




Daniela Flügel



**Regulation der Stabilität  
des Hypoxie-induzierbaren Faktors  
durch Glycogen-Synthase-Kinase-3**

Cuvillier Verlag Göttingen

**Regulation der Stabilität des  
Hypoxie-induzierbaren Faktors durch  
Glycogen-Synthase-Kinase-3**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**DANIELA FLÜGEL**  
aus Northeim

Göttingen 2005

### **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2006  
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2005  
ISBN 3-86537-797-1

D7

Referent: Prof. Dr. Detlef Doenecke  
Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Hardeland  
Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2005

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2006  
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen  
Telefon: 0551-54724-0  
Telefax: 0551-54724-21  
[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2006  
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-797-1

Meiner Familie



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	VI
<b>Tabellenverzeichnis</b>	VIII
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	IX
<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>1. Einleitung</b>	3
1.1 Der Hypoxie-induzierbare Faktor	6
1.2 Aktivierung und Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ unter Hypoxie	7
1.3 Aktivierung und Kontrolle der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität durch Insulin	7
1.4 Regulation der GSK-3 durch Insulin und den Wnt-Signalweg	8
1.5 Aufgabenstellung	11
<b>2. Material</b>	12
2.1 Geräte	12
2.2 Chemikalien	13
2.3 Sonstige Materialien	15
2.4 Nachweis- und Reinigungssysteme	16
2.5 Molekulare-Standards	16
2.5.1 DNA-Längenstandards	16
2.5.2 Protein-Standards	16
2.6 Stammlösungen	16
2.7 Enzyme	18
2.7.1 Restriktionsendonucleasen mit Erkennungssequenzen	18
2.7.2 DNA-modifizierende Enzyme	19
2.7.3 Sonstige Enzyme	19
2.8 Antikörper	20
2.9 Tiere und Tierhaltung	21
2.10 Eukaryote Zelllinien	21
2.11 Bakterien, Plasmide und Vektoren	21
2.11.1 E. coli-XL-1 (blue)	21
2.11.2 Plasmidkonstrukte: pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Konstrukte, pcDNA6/Myc-His A-Konstrukte, pCMV-Myc-Konstrukte, pGEX-5X1-Konstrukte	22

2.11.3	Weitere Vektoren	29
	<i>pGI3-Konstrukte</i>	29
	<i>p5GE1B-Luc</i>	30
	<i>pCMV2-Gal4-TADN-HIF-1<math>\alpha</math> Wildtyp</i>	30
	<i>pCMV2-Gal4-TADC- HIF-1<math>\alpha</math> Wildtyp</i>	30
<b>2.12</b>	<b>Digoxigenin-markierte RNA-Sonden</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
3.1.1	Isolierung von Rattenhepatocyten	32
	<i>Perfusion der Leber</i>	32
	<i>Herstellung der Hepatocytensuspension</i>	32
3.1.2	Primärkultur von Rattenhepatocyten	34
3.1.3	Kultur von HepG2-Zellen und COS-7-Zellen	35
	<i>Anlegen und Weiterführen einer Kultur</i>	35
	<i>Medium für HepG2- und COS-7-Zellen</i>	36
3.1.4	Induktionsversuche in transient transfizierten HepG2-Zellen	36
3.1.5	Ernte und Zellaufschluß von HepG2-Zellen	36
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>38</b>
3.2.1	Herstellung elektrokompetenter E.coli	38
3.2.2	Transformation von E.coli	39
	<i>Elektrische Transformation von E.coli</i>	39
3.2.3	Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Minipräparation)	40
	<i>Minipräparation</i>	41
	<i>Restriktionsanalyse</i>	42
3.2.4	Gelelektrophorese	42
3.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	43
3.2.6	Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Maxipräparation)	44
3.2.7	Charakterisierung der Plasmide durch Sequenzierung	46
3.2.8	Aufreinigung der Proben	46
3.2.9	Automatische Sequenzierung und EDV-gestützte Auswertung	47
3.2.10	Transfektion von HepG2- und COS-7-Zellen nach der Calcium-Phosphat-Technik	47
3.2.11	RNA-Isolierung aus primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen	48

<b>3.3</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	49
3.3.1	Northern Blot Analyse	49
	<i>Denaturierung der RNA</i>	50
	<i>Elektrophoresebedingungen</i>	50
	<i>Visualisierung der RNA mit Ethidiumbromid</i>	51
	<i>Transfer auf eine Nylonmembran</i>	51
	<i>Hybridisierung der RNA mit Digoxigenin-markierten Sonden</i>	52
	<i>Detektion und Quantifizierung</i>	53
3.3.2	Methode zur Isolierung der Gesamtproteine aus HepG2-Zellen	54
3.3.3	Methode zur Isolierung der Gesamtproteine aus COS-7-Zellen	56
3.3.4	Proteinbestimmung	56
3.3.5	Western Blot Analyse	57
	<i>Vorbereitung der Proteine für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	57
	<i>Präparation eines SDS-Minigels und Durchführung der Elektrophorese</i>	58
	<i>Blotten der Proteine auf Nitrocellulose (NC)</i>	59
	<i>Inkubation des "Blots" mit Antikörpern</i>	61
	<i>Nachweis der gebundenen Antikörper über den Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper</i>	62
	<i>Erneute Verwendung des NC-Filters</i>	62
3.3.6	Luciferase Nachweis	63
3.3.7	Anreicherung von Expressionsproteinen in E.coli und Aufreinigung mittels Glutathion-Sepharose 4B	63
	<i>Transformation</i>	63
	<i>Expression</i>	64
	<i>Analyse der exprimierten Proteine</i>	64
	<i>Aufreinigung der Expressionsproteine aus E.coli</i>	64
	<i>Aufreinigung der Expressionsproteine mittels Glutathion-Sepharose 4B</i>	64
	<i>Elution</i>	65
3.3.8	GSK-Kinase-Assay	66
	Phosphorimager	67
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	68
<b>4.1</b>	<b>Aktivierung der PAI-1- und HIF-1<math>\alpha</math>-Expression in primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen</b>	68
4.1.1	Induktion der PAI-1-mRNA- und HIF-1 $\alpha$ -Protein-Spiegel durch Lithiumchlorid und Insulin in primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen	68



4.1.2	Fehlender Einfluß von Rapamycin auf die Induktion der PAI-1-mRNA und des HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch venösen pO <sub>2</sub> in primären Ratten-hepatocyten und HepG2-Zellen	70
4.1.3	Hemmung der PAI-1-Promotor abhängigen Luciferase-Aktivität durch GSK-3 in HepG2-Zellen	71
<b>4.2</b>	<b>Modulation des HIF-1<math>\alpha</math>-Proteinspiegels durch Lithiumchlorid (LiCl), Cycloheximid (CHX) und Actinomycin D (Act. D)</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>Regulation der HIF-1<math>\alpha</math>-Proteinmenge durch GSK-3 in HepG2-Zellen</b>	<b>73</b>
4.3.1	Regulation des Transaktivierungspotentials von HIF-1 $\alpha$ durch GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ in HepG2- und COS-7-Zellen	74
<b>4.4</b>	<b>Modulation des gesamten HIF-1<math>\alpha</math> Proteins durch die GSK-3 in HepG2-Zellen</b>	<b>76</b>
<b>4.5</b>	<b>Modulation der HIF-1<math>\alpha</math> N-terminalen Transaktivierungsdomäne bei Punktmutation der GSK-3-Phosphorylierungsstellen in HepG2- und COS-7-Zellen</b>	<b>79</b>
<b>4.6</b>	<b>Modulation des gesamten humanen HIF-1<math>\alpha</math> Proteins durch die GSK-3 in HepG2-Zellen</b>	<b>83</b>
<b>4.7</b>	<b>Phosphorylierung der HIF-1<math>\alpha</math>-TADN durch GSK-3</b>	<b>86</b>
<b>4.8</b>	<b>Modulation des HIF-2<math>\alpha</math> Proteins durch GSK-3 in HepG2- und COS-7-Zellen</b>	<b>87</b>
<b>4.9</b>	<b>Modulation des HIF-3<math>\alpha</math> Proteins in HepG2-Zellen</b>	<b>89</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>91</b>
<b>5.1</b>	<b>Insulin-vermittelte Aktivierung der PAI-1-Genexpression über PI3K, PKB und den Transkriptionsfaktor HIF-1<math>\alpha</math></b>	<b>91</b>
<b>5.2</b>	<b>Regulation der HIF-1<math>\alpha</math>-Spiegel durch GSK-3<math>\alpha</math> und GSK-3<math>\beta</math> auf Ebene der Translation und Proteinstabilität</b>	<b>92</b>
<b>5.3</b>	<b>Mutationen der GSK-3-Phosphorylierungsstellen innerhalb der HIF-1<math>\alpha</math> N-terminalen Transaktivierungsdomäne steigern die Proteinstabilität</b>	<b>93</b>
5.3.1	Die VHL-Bindungsstellen haben keinen Einfluss auf die Regulation von HIF-1 $\alpha$ durch die GSK-3	94
5.3.2	Die HIF-1 $\alpha$ -TADN ist Substrat der GSK-3	96
<b>5.4</b>	<b>Bedeutung der Mutationen der GSK-3-Phosphorylierungsstellen innerhalb der HIF-2<math>\alpha</math> N-terminalen Transaktivierungsdomäne</b>	<b>96</b>

<u>Inhaltsverzeichnis</u>		V
<b>5.5</b>	<b>Einfluss der Proteinkinase B auf das Transaktivierungspotential von HIF-3<math>\alpha</math></b>	97
<b>5.6</b>	<b>Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der HIF-1<math>\alpha</math> Regulation durch die GSK-3</b>	98
<b>Literaturverzeichnis</b>		101

**Abbildungsverzeichnis**

Abb.1	Modulation der Genaktivität durch Sauerstoff-Sensing (Hypothese)	5
Abb.2	Struktur einer $\alpha$ -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors	6
Abb.3	Stimulation der Glycogen-Synthese durch Insulin über die Inhibierung von GSK-3	9
Abb.4	Mögliche Signalwege zur Blockierung der GSK-3	10
Abb.5	Aufbau des pcDNA3.1D/V5-His-Topo-Vektors	22
Abb.6	Schematische Darstellung der pcDNA3.1D/V5-His-hHIF-1 $\alpha$ -Expressionsvektoren	23
Abb.7	Aufbau des pcDNA6/ Myc-His A-Vektors	24
Abb.8	Schematische Darstellung der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Expressionsvektoren	25
Abb.9	Aufbau des pCMV-Myc-Vektors	26
Abb.10	Schematische Darstellung der pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$ -Expressionsvektoren	27
Abb.11	Aufbau des pGEX-5X-1-Vektors	28
Abb.12	Luciferase-Gen-Konstrukte mit Bereichen des Ratten-PAI-1-Promotors	29
Abb.13	Schematische Darstellung des p5GE1B-Luc-Genkonstruktes	30
Abb.14	Schematische Darstellung des pCMV2-Gal4-TADN-HIF-1 $\alpha$ -Konstruktes (Wildtyp)	30
Abb.15	Schematische Darstellung des pCMV2-Gal4-TADC-HIF-1 $\alpha$ -Konstruktes (Wildtyp)	31
Abb.16	Prinzip eines Northern-Blots	52
Abb.17	Schematischer Aufbau eines Western-Blots	60
Abb.18	Induktion der PAI-1- und HIF-1 $\alpha$ -Expression durch Insulin und LiCl	69
Abb.19	Induktion der PAI-1- und HIF-1 $\alpha$ -Expression durch Insulin, nicht durch Rapamycin	71
Abb.20	Hemmung der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Promotor-Luciferase-Genkonstrukte nach Cotransfektion mit GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ in HepG2-Zellen	72
Abb.21	Modulation der HIF-1 $\alpha$ -Expression durch Lithiumchlorid, Actinomycin D und Cycloheximid	73
Abb.22	Hemmung der Hypoxie-induzierten HIF-1 $\alpha$ -Expression durch GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$	74

Abb.23	Modulation des HIF-1 $\alpha$ -Transaktivierungspotentials und der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel unter arteriellem pO <sub>2</sub> nach Cotransfektion von GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Expressionsvektoren in HepG2- und COS-7-Zellen.	76
Abb.24	Modulation der HIF-1 $\alpha$ -Expression durch GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ und MG132 in HepG2-Zellen.	78
Abb.25	Modulation der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -Transaktivität und der Gal-4-Spiegel nach Punktmutation unter arteriellem pO <sub>2</sub> durch GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ in HepG2- und COS-7-Zellen	80
Abb.26	Modulation der Gal-4-HIF-1 $\alpha$ -Transaktivität und der Gal-4-Spiegel nach Doppel- und Dreifachmutation unter arteriellem pO <sub>2</sub> durch GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ in HepG2- und COS-7-Zellen	82
Abb.27	Modulation von Gal-4-HIF-1 $\alpha$ -Transaktivität und der Gal-4-Spiegel nach Punkt- und Dreifachmutation unter arteriellem pO <sub>2</sub> durch GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ in HepG2- und COS-7-Zellen	84
Abb.28	Aktivierung der HIF-1 $\alpha$ -Expression durch verschiedene Mutationen innerhalb der GSK-3-Sites	85
Abb.29	Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel durch Mutation der Hydroxylierungs- und GSK-3-Phosphorylierungsstellen	86
Abb.30	Phosphorylierung der HIF-1 $\alpha$ -TADN durch GSK-3	87
Abb.31	Modulation von HIF-2 $\alpha$ -Gal4-Genkonstrukten und der Gal4-Spiegel unter arteriellem pO <sub>2</sub> durch GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ in HepG2- und COS-7-Zellen	88
Abb.32	Aktivierung von Gal4-HIF-3 $\alpha$ -Genkonstrukten unter arteriellem pO <sub>2</sub> nach Cotransfektion von PKB-Expressionsvektoren in HepG2-Zellen	90
Abb.33	Schematische Darstellung der HIF-1 $\alpha$ Regulation durch GSK-3 über PI3K und PKB.	100

**Tabellenverzeichnis**

Tab.1	O <sub>2</sub> -modulierte Prozesse und darin involvierte Gene bei Säugetieren	4
Tab.2	Primärantikörper und Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analyse	62

**Abkürzungsverzeichnis**

A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACT	$\beta$ -Actin
AHR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AK	Antikörper
AKT	Entspricht PKB (homolog zu v-Akt)
ALDA	Aldolase A
ANPR	Atrial natriuretic peptide receptor
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	adenomatous polyposis coli
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	Arylhydrocarbon-Rezeptor nukleär Translokator
AS	Amminosäure
bHLH	basic-helix-loop-helix
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CBP	CREB-bindendes Protein
C/EBP	CAAT/Enhancer Bindungsprotein
cDNA	kopierte (copy) Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	CRE-Bindungsprotein
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioetane-3,2(5' chloro)- Tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decane}-4-yl) –phenylphosphat
CycD/Cdk4	CyclinD/ Cyclin-abhängige Kinase 4
CYP1A1	Cytochrom P450-1 A1
d	Tage
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsufoxid

---

DMTU	Dimethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
ds	Doppelstrang
DSF	Desferrioxamin
DTE	Dithioerythriol
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N, N'-Tetra-Acetat
4E-BP	4E-bindendes Protein
eIF-2B	Eukaryotischer Translations-Initiations-Faktor 2B
eIF-4E	Eukaryotischer Translations-Initiations-Faktor 4E
EPAS	endothelial PAS-domain protein 1
EPO	Erythropoetin
FCS	Fetales Kälberserum
FIH	Factor-inhibiting HIF
FK-TF	Forkhead-Transkriptionsfaktoren
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GADPH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GAL4DBD	Hefetranskriptionsfaktor GAL4-DNA-Bindungsdomäne
gg	gegenüber
GK	Glucokinase
GLUT	Glucose-Transporter
GS	Glycogen-Synthase
GSK-3	Glycogen-Synthase-Kinase-3
HC	Hepatocyten
HEPES	N-(2-Hydroxymethyl)piperazin,N'-3-propansulfonsäure
HepG2	Hepatom Zelllinie HepG2
HIF1	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HLF	HIF like factor
HO-1	Heme oxygenase-1
HRE	Hypoxie-responsive-Elemente
HRF	HIF related factor
HRP	Horseradish Peroxidase
Hx	Hemopexin

ID	Inhibitorische Domäne
IGFBP	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein (Insulin-like growth factor binding protein)
I $\kappa$ B	NF $\kappa$ B-Inhibitor
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
iNOS	Induzierbare NO-Synthase (Inducible nitric oxide synthase)
Ins	Insulin
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
IVS	Intervenierende Sequenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LDH-A	Lactat Dehydrogenase A
LMW	Low Molecular Weight
Lsg.	Lösung
LUC	Luciferase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAP-K1	MAPK-activated protein kinase-1
MEM	Minimal Essential Medium
MOP	Member of PAS Superfamily
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mTOR	mammalian target of Rapamycin
MW	Molekulargewicht
myr	myristoyliert
NaAC	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NB	Northern Blot
NBT	Nitroblautetrazoliumsalz
NC	Nitrocellulose
NCS	Neugeborenen Kälberserum (new born calf serum)
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
NRE	Normoxie-responsive-Elemente
OD	Optische Dichte
ODD	O <sub>2</sub> -abhängige Degradierungsdomäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PAS	Per-AHR-Sim



---

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphat-buffered-saline)
PCK1	cytosolische Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDK	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase
Per	Periodic (Drosophila Protein)
PGK1	Phosphoglyceratekinase1
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PHD 1-4	Prolinhydroxylasen 1-4
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PK <sub>M</sub>	Pyruvat-Kinase-M
PLGF	Placental growth factor
PTEN	Phosphatase-Tensin-Homolog
PMSF	Phenylmethyl Sulfonylfluorid
Ref	Redoxfaktor
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtempertatur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylphosphat (sodium dodecylphosphat)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard error of the mean)
Sim	Single minded protein
S6K1	p70 ribosomal S6 kinase-1
ss	Einzelstrang (single strand)
SSC	Standard saline citrat
Stlsg.	Stammlösung
TAD-C	C-terminale Transaktivierungsdomäne des HIF-1 $\alpha$ -Proteins
TAD-N	N-terminale Transaktivierungsdomäne des HIF-1 $\alpha$ -Proteins
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N', N', N', N'- Tetramethylethylendiamin
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
tPA	Plasminogen activator

---

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit für Enzymaktivität ( $\mu\text{mol}$ umgesetztes Substrat/ min.)
USF	Upstream Stimulatory Factor
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular-endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau tumor supressor protein
Vol.	Volumenanteile
ZIP	Zipper



## Zusammenfassung

Die langfristige Anpassung einer Zelle an Veränderungen in der O<sub>2</sub>-Versorgung erfolgt durch eine Modulation der Genexpression. Die transkriptionelle Kontrolle der Genexpression wird über die Funktion von verschiedenen Transkriptionsfaktoren ausgeübt. Unter Hypoxie spielt der Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 (HIF-1) eine entscheidende Rolle für die transkriptionelle Aktivierung der Expression von vielen Genen, wie z.B. Erythropoetin (EPO), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). HIF-1 besteht aus einer O<sub>2</sub>-sensitiven Untereinheit HIF-1 $\alpha$  und einer konstitutiv exprimierten Untereinheit HIF-1 $\beta$ , die auch als Arylhydrocarbon-Rezeptor-nukleäres-Translokator-Protein (ARNT) bekannt ist.

Die O<sub>2</sub>-abhängige Regulation von HIF-1 $\alpha$  erfolgt überwiegend durch post-translationale Modifikation. Unter Normoxie werden Sauerstoff-abhängig zwei Prolin-Reste (P402/ P564) innerhalb der O<sub>2</sub>-abhängigen Degradierungsdomäne (ODD) und ein Asparagin-Rest (N803) in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (C-TAD) hydroxyliert. Die Prolinhydroxylierung bedingt dann die Bindung des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorproteins (VHL), Ubiquitylierung und proteasomalen Abbau von HIF-1 $\alpha$ . Die Asparaginhydroxylierung verhindert die Rekrutierung des Coaktivators p300.

Neben der O<sub>2</sub>-abhängigen Regulation von HIF-1 $\alpha$  können viele Wachstumsfaktoren und Hormone, einschließlich Insulin über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase B (PKB) Signalweg, die HIF-1 $\alpha$ -Spiegel O<sub>2</sub>-unabhängig induzieren. Dabei ist die Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel nicht direkt auf die Phosphorylierung durch PKB zurückzuführen, sondern wird wahrscheinlich durch weitere PKB Substrate, wie mammalian target of Rapamycin (mTOR) und Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) verursacht. Insbesondere die GSK-3 könnte eine Rolle bei der Regulation der HIF-1 $\alpha$  Proteinstabilität spielen, denn potentielle Consensus-Sequenzen für die GSK-3 scheinen in der O<sub>2</sub>-abhängigen Degradierungsdomäne (ODD) von HIF-1 $\alpha$  zu existieren.

Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit die exakte Lokalisation dieser möglichen Phosphorylierungsstellen für die GSK-3 im Zusammenhang mit der HIF-1 $\alpha$  Stabilität zu untersuchen.

### *Aktivierung der PAI-1- und HIF-1 $\alpha$ -Expression durch Insulin und Lithiumchlorid*

Insulin kann die PAI-1-Genexpression über den PI3K/ PKB Signalweg via HIF-1 $\alpha$  vermitteln. In Primärkulturen von Rattenhepatocyten und in HepG2 Hepatomazellen konnte Insulin unter Normoxie die GSK-3 durch Phosphorylierung hemmen und eine Induktion der PAI-1-mRNA und HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge bedingen. Hemmung der GSK-3 durch Behandlung mit LiCl imitierte den Insulineffekt und steigerte die PAI-1-mRNA- und die HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel. Unter venösem pO<sub>2</sub> konnte dieser Effekt noch verstärkt werden. Dies deutete darauf hin, dass die GSK-3 über eine

Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel an der Vermittlung der Insulin-induzierten PAI-1-Expression beteiligt sein könnte.

#### *Regulation der HIF-1 $\alpha$ Proteinmenge durch GSK-3*

In HepG2- und COS-7-Zellen wurden die HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel nach Cotransfektion von verschiedenen HIF-1 $\alpha$ -, GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Expressionsplasmiden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass unter Normoxie und Hypoxie die Expression von GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  zu einer Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmengen führte. Diese Abnahme der Proteinmenge war auf einen VHL-unabhängigen proteasomalen Abbauprozess zurückzuführen, da i) eine VHL-resistente HIF-1 $\alpha$ -Mutante auch durch GSK-3 destabilisiert wurde und ii) der Proteasomenhemmstoff MG132 die Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel dieser Mutante durch GSK-3 teilweise aufhob. Die Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Proteine durch GSK-3 erfolgte ausschließlich im Bereich der ODD von HIF-1 $\alpha$ . Innerhalb dieses Bereichs befinden sich die putativen GSK-3 Phosphorylierungsstellen (S551, T555 und S589). Durch Mutationen von S551A, T555V und S589A, allein und in Kombination, wurden diese Phosphorylierungsstellen ausgeschaltet. Die nachfolgenden Experimente zeigten dann, dass die Punktmutationen den Effekt der Reduktion durch GSK-3 aufgehoben hatten. Dadurch kann angenommen werden, dass durch diese Mutationen innerhalb der N-terminalen Transaktivierungsdomäne der ODD die Regulierung durch die GSK-3 ausgeschaltet wurde.

#### *Phosphorylierung der HIF-1 $\alpha$ -TADN durch GSK-3*

Da die bisherigen Versuche gezeigt haben, dass die putativen Phosphorylierungsstellen S551, T555 und S589 durch GSK-3 phosphoryliert werden könnten, konnte erst durch einen GSK-3-Kinase-Assay gezeigt werden, dass nur bei Ausschaltung aller drei Phosphorylierungsstellen die aktive GSK-3 $\beta$  HIF-1 $\alpha$  nicht mehr phosphorylieren kann.

#### *Regulation der HIF-2 $\alpha$ Proteinmenge durch GSK-3*

Um zu überprüfen, inwieweit die Regulation durch GSK-3 auch für HIF-2 $\alpha$  zutrifft, wurden die ebenfalls im HIF-2 $\alpha$ -Protein vorhandenen GSK-3-Phosphorylierungsstellen mutiert. Transfektionsexperimente mit einem HIF-2 $\alpha$ -TADN-Expressionsplasmid, sowie dessen Mutante mit GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Genkonstrukten in HepG2-Zellen zeigten, dass die Modulation, die die GSK-3 auf HIF-1 $\alpha$  ausübt, auch auf HIF-2 $\alpha$  übertragbar ist.

#### *Regulation der HIF-3 $\alpha$ Proteinmenge durch PKB*

Im Gegensatz zu HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  besitzt HIF-3 $\alpha$  eine putative Targetsequenz für PKB. Two Hybrid-Analysen in Gegenwart eines PKB-Expressionsvektors zeigten, dass PKB HIF-3 $\alpha$  reprimiert, was durch Mutation der "PKB-Site" aufgehoben werden konnte.

Somit zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass GSK-3 sowohl die VHL-unabhängige proteasomale HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -, aber nicht die HIF-3 $\alpha$ -Degradation verursachen kann.

## 1. Einleitung

Die Grundlage des höheren Lebens wurde mit der Entstehung des Sauerstoffs vor etwa 2 Milliarden Jahren geschaffen. Er dient als Substrat bei verschiedenen enzymatischen Reaktionen sowie als terminaler Elektronenakzeptor in der mitochondrialen Atmungskette und trägt somit dazu bei, daß Energie im Rahmen der ATP-Synthese bereitgestellt werden kann. Bei einer mangelnden Versorgung des Körpers mit Sauerstoff kommt es zu schwerwiegenden Konsequenzen für den Körper, denn insbesondere Gehirn, Herz und Muskeln von Säugern sind auf eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff über das Blut angewiesen. Tritt eine Unterversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) auf, muß der Körper darauf mit sogenannten Anpassungsreaktionen reagieren. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen: die kurzfristigen, die innerhalb von Sekunden bis Minuten ablaufen und die langfristigen Reaktionen, die über Stunden und Tage verlaufen. Bei den kurzfristigen Reaktionen handelt es sich um kompensatorische Maßnahmen, die keinen Einfluss auf die Genexpression haben, wie z.B. das Einsetzen einer verstärkten Atmung und die Erweiterung der Lungengefäße. Energieverbrauchende Stoffwechselwege, wie Proteinsynthese oder Gluconeogenese werden auf zellulärer Ebene herunterreguliert und so durch Verlangsamung der ATP-verbrauchenden zellulären Prozesse der ATP-Umsatz verringert.

Bei den längerfristigen Anpassungsreaktionen des Organismus an Hypoxie handelt es sich um eine Veränderung der Genexpression. Die durch Hypoxie angeregte Synthese von roten Blutkörperchen (Erythropoese) im Knochenmark ist die am besten charakterisierte  $O_2$ -abhängige Genexpression bei Säugern. Eine Schlüsselfunktion hat hierbei das Hormon Erythropoetin (EPO), das als Antwort auf Hypoxie in den fibroblastenähnlichen, Typ I interstitiellen Zellen der äußeren Medulla der Niere produziert wird. Über den Blutkreislauf gelangt das Hormon ins Knochenmark, wo es an Rezeptoren der erythroiden Vorläuferzellen bindet und somit ihre Proliferation und Differenzierung stimuliert. Die so verstärkte Erythrocytenproduktion trägt entscheidend zur Normalisierung des  $O_2$ -Transports bei. Neben der EPO-Synthese und den klassischen Stoffwechselwegen Glycolyse und Gluconeogenese sind bei Säugern eine große Zahl weitere physiologischer Prozesse bekannt, bei denen Sauerstoff einen regulatorischen Einfluß hat. Dabei spielen eine Vielzahl von Transportern, Enzymen, Hormonen und Wachstumsfaktoren eine Rolle, deren Genexpression durch verringerten Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie) und normalen Sauerstoffpartialdruck (Normoxie) moduliert wird (Tab. 1). Die Wirkung einer extrazellulären Signalsubstanz, wie eines Hormons, Wachstumsfaktors oder Neurotransmitters wird in der Regel über einen Rezeptor vermittelt, jedoch ist ein eigentlicher Sauerstoffsensoren bisher nicht identifiziert.

