHS08	228, 302, 332, 351, 335, 315, 319, 317	281, 302+352, 305+351+338, 308+313, 304+340
PD98059	167869-21-8	GHS06	301	301+310
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	329-98-6	GHS05, GHS06	301, 314	280, 305+351+338, 310
Phosphorsäure	7664-38-2	GHS05	314, 290	280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310
Ponceau S Lösung	6226-79-5	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Salzsäure	7647-01-0	GHS05, GHS07	314, 335	260, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 405, 501
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	77-86-1	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Triton X-100	9002-93-1	GHS05, GHS07	302, 318	280, 305+351+338
Trypanblau	72-57-1	GHS08	350	201, 308+313



GHS01



GHS02



GHS03



GHS04



GHS05



GHS06



GHS07



GHS08



GHS09