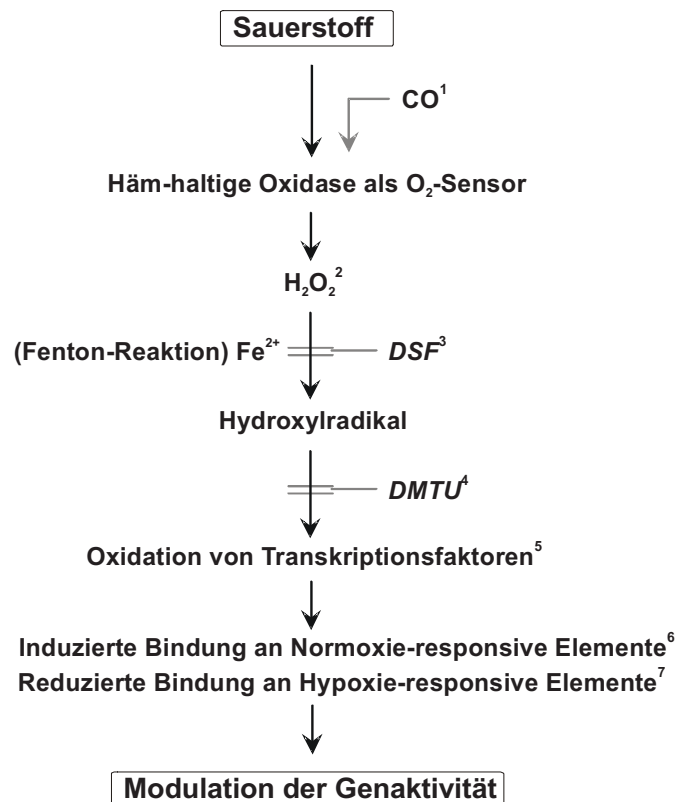
Tabelle 1: O<sub>2</sub>-modulierte Prozesse und darin involvierte Gene bei Säugetieren.

Prozesse	Hypoxie-induzierte Genexpression	Normoxie-induzierte Genexpression
Hämatopoese	Erythropoietin (EPO) 1	
Angiogenese	Vascular endothelial growth factor (VEGF) 2	Placental growth factor (PLGF) 3
Fibrinolyse	Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4	Plasminogen activator (tPA) 5
Wundverschluss/Entzündung	Inducible nitric oxide synthase (iNOS) 6	Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) 7
Wachstum/Differenzierung	p53 Tumor suppressor protein 8	
	bcl-2 Apoptosis preventing protein 9	
	Insulin like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) 10	
Kohlenhydrat-Stoffwechsel		
Glucosetransport	Glucosetransporter-1 (GLUT-1) 11	
Glykolyse/Gluconeogenese	Glucokinase (GK) 12-16	cytosolic Phosphoenolpyruvate carboxykinase-1 (PCK-1) 17
	Aldolase A (ALD-A)	
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	
	Phosphoglycerate kinase1 (PGK1)	
	Pyruvate kinase M (PK <sub>M</sub> )	
	Lactate dehydrogenase A (LDH-A)	
NH <sub>3</sub> -Aminosäuren-Stoffwechsel	L-Arginine transporter 18	Tyrosine aminotransferase (TAT) 19
Xenobiotika-Stoffwechsel		Cytochrome P450-1 A1 (CYP1A1) 20
Häm-Stoffwechsel	Heme oxygenase-1 (HO-1) 21	Hemopexin (Hx) 22
H <sub>2</sub> O- und Elektrolythaushalt	Angiotensin converting enzyme (ACE) 23	Atrial natriuretic peptide receptor (ANPR) 24

- 1 Goldberg, M.A., Dunning, S.P., Bunn, H.F. (1988) *Science* **242**, 1412-1415
- 2 Goldberg, M.A. and Schneider, T.J. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 4355-4359
- 3 Gleadle, J.M., Ebert, B.L., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J. (1995) *Am.J.Physiol.* **268**, C1362-C1368
- 4 Kietzmann, T., Roth, U., Jungermann, K. (1999) *Blood* **94**, 4177-4185
- 5 Pinsky, D.J., Liao, H., Lawson, C.A., Yan, S.F., Chen, J., Carmeliet, P., Loskutoff, D.J., Stern, D.M. (1998) *J.Clin.Invest.* **102**, 919-928
- 6 Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L.S., Cox, G.W., Varesio, L. (1995) *J.Exp.Med.* **182**, 1683-1693
- 7 VanOtteren, G.M., Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Danforth, J.M., Strieter, R.M. (1995) *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **13**, 399-409
- 8 Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Fornace-AJ, Giaccia, A.J. (1994) *Mol.Cell Biol* **14**, 6264-6277
- 9 Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1995) *Nature* **374**, 811-813
- 10 Tazuke, S.I., Mazure, N.M., Sugawara, J., Carland, G., Faessen, G.H., Suen, L.F., Irwin, J.C., Powell, D.R., Giaccia, A.J., Giudice, L.C. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 10188-10193
- 11 Gleadle, J.M., Ebert, B.L., Ratcliffe, P.J. (1995) *Eur.J.Biochem.* **234**, 92-99
- 12 Kietzmann, T., Roth, U., Freimann, S., Jungermann, K. (1997) *Biochem.J.* **321**, 17-20
- 13 Kietzmann, T., Freimann, S., Bratke, J., Jungermann, K. (1996) *FEBS Lett.* **388**, 228-232
- 14 Graven, K., Troxler, R.F., Kornfeld, H., Panchenko, M.V., Farber, H.W. (1994) *J.Biol.Chem.* **269**, 24446-24453
- 15 Firth, J.D., Ebert, B.L., Ratcliffe, P.J. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 21021-21027
- 16 Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P., Giallongo, A. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 32529-32537
- 17 Hellkamp, J., Christ, B., Bastian, H., Jungermann, K. (1991) *Eur.J.Biochem.* **198**, 635-639
- 18 Louis, C.A., Reichner, J.S., Henry-WL, J., Mastrofrancesco, B., Gotoh, T., Mori, M., Albina, J.E. (1998) *Am.J.Physiol.* **274**, R775-R782
- 19 Nauck, M., Woffle, D., Katz, N., Jungermann, K. (1981) *Eur.J.Biochem.* **119**, 657-661
- 20 Hazinski, T.A., Noisin, E., Hamon, I., DeMatteo, A. (1995) *J Clin.Invest.* **96**, 2083-2089
- 21 Lee, P.J., Jiang, B.H., Chin, B.Y., Iyer, N.V., Alam, J., Semenza, G.L., Choi, A.M. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 5375-5381
- 22 Kietzmann, T., Immenschuh, S., Katz, N., Jungermann, K., Muller, E.U. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 397-403
- 23 King, S.J., Booyse, F.M., Lin, P.H., Traylor, M., Narkates, A.J., Oparil, S. (1989) *Am.J Physiol.* **256**, C1231-C1238
- 24 Mathew, R., Omar, H.A., Fayngersh, R., Shen, W., Wang, J., Gewitz, M.H., Hintze, T.H., Wolin, M.S. (1996) *Br.J.Pharmacol.* **118**, 1886-1890

Insbesondere Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Erythropoetin (EPO)-Genexpression (Bunn und Poyton, 1996; Goldberg et al., 1988; Wang und Semenza, 1993) und zur Normoxie-modulierten Glucagon-abhängigen PCK1-Genaktivierung (Kietzmann et al., 1997; Kietzmann et al., 1996; Kietzmann et al., 1997) sowie zur Hypoxie-modulierten Insulin-abhängigen GK-Genaktivierung (Kietzmann und Jungermann, 1997; Bratke et al., 1999; Kietzmann et al., 1998; Kietzmann et al., 1997) weisen darauf hin, daß ein  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bildendes Häm-Protein als Sauerstoff-Sensor beteiligt sein könnte.

Spektroskopische Untersuchungen und deren Befunde führten zu der Hypothese, daß ein b-Typ-Cytochrom am  $\text{O}_2$ -Sensing beteiligt sein könnte (Acker et al., 1989, 1992, 1994), in dessen Signaltransduktionsprozess  $\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt wird (Fandrey et al., 1994; Görlach et al., 1994) (Abb. 1). Das daraus entstandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann dann durch eine am endoplasmatischen Retikulum lokalisierte perinukleäre Fenton-Reaktion in Hydroxylradikale ( $\text{OH}\bullet$ ) und in Hydroxylanionen ( $\text{OH}^-$ ) umgewandelt werden (Kietzmann et al., 1998; Liu et al., 2004). Durch die Fenton-Reaktion wird es den Zellen ermöglicht, ihre Genexpression adäquat an den Sauerstoffpartialdruck anzupassen. Diese Anpassung erfolgt durch die hohe Reaktivität des Hydroxylradikals mit RNA-bindenden Faktoren, wie der ein Fe-S-Cluster enthaltenden Aconita-



**Abb. 1: Modulation der Genaktivität durch Sauerstoff-Sensing (Hypothese) (Jungermann und Kietzmann, 2000).** (1) CO, Kohlenmonoxid (Sauerstoffsimulator) (Goldberg et al., 1988; Kietzmann et al., 1993); (2) Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kietzmann et al., 1997, 1996; Fandrey et al., 1994); (3) DSF, Desferrioxamin (Eisenchelator) (Fandrey et al., 1994; Ehleben et al., 1997; Kietzmann et al., 1998); (4) DMTU, Dimethylthioharnstoff (Radikalfänger) (Fandrey et al., 1994; Ehleben et al., 1997; Kietzmann et al., 1998); (5) s. Huang et al., 1996; (6) s. Bratke et al., 1999; (7) s. Huang et al., 1996; Firth et al., 1994; und Semenza et al., 1996.

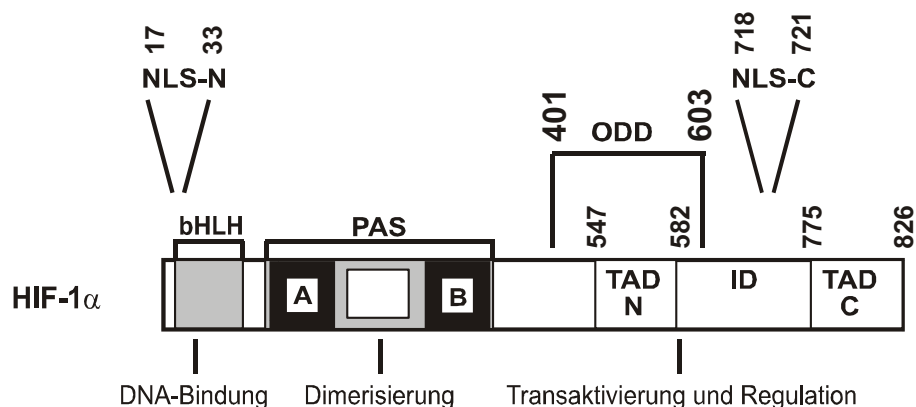


se (Rouault und Klausner, 1997) oder redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren. Zu diesen gehören neben dem leucin-zipper Protein Aktivator-Protein 1 (AP-1) (Abate et al., 1990), die zur Gruppe der basic helix-loop-helix (bHLH)-Familie gehörenden Proteine Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF-1) (Wang et al., 1995) und der Upstream Stimulatory Factor (USF) (Pognonec et al., 1992), die an Cysteinen modifiziert werden, bevor sie in den Kern einwandern und die Genexpression über die modifizierte Bindung an Normoxie-responsive Elemente (NRE) oder Hypoxie-responsive Elemente (HRE) modulieren (Abb. 1).

### 1.1 Der Hypoxie-induzierbare Faktor

Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1) ist ein heterodimerer Proteinkomplex, der aus einer HIF-1 $\alpha$  Untereinheit (Wang und Semenza, 1995) und aus einer HIF-1 $\beta$  Untereinheit besteht, die auch als Arylhydrocarbon-Rezeptor-nukleärem-Translokator (ARNT) bekannt ist (Hoffmann et al., 1991).

Der humane HIF-1 $\alpha$  ist ein Protein von 826 AS. Der aminoternale Bereich von HIF-1 $\alpha$  beinhaltet eine basic helix-loop-helix (bHLH)-Domäne und eine PAS (Per-AHR-ARNT-Sim)-Domäne, die in dem Drosophila Protein Periodic (Per), dem Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR), dem ARNT und dem Single minded (Sim) Protein vorkommt und deshalb PAS-Domäne genannt wird. Die DNA-Bindung wird durch die basischen Aminosäuren der bHLH-Domäne ermöglicht, wohingegen die bHLH-PAS-Domäne für die Protein-Dimerisierung verantwortlich ist (Reisz-Porszasz et al., 1994; Wang et al., 1995; Jiang et al., 1996a) (Abb. 2).



**Abb. 2: Struktur einer  $\alpha$ -Untereinheit des Hypoxie-induzierbaren Faktors am Beispiel von HIF-1 $\alpha$ .** Angegeben sind die funktionellen Domänen mit den dazugehörigen Aminosäure-Bereichen (wenn bekannt) bHLH: basic Helix-Loop-Helix, ID: Inhibitorische Domäne, NLS: Nukleäre Lokalisationssequenz; ODD: O<sub>2</sub>-abhängige Degradierungsdomäne, PAS: PAS (Per/ARNT/Sim)-Domäne mit den beiden internen homologen Bereichen A und B; TAD: Transaktivierungsdomäne.

Neben der HIF-1 $\alpha$  Untereinheit sind noch zwei weitere  $\alpha$ -Untereinheiten bekannt, die mit der  $\beta$ -Untereinheit (ARNT) zu einem aktiven Transkriptionsfaktor dimerisieren können. Es handelt sich um HIF-2 $\alpha$ , auch bekannt als EPAS1 (endothelial PAS-domain-protein 1) (Tian et al., 1997), MOP2 (Member of PAS Superfamily 2) (Rivard et al., 2000), HLF (HIF like factor) (Ema et al., 1997) oder HRF (HIF related factor) (Flamme et al., 1997) und um HIF-3 $\alpha$ , auch bezeichnet als MOP7 (Hogenesch et al., 1997; Gu et al., 1998). Unter Hypoxie gelangt die  $\alpha$ -Untereinheit in den Kern, heterodimerisiert dort mit der  $\beta$ -Untereinheit und entfaltet durch Bindung an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) (Beck et al., 1991) seine transkriptionsaktivierende Wirkung (Kallio et al., 1998).

## 1.2 Aktivierung und Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ unter Hypoxie

Die Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  wird durch verschiedene post-translationale Modifikationen, wie Hydroxylierungen reguliert.

Unter Normoxie wird das HIF-1 $\alpha$ -Protein einer schnellen proteasomalen Degradation unterzogen, wohingegen Hypoxie diese Degradation blockiert (Huang et al., 1996; Kallio et al., 1997). Voraussetzung für den proteasomalen Abbau ist die Ubiquitylierung von HIF-1 $\alpha$  nach Bindung des von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL), einer Komponente eines E3 Ubiquitin Ligase Komplexes (Hon et al., 2002; Min et al., 2002). Die Bindung von pVHL erfolgt jedoch erst, wenn zwei Prolin Reste (P402/ P564), die sich in der O<sub>2</sub>-abhängigen Degradierungsdomäne (ODD) des HIF-1 $\alpha$  Proteins befinden, durch spezifische Prolinhydroxylasen (PHD1-4) hydroxyliert sind. Durch die post-translationale Hydroxylierung eines weiteren Asparagin-Restes (N803) der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (C-TAD) durch den Factor-inhibiting HIF (FIH) wird die Rekrutierung des Coaktivators CBP/p300 verhindert, was sich in einem Verlust des Transaktivierungspotentials von HIF-1 $\alpha$  verdeutlicht.

Zusätzlich kann die Acetylierung von HIF-1 $\alpha$  durch die Acetyltransferase ARD-1 am Lysin 532 die Interaktion mit pVHL verstärken und so zur proteasomalen Degradation beitragen (Jeong et al 2002). Weitere post-translationale Modifikationen sind durch MAP-Kinasen beschrieben worden, wobei die genaue Lokalisation der phosphorylierten Aminosäuren im HIF-1 $\alpha$  Molekül nicht determiniert wurde (Richard et al. 1999).

## 1.3 Aktivierung und Kontrolle der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität durch Insulin

Die HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel werden nicht nur durch veränderten O<sub>2</sub>-Partialdruck reguliert, sondern auch O<sub>2</sub>-unabhängig durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie PDGF, Gerinnungsfaktoren wie Thrombin und Hormone wie Insulin. Interessanterweise scheint bei der

HIF-1 $\alpha$  Regulation durch alle diese O<sub>2</sub>-unabhängigen Stimuli der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)- und Proteinkinase B (PKB)-Signalweg eine entscheidende Rolle zu spielen.

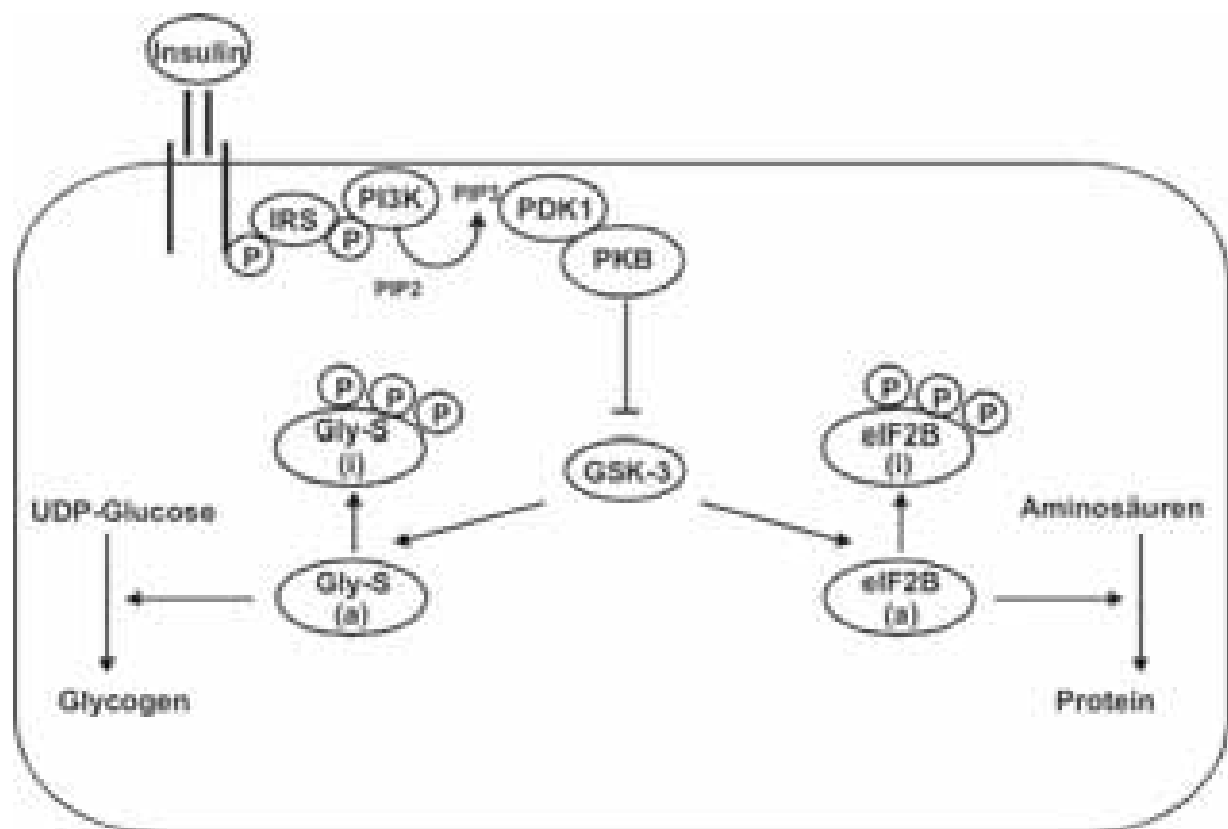
So wird diese Signalkaskade nach Insulin-Bindung an seinen Rezeptor und durch Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der intrazellulären Rezeptor  $\beta$ -Ketten und der Tyrosinphosphorylierung von Insulin-Rezeptor-Substraten (IRS) initiiert (Myers and White, 1996; O'Brian und Granner, 1996). Anschließend wird durch Phosphorylierung von Insulin-Rezeptor-Substraten (IRS) und Bindung der Phosphotyrosin-Reste der IRS an der regulatorischen Untereinheit p85 der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) diese Kinase aktiviert (Kazlauskas, 1994; Pawson, 1995). Durch diesen Prozess wird die PI3K-katalytische Untereinheit p110 zur Plasmamembran geführt, wo dann das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) zu PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sowie PI(4)P zu PI(3,4)P<sub>2</sub> durch p110 phosphoryliert wird (Reif et al., 1996). Mit hoher Affinität binden dann PI(3,4,5)P<sub>3</sub> bzw. PI(3,4)P<sub>2</sub> an die Pleckstrin (PH)-Domäne der PKB und binden somit die Kinase an die Plasmamembran. Dort wird die PKB am Threonin (Thr) 308 und am Serin (Ser) 473 phosphoryliert (Alessi und Cohen, 1998; Bellacosa et al., 1998) und somit aktiviert. Die Phosphorylierung am Thr308 wird durch eine Kinase vermittelt, bei der es sich um eine ubiquitär exprimierte Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) handelt (Alessi et al., 1997; Stephens et al., 1998). Bei Ser473 ist die Phosphorylierung unabhängig von PDK1. Sie scheint durch eine Kinase vermittelt zu werden, die im Gegensatz zu PDK1 von dem Kinase-Inhibitor Staurosporin unbeeinflusst bleibt (Hill et al., 2001).

Über Phosphorylierungen von weiteren Substraten wie der Glycogen-Synthase-Kinase-3, dem mammalian target of Rapamycin (mTOR) und Transkriptionsfaktoren wie Forkhead-Transkriptionsfaktoren und Elongationsfaktoren wird der PKB-Effekt auf die Gen-Expression übertragen. PKB beeinflusst so die NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription durch Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Inhibitor (I $\kappa$ B)-Kinase (IKK) und Degradierung von I $\kappa$ B (Kane et al., 1999). Ob und wie PKB nun genau die Aktivität von HIF-1 $\alpha$  regulieren kann, ist bisher nicht genau bekannt. Eine Möglichkeit ergibt sich durch die Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3).

#### **1.4 Regulation der GSK-3 durch Insulin und den Wnt-Signalweg**

Die Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) wurde als erstes als ein Regulator des Glycogen Stoffwechsels entdeckt, da die GSK-3 das Schlüsselenzym der Glycogen Biosynthese ist, welches die Glycogen-Synthase durch Phosphorylierung inaktiviert (Embi et al., 1980). Die GSK-3 ist eine Serin/ Threonin Kinase, die in ihren Zielproteinen die Sequenz S/TXXXS/T erkennt (Fiol et al., 1990). Es existieren zwei Isoformen GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ , welche ubiquitär in Säugetierzellen exprimiert werden (Woodgett, 1990, 1991).

Die Insulin-abhängige Dephosphorylierung der Glycogen-Synthase beruht auf der Inhibierung der GSK-3 (Cohen et al., 1978). Nach Stimulation mit Insulin wird die GSK-3 durch PKB an N-terminalen Serin-Resten (Ser21 bei GSK-3 $\alpha$  und Ser9 bei GSK-3 $\beta$ ) phosphoryliert und damit inhibiert, was letztendlich zur Aktivierung der Glycogen-Synthase führt. Dieser Vorgang wird durch die Proteinkinase B (PKB) katalysiert (Cross et al., 1995). Allerdings ist es auch möglich, daß Insulin die Dephosphorylierung der Glycogen-Synthase über die Aktivierung einer Glycogen-verbundenen Form der Protein Phosphatase 1 stimuliert (Suzuki et al., 2001). Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, daß die Aktivität von GSK-3 auch die Expression von HIF-1 $\alpha$  regulieren kann. Dies scheint einerseits durch eine direkte Phosphorylierung zu geschehen (Sohdi et al. 2001, Mottet et al 2003), oder über einen translationalen Mechanismus durch Beeinflussung der Proteinsynthese. Dabei könnte die GSK-3 vermittelte Phosphorylierung und Inhibierung des eukaryotic protein synthesis initiation factor 2B (eIF2B) eine Rolle spielen. Durch Insulin via PKB und GSK-3 kann es somit zu einer Dephosphorylierung und Aktivierung von eIF2B kommen, was in einer erhöhten Protein- und damit auch HIF-1 $\alpha$ -Synthese zum Ausdruck kommt (Welsh et al., 1992, 1998) (Abb. 3).

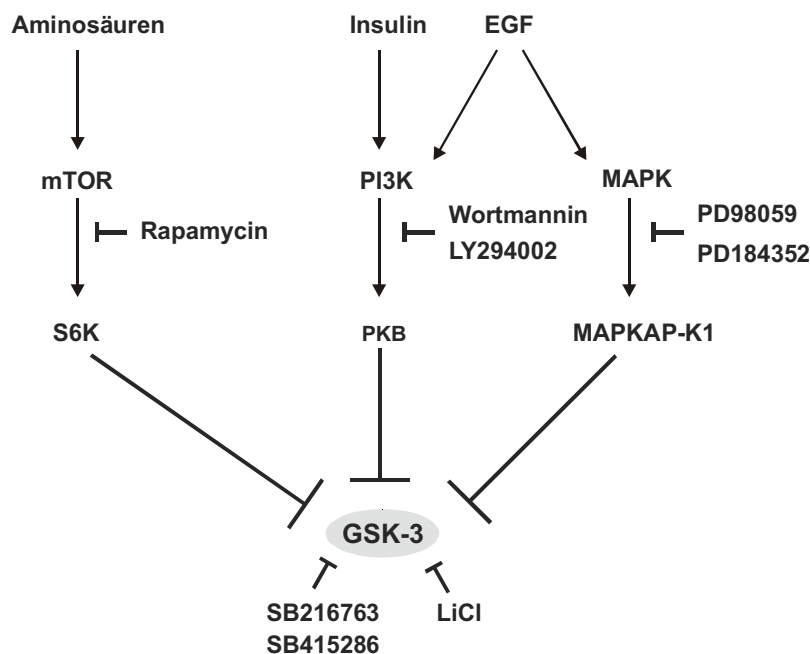


**Abb 3.: Stimulation der Glycogen-Synthese durch Insulin über die Inhibierung von GSK-3.** Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor führt dazu, daß über den PI3K/ PKB Signalweg die GSK-3 durch die aktive PKB am Serin 21 (GSK-3 $\alpha$ ) und Serin 9 (GSK-3 $\beta$ ) phosphoryliert und somit inaktiviert (i) wird. Dieses hat zur Folge, daß die Glycogen-Synthase (Gly-S) und der eukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) dephosphoryliert und so aktiviert (a) werden. IRS: Insulin-Rezeptor-Substrate; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PDK1: Proteinkinase 1; PKB: Proteinkinase B; GSK-3: Glycogen-Synthase-Kinase-3; eIF2B: eukaryotic initiation factor 2B.

Weiterhin kann die GSK-3 über die mitogen-activated protein kinase (MAPK) Kaskade phosphoryliert werden, was durch die MAPK-activated protein kinase-1 (MAPKAP-K1) katalysiert wird. Diese Kaskade zeigt einen Weg auf, durch den die GSK-3 Aktivität durch Wachstumsfaktoren, wie den epidermal growth factor (EGF) gehemmt werden kann (Shaw und Cohen, 1999).

Eine weitere entscheidende Rolle in der Vermittlung des Insulineffekts auf HIF-1 $\alpha$  scheint die p70-ribosomale-S6-Kinase 1 (S6K1) (Cross et al., 1994) zu spielen. Diese Kinase, kann die GSK-3 an Ser21 und Ser9 phosphorylieren und damit ebenfalls inaktivieren. Die Inaktivierung von S6K1 und damit verbunden die Aktivierung von GSK-3 kann auch durch Rapamycin, welches die Kinase mammalian target of rapamycin (mTOR) hemmt, ausgelöst werden (Armstrong et al., 2001) (Abb. 4).

GSK-3 $\beta$  vermittelte Phosphorylierungen können aber auch ein Signal für den proteasomalen Abbau darstellen (Aberle et al., 1997; Bullions et al., 1998; Polakis et al., 1997). Zusammen mit Axin und adenomatous polyposis coli (APC) kann die GSK-3 $\beta$  einen Proteinkomplex bilden, der die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin einem Protein, welches in Zell-Adhäsion, Oncogenese und Differenzierung involviert ist, reguliert (Rubinfeld et al., 1996; Behrens et al., 1998).



**Abb. 4: Mögliche Signalwege zur Blockierung der GSK-3.** GSK-3 kann durch mehrere Signalwege inhibiert werden. Zum einen durch den PI3K/PKB-Signalweg und zum anderen sowohl durch die MAPK-Kaskade, als auch durch den mTOR-Signalweg. Der epidermal growth factor (EGF) kann entweder den PI3K/PKB-Signalweg oder die MAPK-Kaskade nutzen, um GSK-3 zu blockieren. mTOR: mammalian target of rapamycin; S6K1: p70 ribosomal S6 Kinase-1; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PKB: Proteinkinase B; GSK-3 Glycogen-Synthase-Kinase; EGF: epidermal growth factor; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MAPKAP-K1: MAPK-activated protein kinase-1; LiCl: Lithiumchlorid

Die GSK-3 $\beta$ -vermittelten Phosphorylierungen einiger N-terminaler Serin Reste von  $\beta$ -Catenin bilden das Signal für den Abbau von  $\beta$ -Catenin via Ubiquitin-vermittelter Degradation (Aberle et al., 1997). Axin und APC sind ebenfalls Substrate der GSK-3 $\beta$ . Bei Axin führt die Phosphorylierung durch die GSK-3 $\beta$  zu einer Stabilisierung des Proteins (Yamamoto et al., 1999), wohingegen es bei APC durch die Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  zu einer Erleichterung der Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit APC kommt (Rubinfeld et al., 1996). Somit könnte in Analogie zum  $\beta$ -Catenin auch eine GSK-3-vermittelte Phosphorylierung zur Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch das Proteasom beitragen.

## 1.5 Aufgabenstellung

Da Insulin via Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase B (PKB) die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge erhöht, HIF-1 $\alpha$  selber aber keine Phosphorylierungsstelle für PKB besitzt, sollte überprüft werden, welche Komponenten der PKB-Signalkaskade an diesem Effekt beteiligt sind. Die Aktivierung der PKB könnte entweder durch Hemmung der GSK-3 oder durch Stimulation von mTOR zur Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  führen. Voruntersuchungen wiesen darauf hin, daß insbesondere der GSK-3 eine wichtige Rolle bei der Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Proteinstabilität durch direkte Phosphorylierungen zukommt. Die exakte Lokalisation dieser "GSK-3-Site" ist allerdings noch unklar. Daher sollte mittels Mutationen dieser putativen Phosphorylierungsstellen innerhalb der ODD vom HIF-1 $\alpha$ -Protein, Western-Blot-Technik, Northern-Blot-Technik, Transfektionsexperimenten und Kinase-Assays die exakte Lokalisation dieser möglichen "GSK-3-Site" im Zusammenhang mit der HIF-1 $\alpha$  Stabilität untersucht werden.

## 2. MATERIAL

### 2.1 Geräte

Auto Lumat LB 953, Berthold/ Pforzheim

Automatische Pipettenhilfe, Typ Variette 4710, Eppendorf/ Hamburg

Automatische Pipettenhilfe, Typ Pipetman P 20, P200, P 1000, Abimed Analysen-Technik GmbH/ Langenfeld

Automatischer DNA- Sequenzer, Modell 373 A, Applied Biosystems/ Weiterstadt

Begasungsbrutschrank "Cytoperm 8080" und "B 5060 EK/O2", Gasmonitor, Heraeus/ Hanau

Begasungsbrutschrank "Cytoperm II" Heraeus/ Hanau

Eismaschine, Inco-Ziegra/ Isernhagen

Elektroblotgerät; Eigenbau der Institutwerkstatt

Elektroporator; Gene Puls System II, Biorad/ München

Eppendorf-Tischzentrifugen, Typ 5414 und 5415C, Eppendorf-Netheler GmbH/ Hamburg

Eppendorfthermostat, Typ 5320, Eppendorf-Netheler GmbH/ Hamburg

Eppendorf-Thermomixer, Typ Comfort, Eppendorf-Netheler GmbH/ Hamburg

Flachbettelektrophoresekammern, Eigenbau der Institutwerkstatt

Fluoreszenzmikroskop Eclipse E1000; Nikon Deutschland/ Düsseldorf mit Objektiv: Plan Apo, 60x/1.40 Öl und Programm: EZ2000 für Video 2.1.4, Coord/ Holland

Geltrockner, Schütt Labortechnik/ Göttingen

Glasplatten, Ochs/ Göttingen

Hettich Zentrifuge, Typ 3850, Hettich/ Tuttlingen

Hybridisierungsschrank OV3 und Gefäße, Biometra/ Göttingen

Magnetrührer mit Heizung, Typ RCT B, Ika Labortechnik/ Staufen

Mikrowellengerät, Typ KOR-6105, Daewoo-Electronics Dtl. GmbH/ Butzbach

pH-Meter, pH535 Multi Cal, Schütt Labortechnik/ Göttingen

Phosphorimager mit Screen-Platten und Eraser, Molecular Dynamics/ Krefeld

Photometer, Lambda 3 UV/VIS mit 8 Cell Programmer (Weef electronic), Perkin-Elmer GmbH/ Langen

Photometer "Gene Quant", Pharmacia LKB GmbH/ Freiburg

Röntgenfilmkassetten, Intas/ Göttingen

Sartoriuswaagen, Typ 2254, H 120 und 2434, Sartorius/ Göttingen

Schlauchpumpe "Multifix", Multifix Motoren, Alfred Schwinherr/ Schwäbisch Gmünd

Schüttelinkubator, Modell 3-25, New Brunswick, Scientific Co., Inc./ Edison, New Jersey 08818, USA

Sicherheitswerkbank, Typ MRF 06.12-GS, Prettl Laminarflow und Prozesstechnik GmbH/ Bempflingen

Sigma-Tischzentrifuge 3E-1, Sigma Laborzentrifugen GmbH/ Osterode/ Harz

Sorvall- Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge, RC 5 und RC 5B, Du Pont Instruments/ Bad Nauheim

Sonicator (Beschallungsgerät), Modell W-220 F, Schütt Labortechnik/ Göttingen

Spannungsgerät, Typ EPS 500/400, Pharmacia LKB GmbH/ Freiburg

Steril-Arbeitsbank, Typ Lamin Air, TL 2472, Heraeus/ Hanau

Sterilpumpe, DBP Nr. P 24333991, Schleicher und Schüll/ Dassel

Thermocycler, GeneAmp PCR-System 2400, Perkin-Elmer/ Californien, USA

Thermostat, Typ 450 LE und Typ R 10/2, Messgeräte-Werk Lauda, Dr. R. Wobser KG/ Lauda-Königshofen

Ultraviolettstrahler, Typ Modell C 62, Ultraviolett Productions Inc./ Californien, USA

Ultraviolettstrahler, Typ N-90 GLC-6-P, Konrad Bender/ Wiesloch

Umkehrmikroskop Zeiss IM (Videokamera Hitachi HV-C20), Zeiss/ Göttingen

UV-Stratalinker, Modell C 62, Ultraviolett Productions Inc./ Californien, USA

Vakuumpumpe, Univac DM 04 mit Kühlfalle Unicryo MC 2L-600C und beheizbare Zentrifuge Univapo 150 A, Uniequip Laborgerätebau/ Martinsried

Videodensitometer, Biotech Fischer/ Reiskirchen

Videodensitometer Kamera Hitachi KP-140, Hitachi AC Adapter Modell AP-130, Biotech Fischer/ Reiskirchen

Wasserbad, Typ K2R und NB/S8, Messgeräte-Werk Lauda, Dr. R. Wobser KG/ Lauda-Königshofen

Wippe; Eigenbau der Institutwerkstatt

## 2.2 Chemikalien

Name	Firma	Ort
Acrylamid	Biomol	Hamburg
Agarose	Gibco BRL	Eggenstein
Ameisensäure	Merck	Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Biomol	Hamburg
Ampicillin	Serva	Heidelberg
Anti-DIG-AP-AK	Roche	Mannheim
Bisacrylamid	Serva	Heidelberg
Blocking-Reagenz	Roche	Mannheim
Borsäure	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma	München
Desoxyribonukleotide	Roche	Mannheim



---

Diethylether	Merck	Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Biomol	Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	München
EDTA	Serva	Heidelberg
Essigsäure	Merck	Darmstadt
Ethanol	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma	München
Formamid	Sigma	München
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	Amersham	Braunschweig
GBx Entwickler	Kodak	Stuttgart
GBx Fixierer	Kodak	Stuttgart
Glucose	Merck	Darmstadt
Glycerol	Biomol	Hamburg
Glycin	Biomol	Hamburg
Hepes	Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Merck	Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka	Neu Ulm
Kaliumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Lysozym	Sigma	München
Magermilchpulver	Nestle	Frankfurt
Methanol	Merck	Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma	Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck	Darmstadt
Natriumacetat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
n-Butanol	Merck	Darmstadt
N-Lauroyl-Sarkosin	Sigma	Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol	Hamburg
Penicillin	Serva	Heidelberg
Phenol	Merck	Darmstadt
Phosphorsäure	Merck	Darmstadt
Ponceau S	Sigma	Deisenhofen
Pyruvat	Serva	Heidelberg
RNase A	Roche	Mannheim
Restriktionsenzyme- und Puffer	Roche	Mannheim

Salzsäure (37%)	Merck	Darmstadt
Serva Blue	Serva	Heidelberg
Shrimp Alkalische Phosphatase	USB (United States Biochemical)	Cleveland/ USA
T7-Polymerase	Roche	Mannheim
Tris	Sigma	München
Trichloressigsäure (TCA)	Merck	Darmstadt
N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva	Heidelberg
Trypton	Gibco BRL	Eggenheim
Tween 20	Merck	Darmstadt
Triton-X-100	Serva	Heidelberg

### Säugetierzellkultur

Minimales essentielles Medium (MEM)	PAA	Linz/ Österreich
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS 1 x)	PAA	Linz/ Österreich
MEM Non Essential Amino Acids (100 x)	PAA	Linz/ Österreich
Viralex <sup>TM</sup> Trypsin/ EDTA	PAA	Linz/ Österreich
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA	Linz/ Österreich

### **2.3 Sonstige Materialien**

3 MM Filterpapier	Whatmann	Maidstone (England)
Faltenfilter	Schleicher und Schüll	Duderstadt
Pipettenspitzen	Greiner	Nürtlingen
Kulturschalen	Greiner	Nürtlingen
Kulturflaschen	Greiner	Nürtlingen
Reaktionsgefäße	Greiner	Nürtlingen
Polystyrolröhrchen	Greiner	Nürtlingen
Sterilfilter Nalgene 0,2µm	Sartorius	Göttingen
Elektroporationsküvetten	Eppendorf	Hamburg

Luciferase-Röhrchen	Sarstedt	Nümbrecht
Hyperfilm MP	Amersham	Braunschweig
Hybond N Nylonmembran	Amersham	Braunschweig
Verstärkte Nitrocellulose	Schleicher und Schüll	Duderstadt
Braunülen 2G14	Braun	Melsungen

## 2.4 Nachweis- und Reinigungssysteme ("Kits")

JETstar	Genomed	Bad Oeynhausen
QiaEX II Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden
Luciferase Assay Kit	Berthold	Pforzheim
ECL-Plus-System	Amersham	Braunschweig
Mutagenese-Kit	Invitrogen	

## 2.5 Molekulare-Standards

### 2.5.1 DNA-Längenstandards

Hind III-Fragmente von $\lambda$ -DNA	Gibco BRL	Eggenstein
1 Kb-Standard	Gibco BRL	Eggenstein

### 2.5.2 Protein-Standards

LMW-Standard	Pharmacia	Freiburg
--------------	-----------	----------

## 2.6 Stammlösungen

Die Stammlösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit sterilem H<sub>2</sub>O angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

<u>APS</u>		Endkonzentration
APS	1 g	10 %
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

Acryl-/ Bisacrylamid

Endkonzentration

Acryl-/ Bisacrylamid	Acrylamid 30 g	30%
	Bisacrylamid 0,2 g	0,2%
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Die Lösungen wurden steril filtriert, um nicht gelöste Partikel zu entfernen. Die Lagerung erfolgte kühl und dunkel.

Blocking-Reagenz 10%

50 mg Blocking-Reagenz (keine weiteren Herstellerangaben) wurden unter Erhitzen in 500 ml 1 x Maleinsäure-Puffer gelöst. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

Natriumacetat 3M, pH 5.2

Endkonzentration

NaAc	24,61 g	300 mM
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Essigsäure auf pH 5.2 eingestellt. Es ist hierbei zu berücksichtigen, daß bei der Einstellung des pH-Wertes ein sehr großes Volumen an Essigsäure benötigt wird. Die Lösung wurde autoklaviert.

PBS 10 x

Endkonzentration

NaCl	81,82 g	1,4 M
KCl	2,02 g	27 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16,02 g	90 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,04 g	15 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde auf 7.0 eingestellt und die Lösung wurde autoklaviert.

SDS

Endkonzentration

SDS	10 g	10%
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Falls das SDS wieder ausfällt, muß die Lösung erwärmt werden, bis es wieder gelöst ist.

SSC 20 x

Endkonzentration

NaCl	175,32 g	3 M
Natrium-Citrat	88,25 g	0,3 M
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde auf 7.0 eingestellt und die Lösung wurde autoklaviert.

<u>Tris/ HCl 1 M</u>		Endkonzentration
Tris	12,11 g	1 M
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Die Lösung wurde für verschiedene Stammlösungen mit HCl auf folgende pH-Werte eingestellt: pH 7.5, 8.0, 9.0. Die Lösungen wurden autoklaviert.

<u>Tris/ HCl 0,1 M</u>		Endkonzentration
Tris	1,211 g	0,1 M
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Die Lösung wurde für verschiedene Stammlösungen mit HCl auf die nachfolgenden pH-Werte eingestellt: pH 7.5, 8.0, 9.0. Die Lösungen wurden autoklaviert.

## 2.7 Enzyme

### 2.7.1 Restriktionsendonucleasen mit Erkennungssequenzen

Die Restriktionsendonucleasen waren von BioWhittaker TaKaRa (Taufkirchen)

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	Firma
BamHI	5' G_GATCC 3'	K	TaKaRa
Hind III	5'...A_AGCTT...3'	M	TaKaRa
Kpn	5'...GGTAC_C...3'	L	TaKaRa
Sall	5' G_TCGAC 3'	M	TaKaRa
Xba	5'...T_CTAGA...3'	M	TaKaRa

### 10 x Inkubationspuffer für Restriktionsenzyme der Firma TaKaRa

	H	L	M	K
Tris/ HCl	500 mM	10 mM	100 mM	200 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	10 mM	100 mM	100 mM
KCl	-	-	1000 mM	1000 mM
DTT	10 mM	1 mM	10 mM	5 mM

Restriktionsenzyme spalten nur unter bestimmten Pufferbedingungen. Für den Verdau wurden jeweils die vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt, bei denen das Enzym seine Aktivität entwickelt.

## 2.7.2 DNA-modifizierende Enzyme

### Taq-DNA-Polymerase

Isoliert wird die Taq-Polymerase aus einem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* BM. Die Taq-Polymerase ist eine 5'-3'-DNA-Polymerase, die keine 3'-5'- und keine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität besitzt. Weiterhin zeigt die Taq-Polymerase die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 8-9 und Temperaturen von 70°C-75°C und ist somit hitzebeständig. Die hohe Prozessivität der Taq-DNA-Polymerase, das Fehlen von Exonuclease-Aktivität und das hohe Temperatur-Optimum ermöglichen die Verwendung dieses Enzyms für die PCR und die DNA-Sequenzierung (Produktinformation).

### Alkalische Phosphatase

Im Gegensatz zu der aus Kälberdarm stammenden Alkalischen Phosphatase (CIAP) stammt die Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) aus Nordseekrabben und katalysiert die Hydrolyse von 5'-terminalen Monophosphatgruppen, sowie von 5'-Di- und Triphosphatgruppen. Dadurch, daß die SAP hitzelabil ist, kann sie somit komplett und irreversibel durch Erhitzen für 10 min auf 65°C inaktiviert werden.

### T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase wird aus *E. coli* Bakterien isoliert, die mit dem T4-Phagen (Wildtyp) infiziert werden. Ihr MW beträgt ca. 68 kDa und sie liegt in Lösung als Monomer vor (Boyer, 1982). Sie verknüpft DNA-Stränge, indem sie die 5'-Phosphorylgruppe des einen mit der 3'-Hydroxylgruppe des anderen DNA-Moleküls verbindet. Sowohl überhängende Enden ("sticky ends"), als auch glatte Enden ("blunt ends"), die keinen einzelsträngigen Bereich haben, kann die T4-DNA-Ligase miteinander verknüpfen.

## 2.7.3 sonstige Enzyme

### Lysozym

Lysozym ist eine Muramidase, die glykosidische Bindungen des Mureins in der Bakterienzellwand spaltet.

### RNase A

RNase A wird aus Rinderpankreas isoliert und schneidet in einzelsträngiger RNA die Phosphordiesterbindung von Pyrimidinnucleosiden auf deren 3'-Seite. Dabei entstehen Nucleosid-5'-Monophosphate. RNase A besitzt ein MW von 13,7 kDa und ein pH-Optimum bei 7.0 – 7.5 (Sambrook et al., 1989, Produktinformation). Sie kann bei der Isolierung von DNA

verwendet werden, da sie hitzestabil ist und so zur Inaktivierung möglicher DNasen für 10 min bei 100°C gekocht werden.

### Collagenase

Bei der Präparation von Rattenlebereinzellen wird die Collagenase verwendet. Die Collagenase ist eine Protease, durch die das vorhandene Collagen im Bindegewebe der Leber auflöst wird. Proteasen erkennen bestimmte Strukturmerkmale der Peptidketten und sind somit nicht spezifisch für bestimmte Substrate.

### Glycogen-Synthase-Kinase-3

Die Glycogen-Synthase-Kinase-3 ist eine Serin/ Threonin Kinase, die in der DNA-Sequenz ihrer Substrate die Sequenz SXXXS/T erkennt. Sie wurde als erstes als eine Kinase entdeckt, die die Fähigkeit besitzt, die Glycogen-Synthase zu phosphorylieren und somit zu inaktivieren. Mittlerweile sind außer der Glycogen-Synthase noch viele andere Proteine bekannt, die durch die Glycogen-Synthase-Kinase phosphoryliert werden können.

## **2.8 Antikörper**

HIF-1 $\alpha$	Transduction-Laboratories	Mamhead, UK
rPAI	American Diagnostics	Heidelberg
GSK-3 $\alpha/\beta$	Santa Cruz	Kalifornien
Phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$	Santa Cruz	Kalifornien
V5	Invitrogen	Karlsruhe
FlagM2	Sigma	Taufkirchen
Gal4	American Diagnostics	Heidelberg
c-Myc	Santa Cruz	Kalifornien

Zum Nachweis der Primärantikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG-HRP (Horseradish-Peroxidase) aus Ziege, Anti Maus-IgG-HRP aus Ziege benutzt (Santa Cruz, Kalifornien).

## 2.9 Tiere und Tierhaltung

Die Hepatocyten wurden aus männlichen Wistar-Ratten (180–280 g) aus der Zucht der Firma Winkelmann (Borchen) gewonnen. Für die Präparation von Hepatocyten wurden nur Tiere benutzt, bei denen der Transport länger als 6 d vergangen war. Während dieser Zeit wurden die Tiere im 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus (19h–7h Dunkelphase) mit freiem Zugang zum Futter (Rattendiät "ssniff", Firma Spezialdiäten GmbH, Soest) bei einer Raumtemperatur von 19–23°C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 50% gehalten. Eine Gewichtszunahme von 3-40 g ergab sich in einer Woche bei einer Futteraufnahme von 12–15 g und einem Wasserverbrauch von 12–25 ml pro Tag. Die Präparation der Hepatocyten erfolgte in der ersten 3 h der Hellphase. Durch intraperiportale Injektion von Nembutal (80 mg/ kg Körpergewicht) wurden die Tiere narkotisiert.

## 2.10 Eukaryote Zelllinien

### Humane Tumorzelllinien: HepG2- und COS-7-Zellen

Die in dieser Arbeit benutzten Tumorzelllinien waren zum einen HepG2-Zellen, die aus der Leber des Menschen stammen und zum anderen COS-7-Zellen, die aus der Niere eines Affen stammen (*Cercopithecus aethiops*, African green). Tumorzellen haben gegenüber primären Zellen den Vorteil, daß sie ohne größeren Aufwand in großen Mengen in Kultur zu halten sind. Weiterhin unterscheiden sich die einzelnen Passagen nicht so sehr voneinander, als bei den jeweiligen neu angelegten Primärkulturen. Die Transfektion der Tumorzelllinien erweist sich auch als einfacher, als die der Primärkulturen. Rückschlüsse auf die in vivo Situation sind im allgemeinen allerdings schwer daraus zu ziehen, da die Tumorzellen auf physiologische Reize teilweise nicht mehr adäquat reagieren können, da sie z.B. andere Transkriptionsfaktoren besitzen oder eine andere Enzym- und Rezeptorausstattung haben, als die nicht transformierte "Mutterzelle".

## 2.11 Bakterien, Plasmide und Vektoren

### 2.11.1 E.Coli-XL-1 (blue)

E.coli XL-1 (blue)

Stratagen

Heidelberg

RecA;endA1;gyrA96;thi1;hsdR17;subE44;relA1;lac[F';proAB;laclqZWM15;Tn10(tet')]

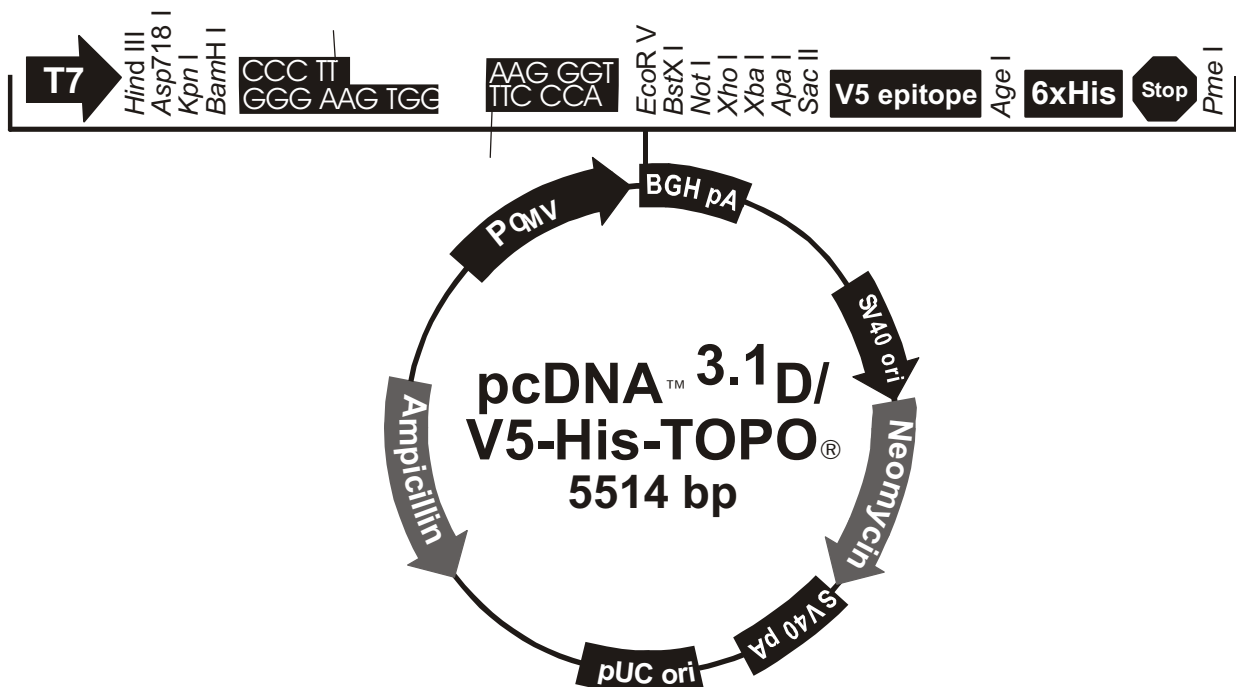


2.11.2 Plasmidkonstrukte: pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Konstrukte, pcDNA6/Myc-His A-Konstrukte, pCMV-Myc-Konstrukte, pGEX-5X1-Konstrukte

### pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Konstrukte

Die Vektoren wurden aus dem Plasmid pcDNA3.1/V5-His-TOPO (5,5kb) der Firma Invitrogen hergestellt, in dessen Polylinker die entsprechenden cDNA's (Abb. 6) einkloniert wurden. Die Polylinkerregion zeichnet sich durch die Aneinanderreihung singulärer Restriktionsschnittstellen aus, die der Einklonierung von DNA-Fragmenten dienen. Der Polylinker wird von Primersequenzen (T7-Primer und bGH-Primer) flankiert, die für die DNA-Sequenzierung notwendig sind.

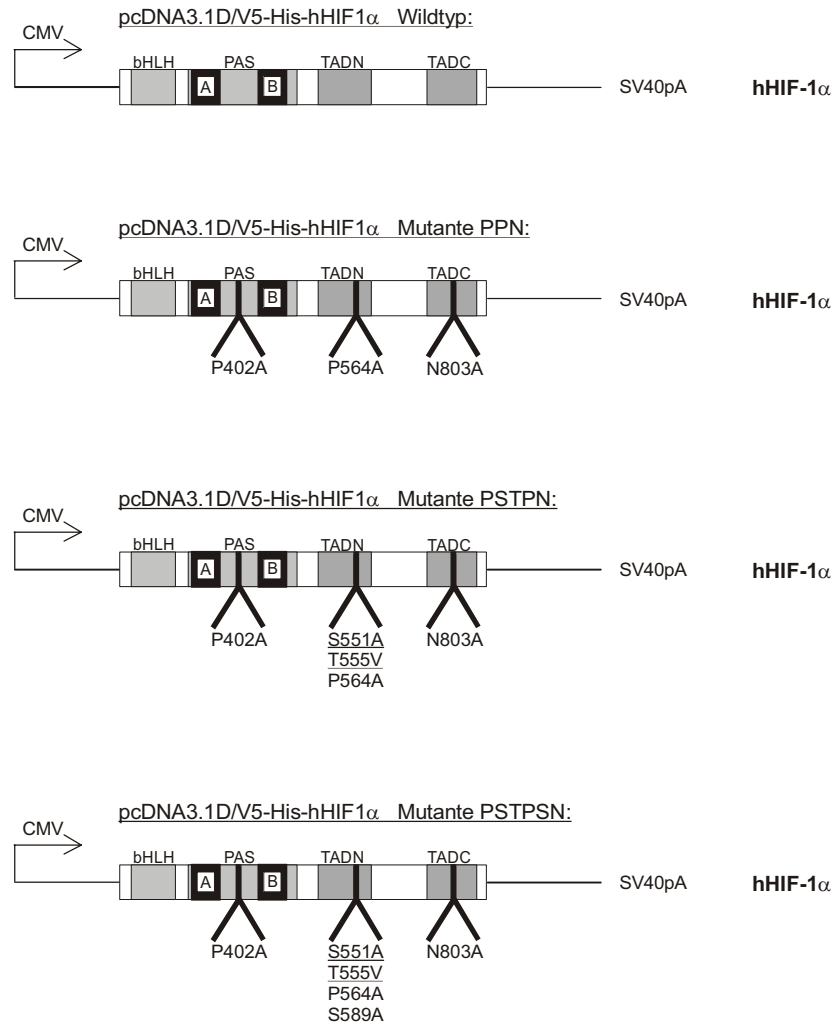
Durch die Topoisomerase Aktivität wird eine schnelle Einklonierung von PCR-Produkten gewährleistet. Der Vektor enthält den CMV-Promotor ohne Enhancer und zwei Polyadenylierungssignale. Zusätzlich trägt der Vektor V5-Epitope, einen Polyhistidin-Tag und ein Ampicillin- und ein Neomycin-Resistenzgen, dessen Expression die Selektion von stabil transfizierten Zellen erlaubt. Das Neomycingen wird ausgehend vom SV40-Promotor exprimiert (Abb. 5).



**Abb. 5: Aufbau des pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektors**

Dem Polylinker (97bp), in den die V5-Epitope (23bp) und der Polyhistidin-Tag [6 x His] (17bp) eingebaut sind, folgt ein Poly-A-Signal aus dem Rinderwachstumshormon-Gen (bGH) (227bp). Vor dem Polylinker befindet sich der CMV-Promotor (PCMV) (65bp). Weiterhin sind ein Ampicillinresistenzgen (860bp), ein unter der Kontrolle eines SV40 Promotors stehendes Neomycinresistenzgen (794bp) und zwei Replikationsursprünge (pUC ori/ SV40 ori) enthalten. Das Ampicillinresistenzgen wird gegen die Uhrzeigerichtung abgelesen.

Der Wildtyp pcDNA3.1/V5-His-hHIF-1 $\alpha$  lag bereits im Labor vor. Die unter Abb.6 dargestellten Mutationen wurden mit Hilfe eines Mutagenese-Kits der Firma Stratagene in die Expressionsvektoren eingebaut.

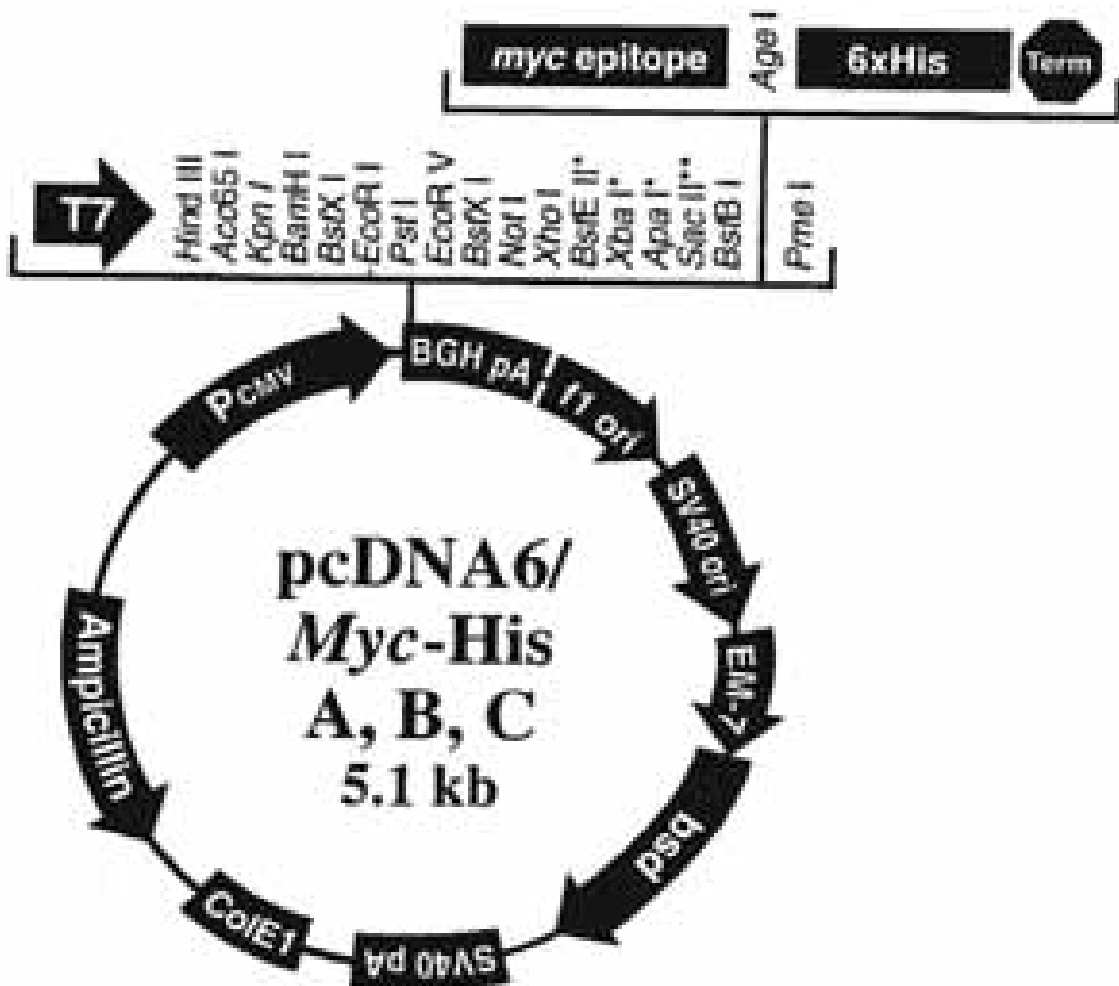


**Abb. 6: Schematische Darstellung der pcDNA3.1D/V5-His-hHIF-1 $\alpha$ -Expressionsvektoren.** CMV: Cytomegalie-Virus-Promotor, bHLH: basic Helix-Loop-Helix, PAS: PAS (Per/ARNT/Sim)-Domäne mit den beiden internen homologen Bereichen A und B, TAD: Transaktivierungsdomäne, SV40pA: Polyadenylierungssignal

### pcDNA6/Myc-His A-Vektor

Die Vektoren wurden aus dem Plasmid pcDNA6/Myc-His A (5,1kb) der Firma Invitrogen hergestellt, in dessen Polylinker die entsprechenden cDNA's (Abb. 8) inkloniert wurden. Die Polylinkerregion zeichnet sich durch die Aneinanderreihung singulärer Restriktionsschnittstellen aus, die der Einklonierung von DNA-Fragmenten dienen. Der Polylinker wird von Primersequenzen (T7-Primer und bGH-Primer) flankiert, die für die DNA-Sequenzierung notwendig sind.

Der Vektor enthält den CMV-Promotor ohne Enhancer und zwei Polyadenylierungssignale. Zusätzlich trägt der Vektor zwei Replikationsursprünge ori/ f1 ori, letzteres für die Produktion von einzelsträngiger (single-stranded) DNA (ssDNA) und ein Ampicillin- und ein Blastidicin-Resistenzgen, dessen Expression die Selektion von stabil transfizierten Zellen erlaubt. Das Blastidicinresistenzgen wird ausgehend vom EM-7-Promotor exprimiert (Abb. 7).

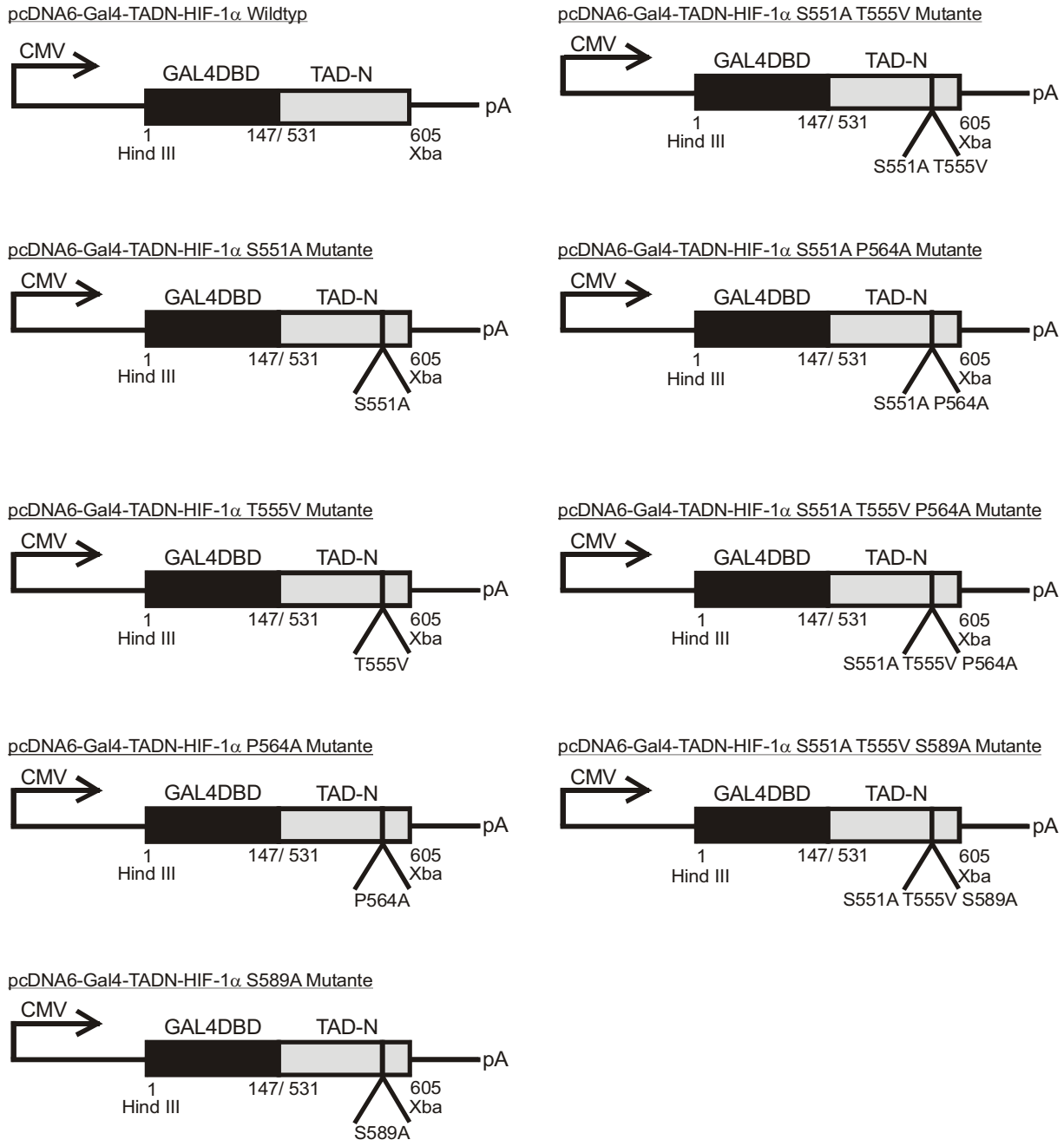


**Abb. 7: Aufbau des pcDNA6/ Myc-His A-Vektors**

Dem Polylinker (97bp), in den die Myc-Epitope (23bp) und der Polyhistidin-Tag [6 x His] (17bp) eingebaut sind, folgt ein Poly-A-Signal aus dem Rinderwachstumshormon-Gen (bGH) (227bp). Vor dem Polylinker befindet sich der CMV-Promotor (PCMV) (65bp). Weiterhin sind ein Ampicillinresistenzgen (860bp), ein unter der Kontrolle eines EM-7 Promotors stehendes Blasticidinresistenzgen (bsd) (392bp) und zwei Replikationsursprünge (f1 ori/ SV40 ori) enthalten. Das Ampicillinresistenzgen wird gegen die Uhrzeigerichtung abgelesen.

Das schon im Labor vorliegende cDNA-Fragment wurde in die Polylinkerregion inkloniert. Dazu wurde der pcDNA6/ Myc-His A-Vektor mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Religation der offenen Enden zu verhindern. Die cDNA-Fragmente, welche komplementäre Enden zu den Restriktionsschnittstellen besaßen, und der geschnittene, dephosphorylierte Vektor wurden mit

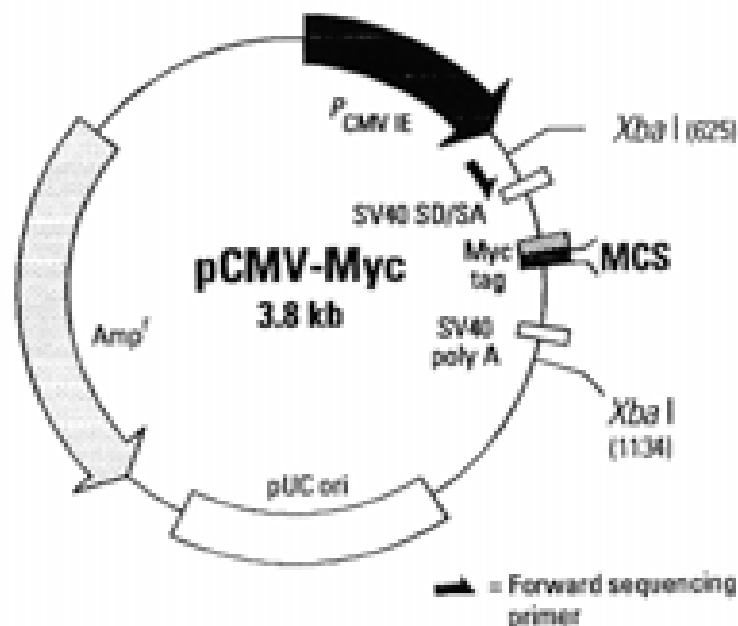
Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Die unter Abb.8 dargestellten Mutationen wurden mit Hilfe eines Mutagenese-Kits der Firma Stratagene in die Expressionsvektoren eingeführt.



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Expressionsvektoren:** Die cDNA's wurden in die angegebenen Restriktionsstellen von pcDNA6 kloniert. CMV: Cytomegalie-Virus-Promotor, GAL4: Gal4 DNA-bindende Domäne, TAD-N: N-terminale Transaktivierungsdomäne, pA: Polyadenylierungssignal

### pCMV-Myc-Konstrukte

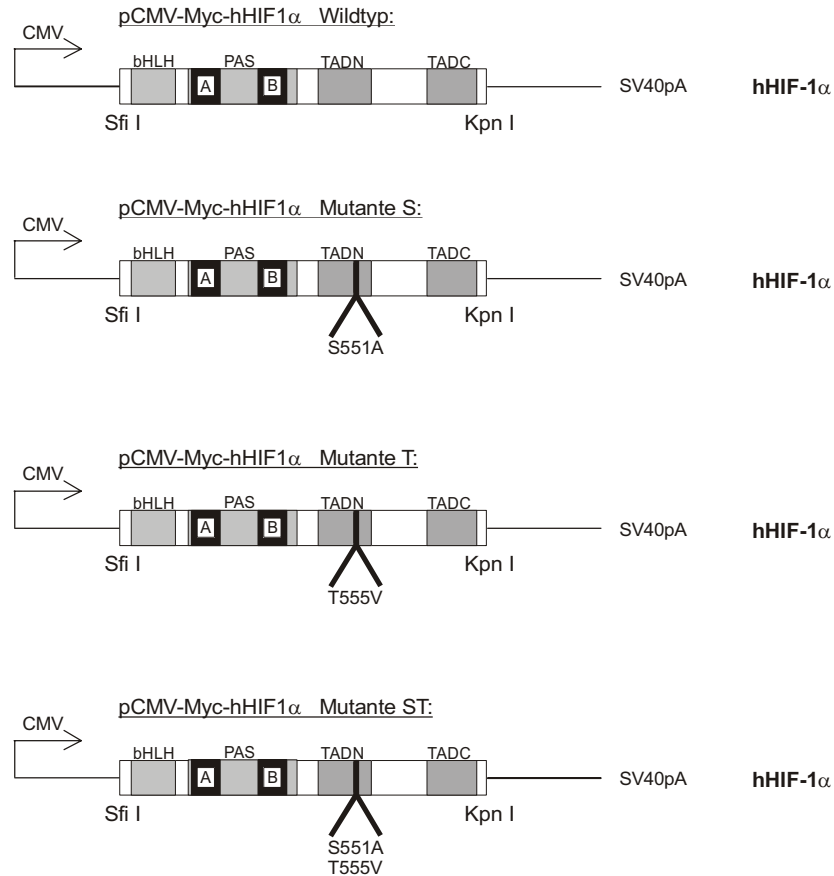
Die Vektoren wurden aus dem Plasmid pCMV-Myc (3,8kb) der Firma Clontech hergestellt, in dessen Polylinker die entsprechenden cDNA's (Abb. 10) einkloniert wurde. Die Polylinkerregion zeichnet sich durch die Aneinanderreihung singulärer Restriktionsschnittstellen aus, die der Einklonierung von DNA-Fragmenten dienen. Dem Polylinker vorausgestellt ist ein Myc-Tag. Der Vektor enthält den CMV-Promotor ohne Enhancer und ein Polyadenylierungssignal. Zusätzlich trägt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen (Abb. 9).



#### **Abb. 9: Aufbau des pCMV-Myc-Vektors:**

Der Multi-Cloning-Site (MCS) folgt ein Poly-A-Signal (SV40 poly A). Vor der MCS befindet sich der CMV-Promotor (pCMV). Weiterhin sind ein Ampicillinresistenzgen und ein Replikationsursprung (pUC ori) enthalten. Das Ampicillinresistenzgen wird gegen die Uhrzeigerrichtung abgelesen.

Der Wildtyp pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$  und die Mutante pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$  S551A wurden freundlicherweise von Dr. Carine Michiels (Namur/ Belgien) zu Verfügung gestellt. Die weiteren Mutationen, die unter Abb. 10 dargestellt sind, wurden wiederum mittels eines Mutagenese-Kits der Firma Stratagene hergestellt.

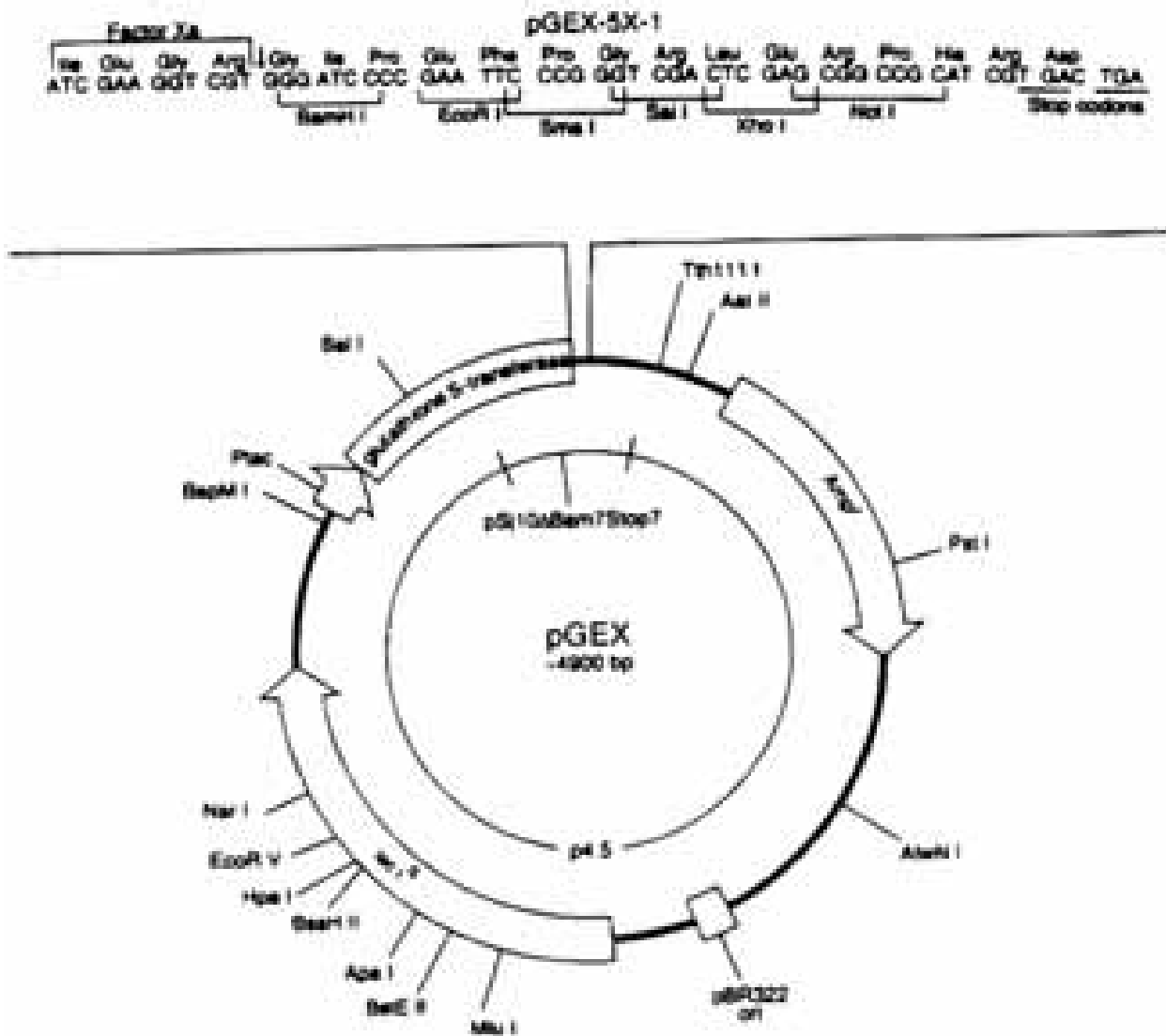


**Abb. 10: Schematische Darstellung der pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$ -Expressionsvektoren.** CMV: Cytomegalie-Virus-Promotor, bHLH: basic Helix-Loop-Helix, PAS: PAS (Per/ARNT/Sim)-Domäne mit den beiden internen homologen Bereichen A und B, TAD: Transaktivierungsdomäne, SV40pA: Polyadenylierungssignal

### pGEX-5X-1-Konstrukte

Die Vektoren wurden aus dem Plasmid pGEX-5X-1 (4,9kb) der Firma Amersham Bioscience hergestellt, in dessen Polylinker die entsprechende cDNA inkloniert wurde. Die Polylinkerregion zeichnet sich durch die Aneinanderreihung singulärer Restriktionsschnittstellen aus, die der Einklonierung von DNA-Fragmenten dienen. Dem Polylinker vorausgestellt ist die Glutathion-S-Transferase (GST).

Der Vektor enthält den *tac* Promotor ohne Enhancer. Zusätzlich trägt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen und ein internes lac I<sup>q</sup>-Gen (Abb.11).



**Abb. 11: Aufbau des pGEX-5X-1-Vektors.**

Dem Polylinker folgt ein Ampicillinresistenzgen. Vor dem Polylinker befindet sich die Glutathion-S-Transferase. Weiterhin ein  $lac I^q$ -gen und ein Replikationsursprung (pBR322 ori) enthalten.

Die Konstrukte wurden alle so hergestellt, daß die bereits vorliegenden cDNA's aus den pcDNA6/Myc-His A-Konstrukten (vgl. Abb. 8) BamHI/SalI herausgeschnitten und in die Polylinkerregion des pGEX-5X1-Vektors einkloniert wurden. Dazu wurde der pGEX-5X-1-Vektor mit den oben genannten Restriktionsenzymen verdaut und mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Religation der offenen Enden zu verhindern. Die cDNA-Fragmente, welche komplementäre Enden zu den Restriktionsschnittstellen besaßen, und der geschnittene, dephosphorylierte Vektor wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert.

### 2.11.3 Weitere Vektoren

Die Vektoren wurden hinsichtlich ihres Inserts alle mittels Restriktion auf ihre richtige Größe überprüft.

#### pGL3-Konstrukte: pGL3PAI-766, pGL3PAI-766M2

Die Plasmide pGL3PAI-766 und pGL3PAI-766M2 wurden aus dem Vektor pGL3-Basic (4818bp) der Firma Promega hergestellt, in dessen Polylinker die entsprechenden Promotorelemente inkloniert wurden. Die Promotorelemente wurden in die Polylinkerregion inkloniert, nachdem der pGL3-Vektor mit *Bgl II* und *Sac I* verdaut und mit alkalischer Phosphatase behandelt wurde, um eine Religation der offenen Enden zu verhindern. Die doppelsträngigen, phosphorylierten Promotorelemente, welche im 5' und 3' Bereich komplementäre Enden zu der *Bgl II*, bzw. im 5' Bereich zur *Sac I* und im 3' Bereich zur *Bgl II* Schnittstelle besaßen, sowie der geschnittene, dephosphorylierte Vektor wurden mit Hilfe von T4 Ligase ligiert. Die pGL3-Konstrukte lagen im Institut bereits vor und sind in Abb. 12 dargestellt.



**Abb. 12: Luciferase-Gen-Konstrukte mit Bereichen des Ratten-PAI-1-Promotors.** (A) Die Promotorelemente im 5'-regulatorischen Bereich des Ratten-PAI-1-Promotors [A-G]. Im "C"-Bereich das HIF-1 responsive Element (HRE-2) mit Angabe der Sequenz und der HIF-1 Consensus-Sequenz BACGTSSK (unterstrichen) (B=G/C/T; S=C/G; K=G/T). (B) Die Ratten-PAI-1-Promotorregionen wurden in den pGL3-basic Vektor vor das Luciferase-Gen kloniert. Die Sequenzen, die das HRE-2 umfassen, sind unterhalb der offenen Klammer angegeben, der mutierte Strang darunter. Die Kleinbuchstaben weisen auf die mutierten Basen hin. Sterne zeigen die Mutation an.



p5GE1B-Luc

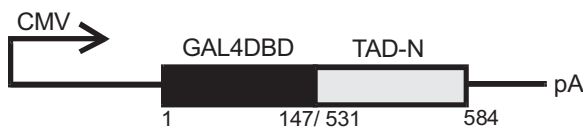
Das Plasmid p5GE1B-Luc (Abb.13) wurde aus dem Vektor pGL3-Basic der Firma Promega hergestellt, in dessen Polylinkerregion ein Oligonukleotid mit fünf responsiven Elementen für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4 (Gal4) einkloniert wurde. Im Vektor folgt dem Polylinker der Adenovirus E1B-Promotor und das Luciferase-(Luc) Gen, als Reporter gen zum Nachweis der Genexpression. Das Plasmid lag bereits im Labor vor.



**Abb. 13: Schematische Darstellung des p5GE1B-Luc-Konstrukts:** Die Gal 4 responsiven Elemente wurden als Enhancerelemente vor den E1B-Promotor und das Luciferase-Gen kloniert. Luc: Luciferase-Gen; pA: Polyadenylierungssignal

pCMV2-Gal4-TADN-HIF-1 $\alpha$  Wildtyp

Das Plasmid pCMV2-Gal4-TADN-HIF-1 $\alpha$  (Abb.14) wurde aus dem Vektor pCMV2 hergestellt, in dessen Polylinkerregion das cDNA-Fragment, welches für die DNA-Bindungsdomäne (AS 1-147) des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 codiert, einkloniert wurde. Im weiteren Verlauf wurde dann ein cDNA-Fragment, das für die N-terminale TAD (AS 531-584) von HIF-1 $\alpha$  codiert, so einkloniert, daß ein Gal4-TADN-HIF-1 $\alpha$ -Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Dem Polylinker folgt eine reverse Primersequenz, die für die DNA-Sequenzierung notwendig ist. Der Vektor enthält einen CMV-Promotor ohne Enhancer und ein Polyadenylierungssignal. Zusätzlich enthält der Vektor noch drei Replikationsursprünge ori/ E. coli ori/ f1 ori, letzteres für die Produktion von einzelsträngiger DNA (single stranded) (ssDNA) und ein Ampicillinresistenzgen. Das Plasmid lag bereits im Labor vor.



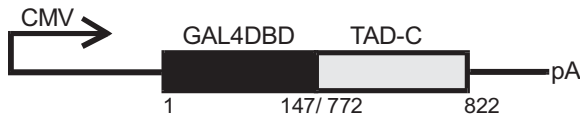
**Abb. 14: Schematische Darstellung des pCMV2-Gal4-TADN-HIF-1 $\alpha$ -Konstrukts**

CMV: Cytomegalie-Virus-Promotor; Gal4DBD: Hefetranskriptionsfaktor Gal4-DNA-Bindungsdomäne, TAD-N: Transaktivierungsdomäne N-terminal, pA: Polyadenylierungssignal

pCMV2-Gal4-TADC-HIF-1 $\alpha$  Wildtyp

Das Plasmid pCMV2-Gal4-TADC-HIF-1 $\alpha$  (Abb.15) wurde aus dem Vektor pCMV2 hergestellt. In die Polylinkerregion wurde das cDNA-Fragment, das für die DNA-Bindungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 codiert, zusammen mit einem cDNA-Fragment, welches für die

C-terminale TAD (AS 772-822) von HIF-1 $\alpha$  codiert, so einkloniert, daß ein Gal4-TADC-HIF-1 $\alpha$  Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Der Vektor besitzt einen CMV-Promotor und ein Polyadenylierungssignal. Weiterhin enthält der Vektor noch drei Replikationssprünge ori/ E. coli ori/ f1 ori, letzteres für die Produktion von single stranded DNA (ssDNA) und ein Ampicillin-Resistenzgen. Das Plasmid lag bereits im Labor vor.



**Abb. 15: Schematische Darstellung des pCMV2-Gal4-TADC-HIF-1 $\alpha$ -Konstrukts**

CMV: Cytomegalie-Virus-Promotor, Gal4DBD: Hefetranskriptionsfaktor Gal4-DNA-Bindungsdomäne, TAD-C: Transaktivierungsdomäne C-terminal, pA: Polyadenylierungssignal

Das Konstrukt pcDNA6/*Myc*-His A-rMOP7 (member of PAS = HIF-3 $\alpha$ ) beinhaltet die gesamte Ratten cDNA und lag bereits im Labor vor.

Die Konstrukte pcDNA6/*Myc*-His A-Gal4-TADN-HIF-2 $\alpha$  Wildtyp und pcDNA6/*Myc*-His A-Gal4-TADN-HIF-2 $\alpha$  475/481 lagen bereits im Labor vor.

Das Konstrukt pCMV3-*myr*PKB-EEC-term codiert für eine aktive Form der Proteinkinase B und wurde von Dr. David Stokoe (San Francisco) zur Verfügung gestellt. Dabei wurde im pcDNA3-Vektor der CMV-Promotor durch CMV-3 ersetzt und eine Myristoylierungssequenz und C-terminale EE (Glutaminsäure)-getaggte PKB-cDNA einkloniert.

Ein c-*Myc*- oder V5-Tag in einem Expressionsplasmid bietet die Möglichkeit, die Expression und Lokalisation des Proteins durch einen bekannten, spezifischen Antikörper zu überprüfen.

## 2.12 Digoxigenin-markierte RNA-Sonden

Die in dieser Arbeit für die Northern Blot Analyse verwendeten Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonden sind Ratten-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 und  $\beta$ -Actin-(ACT)-RNA. Alle Sonden lagen bereits Digoxigenin-markiert im Labor vor.

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Isolierung von Rattenhepatocyten

Die Isolierung der Hepatocyten erfolgte unter aseptischen Bedingungen durch Collagenase-Perfusion der Leber (modifiziert nach Berry und Friend, 1969)

##### Perfusion der Leber

Die Perfusion der Leber teilt sich in eine nicht-zirkulierende in-situ Prä-Perfusion und eine rezirkulierende Perfusion auf. Bei der nicht-zirkulierenden Prä-Perfusion wird die Leber über eine eingeführte Kanüle in die Vena portae mit 150 – 200 ml Präperfuptionsmedium und einer Flußrate von 30 ml/ min blutfrei gespült. Durch die in die Vena cava eingeführte Kanüle erfolgt der Ausfluß. Bei der anschließend durchgeführten rezirkulierenden Perfusion führt ein Collagenase-Perfuptionsmedium mit einer Flußrate von 30 ml/ min und einer Dauer von etwa 11 min zur Auflösung des Zellverbandes. Der Perfuptionskreislauf wurde durch die Ligatur der Vena cava inferior eingeführte Kanüle vor der Einmündung ins Herz geschlossen. Über einen Oxygenator wurden sowohl das Präperfuptions- als auch das Perfuptionsmedium gepumpt, von wo aus sie mit einem Druck von 10 – 15 cm Wassersäule in die Vena portae strömten.

##### Herstellung der Hepatocytensuspension

Nachdem die Perfusion beendet war, wurde die Leber herauspräpariert und in Waschmedium gelegt. Mit zwei Pinzetten wurde vorsichtig die Leberkapsel zerrissen und die Zellen aus dem Leberlappen unter leichtem Schütteln herausgewaschen. Die Bindegewebs- und Kapselbestandteile wurden entfernt und durch anschließende Filtration dieser Suspension durch ein Nylonnetz größere Zellaggregate abgetrennt. Durch mehrfache Zentrifugation (20 g, 2 min) dieser primären Suspension konnten die Hepatocyten von Zellüberresten und den nicht-Parenchymzellen getrennt werden. Die Hepatocyten wurden nach dem letzten Waschgang in M 199 aufgenommen. Zu 1 g Feuchtgewicht der sich im Pellet befindlichen Hepatocyten wurden 50 ml M 199 gegeben; dadurch hatte die Suspension eine Zelldichte von etwa  $10^6/2,5$  ml.

## Medien und Lösungen für die Hepatocytenpräparation- und Kultur

Kebs-Ringer-Stammlösung

		Endkonzentration
NaCl	7 g	120 mM
KCl	0,36 g	4,8 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,296 g	1,2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,163 g	1,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	2,016 g	24,4 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Die Lösung wurde mit Carbogen äquilibriert und auf pH 7.35 eingestellt.

Präperfusionsmedium

		Endkonzentration
EGTA	0,1 g	0,25 mM
Krebs-Ringer-Stammlsg.	ad 1 l	

Collagenase-Perfusionsmedium

		Endkonzentration
HEPES	3,356 g	15 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,588 g	4 mM
Collagenase	0,5 g	
Krebs-Ringer-Stammlsg.	ad 1 l	

Für jede Hepatocytenpräparation wurde die Collagenase kurze Zeit vorher im Perfusionsmedium gelöst, für ca. 30 min mit Carbogen äquilibriert und anschließend steril filtriert.

Waschmedium

		Endkonzentration
HEPES/ NaOH pH 7.4	4,766 g	20 mM
NaCl	7 g	120 mM
KCl	0,36 g	4,8 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,296 g	1,2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,163 g	1,2 mM
Rinderserumalbumin	4 g	0,4 %
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

M 199

Endkonzentration

Pulvermedium M 199 mit Earle's

Salzen ohne NaHCO <sub>3</sub>	9,77 g	
Glucose x H <sub>2</sub> O	1,1 g	5,5 mM
HEPES	3,6 g	15 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,5 g	18 mM
Rinderserumalbumin	4 g	0,4 %
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Lösung A wurde durch Lösen von 1,5 g NaHCO<sub>3</sub> in 550 ml H<sub>2</sub>O hergestellt und mit Carbogen für mehrere Stunden begast, der pH auf 7.35 eingestellt. Lösung B wurde aus Pulvermedium, Rinderserumalbumin und HEPES in 450 ml H<sub>2</sub>O hergestellt und der pH auf 7.35 eingestellt. Dann wurden Lösung A und B zusammengegossen und nochmals mit Carbogen begast, bis ein pH 7.35 erreicht war. Anschließend wurde das Medium steril filtriert.

## 3.1.2 Primärkultur von Rattenhepatocyten

Zur besseren Anheftung an den Boden der Polystyrolschalen wurde die Hepatocytensuspension sofort nach der Herstellung mit verschiedenen Substanzen versetzt. Dazu gehörten fetales Kälberserum (4 ml/ 100 ml Suspension), eine Antibiotikastammlösung (1 ml/ 100 ml Suspension), 10<sup>-7</sup> M Dexamethason und 5 x 10<sup>-10</sup> M Insulin als permissen Wachstumsfaktor. Für die RNA-Isolierung wurden 3 x 10<sup>6</sup> Zellen/ 10 ml M 199 auf Kulturschalen Ø = 10 mm ausplattiert.

Bei transfizierten Hepatocyten erfolgte nach der Anheftungsphase von 5 h (bei nicht-transfizierten 4 h) ein Mediumwechsel, bei dem die Zellen in M 199 mit den oben angegebenen Hormon- und Antibiotikakonzentrationen, aber ohne fetales Kälberserum weiterkultiviert wurden. Es wurden 6 ml Medium pro Ø = 10 mm Kulturschale zugegeben. Die Inkubation der Hepatocyten erfolgte in Begasungsbrutschränken bei einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 16 % oder 8 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und entsprechend 79 % oder 87 % N<sub>2</sub> bei 37°C.

Hormon- und Antibiotikastammlösungen

Alle Stammlösungen wurden steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Antibiotika

Penicillin G, Natrium-Salz	0,64 g
Streptomycinsulfat	1,17 g
0,9 %-ige NaCl-Lösung	100 ml

Dexamethason (100  $\mu$ M)

Dexamethason	3,92 g
0,9 %ige NaCl-Lösung	100 ml

Dexamethason wurde zunächst in 0,3 ml Ethanol gelöst und anschließend mit 0,9 % NaCl-Lösung auf 100 ml aufgefüllt.

Insulin (10  $\mu$ M)

Insulin	6 mg
Rinderserumalbumin	100 mg
0,9 %ige NaCl-Lösung	100 ml

Insulin wurde bei pH 2.5 gelöst, neutralisiert und mit Rinderserumalbumin versetzt.

### 3.1.3 Kultur von HepG2-Zellen und COS-7-Zellen

Anlegen und Weiterführung einer Kultur

Ein in flüssigem Stickstoff eingefrorenes Kryoröhrchen HepG2-Zellen oder COS-7-Zellen (ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, in 20ml Medium MEM mit 10% FCS, 1% Antibiotikum und 1% nicht essentielle Aminosäuren aufgenommen und in einer 175 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausplattiert. Die Kultur der Zellen erfolgte in Begasungsbrutschränken in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 16% O<sub>2</sub> (v/v), 5% CO<sub>2</sub> (v/v) und 79% N<sub>2</sub> (v/v) bei 37°C. Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren (ca.  $25 \times 10^6$  Zellen pro 175 cm<sup>2</sup> Flasche), wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 x sterilem PBS gewaschen, um verbliebenes Medium zu entfernen. Das PBS wurde ebenfalls abgesaugt und die Zellen durch eine Trypsin Behandlung vom Boden der Kulturflaschen abgelöst (3ml Trypsin pro 175 cm<sup>2</sup> Flasche, für 3-5 min bei 37°C). Die Trypsinisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 5 ml kompletten Medium abgestoppt und die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension vereinzelt. FCS enthält Trypsininhibitoren. Für das Weiterführen einer Kultur wurden ca. 1/3 der HepG2-Zellen in einer neuen Kulturflasche ausplattiert, so daß die Zellen nach ca. 3-5 Tagen wieder konfluent gewachsen waren.

Für Transfektionsexperimente mit anschließender Luciferase-Bestimmung wurden  $4 \times 10^5$  Zellen/ 2,5 ml Medium auf 6 cm  $\varnothing$  Kulturschalen ausplattiert (3.1.4). Für Northern Blot Analysen (3.3.1) und Western Blot Analysen (3.3.5) wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ 6 ml Medium auf 10 cm  $\varnothing$  Kulturschalen ausplattiert.

### Medium für HepG2- und COS-7-Zellen

#### MEM

Earle's MEM (1 x) mit Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> und L-Glutamin, Endotoxin getestet, steril filtriert. Lagerung bei 2°C – 8°C. Vor Gebrauch angereichert mit 10% FCS, 1% nicht essentiellen Aminosäuren und 1% Ciprofloxacin.

#### 1 x PBS

Dulbeccos phosphate buffered saline (1 x), ohne Kalzium und Magnesium, Endotoxin getestet, steril filtriert. Lagerung bei 15°C – 25°C.

#### Nicht essentielle Aminosäuren

MEM non essential amino acids (100 x), ohne L-Glutamin, Endotoxin getestet, steril filtriert. Lagerung bei 2°C – 8°C.

#### Ciprofloxacin

Ciprobay® 200, Wirkstoff: Ciprofloxacin, 2mg/ ml. Lagerung der Lösung bei 4°C.

#### FSC

Seromed Fetal Calf Serum, Mycoplasmen getestet

#### Trypsin

Viralex™ Trypsin/ EDTA (1 x), 0,5 g Trypsin/ l, 0,2 g EDTA/ l, in 1 x PBS, Endotoxin getestet, steril filtriert, Lagerung bei – 20 °C

### 3.1.4 Induktionsversuche in transient transfizierten HepG2-Zellen

Die Zellen wurden auf Gewebekulturschalen mit  $\varnothing = 60$  mm ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion der Zellen. Ein Mediumwechsel wurde 5 Stunden danach durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Atmosphäre mit 16% Sauerstoff 48 Stunden weiterkultiviert und anschließend geerntet.

### 3.1.5 Ernte und Zellaufschluß von HepG2-Zellen

Ernte und Zellaufschluß von kultivierten HepG2-Zellen zur RNA-Isolierung, Proteinisolierung und Luciferase-Bestimmung.

Am Ende eines Versuches wurden die Zellen auf den Kulturschalen aus dem Brutschrank genommen und zweimal mit kaltem, sterilem 1 x PBS gewaschen, das PBS gründlich entfernt und die Kulturschale bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Innerhalb der nächsten 2 Stunden erfolgte die Isolierung der RNA (3.2.11) oder die Proteinisolierung (3.3.2). Für die Luciferase-Bestimmung wurden die gewaschenen Zellen mit  $300\ \mu\text{l}$  1 x Lysispuffer versehen, 15 min bei RT gewippt und mit einem Gummischaber abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf-Cups überführt und auf Eis gelagert. Das Zell-Lysat wurde anschließend 30 sec gevortext und die Zelltrümmer bei  $15.800\ \text{g}$  ( $14.000\ \text{rpm}$ , Tischzentrifuge) 2 min sedimentiert.  $20\ \mu\text{l}$  aus dem Überstand wurden in ein Luciferase-Röhrchen überführt und für die Biolumineszenzmessung verwendet (3.3.6).

#### 5 x Lysispuffer

#### Endkonzentration

1 M Tris pH 7.8	25 ml	125 mM
200 mM EDTA	10 ml	10 mM
500 mM DTT	4 ml	10 mM
85 % Glycerol	115 ml	50 %
100 % Triton-X-100	10 ml	8 %
H <sub>2</sub> O	ad 200 ml	

Die Lösung wurde autoklaviert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.



## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung elektrokompetenter E. coli

50 ml Tetracyclin-haltiges LB-Medium (60 µg/ml Tetracyclin) wurden mit einer Einzelkolonie, die aus einem Ösenausstrich einer E. coli XL1-blue Glycerolkultur gewachsen war, angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden 4 Kolben mit 250 ml LB-Medium mit je 5 ml dieser Übernachtskultur beimpft. Die Bakteriensuspension wurde dann 3 – 4 Stunden bei 37°C weiterkultiviert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,7 erreicht war. Die folgenden Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt.

Die Kultur wurde in vier 250 ml Flaschen überführt und 15 min bei 2.520 g und 4°C in einem GSA-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Sedimente in jeweils 250 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert. Alle vier Flaschen wurden nochmals bei 4.080 g und 4°C in einem GSA-Rotor zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden je zwei Sedimente zusammen in 250 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert und anschließend für 12 min bei 4.080 g und 4°C zentrifugiert. Die beiden Sedimente wurden nun zusammen in 50 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert und für weitere 15 min bei 4°C und 4.080 g in einem GSA-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das nun erhaltene Sediment ein letztes Mal in 2 ml eiskaltem 10%-igem Glycerin aufgenommen und zu 70 µl in Eppendorf-Cups aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei –70°C gelagert.

Die Kompetenz der Zellen wird durch die Transformation (3.2.2) von 1 ng eines Plasmides mit Ampicillin-Resistenz-Gen, z.B. pUC 19, überprüft. Dazu wurde der Transformationsansatz auf Ampicillin-haltigem Agarboden ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Morgen die Anzahl der gewachsenen Kolonien bestimmt

#### LB-Medium (Luria Bertani)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

Der pH-Wert von pH 7.3 wurde mit NaOH eingestellt. Das Medium wurde sofort nach dem Ansetzen autoklaviert.

#### 10% Glycerin

Glycerin	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### 3.2.2 Transformation von E. coli

Kompetente Zellen, die zur Transformation eingesetzt werden haben die Fähigkeit, lineare oder circulare doppelsträngige DNA (z.B. Plasmide) aufzunehmen. In der Bakterienzelle liegt ein aufgenommenes Plasmid extrachromosomal vor. Resistenz- und Konjugationsgene, die im Plasmid enthalten sind, werden autonom repliziert und exprimiert. Eine natürliche Kompetenz weisen Bakterien nur in der mittleren und exponentiellen Wachstumsphase auf. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an die Zellwand bei einer Transformation wird diese für die Plasmide durchlässig gemacht. Dadurch, daß das transformierte Bakterium das Plasmid aufgenommen hat, wird dieses nach etwa 1 h Inkubation bei 37°C in einem Medium, welches keine Antibiotika enthält, durch die Expression eines Antibiotikaresistenzgens die Resistenz gegen das entsprechende Antibiotikum erhalten (Cohen et al., 1972).

#### Elektrische Transformation von E. coli

Zur elektrischen Transformation der elektrokompetenten E. coli-Zellen wurden alle Schritte bis zur Pulsgabe auf Eis durchgeführt.

Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu den 70 µl wurde 5 µl Ligationsansatz bzw. 1 ng Plasmid gegeben und vorsichtig vermischt. Der Transformationsansatz wurde vorsichtig, um eine Blasenbildung zu vermeiden, in eine Elektroporationsküvette pipettiert (d = 0,1 cm) und vollständig durch leichtes Klopfen auf den Boden der Küvette gebracht. Für die Transformation wurden folgende Parameter am Pulsgeber eingestellt: 25 nF, 2,5 kV parallel zur Probe. Nach der Pulsgabe wurden sofort 500 µl SOC-Medium in die Küvette gegeben und mit der transformierten Bakteriensuspension vermischt. Die Suspension wurde vollständig aus der Küvette in ein Eppendorf-Cup überführt und 40 – 60 min bei 37°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz (bei Ligation) oder nur ein Teil (50 µl bei Plasmiden) auf Selektiv-LB-Agarplatten mit Hilfe von Glaskugeln ausplattiert.

#### Transformationansatz

Kompetente XL1-blue Zellen	70 µl
Ligationsansatz	5 µl
oder Plasmid	1 ng

<u>SOC-Medium</u>		Endkonzentration
Trypton	1 g	2 %
Hefe	0,25 g	0,5 %
5 M NaCl	100 $\mu$ l	0,01 M
4 M KCl	31,25 $\mu$ l	2,5 M
1 M MgSO <sub>4</sub>	500 $\mu$ l	0,01 M
1 M MgCl <sub>2</sub>	500 $\mu$ l	0,01 M
Glucose	180 mg	0,36 %

Der pH-Wert wurde auf pH 7.0 eingestellt und die Lösung autoklaviert und bei 4°C in Aliquots zu 5 ml gelagert.

#### LB-Agarplatten

Zu 500 ml LB-Medium wurden 6,25 g Bactoagar gegeben und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C wurden entweder 200  $\mu$ l Ampicillin-Stammlösung (Endkonzentration 40  $\mu$ l/ml) hinzu gegeben oder die Lösung ohne Antibiotikum belassen. Jeweils 20 ml wurden in eine 10 cm Petrischale gegossen und nach dem Erstarren auf dem Kopf stehend für etwa 6 Stunden bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die Agarplatten bei 4°C im Dunkeln gelagert.

#### Ampicillin-Platten

500 ml LB-Medium (3.2.1), dem 6,25 g Bactoagar zugegeben worden war, wurde autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C wurden 200  $\mu$ l Ampicillin-Stammlösung dazu pipettiert, vermischt und je 10 ml in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Schalen ca. 6 h auf dem Kopf stehend bei 37°C getrocknet. Die fertigen Schalen wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

#### Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	100 mg
H <sub>2</sub> O	1 ml

Der pH-wert wurde mit HCl auf pH 7.0 eingestellt und die Lösung in Aliquots zu je 500  $\mu$ l bei – 20°C gelagert.

### 3.2.3 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Die auf den Ampicillin-Platten gewachsenen weißen Bakterienkolonien wurden mit einem sterilem Zahnstocher gepickt, in 5 ml antibiotikahaltigem LB-Medium (Ampicillin, 40  $\mu$ g/ml) über

Nacht bei 37°C vermehrt. Aus den 5 ml Kulturen der gepickten Kolonien wurde die Plasmid-DNA in einer sogenannten Minipräparation isoliert.

Minipräparation nach der TELT-Methode(Tris-HCL, EDTA, LiCL, Triton-X-100)

Aus 3 ml einer Übernachtskultur wurden in zwei Schritten die Bakterien für jeweils 5 min bei 4.000 g (7.000 rpm, Tischzentrifuge, RT) in einem 2 ml Eppendorf-Cup sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde unter kräftigem Schütteln gelöst, mit 260 µl TELT-Lösung (+ 270 µg Lysozym) versehen und durch Schwenken gemischt. Die Proben wurden für 5 min bei RT und danach bei 95°C für 2 min inkubiert, um die Zellen vollständig zu lysieren. Anschließend wurden die Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA bei 15.800 g (14.000 rpm, Tischzentrifuge, RT) für 10 min sedimentiert und als stark visköses Pellet mit einem sterilem Zahnstocher aus dem Eppendorf-Cup entfernt. Um aus dem Überstand die DNA zu fällen, wurden 0,6 Volumen Isopropanol dazugegeben und für 15 min bei 15.800 g (14.000 rpm, Tischzentrifuge, RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen das Pellet mit 0,5 Volumen 70 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 15.800 g (14.000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet kurz Speed Vac getrocknet und dann in 20 µl H<sub>2</sub>O mit RNase (0,2 µg/ ml) aufgenommen. Um das Pellet zu lösen, fand erst eine Inkubation für 5 min bei RT und dann für weitere 5 min bei 65°C statt.

#### TELT-Lösung

		Endkonzentration
1 M Tris-HCl pH 7.5	2,5 ml	50 mM
0,5 M EDTA	6,2 ml	0,062 mM
10 % Triton-X-100	2,0 ml	0,2 %
3,2 M LiCl	39,2 ml	2,562 mM
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml	

Die Lösung wurde autoklaviert.

#### Lysozym

	Endkonzentration
Lysozym	50 mg/ ml

Restriktionsanalyse

Plasmid-DNA	5 – 10 µl
10 x Puffer (enzymspezifisch)	2 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Da die Minipräparation nach TELT noch RNA enthielt, wurde 1 µl RNase A (10 µg/µl) zugegeben und 15 min bei 37°C weiterinkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 5 µl Probenpuffer gemischt, auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen.

## 3.2.4 Gelelektrophorese

Hierbei wurde der Restriktionsansatz mit 0,25 Vol Orange G-Probenpuffer gemischt und auf einem 1%-igem Agarosegel einer Elektrophorese unterworfen. Um die genauen Größen der DNA-Fragmente zu bestimmen wurde ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 45-60 min mit 70 Volt/ 10 cm durchgeführt (kürzeste Distanz zwischen beiden Elektroden). Die negativ geladene DNA läuft von der Kathode (-) zur Anode (+). Zur Herstellung des 1%-igen Gels wurden 1,5 mg Agarose in 150 ml 1 x TAE-Puffer aufgeköcht, bis die Agarose gelöst war. Das Gel wurde in eine vorbereitete Kammer mit einer Größe von 19 cm x 11 cm x 2 cm gegossen und bis zum vollständigem Erstarren in den Kühlschrank gestellt. Das Gel wurde anschließend in eine Elektrophoresekammer gelegt (10 cm x 10 cm x 2 cm) und mit 1 x TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel bedeckt war. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden 10 µl eines DNA-Längenstandards (MBI/ Fermentas 1 kb) in eine Geltasche aufgetragen. Die aus dem Restriktionsverdau mit Orange G versehenen Proben wurden in die restlichen Taschen pipettiert und die Spannung angelegt. Die Elektrophorese dauerte etwa 1 Stunde. Damit die im Gel vorhandene DNA sichtbar gemacht werden kann, wurde das Gel in eine Ethidiumbromid-Lösung gelegt. Ethidiumbromid interkaliert in den DNA-Doppelstrang und bildet mit der DNA einen im UV-Licht fluoreszierenden Komplex. Die Banden wurden auf einem UV-Schirm ausgewertet.

Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid 10 mg/ ml

In 150 ml 1 x TAE-Puffer. Vor Licht geschützt bei 4°C aufbewahren.

<u>10 x Tris/ Acetat/ EDTA (TAE)-Puffer</u>		Endkonzentration
Tris	6,1 g	0,5 M
Natriumacetat	1,6 g	0,2 M
EDTA	0,7 g	0,02 M
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 7.4 eingestellt und der Puffer autoklaviert.

<u>Orange G</u>		Endkonzentration
Ficoll	12 g	12 %
Orange G	1 Spatelspitze	
H <sub>2</sub> O	10 ml	

Das Ficoll wurde in H<sub>2</sub>O gelöst und eine Spatelspitze Orange G zugegeben. Der Puffer wurde steril filtriert und aliquotiert.

### 3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Auf einem Ultraviolettstrahler wurden bei einer Wellenlänge von 366 nm die Banden sichtbar gemacht und die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die in den Agarose-Gelstreifen enthaltene DNA wurde mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (Qiagen/Hilden) aus dem Gel extrahiert.

Die Gelextraktion wurde in einem 2 ml Eppendorf-Cup durchgeführt. Die Gelstücke wurden gewogen und pro 1 Volumen Gel 3 Volumen Puffer QX1 dazugegeben. Der Puffer QIAEX II wurde durch vortexen für 30 sec. resuspendiert und 10 µl zum Ansatz hinzugefügt. Das Eppendorf-Cup wurde für 10 min. bei 50°C inkubiert und dabei leicht geschüttelt, bis sich das Gelstück komplett aufgelöst hatte.

Puffer QX1 bewirkt durch seine hohe Konzentration an chaotropem Salz eine Zerstörung der Wasserstoffbindungen zwischen den Zuckern der Agarose Polymere. Puffer QIAEX II enthält Silicagel-Partikel, an die die gelösten Nucleinsäuremoleküle bei hoher Salzkonzentration adsorbiert werden. Nachdem das Gelstück gelöst war, wurde der Ansatz bei 15.800 g (14.000 rpm, Tischzentrifuge, RT) für 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entfernt und das Sediment durch vorsichtiges Schütteln in 500 µl Puffer PE resuspendiert, um mittels des, im PE-Puffer enthaltenen Ethanol Salzkontaminationen zu entfernen. Der Ansatz wurde nochmals bei 15.800 g (14.000 rpm, Tischzentrifuge, RT) für 30 sec zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Wasserstrahlpumpe erneut entfernt und das Pellet luftgetrocknet, bis es eine weiße Farbe bekam. Um die DNA zu eluieren, wurden 20 µl steriles H<sub>2</sub>O zum Pellet gegeben, dieses unter vorsichtigem Schütteln resuspendiert und 5 min. bei RT inkubiert. Die Probe wurde wieder bei 15.800 g (14.000 rpm, Tischzentrifuge, RT) für 30

sec zentrifugiert und der Überstand, der die gereinigte DNA enthielt in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Anschließend wurde die Elution noch einmal wiederholt, um die Ausbeute an DNA zu erhöhen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl des Eluats auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen, wobei als Größen- und Konzentrationsstandard mit Hind III verdaute λ-DNA verwendet wurde.

λ-Hind

λ-DNA (0,4 µg/ µl)	50 µl
10 x Restriktionspuffer H	10 µl
Restriktionsendonuclease Hind III	5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Die DNA wurde 3 – 4 Stunden bei 37°C verdaut.

### 3.2.6 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA (Maxipräparation)

Eine Maxipräparation wird durchgeführt, um größere Mengen von Plasmid-DNA zu erhalten. Dabei wird das Plasmid über eine Silikat-Säule gereinigt. Nach der Präzipitation eines großen Teils der Bakterienproteine und der genomischen DNA und dem Abbau der RNA durch RNasen werden die noch im Zell-Lysat vorhandene Bestandteile an die Silikat-Säule gebunden und dann sukzessiv eluiert. Die Säulen enthalten Kieselerdepartikel (ungefähre Größe 100 nm), die kovalent mit einer hydrophilen Substanz beschichtet sind. Ein weites Separationsspektrum ergibt sich durch die hohe Ladungsdichte; durch Veränderung des pH-Wertes und der Ionenstärke der Puffer werden nacheinander Proteine, Metabolite, Polysaccharide, dNTP's, dann RNA und einzelsträngige DNA und schließlich doppelsträngige DNA eluiert (Produktinformation).

Die Präparation der benötigten Plasmid-DNA wurde mit dem JETstar Plasmid Maxiprep Kit der Firma Genomed entsprechend der Herstellervorschriften durchgeführt.

In 200 ml LB-Medium wurden über Nacht die transformierten E. coli XL1-blue-Zellen mit dem entsprechendem Antibiotikum bis zu einer Dichte von ungefähr  $10^9$  Zellen pro ml ( $OD_{600}$  1–1,5) vermehrt. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 5.080 g (6.000 rpm, 4°C, GSA-Rotor). Das Bakterienpellet wurde mit 10 ml Puffer E 1, dem zuvor 100 µg/ ml RNase zugesetzt wurde, resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 10 ml Puffer E 2 (mit NaOH und SDS zur Lyse der Bakterien) hinzugefügt. Nach Zugabe dieser zwei Puffer wurde der Behälter vorsichtig gemischt, um das Auftreten von Scherkräften zu vermeiden, die die genomische DNA zerstören könnten. Danach erfolgte eine 5 min Inkubation bei RT. Nun wurden 10 ml Puffer E 3 zugegeben, der wieder vorsichtig mit der Zellsuspension vermischt wurde. Durch die Zugabe von Puffer 3 und vorsichtiges Mischen des Behälters, neutralisiert sich der pH-Wert, Proteine

fallen aus und es bilden sich Präzipitate aus großer genomischer DNA. Diese Lösung wurde für 15 min bei 20°C und 16.000 g (10.000 rpm, SS34-Rotor) zentrifugiert und der Überstand durch einen Faltenfilter auf eine mit 30 ml Puffer E 4 äquilibrierten Kieselerde-Säule (Länge 13 cm, Durchmesser 2,6 cm) gegeben. Hatte der gesamte Überstand die Säule durchlaufen, wurde einmal mit 60 ml des Puffers E 5 gewaschen. Nach dem Waschgang erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 15 ml des Puffers E 6. Das daraus erhaltene Eluat wurde mit 10,5 ml Isopropanol (bei RT, um die Salzpräzipitation zu minimieren) gemischt und anschließend 50 min bei 15.000 g (9.000 rpm, 4°C, HB6-Rotor) zentrifugiert (bei Bedarf konnte das Eluat zusammen mit Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt werden). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen, um präzipitierte Salze zu entfernen und nochmals 50 min bei 15.000 g (9.000 rpm, 4°C, HB6-Rotor) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei RT ca. 20 min. getrocknet und in 0,5–1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Reinheit der isolierten Plasmid-DNA und die Konzentration wurde überprüft, indem die OD bei 260 nm (DNA) und bei OD 280 nm (Proteine) gemessen wurde. Ein ideales Ergebnis erzielte man dann, wenn das Verhältnis zwischen OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> 2 betrug. Allerdings wurde dies meistens nicht erreicht, sondern nur ein Verhältnis von 1,5 – 1,8. 1 OD entspricht 50 µg DNA/ ml. Anschließend wurde die gereinigte Plasmid-DNA in einem Restriktionsverdau auf die richtige Größe überprüft, damit sie für weitere Versuche eingesetzt werden konnte.

Puffer E 1	50 mM Tris 10 mM EDTA 100 ng/ ml RNase	pH 8.0 mit HCl eingestellt E 1 mit RNase bei 4°C aufbewahren
Puffer E 2	200 mM NaOH 1 % SDS	
Puffer E 3	3,1 M Kaliumacetat	pH 5.0 mit Essigsäure eingestellt
Puffer E 4	600 mM NaCl 100 mM Natriumacetat 0,15 % Triton-X-100	pH 5.0 mit Essigsäure eingestellt
Puffer E 5	800 mM NaCl 100 mM Natriumacetat	pH 5.0 mit Essigsäure eingestellt
Puffer E 6	1,25 M NaCl 100mM Tris	pH 5.8 mit HCl eingestellt

(Herstellerangaben)



### 3.2.7 Charakterisierung der Plasmide durch Sequenzierung

Um Doppelstrang-DNA der Plasmide sequenzieren zu können, wurde die "Big Dye Terminator Cycle Sequencing" Methode, entsprechend der Herstellervorschrift von Perkin Elmer angewendet. Die Methode besteht darin, daß 4 mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Didesoxyribonucleosidtriphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) mit nicht markierten Dideoxyribonucleosidtriphosphaten gemischt werden. Von einem bestimmten Oligonukleotid ausgehend wurde die DNA-Matrize an einem Strang durch zyklisches Denaturieren, Anlagern und Synthetisieren immer wieder abgeschrieben. Dabei entstehen Fragmente, die am 3'-Ende mit basenspezifischen Farbstoffen markiert sind. Diese werden dann elektrophoretisch aufgetrennt und durch ihre Fluoreszenz im Gel nachgewiesen.

#### 30 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung

		Endkonzentration
Acrylamid	29 g	29 % (w/v)
Bisacrylamid	1 g	1 % (w/v)
H <sub>2</sub> O	100 ml	

Die Lösung wurde steril filtriert und in einer lichtgeschützten Flasche bei 4°C gelagert.

#### 10 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)

		Endkonzentration
Tris	108 g	0,9 M
Borsäure	55 g	0,9 M
EDTA	8,3 g	25 mM
H <sub>2</sub> O	1 l	

### 3.2.8 Aufreinigung der Proben

Nach Abschluß der Sequenzierungsreaktion wurde der Reaktionsansatz auf 4°C gekühlt und die DNA durch Ethanol gefällt, um überschüssige Dideoxyribonucleosidtriphosphate mit Fluoreszenzfarbstoffen zu entfernen. Hierzu wurden dem Reaktionsansatz 80 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M NaAc pH 4.6 und 250 µl 100 % Ethanol (RT) zugegeben und 5 min. bei 15.000 g (14.000 rpm, Tischzentrifuge) zentrifugiert. Anschließend wurde der Ethanol abpipettiert und die DNA in der Speed-Vac getrocknet. Die DNA wurde in 3 µl Formamid/ 25 mM EDTA pH 8.0 (5:1) aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert.

### 3.2.9 Automatische Sequenzierung und EDV-gestützte Auswertung

Auf das Sequenziergel wurden 3 µl der DNA-Lösung aufgetragen. Die Oligonukleotide wurden elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Die vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffgruppen, die jeweils an das terminale Didesoxyribonucleotid eines bestimmten Oligonukleotids gekoppelt waren, wurde durch einen 40 mW Argon-Laser (540 nm, 570 nm, 595 nm, 625 nm) angeregt und die Fluoreszenzsignale wurden durch ein Detektorsystem des DNA-Sequenzers anhand ihrer unterschiedlichen Emissionswellen identifiziert und quantifiziert.

### 3.2.10 Transfektion von HepG2- und COS-7-Zellen nach der Calcium-Phosphat-Technik

Die DNA wird zusammen mit Calcium-Phosphat-Präzipitaten auf die Zellen gebracht, was dann durch Endocytose in die Zellen aufgenommen wurde.

Die HepG2- und COS-7-Zellen wurden etwa 1 d vor der Transfektion in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen in 2,5 ml Medium MEM in 60 mm Ø Kulturschalen ausplattiert. Wurden die Zellen für eine Proteinisolierung verwendet, wurde 3 h vor der Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei Zellen, die für eine Luciferase-Bestimmung verwendet wurden, war dieser Mediumwechsel nicht notwendig.

Der Transfektionsansatz wurde in Polystyrolröhrchen angesetzt, da sich die DNA an Glasröhrchen anheftet. Nach dem Zusammenpipettieren wurden die Lösungen durch vortexen vermischt und dann für 5 – 10 min bei RT stehen gelassen. In dieser Zeit bildet sich das DNA-Calcium-Phosphat-Präzipitat, was durch eine leichte Trübung des Puffers zu verfolgen war. Von diesem Gemisch wurden 150 µl auf 2,5 ml ausplattierte und angeheftete Zellen (HepG2- oder COS-7-Zellen) in 60 mm Ø Schalen pipettiert, durch leichtes Schwenken gemischt und im Begasungsbrutschrank bei 16 % Sauerstoff inkubiert.

Nach der erfolgten Transfektion wurde entweder nach 5 Stunden (bei HepG2) oder nach 24 Stunden (bei COS-7) ein Mediumwechsel durchgeführt.

<u>Transfektionsansatz für eine Kulturschale (60 mm)</u>		Endkonzentration
Plasmid-DNA	2,5 µg bei HepG2 5 µg bei COS-7	
2,5 M CaCl <sub>2</sub>	7,5 µl	125 mM
2 x Hepes	75 µl	
H <sub>2</sub> O	ad 150 µl	

<u>2 x Hepes</u>		Endkonzentration
Hepes	1,192 g	50 mM
NaCl	1,636 g	280 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,267 g	1,5 mM
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf pH 7.05 eingestellt, der Puffer in 10 ml Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

<u>Calciumchlorid 2,5 M</u>		Endkonzentration
CaCl <sub>2</sub>	36,75 g	2,5 M
H <sub>2</sub> O	100 ml	

Die Lösung wurde autoklaviert und in Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.11 RNA-Isolierung aus primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden  $1 \times 10^6$  Zellen auf Gewebekulturschalen ( $\varnothing = 100$  mm) verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gewebekulturschalen aus dem Brutschrank genommen und 2 mal mit kaltem, sterilem 1 x PBS gewaschen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für ca. 10 min eingefroren. Anschließend wurden die gefrorenen Zellen in 500  $\mu\text{l}$  Guanidiniumthiocyanat-Aufschlußpuffer aufgenommen, mit einem sterilem Gummispatel abgeschabt und mehrfach resuspendiert. Das Homogenat wurde in ein 2 ml Eppendorf-Schraubdeckel-Cup überführt. Es wurden nun nacheinander 50  $\mu\text{l}$  2 M Natriumacetat (pH 4.1), 500  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O-gesättigtes Phenol und 100  $\mu\text{l}$  Chloroform/ Isoamylalkohol (Verhältnis 49:1) hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz durch starkes Schütteln für 10 sec gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation im SS-34-Rotor für 30 min bei 8.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$ . Nach der Zentrifugation war das Homogenat in drei Phasen unterteilt. Die wässrige Oberphase, die die RNA enthielt, wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Schraubdeckel-Cup überführt und mit 1 ml Isopropanol versetzt. Die RNA wurde etwa 2 – 3 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt (bei Bedarf konnte auch über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt werden). Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für 20 min bei 8.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  im SS34-Rotor. Der Überstand wurde dann vorsichtig entfernt und das entstandene Pellet mit 300  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol gewaschen. Wieder wurden die Proben für 20 min bei 8.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  im SS34-Rotor zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Die gereinigte RNA wurde kurz bei RT getrocknet, dann in 40  $\mu\text{l}$  0,1 % SDS aufgenommen und 10 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die RNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Durch Extinktion kann die Konzentration und Reinheit der RNA bestimmt werden. Dazu wird die Extinktion bei OD 260 nm und OD 280 nm gemessen. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht 40 µg RNA/ ml. Der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Bei einer proteinfreien RNA-Lösung ist der Quotient 2. Durch mögliche Verunreinigungen durch Proteine verkleinert sich der Quotient. In der Regel lag er allerdings über 1,7.

### Lösungen für die RNA-Isolierung

Alle Lösungen für die RNA-Versuche wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt. Durch die Zugabe von DEPC zu Millipore-Wasser und dem Stehenlassen über Nacht wurden RNasen in dem Wasser inaktiviert. Anschließend wurde das Wasser autoklaviert.

#### Phenol (H<sub>2</sub>O-gesättigt)

2/3 Volumen Phenol wurden in der Wärme mit 1/3 Volumen H<sub>2</sub>O vermischt. Nach der Phasentrennung wurde die Lösung bei 4°C in einem lichtgeschützten Gefäß aufbewahrt.

Aufschlußpuffer		Endkonzentration
Guanidiniumthiocyanat	47,3 g	4 M
1 M Natriumcitrat	2,5 ml	25 mM
N-Lauroylsarcosin	0,5 g	17 mM
2-Mercaptoethanol	0,7 ml	0,1 M
30%-iges Antifoam A	0,33 ml	0,1 %
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Die Lösung wurde für 30 min. auf 65°C erwärmt. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt. 2-Mercaptoethanol wurde zum Schluß dazu pipettiert.

## **3.3 Biochemische Methoden**

### 3.3.1 Northern Blot Analyse

Dieses Verfahren dient zur Analyse von RNA. Die RNA wird in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, anschließend durch Kapillartransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Blot) und durch UV-Crosslinking fixiert. Durch die darauf folgende Hybridisierung mit spezifischen Sonden wird die RNA von Interesse identifiziert (Abb.16). Bei diesem Verfahren ist darauf zu achten, daß nur autoklavierte Lösungen verwendet werden, und daß die Elektrophorese- und Blotkammern vorher mit einem 3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt werden, um RNasen zu inaktivieren.

Denaturierung der RNA

Der Standardansatz enthielt in der Regel 20 µg RNA. Zu der RNA wurden 16,5 µl Ladungspuffer hinzupipettiert und die Proben bei 60°C für 15 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben 2 min auf Eis inkubiert und mit 5 µl Proben-Puffer für RNA versetzt.

Ladungspuffer

		Endkonzentration
Deionisiertes Formamid	15 ml	66,6 %
14,3 x MOPS	2,1 ml	26,7 mM
37%ig Formaldehyd	5,4 ml	8,9 %

Der Puffer wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

14,3 x MOPS

		Endkonzentration
MOPS	5,93 g	286 mM
NaAc	0,58 g	7,1 mM
EDTA	0,5 g	1,3 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

Probenpuffer

		Endkonzentration
Glycerin	5 ml	50 %
0,5 M EDTA	20 µl	1 mM
Bromphenolblau	10 mg	0,1 %
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

Der Puffer wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Elektrophoresebedingungen

Um die RNA zu denaturieren, wurde dem Agarosegel Formaldehyd zugesetzt (Lehrach et al., 1977). Man benötigte für die Herstellung eines 1,5%-igen 1,8 g Agarose, die in 98 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gekocht wurden, bis die Agarose vollständig gelöst war. 10 ml Formaldehyd und 12 ml 10 X MOPS wurden erst nach dem Abkühlen der Agaroselösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung gut vermischt und dann in einen Gelträger (Größe: 10 x 20 cm, Anzahl der Taschen: 14) gegossen, der vorher für mindestens 1 Stunde in der Kammer mit einer 3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung behandelt und somit RNase frei gemacht wurde.

Das denaturierende Agarosegel wurde in der Gelkammer mit 1 x MOPS-Puffer überschichtet (ca. 750 ml). Nachdem die Proben in die Geltaschen aufgetragen worden waren, wurde eine Spannung von 100 Volt für 2,5 h angelegt.

10 x MOPS

		Endkonzentration
MOPS	41,9 g	200 mM
NaAc	4,1 g	50 mM
EDTA	3,7 g	10 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert

Visualisierung der RNA mit Ethidiumbromid

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel für 20 min. in 150 ml einer 1%-igen Glycinlösung gewippt, um das Formaldehyd auszuwaschen. Zu dieser Glycinlösung wurden 5 µl Ethidiumbromid (3.2.4) zugesetzt und für 5 min inkubiert. Ethidiumbromid bildet mit RNA Komplexe. Die RNA kann anschließend im Gel sichtbar gemacht werden, da das Ethidiumbromid im UV-Licht (254nm) fluoresziert. Durch das fluoreszierende Ethidiumbromid erscheinen im Gel zwei Hauptbanden, welche die 28S- und 18S- ribosomale RNA darstellen. Das Gel wurde mit Hilfe einer Videokamera photographiert.

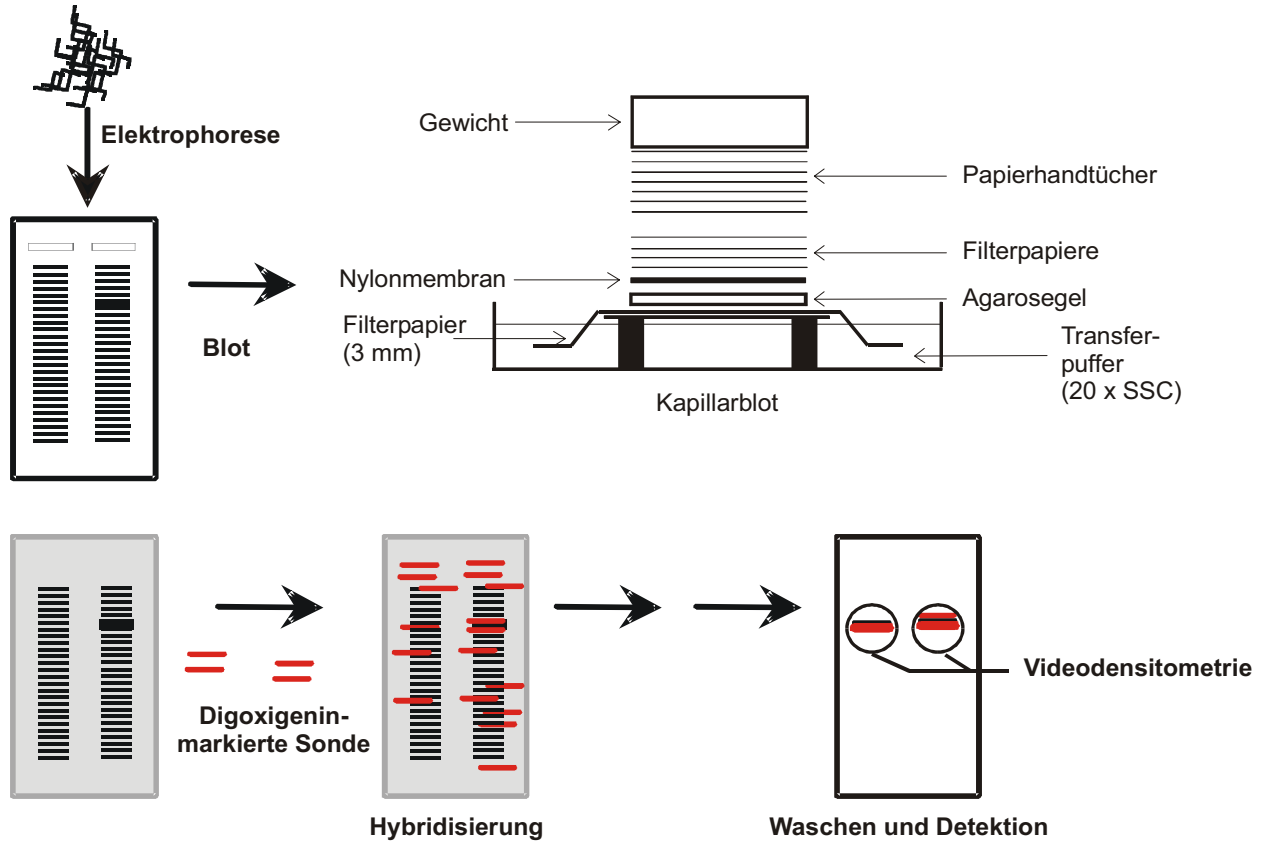
Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

Um nun die im Gel aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran durch einen Kapillarblot zu übertragen, wurde das Gel für 20 min in 20 X SSC gewippt. Die Nylonmembran wurde auf die Größe eines Gels zugeschnitten und mit 20 x SSC befeuchtet. Die Transferapparatur wurde folgendermaßen aufgebaut (Abb.16). Ein mit Transferpuffer ( 20 x SSC) gesättigtes 3 mm starkes Filterpapier wurde über eine Glasplatte in eine große, flache Schale so hineingelegt, daß die Enden des Filterpapiers ständig mit dem Transferpuffer in Berührung standen. Darauf wurde das Gel gelegt und auf das Gel passgenau die Nylonmembran. Auf die Membran wurden weitere 4 auf Gelgröße zugeschnittene 3 mm starke Filterpapiere gestapelt und darauf ein Stapel Papierhandtücher. Zum Schluß wurde ein Gewicht aufgelegt, das dazu diente, optimalen Kontakt zwischen den einzelnen Komponenten herzustellen, so daß die RNA durch nach oben gerichtete Kapillarkräfte auf die Nylonmembran übertragen wurde. Außerdem wurde mit einer Wasserwaage der gerade Aufbau kontrolliert, damit der Druck durch das Gewicht , das in der Mitte auf den Blot gestellt wurde, sich an den Stellen gleichmäßig auf den Blot verteilt. Der Transfer wurde über 48 h durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die RNA auf der Nylonmembran durch 2 min. UV-Crosslinking fixiert. Zur Kontrolle, ob die RNA vollständig transferiert war, wurde das Gel nach dem Transfer erneut unter UV-Licht betrachtet.

<u>20 x SSC</u>		Endkonzentration
NaCl	175,32 g	3 M
Natriumcitrat	88,25 g	0,3 M
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

### RNA Moleküle



**Abb. 16: Prinzip eines Northern-Blots**

Nachdem die RNA-Fragmente durch denaturierende Agaroseelektrophorese getrennt worden sind, werden die verschiedenen vorhandenen RNA-Moleküle auf eine Nylonmembran übertragen. Durch Hybridisierung der RNA-Moleküle auf der Nylonmembran mit Digoxigenin-markierten, spezifischen Sonden, anschließender Lumineszenzreaktion und Auflegen eines Films werden die Banden der RNA von Interesse nachgewiesen.

### Hybridisierung der RNA mit Digoxigenin-markierten Sonden

Mit Hilfe spezifischer Sonden konnte die gewünschte RNA identifiziert werden. Es wurden Digoxigenin-markierte antisense-RNA-Sonden verwendet.

Nachdem die RNA durch UV-Crosslinking auf der Nylonmembran fixiert wurde, wurde diese in ein Hybridisierungsröhrchen überführt. Mit 20 ml Hybridisierungslösung erfolgte eine Vorhybridisierung der Nylonmembran für 30 min bei 68°C im Hybridisierungssofen, um spezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Lösung, die zur Vorhybridisierung diente, wurde verworfen und es wurden anschließend 100 ng Sonde (Digoxigenin-markierte Antisense-RNA), die in 6 ml Hybridisierungslösung aufgenommen wurden, zu der Nylonmembran gegeben und bei 68°C über Nacht im Hybridisierungssofen inkubiert. Die darauf folgenden Waschschriffe erfolgten unter stringenten Bedingungen, um nicht hybridisierte Sonde zu entfernen und instabile Hybride zu schmelzen. Es wurden nacheinander 2 x 5 min in 2 x SSC/ 0,1% SDS und 2 x 15 min in 0,1 x SSC/ 0,1% SDS jeweils bei Hybridisierungstemperatur gewaschen (Posthybridisierung).

<u>Hybridisierungslösung</u>		Endkonzentration
Deionisiertes Formamid	12,5 ml	50 %
10 % Blockingreagenz	6 ml	2,5 %
20 % SDS	25 µl	0,02 %
1 % N-Lauroylsarcosin	250 µl	0,1 %
20 x SSC	6,25 ml	5 x

Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

### Detektion und Quantifizierung

Durch die Bindung eines Antikörpers gegen Digoxigenin, an den die alkalische Phosphatase gekoppelt war (Enzym-Immunoassay) wurde die Detektion der Digoxigenin-markierten Hybride durchgeführt. Die Entstehung einer metastabilen Verbindung, die durch die Dephosphorylierung des alkalischen Phosphatasesubstrats Dinatrium3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl)phenyl-phosphat (CSPD) durch alkalische Phosphatase entstand, emittiert beim Zerfall Licht einer Wellenlänge von 477 nm. Dieses Lumineszenz-Lichtsignal konnte durch Auflegen eines Films sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch.

Die Detektion und Anfärbung erfolgte mit dem Dig-Nucleic-Acid Detection Kit der Firma Roche. Nach der Hybridisierung der Nylonmembran im Hybridisierungssofen wurde diese zunächst kurz (1 min.) in Puffer (1 x Maleinsäurepuffer) gewippt. Um die auf der Membran enthaltenen unspezifischen Antikörperbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für 30 min in 100 ml 1% Blocking-Reagenz (10% Blocking-Reagenz mit 1 X Maleinsäurepuffer auf 1% verdünnt) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Dig-Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase-Konjugat in Puffer 2 auf 75 mU/ ml = 1:1000) 30 min bei RT inkubiert. Ungebundenes Antikörperkonjugat wurde anschließend durch 2 x 15 min Waschen in Puffer 1 entfernt. Nach 2 min Äquilibrierung in Puffer 3 wurde die Nylonmembran 5 min mit verdünnter



CSPD-Lösung (1:100 in Puffer 3) inkubiert und dann auf Frischhaltefolie gelegt. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Hilfe einer Glaspipette heraus gerollt und die Membran vollständig in Frischhaltefolie eingepackt. Unter Lichtausschluß wurde die Nylonmembran für 10 min in einer Filmkassette bei 37°C inkubiert, was zur Erhöhung der Lumineszenzreaktion führte. Je nach Stärke des Lichtsignals wurde ein Film für die Dauer von 30 min bis zu 2 Stunden aufgelegt. Dieser Film wurde anschließend densitometrisch ausgewertet. Zur Quantifizierung der RNA-Banden auf der Nylonmembran diente das Videodensitometer der Firma Biotec-Fischer.

<u>Puffer 1 (Maleinsäurepuffer) 1 x</u>		Endkonzentration
Maleinsäure	11,61 g	0,1 M
NaCl	8,78 g	0,15 M
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde mit festem NaOH auf pH 7.5 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert.

<u>Puffer 2 (1 % Blocking-Reagenz)</u>		Endkonzentration
10 % Blocking-Reagenz	100 ml	1 %
Maleinsäurepuffer 1 x	ad 1 l	

<u>Puffer 3</u>		Endkonzentration
Tris	12,11 g	0,1 M
NaCl	5,84 g	0,1 M
MgCl <sub>2</sub>	10,17 g	50 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 9.5 eingestellt.

### 3.3.2 Methode zur Isolierung der Gesamtproteine aus HepG2-Zellen

Die kultivierten Zellen wurden zweimal mit eiskalten 1 x PBS gewaschen und die Gewebekulturschalen für 5 min bei -20°C eingefroren. Auf die gefrorenen Platten wurde 400 µl (Gewebekulturschalen  $\varnothing$  = 10 cm) Lysispuffer gegeben, die Zellen darin mit einem Gummischaber abschat und ein ein Eppendorf-Cup überführt. Danach wurden die Zellen 2 x 5 sec mit einem Beschallungsgerät aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in einem SS-34-Rotor für 15 min bei 16000 rpm. Der Überstand, in dem sich die Proteine befinden, wurde nach der Zentrifugation in ein neues Eppendorf-Cup überführt

<u>Lysispuffer</u>		Endkonzentration
Tris/ HCl, pH 8,0	12,5 ml	50 mM
EDTA	2,5 ml	5 mM
NaCl	7,5 ml	150 mM
0,5 % Igepal CA-630	1,25 ml	
H <sub>2</sub> O	ad 250 ml	

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Eine Zugabe folgender Substanzen erfolgte kurz vor Gebrauch:

		Stamm	Endkonzentration
PMSF	20 µl	0,5 M	1 mM
Aprotinin	0,7 µl	1,4 mg/ ml	1 mM
Leupeptin	0,5 µl	2 mg/ ml	1 mM
Pepstatin A	1 µl	0,5 mg/ ml	1 mM
DTT	100 µl	5 mM	1 mM
1 PH-Cocktailtablette			
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml		

Produktinformation der Firma Boehringer zu

**PMSF:** inhibiert Serinproteasen wie Chymotrypsin, Trypsin und Thrombin, wie auch die Cysteinprotease Papain (reversibel durch DTT-Behandlung). Nicht inhibiert werden Metalloproteasen, auch die meisten Cystein- oder Aspartatproteasen nicht. Unter bestimmten Bedingungen wie z.B. alkalische pH-Werte hat PMSF nur eine Halbwertszeit von 35 min. Die empfohlene Einsatzkonzentration beträgt 0,1 bis 1 mM.

**Pepstatin:** inhibiert sehr stark die HIV-Protease und andere Aspartatproteasen wie Pepsin, Renin, Cathepsin D, Chymosin und viele bakterielle saure Proteasen. Pepstatin ist in Wasser unlöslich. Die empfohlene Einsatzkonzentration beträgt 0,7 bis 7 µg/ ml.

**Leupeptin:** inhibiert Serin- und Thiolproteasen wie Trypsin, Plasmin, Proteinase K, Kallikrein, Papain, Thrombin und Cathepsin A und B. Nicht gehemmt werden  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ -Chymotrypsin, Pepsin, Cathepsin D, Elastase, Renin und Thermolysin. Die empfohlene Einsatzkonzentration beträgt 0,5 bis 5 µg/ ml.

### 3.3.3 Methode zur Gesamtproteinisolierung aus COS-7-Zellen

Die kultivierten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Auf die Platten wurden 1,5 ml (Gewebe Kulturschalen  $\varnothing = 10$  cm) eiskalter TEN-Puffer gegeben, die Zellen darin mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt. Danach wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge für 3 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren, um die Zellen aufzuschließen. Anschließend wurden die Zellen in 200  $\mu$ l Zell-Extrakt-Puffer resuspendiert und nochmals in einem SS-34-Rotor für 30 min bei 11000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Proteine befinden, wurde nach der Zentrifugation in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt.

#### TEN-Puffer (Tris-HCl, EDTA, NaCl)

		Endkonzentration
1M Tris-HCl pH 7.9	10 ml	40 mM
0,5 M EDTA	5 ml	10 mM
5 M NaCl	7,5 ml	150 mM
H <sub>2</sub> O	ad 250 ml	

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

#### Zell-Extrakt-Puffer

		Endkonzentration
1 M Hepes pH 7.9	0,1 ml	10 mM
5 M NaCl	0,8 ml	400 mM
0,5 M EDTA	2 $\mu$ l	0,1 mM
87 % Glycerin	0,58 ml	5 %
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

Die Lösung wurde immer frisch angesetzt und es erfolgte noch eine Zugabe der Substanzen, wie sie unter 3.3.2 beschrieben ist.

### 3.3.4 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurde ein Bradford-Reagenz benutzt. Dabei wurden 2  $\mu$ l der jeweiligen isolierten Gesamtproteine zu 98  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 1 ml Bradford-Reagenz gegeben. Für den Leerwert wurden 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 1 ml Reagenz verwendet. Die Ansätze wurden nach dem sie zusammen pipettiert waren durch Schütteln gut vermischt und nach 10 min bis höchstens 30 min wurde die OD<sub>578</sub> gemessen; mit dem Leerwert wurde gegen Null abgeglichen. Mit Rinderserumalbumin (BSA) wurde eine Eichgerade von 0 bis 6  $\mu$ g Protein erstellt. Die Eichgerade war bis 6  $\mu$ g linear.

Ansatz für die Proteinbestimmung

Gesamtproteinlösung	2 µl
oder Stammlösung BSA (1 µg/ µl)	1; 2; 3; 4; 5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl
Bradford-Reagenz	1 ml

Bradford-Reagenz

Serva-Blue (No. 35050)	100 mg
Ethanol (95 %)	50 ml
Phosphorsäure (85 %)	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

## 3.3.5 Western Blot Analyse

Im Western-Immuno-Blot werden nach Auftrennung mittels PAGE die Proteine auf einen Nylonfilter gebロットet und einzelne Proteine können direkt über eine Antikörper-Bindung nachgewiesen werden.

Nach der Inkubation dieses Filters mit dem Primärantikörper folgt eine Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper, der den Primärantikörper erkennt. Durch eine anschließende Peroxidase-Reaktion wird die Bindung der Antikörper an die Proteine sichtbar gemacht.

Vorbereitung der Proteine für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

100 µg Protein wurden auf ein Volumen von 15 µl eingeeengt, mit 5 µl Probenpuffer und 2 µl Mercaptoethanol versehen und für 5 min bei 95°C unter Schütteln inkubiert.

Nach dem Abkühlen der Proben bei RT wurden diese kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge) und auf das Gel aufgetragen.

<u>Probenpuffer</u>		Endkonzentration
0,6 M Tris, pH 6.8	1 ml	4 %
10% SDS	4 ml	1 %
Glycerol	1 ml	10 %
Bromphenolblau	1 Tropfen	~ 1 %
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

## Präparation eines SDS-Minigels und Durchführung der Elektrophorese

Die Glasplatten wurde vor der Benutzung gründlich mit 70% Ethanol abgerieben. Dann wurden auf die Glasplatte mit den Abstandshaltern ("Spacer") die Gummidichtung und dann die Ohrenplatte gelegt, was mit zwei Klammern befestigt wurde. Anschließend wurde eine Markierung auf die Glasplatten aufgetragen, bis wohin das Trenngel zu gießen war. Das Trenngel wurde vorbereitet und gleich nach Zugabe von TEMED und APS zwischen die Platten gegossen. Um das Austrocknen des Gels zu verhindern und einen geraden Rand entstehen zu lassen, wurde das Trenngel vorsichtig mit 100 % Ethanol überschichtet. Nach etwa 30 min war die Polymerisation des Trenngels bei RT erfolgt. Das vorhandene Ethanol wurde entfernt, das Gel vorsichtig mit H<sub>2</sub>O gespült und das Trenngel danach mit dem Sammelgel überschichtet. Bevor das Sammelgel polymerisierte, wurde sofort nach dem Gießen in das Sammelgel ein Kamm gesteckt, dessen Zähne die Taschen zum späteren Auftragen der Proben bildeten. Das so entstandene Gel hatte eine Größe von 85 mm x 90 mm x 0,8 mm. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurden die Klammern, die Gummidichtung und der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut. In die obere und untere Kammer der Elektrophoresekammer wurde der Laufpuffer eingefüllt und die vorbereiteten Proben aufgetragen. In den ersten 30 min der Elektrophorese, wo sich die Proteine im Sammelgel konzentrieren, lief die Elektrophorese bei 10 mA. Wenn sich die Lauffront, markiert durch das Bromphenolblau im Probenpuffer, an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel befand, wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn sich die Lauffront am unteren Ende des Gels befand. Nach Ende des Laufs wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel abgetrennt und verworfen.

### Sammelgelpuffer

		Endkonzentration
Tris	7.2 g	0,6 M
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde auf pH 6.8 eingestellt und der Puffer steril filtriert

### Trenngelpuffer

		Endkonzentration
Tris	22,7 g	1,875 M
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde auf pH 8.8 eingestellt und der Puffer steril filtriert.

<u>Laufpuffer</u>		Endkonzentration
Tris	6 g	50 mM
Glycin	29 g	384 mM
10 % SDS	10 ml	0,1 %
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

#### SDS-Minigel (85 mm x 90 mm x 0,8 mm)

	Trenngel 7,5 %-ig	Trenngel 12 %-ig	Sammelgel 5 %-ig
Acryl-/Bisarylamid	1,74 ml	2,8 ml	450 µl
Trenngelpuffer	1,462 ml	1,462 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	270 µl
H <sub>2</sub> O	3,64 ml	2,58 ml	1,95 ml
10% SDS	69 µl	69 µl	27 µl
TEMED	2,2 µl	2,2 µl	3 µl
10% APS	34,5 µl	34,5 µl	53 µl

Nach der Zugabe von TEMED und APS muß der Ansatz kurz gerührt werden, damit die Polymerisation anschließend gleichmäßig verläuft.

#### Blotten der Proteine auf Nitrocellulose (NC)

Die Proteine aus dem Gel wurden durch einen Elektrotransfer auf NC übertragen. Auf Gelgröße zurechtgeschnittenes Whatmanpapier wurde zuerst in Anodenpuffer 1 oder 2 geschwenkt. Die für den Blot verwendete NC wurde vor Gebrauch zuerst für 1 min in H<sub>2</sub>O geschwenkt und kam anschließend für 10 min in Anodenpuffer 2. Das Gel wurde für 20 min in Kathodenpuffer gewippt. Um den Blot zusammen zu bauen, wurde als erstes auf den Boden der Blotkammer das Whatmanpapier gelegt, welches in Anodenpuffer 1 oder 2 geschwenkt wurde. Darauf wurde die NC gelegt und auf die NC kam dann das Gel. Diese wurde anschließend durch Whatmanpapier abgedeckt, welches in Kathodenpuffer getränkt wurde. Kathode und Anode der Apparatur bestanden aus zwei plastikumhüllten Graphitplatten. Dieser Aufbau wurde mit einem Gewicht (1 kg) beschwert und der Transfer schließlich mit 1,2 mA/ cm<sup>2</sup> Filterfläche durchgeführt (Abb.17). Die Transferzeit, in der die Proteine aus dem Gel auf die NC wanderten, betrug etwa 120 min. Nach Beendigung des Transfers wurde die NC mit Ponceau S angefärbt, eine Fotokopie des Blots angefertigt und die NC durch Waschen in TBS-Puffer wieder entfärbt.

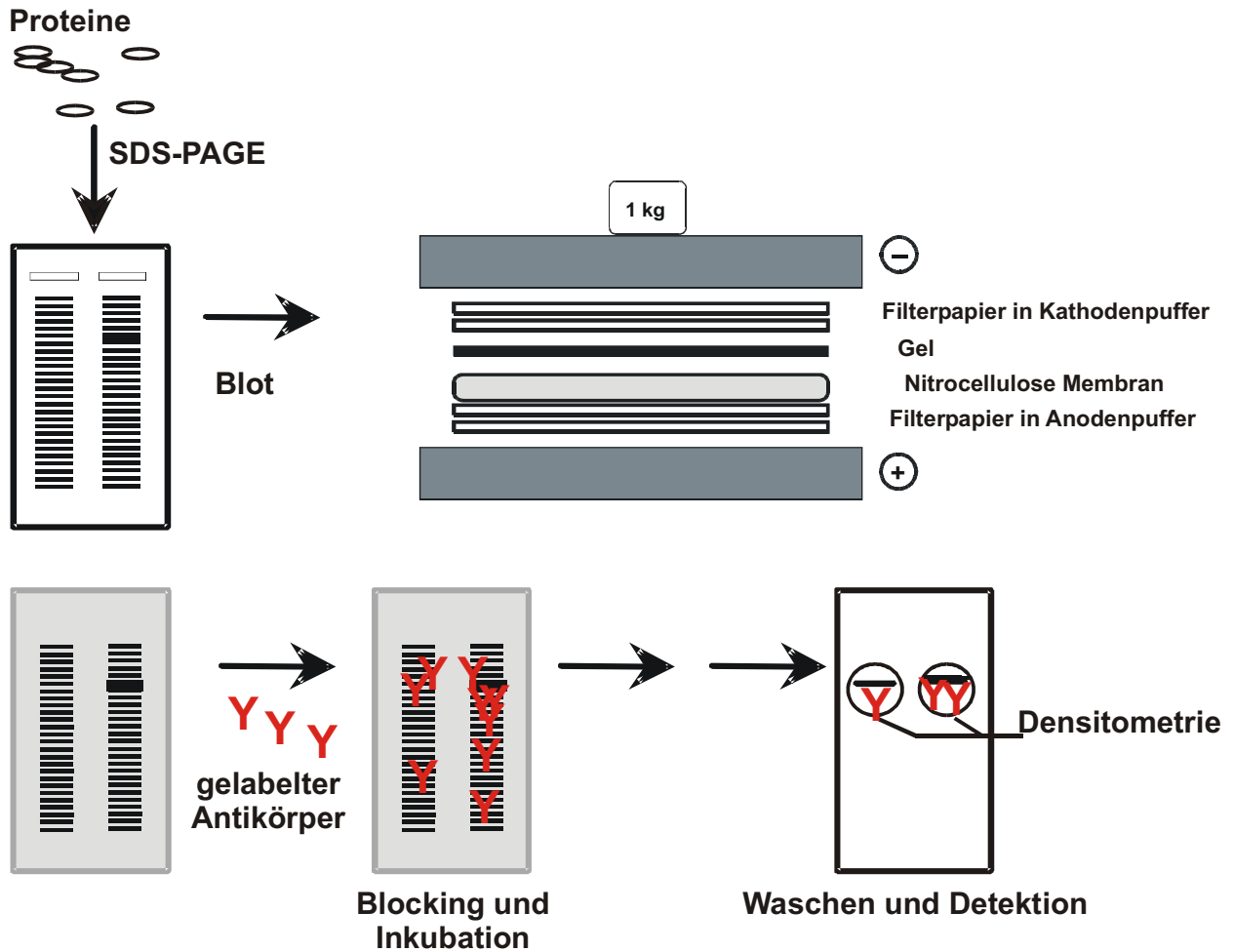


Abb. 17: Schematischer Aufbau eines Western-Blots

#### Anodenpuffer1

Tris, pH 11,3 (mit 2 M Borat)	18,2 g	Endkonzentration	300 mM
Methanol	100 ml		20 %
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml		

#### Anodenpuffer 2

Tris, pH 10.6	1,5 g	Endkonzentration	25 mM
Methanol	100 ml		20 %
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml		

#### Kathodenpuffer

Tris, pH 9	1,5 g	Endkonzentration	25 mM
Methanol	100 ml		20 %
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml		

<u>Ponceau S</u>		Endkonzentration
Ponceau S (Sigma P-3504)	1,25 g	
Methanol	200 ml	40 %
Essigsäure (konz.)	75 ml	15 %
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	

<u>Entfärber (TBS)</u>		Endkonzentration
Tris, pH 7.8	3,6 g	30 mM
NaCl	17,5 g	300 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

#### Inkubation des "Blots" mit Antikörpern

Nach dem Entfärben folgte für 1 Stunde bei RT eine Blockierungsreaktion mit 5 % Milchpulver in Waschpuffer, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Danach erfolgte die Bindungsreaktion mit den Primärantikörpern bei 4°C über Nacht. Die Antikörper wurden in der in Tabelle 2 angegebenen Konzentration mit 1 % Milchpulver verdünnt. Die AK-Lösung wurde in der Regel nach der Reaktion bei -20°C aufbewahrt und bis zu 3 mal wieder benutzt. Der NC-Filter wurde nach der ersten Inkubation 3 x für 15 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem zweiten, Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 1 Stunde bei RT (1:5000, in 5 % Milchpulver in Waschpuffer). Der sekundäre Antikörper ist gegen den Antikörper der Species, aus der der Primärantikörper hervorgegangen ist, gerichtet. Abschließend wurde der Filter noch einmal für 3 x 15 min in Waschpuffer gewaschen.

<u>Waschpuffer (mit Milchpulver)</u>		Endkonzentration
1 M Tris, pH 7.5	1 ml	10 mM
5 M NaCl	2 ml	100 mM
Tween 20	0,3 ml	0,1 %
Milchpulver	1 g	1 %
	bzw. 5 g	bzw. 5 %
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	



**Tabelle 2: Primärantikörper und Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse.**

Angegeben sind Name des Primärantikörpers, die eingesetzte Verdünnung und Verdünnung der Sekundärantikörper.

Primärantikörper gegen	Verdünnung	Sekundärantikörper
GSK-3 $\alpha/\beta$	1: 1000	Anti-Maus IgG-HRP, 1: 5000
V5	1: 5000	Anti-Maus IgG-HRP, 1: 5000
Flag M2	1: 1000	Anti-Maus IgG-HRP, 1: 5000
HIF1- $\alpha$	1: 2000	Anti-Maus IgG-HRP, 1: 5000
c-Myc	1: 1000	Anti-Maus IgG-HRP, 1: 5000
Gal4	1: 1000	Anti-Kaninchen IgG-HRP, 1: 5000
Phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$	1: 1000	Anti-Kaninchen IgG-HRP, 1: 5000
rPAI-1	1: 100	Anti-Kaninchen IgG-HRP, 1: 5000

Nachweis der gebundenen Antikörper über den Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper

Die Peroxidase-Reaktion wurde mit ECL (Enhanced Chemiluminescence) Plus Kit der Firma Amersham durchgeführt. Durch eine Peroxidase wird das Substrat, was in diesem Fall Luminol war, in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert. Das Luminol befindet sich durch die Oxidation in einem angeregten Zustand. Nach einer gewissen Zeit wurde durch die Emission von Licht wieder der Grundzustand erreicht.

Nach dem letzten Waschgang wurde 1 ml der gemischten Reagenzien des Kits auf den auf einer Frischhaltefolie liegenden Filter (ca. 50 cm<sup>2</sup>) gegeben. Der überstehende Rest der Folie wurde jetzt möglichst faltenfrei auf den benetzten Filter gelegt, wodurch sich die Flüssigkeit gleichmäßig verteilte. Der NC-Filter wurde 5 min mit dem ECL-Plus-Gemisch in Dunkelheit inkubiert und dann die überschüssige Flüssigkeit durch Rollen mit einer Glaspipette entfernt. Anschließend wurde sofort ein Film aufgelegt. Die Expositionszeit für den Film richtete sich nach der Stärke des Signals. Die Zeiten bewegten sich je nach Antikörper zwischen 30 sec und 5 min.

Erneute Verwendung des NC-Filters

In manchen Fällen wurde der NC-Filter mehrmals hintereinander verwendet und mit unterschiedlichen Primärantikörpern inkubiert. Dazu wurde der Filter nach der Detektion des zuvor verwendeten Antikörpers aus der Frischhaltefolie genommen und 2 x für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Blockierungsreaktion erfolgte mit 5% Milchpulver in Waschpuffer für 1 h bei RT. Anschließend wurde genauso wie bei der ersten Inkubation verfahren.

### 3.3.6 Luciferase Nachweis

Bei dem Luciferase Nachweis handelt es sich um eine enzymkatalysierte Chemilumineszenz. Das verwendete Luciferin der Firma P.J.K. (Klein-Blittersdorf) ermöglicht den Nachweis von Luciferase aus der nordamerikanischen Feuerfliege (*Photinus pyralis*) in transfizierten Zellen. Die enzymkatalysierte Chemilumineszenz beruht darauf, daß das Luciferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesiumionen durch die Luciferase-Einwirkung oxidiert. Dabei entsteht Licht der Wellenlänge von 562 nm. Durch ein Luminometer kann die Lichtintensität gemessen werden. Im Luminometer wurden automatisch zu 20 µl (3.1.5) des Überstandes aus den transfizierten Zellen 100 µl des Luciferase (Firefly)-Assay-Reagenz injiziert und die Reaktion 10 mal 2 sec gemessen. Dabei ist die Lichtintensität über 20 sec nahezu konstant und nimmt dann mit einer Halbwertszeit von 5 min ab.

Luciferase (Firefly)-Assay-Reagenz		Endkonzentration
0,5 M Tricine	4 ml	20 mM
(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> · Mg(OH) <sub>2</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	52 mg	1,07 mM
1 M MgSO <sub>4</sub>	267 µl	2,67 mM
DTT	514 mg	33,3 mM
D-Luciferin	13,2 mg	470 mM
0,1 M ATP	530µl	530 mM
Coenzym A	22,2 mg	270 mM
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Die Lösung wurde auf pH 7.8 eingestellt und in Aliquots unter Lichtabschluß bei -70°C gelagert.

### 3.3.7 Anreicherung von Expressionsproteinen in E.coli und Aufreinigung mittels Glutathion Sepharose 4B

Das hierzu benutzte System ist das Glutathion-S-Transferase-System (GST). Es ermöglicht die Expression, Aufreinigung und Detektion von Fusionsproteinen, die in E.coli exprimiert wurden.

#### Transformation

10 ng Plasmid wurden in 50 µl kompetenter BL-21-Zellen elektrisch transformiert (s. 3.2.2). Anschließend wurden 100 µl auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Vorkultur wurde 1 Kolonie in 5 ml LB-Medium + Ampicillin (60 mg/ml) aufgenommen und wiederum über Nacht bei 37°C geschüttelt.

### Expression

Die Expression erfolgte, indem 250 ml LB-Medium + Ampicillin (60 mg/ml) mit 1 ml dieser Übernachtskultur beimpft und bei 37°C, bis eine OD 600 nm von 0,4-0,5 erreicht ist, geschüttelt wurde. Anschließend induziert man die Kultur mit 0,1 mM IPTG für 3-5 h. Die Bakteriensuspension wird dann für 10 min bei 4000 rpm herunterzentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren.

### Analyse der exprimierten Proteine

Jeweils vor und nach der Induktion mit IPTG wurde eine Probe von 1 ml der Bakteriensuspension gezogen, bei 15000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert und mit 100 µl 1x-SDS-Probenpuffer + 10 mM DTT versetzt. Die Proben wurden dann bei 95°C für 5 min gekocht und kurz runterzentrifugiert. Zur SDS-Gelanalyse wurden jeweils 20 µl der Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel Coomassie gefärbt.

### Aufreinigung der Expressionproteine aus E.coli

Die Arbeiten wurden alle auf Eis durchgeführt:

Das Bakterienpellet, aus 250 ml beimpfter Übernachtskultur, wurde mit 10 ml Resuspensionspuffer resuspendiert, eine Spatelspitze Lysozym (10 mg) unter Rühren hinzugefügt und 15-30 min weitergerührt. Zu der Suspension wurden 300 mM NaCl gegeben und dann in 15 ml Falcontubes a 5 ml aliquotiert. Anschließend wurde die Suspension 40x 2 sec beschallt mit jeweils 3 sec Pause dazwischen (Microtipstellung 4-5). Nach der Beschallung wurde die Bakteriensuspension in ein Becherglas überführt, mit Triton X-100 in der Endkonzentration von 1 % versetzt und für 60 min gerührt. Die gesamte Suspension wurde dann für 10 min bei 13000 rpm herunterzentrifugiert. Die lösliche Fraktion der Fusionsproteine sollte nun im Überstand vorhanden sein. Die unlösliche Fraktion der Fusionsproteine sollte sich im Pellet befinden, welches in 10 ml PBS resuspendiert wurde. Von beiden Fraktionen wurden anschließend 100 µl Proben gezogen und zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### Aufreinigung der Expressionsproteine mittels Gluthation-Sepharose 4B

Vorbereitung der Gluthation-Sepharose 4B:

Man benötigt für 10 ml gelöstes Fusionsprotein 300 µl Beads, d.h. 380 µl einer 80 %igen Gluthation Sepharose 4B-Lösung. Diese wird 3-4 mal mit 1x PBS äquilibriert, zwischendurch 2 min bei 2000 rpm herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gelöste Fusionsprotein wird nun mit 1x PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt und zu den Beads gegeben. Die Protein-Sepharose-Lösung wird im Anschluß bei RT (bei Bedarf auch bei 4°C) für 2 h leicht geschüttelt (Wippe). Dieses Schütteln hat zur Folge, daß sich das GST-Fusionsprotein an die Sepharose-Beads koppelt. Danach wird die gesamte Lösung für 5 min bei 2000 rpm

abzentrifugiert. Der Überstand wird dann abgenommen und die Beads weitere 2 mal mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Von den Überständen wurde jeweils eine 100 µl Probe entnommen, die im Anschluß zur Kontrolle auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen wurde.

### Elution

Die Sepharose Beads wurden dann in 300 µl Elutionspuffer (50 mM Tris/ HCl pH 8.5, 20 mM GSH) resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt und 60 min bei RT geschüttelt (1400 rpm im Thermomixer). Anschließend wurden die Beads bei 2200 rpm herunterzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Dieser Vorgang wurde weitere 2-3 mal mit je 300 µl Elutionspuffer wiederholt. Von jedem Überstand wurde wieder eine 20 µl Probe entnommen, welche zur Kontrolle der Eluate auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen wurden. Da das Eluat rekombinantes Protein enthält, wurde es im Anschluß noch gegen einen Puffer nach Wahl, z.B. 10 mM Tris/ HCl pH 7.5, 10 % Glycerin dialysiert. Die Dialyse der Eluate erfolgte 2x gegen 500 ml Dialysepuffer für 1 h und anschließend über Nacht gegen 1000 ml Dialysepuffer

### Resuspensionspuffer

		Endkonzentration
1 M Tris/ HCl pH 8.0	2 ml	20 mM
0,5 M NaPP pH 7.0	10 ml	50 mM
0,25 M PMSF	0,4 ml	1 mM
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Kurz vor Gebrauch erfolgte die Zugabe 1 PH-Cocktailtablette auf 10 ml Resuspensionspuffer

### Dialyse-Puffer

		Endkonzentration
1 M Tris/ HCl pH 7.5	10 ml	10 mM
Glycerin	100 ml	10 %
H <sub>2</sub> O	ad 1 l	

### 3.3.8 GSK-Kinase-Assay

Kinasen sind Enzyme, die einen Phosphatrest von einem Adenosintriphosphat (ATP) auf unterschiedliche Substrate übertragen und diese mit einer energiereichen Phosphatgruppe versehen. Aus einer Kinasereaktion entstehen somit also ein phosphoryliertes Substrat und ein Adenosindiphosphat (ADP).

#### Reaktionsansatz

20 µg Substrat (GST-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Fusionsproteine)

10 µl Reaktionspuffer

10 µl GSK3 $\beta$  aktiv (50 mU)

10 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (1 µCi/µl)

ad 40 µl H<sub>2</sub>O

#### Reaktionspuffer

		Enkonzentration
0,2 M MOPS pH 7.4	0,4 ml	8 mM
0,5 M EDTA	4 µl	0,2 mM
0,1 M MgAz	1 ml	10 mM
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

#### Puffer zur Verdünnung von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (µCi/µl)

		Endkonzentration
1 M MgCl <sub>2</sub>	75 µl	75 mM
0,1 M ATP	5 µl	500 µM
0,2 M MOPS pH 7.2	100 µl	20 mM
0,1 M EGTA	50 µl	5 mM
10 mM Natriumorthovanadat	100 µl	1 mM
0,5 M DTT	2 µl	1 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1 ml	

Das [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP wurde mit dem Puffer kurz vor Gebrauch auf die Konzentration von 1 µCi/µl verdünnt.

Die Ansätze wurden für 30 min bei 30°C inkubiert und diese dann auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel Coomassie gefärbt. Im Anschluß daran wurde das Gel getrocknet. Hierzu wurde eine Seite mit Frischhaltefolie, die andere Seite mit 2 Lagen Whatmann-Papier belegt und das Gel mit dem Whatmann-Papier nach unten für etwa 1 h bei 70°C auf einen Geltrockner gelegt. Auf das getrocknete Gel wurde dann ein Phosphorimager-Screen aufgelegt.

### Phosphorimager

Um  $^{32}\text{P}$ -Substrate nachweisen zu können, benötigt man einen Phosphorimager. Bei dieser Methode wird das getrocknete radioaktive Gel für einige Stunden auf eine mit Europium beschichtete Platte gelegt. Dabei werden die Europium-Elektronen durch die radioaktive Strahlung auf ein höheres Energieniveau angehoben. Kehren nun diese Europium-Elektronen durch den Laserstrahl des Scanners auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, geschieht dies unter Ausstrahlung von Licht. Das Licht kann dann von einem Photomultiplier erfaßt, von einer speziellen Software (ImageQuant) verarbeitet und als Schwärzung dargestellt werden, so daß das resultierende Bild einem Autoradiographie-Film sehr ähnlich ist. Diese Art der Detektion von Radioaktivität ist sehr viel empfindlicher als die klassische Autoradiographie. Aus diesem Grund verkürzt sich die Expositionszeit des Gels auf ca. 1/10 der Zeit für die Filmexposition.

#### Coomassie-Färbelösung

		Endkonzentration
Coomassie R 250	0,5 g	0,1 %
Essigsäure	62,5 ml	12,5 %
Methanol	100 ml	20 %
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	

Die Lösung wurde anschließend filtriert.

#### Coomassie-Entfärber-Lösung

		Endkonzentration
Isopropanol	125 ml	25 %
Essigsäure	50 ml	10 %
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Aktivierung der PAI-1- und HIF-1 $\alpha$ -Expression in primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen**

Insulin kann die PAI-1-Genexpression über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (PKB) via dem Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  vermitteln. Da die GSK-3 ein Substrat der PKB ist, könnte diese eine regulatorische Funktion in der Signalkette besitzen. Es sollte daher zunächst untersucht werden, inwieweit Insulin und Lithiumchlorid (LiCl), ein Inhibitor der GSK-3, eine Aktivierung der PAI-1- oder HIF-1 $\alpha$ -Expression, hervorrufen können. Ein weiteres Target der PKB ist die Kinase mammalian target of rapamycin (mTOR), die durch Rapamycin (Rapa) gehemmt werden kann. Deshalb sollte auch gezeigt werden, ob die Insulin-abhängige Steigerung von PAI-1 und HIF-1 $\alpha$  eventuell durch mTOR vermittelt wird.

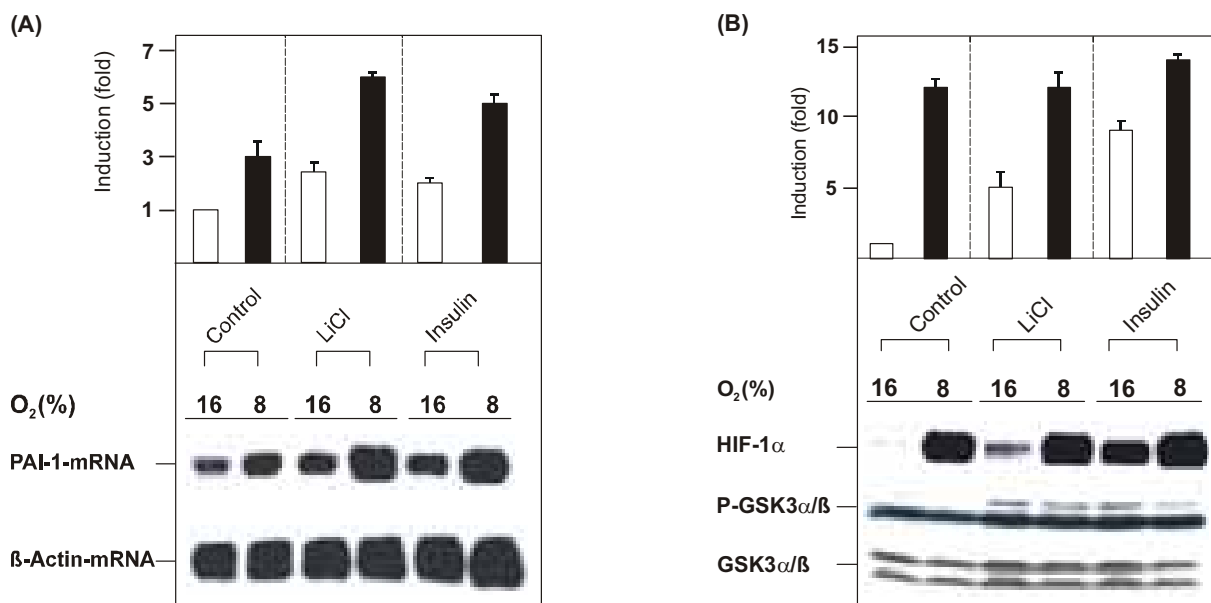
#### **4.1.1 Induktion der PAI-1-mRNA- und HIF-1 $\alpha$ -Protein-Spiegel durch Lithiumchlorid und Insulin in primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen**

Zur Untersuchung der Induktion der PAI-1-Expression wurden primäre Rattenhepatocyten für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Insulin und LiCl stimuliert und für weitere 4h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>) weiterkultiviert. Die PAI-1-mRNA-Spiegel wurden im Northern-Blot mit einer spezifischen PAI-1-Sonde gemessen.

Inkubation der Zellen unter venösem pO<sub>2</sub> steigerte die PAI-1-mRNA-Menge um das 3-fache im Vergleich zu arteriellem pO<sub>2</sub>. Es konnte weiter gezeigt werden, daß durch die Stimulation der primären Hepatocyten mit LiCl der PAI-1-mRNA-Spiegel unter arteriellem pO<sub>2</sub> 2,5-fach und unter venösem pO<sub>2</sub> 6-fach höher war als in den unbehandelten Zellen unter arteriellem pO<sub>2</sub>. Die Stimulation der primären Hepatocyten durch Insulin ergab, daß unter arteriellem pO<sub>2</sub> der PAI-1-Spiegel 2-fach und unter venösem pO<sub>2</sub> 5-fach induziert war. Somit konnte gezeigt werden, daß LiCl sowohl unter arteriellem pO<sub>2</sub> als auch unter venösen pO<sub>2</sub> den Insulineffekt imitieren kann (Abb. 18A).

Zur Untersuchung der Induktion der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel wurden HepG2-Zellen 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) kultiviert. Anschließend wurden die HepG2-Zellen mit LiCl und Insulin stimuliert und für weitere 4h unter arteriellem pO<sub>2</sub> und venösem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Proteinspiegel wurden im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$ , einem polyklonalen Antikörper gegen phospho-GSK3 $\alpha/\beta$  und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK-3 $\alpha/\beta$  gemessen.

Inkubation der HepG2-Zellen unter venösem  $pO_2$  steigerte die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge um das 12-fache. Die unter arteriellem  $pO_2$  kultivierten und mit LiCl stimulierten HepG2-Zellen enthielten das 5-fache an HIF-1 $\alpha$ -Protein im Vergleich zu den Kontrollzellen unter arteriellem  $pO_2$ . HepG2-Zellen, die mit Insulin stimuliert wurden, zeigten sogar einen Anstieg auf die 8-fache Menge HIF-1 $\alpha$ -Protein im Gegensatz zu den Kontrollzellen unter arteriellem  $pO_2$ . Bei den unter venösem  $pO_2$  kultivierten HepG2-Zellen steigerten LiCl und Insulin die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge um das 12-bzw. 14-fache im Vergleich zu den Kontrollzellen unter arteriellem  $pO_2$ . Somit konnte gezeigt werden, daß LiCl den Insulineffekt auch beim HIF-1 $\alpha$ -Protein imitieren kann (Abb. 18B).



**Abb. 18: Induktion der PAI-1- und HIF-1 $\alpha$ -Expression durch Insulin und LiCl.** (A) Primäre Rattenhepatocyten wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation transfiziert und unter arteriellem  $pO_2$  für 48h kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Insulin und LiCl stimuliert und für weitere 4h unter arteriellem  $pO_2$  (16%  $O_2$ ) und venösem  $pO_2$  (8%  $O_2$ ) weiterkultiviert. Aus diesen Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Für die Northern-Blot-Analyse wurden 20  $\mu$ g Gesamt-RNA eingesetzt und mit Digoxigenin-markierten rPAI-1- und  $\beta$ -Actin-RNA-Sonden hybridisiert. Nach Einsatz einer Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte die Autoradiographie. Die quantitative Auswertung wurde mit einem Videodensitometer durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen. (B) HepG2-Zellen wurden wie unter Abb. 18 (A) beschrieben kultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$ , einem polyklonalen Antikörper gegen phospho-GSK3 $\alpha/\beta$  und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert.



#### **4.1.2 Fehlender Einfluß von Rapamycin auf die Induktion der PAI-1-mRNA und des HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch venösen pO<sub>2</sub> in primären Rattenhepatocyten und HepG2-Zellen**

Zur Untersuchung der Induktion der PAI-1-Expression wurden primäre Rattenhepatocyten für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Insulin und Rapamycin stimuliert und für weitere 4h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>) weiterkultiviert. Die PAI-1-mRNA-Spiegel wurden im Northern-Blot mit einer spezifischen PAI-1-Sonde gemessen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Behandlung der primären Hepatocyten mit Rapamycin sowohl unter arteriellem pO<sub>2</sub> als auch unter venösem pO<sub>2</sub> keine signifikanten Änderungen der PAI-1-mRNA-Spiegel verursachte. Insulin hingegen führte, wie schon gezeigt, zu einer 2-fachen Steigerung der PAI-1-mRNA-Spiegel unter arteriellem pO<sub>2</sub> und zu einer Steigerung um das 4-fache unter venösem pO<sub>2</sub> (Abb. 19A).

Zur Untersuchung der Induktion der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel wurden HepG2-Zellen 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) kultiviert. Anschließend wurden die HepG2-Zellen mit Rapamycin und Insulin stimuliert und für weitere 4h unter arteriellem pO<sub>2</sub> und venösem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Proteinspiegel wurden im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$ , einem polyklonalen Antikörper gegen phospho-GSK3 $\alpha/\beta$  und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  gemessen.

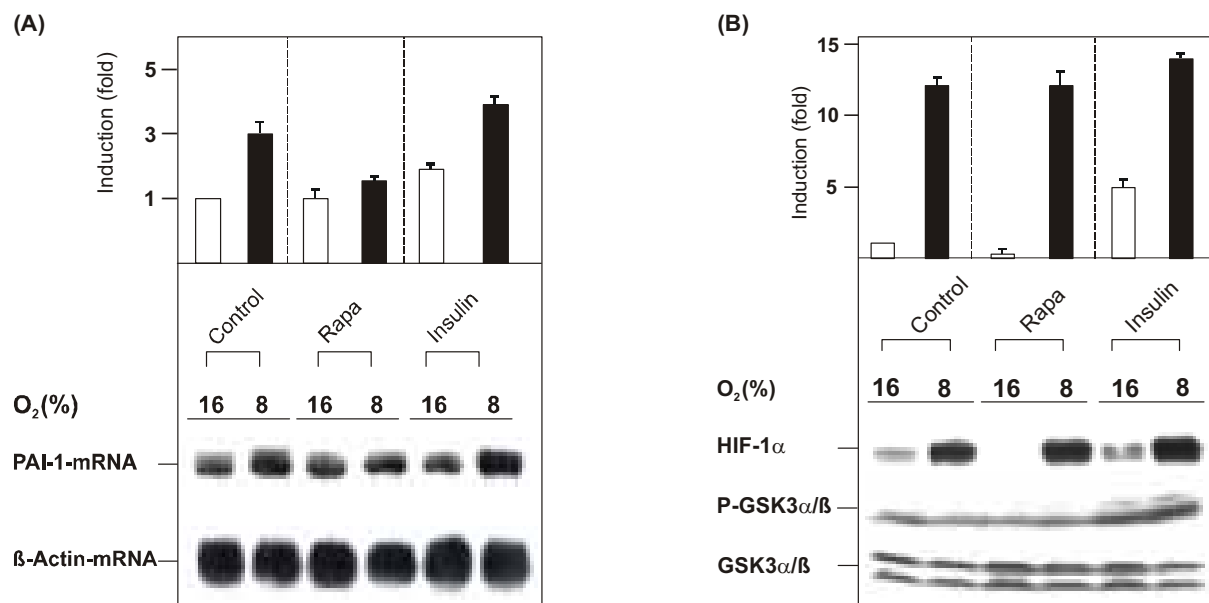
Die Kultur der HepG2-Zellen, die für 4h unter venösem pO<sub>2</sub> kultiviert wurde, steigerte die HIF-1 $\alpha$ -Menge um das 12-fache. Die Behandlung von HepG2-Zellen mit Rapamycin führte unter arteriellem pO<sub>2</sub> zu einer Reduktion des HIF-1 $\alpha$ -Proteins um die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollzellen. Unter venösem pO<sub>2</sub> hatte Rapamycin keinen Einfluß auf die Induktion des HIF-1 $\alpha$ -Proteins. Mit Insulin stimulierte Zellen hingegen wiesen, wie schon gezeigt, eine Steigerung des HIF-1 $\alpha$ -Spiegels um das 4,5-fache unter arteriellem pO<sub>2</sub> auf. Unter venösem pO<sub>2</sub> kultivierte HepG2-Zellen zeigten nach Behandlung mit Insulin eine Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge um das 12-bzw. 14-fache. Somit scheint eher die GSK-3 als mTOR eine Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel zu vermitteln (Abb. 19B).

#### 4.1.3 Hemmung der PAI-1-Promotor abhängigen Luciferase-Aktivität durch GSK-3 in HepG2-Zellen

Es sollte nun geprüft werden, inwieweit die GSK-3 über HIF-1 $\alpha$  und die Hypoxie-responsiven Elemente aus dem PAI-1-Promotor für die Regulation der PAI-1-Expression verantwortlich ist. Dazu wurden PAI-1-Promotor-Luciferase-Genkonstrukte mit Expressionsvektoren für die GSK-3 $\alpha$  und -3 $\beta$  cotransfiziert (Abb. 20).

Dabei konnte gezeigt werden, daß nach Cotransfektion von HepG2-Zellen mit dem Wildtyp pGI3PAI-766-Luc-Konstrukt und GSK-3 $\alpha$  die Luciferase-Aktivität auf 80% abfällt und mit GSK-3 $\beta$  sogar auf 20% reduziert wird.

Wurden die Zellen hingegen mit dem pGI3PAI-766M2-Luc-Konstrukt, in dem das Hypoxie-responsive-Element 2 mutiert war, und der GSK-3 $\alpha$  oder GSK-3 $\beta$  cotransfiziert wurde die Luciferase-Aktivität durch GSK-3 $\alpha$  um das 2,5-fache und durch GSK-3 $\beta$  um das 2,2-fache gesteigert (Abb. 20). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die GSK-3 $\alpha$  und -3 $\beta$  die PAI-1-Expression via HIF-1 $\alpha$  regulieren.



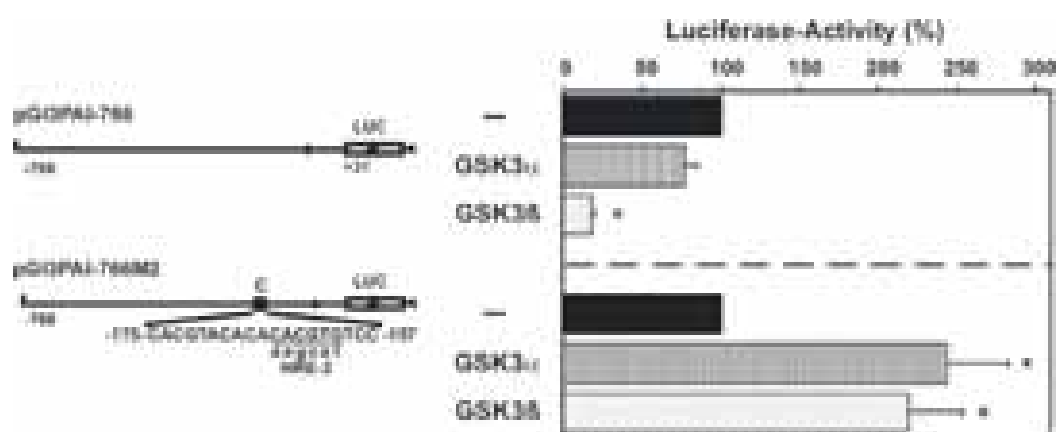
**Abb. 19: Induktion der PAI-1- und HIF-1 $\alpha$ -Expression durch Insulin, nicht durch Rapamycin.** (A) Primäre Rattenhepatocyten wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation transfiziert und unter arteriellem pO<sub>2</sub> für 48h kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Insulin und Rapamycin stimuliert und für weitere 4h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>) weiterkultiviert. Aus diesen Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Für die Northern-Blot-Analyse wurden 20  $\mu$ g Gesamt-RNA eingesetzt und mit Digoxigenin-markierten rPAI-1- und  $\beta$ -Actin-RNA-Sonden hybridisiert. Nach Einsatz einer Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte die Autoradiographie. Die quantitative Auswertung wurde mit einem Videodensitometer durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen. (B) HepG2-Zellen wurden wie unter Abb. 19 (A) beschrieben kultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$ , einem polyklonalen Antikörper gegen phospho-GSK3 $\alpha/\beta$  und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert. Rapa: Rapamycin.

#### 4.2 Modulation des HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegels durch Lithiumchlorid (LiCl), Cycloheximid (CHX) und Actinomycin D (Act. D)

Um herauszufinden, ob die LiCl-vermittelte Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel durch transkriptionelle oder translationale Mechanismen verursacht wird, wurde die Transkription mit Actinomycin D und die Translation mit Cycloheximid gehemmt. Actinomycin D hemmt die Transkription, indem es sich zwischen GC-Paare doppelsträngiger DNA schiebt, was zu einer Verformung der DNA und somit zu einer Blockierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II führt. Cycloheximid blockiert die Translation, indem es die Translokaseaktivität der eukaryoten Ribosomen hemmt.

Dazu wurden HepG2-Zellen für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit LiCl, CHX und Act. D allein und in Kombination behandelt und für weitere 4h unter arteriellem pO<sub>2</sub> und venösem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Die Proteinspiegel wurden im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$  und einem polyklonalen Antikörper gegen die Golgi-Membran gemessen (Abb. 21).

In den HepG2-Zellen, die mit LiCl stimuliert wurden, kam es zu einer Zunahme des HIF-1 $\alpha$  Proteins unter arteriellem pO<sub>2</sub>. Bei den HepG2-Zellen, die sowohl mit CHX als auch mit CHX und LiCl stimuliert wurden, konnte weder unter arteriellem pO<sub>2</sub> noch unter venösem pO<sub>2</sub> HIF-1 $\alpha$  nachgewiesen werden. Act. D hingegen zeigte nur unter arteriellem pO<sub>2</sub> eine Reduktion des HIF-1 $\alpha$ -Proteins um 50%. Unter venösem pO<sub>2</sub> konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen keine Veränderung festgestellt werden. Das gleiche Ergebnis erhielt man auch, wenn man die



**Abb. 20: Hemmung der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Promotor-Luciferase-Genkonstrukte nach Cotransfektion mit GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  in HepG2-Zellen.** HepG2-Zellen wurden mittels Calciumphosphat Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 5h mit Expressionsvektoren für GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , dem pGL3-PAI-766-Konstrukt, sowie deren Mutante pGL3-PAI-766 M2 cotransfiziert und nach einem Mediumwechsel für weitere 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. In jedem Experiment wurde die Luc-Aktivität mit pGL3-PAI-766-, sowie pGL3-PAI-766 M2 = 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte: \* signifikante Differenzen,  $p \leq 0.05$ . HRE: Hypoxie-responsives Element.

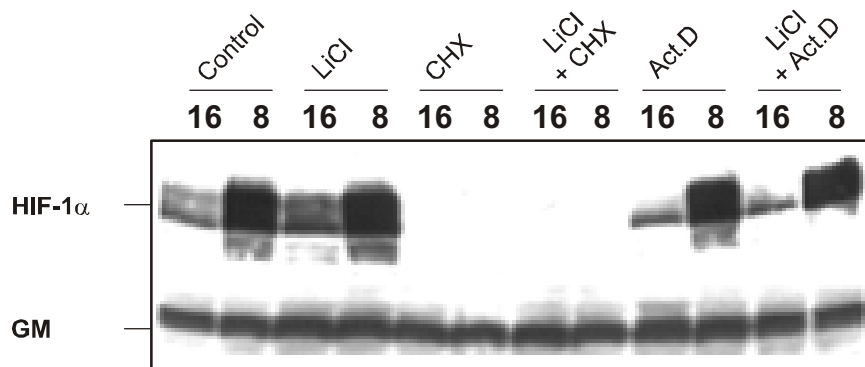
HepG2-Zellen mit Act. D und LiCl zusammen stimulierte. Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß die Regulation von HIF-1 $\alpha$  durch GSK-3 auf der Ebene der Translation oder Proteininstabilität erfolgen kann (Abb. 21).

#### 4.3 Regulation der HIF-1 $\alpha$ Proteinmenge durch GSK-3 in HepG2-Zellen

Es sollte in den folgenden Experimenten geprüft werden, inwieweit GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  direkt für eine Modulation der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel verantwortlich sind.

Dazu wurden HepG2-Zellen 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden dann mit GSK-3-Expressionsvektoren transfiziert und für weitere 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Anschließend erfolgte eine Kultivierung für 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>). Die Proteinspiegel wurden im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$ , einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  und einem polyklonalen gegen die Golgi-Membran gemessen.

Es konnte gezeigt werden, daß es bei der Transfektion mit GSK-3 $\alpha$  zu einer geringen Abnahme des HIF-1 $\alpha$ -Proteins unter venösem pO<sub>2</sub> im Vergleich zu den Kontrollzellen kam. Transfektion mit GSK-3 $\beta$  reduzierte die Menge des HIF-1 $\alpha$ -Proteins unter venösem pO<sub>2</sub> um 50%. Unter arteriellem pO<sub>2</sub> konnten weder mit GSK-3 $\alpha$  als auch mit GSK-3 $\beta$  eine Veränderungen im HIF-1 $\alpha$ -Spiegel in Bezug auf die Kontrollzellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis macht

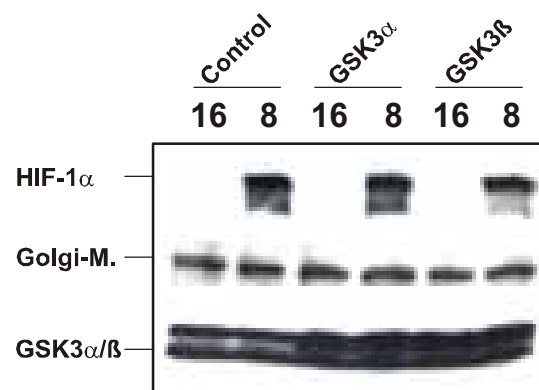


**Abb. 21: Modulation der HIF-1 $\alpha$ -Expression durch Lithiumchlorid, Actinomycin D und Cycloheximid.** HepG2-Zellen wurden für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit LiCl, CHX und Act.D allein und in Kombination stimuliert und für weitere 4h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>) weiterkultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$  und einem polyklonalen Antikörper gegen die Golgi-Membran analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GM: Golgi-Membran; LiCl: Lithiumchlorid; CHX: Cycloheximid; Act.D: Actinomycin D.

deutlich, daß die GSK-3 $\beta$  einen größeren Einfluß auf die Menge des HIF-1 $\alpha$ -Proteins nimmt als die GSK-3 $\alpha$  (Abb. 22).

#### 4.3.1 Regulation des Transaktivierungspotentials von HIF-1 $\alpha$ durch GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ in HepG2- und COS-7-Zellen

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, inwieweit sich eine Überexpression von GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  auf das Transaktivierungspotential und die Proteinstabilität von HIF-1 $\alpha$  auswirkt. Die Transaktivierungsfunktionen werden über N-terminale- (N-TAD) und C-terminale- (C-TAD) Transaktivierungsdomänen des HIF-1 $\alpha$ -Proteins vermittelt. Um modulierende Einflüsse auf die TAD`s zu untersuchen wurde ein sogenanntes "two hybrid-system" benutzt. Das erste Hybrid besteht aus einem Indikatorplasmid, in dem vorliegendem Fall ein Luciferase-Genkonstrukt, welches 5 Bindungsstellen für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4 als Enhancer vor dem Adenovirus E1B-Promotor enthält (5GE1B-Luc). Im zweiten Hybrid ist die DNA-Bindungsdomäne (Gal4DBD) des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 mit einer TAD von HIF-1 $\alpha$  fusioniert. Die Expression dieses Plasmids liefert ein Protein, das in Wechselwirkung zum Indikator-Genkonstrukt treten kann. Die Expression des Gal4DBD-HIF-1 $\alpha$ -TAD-Fusionsproteins erlaubt, über die Gal4DBD eine Wechselwirkung mit den Gal4 Bindungsstellen im p5GE1B-Luc-Konstrukt. So können Veränderungen, die sich an den TAD`s von HIF-1 $\alpha$  manifestieren direkt



**Abb. 22: Hemmung der Hypoxie-induzierten HIF-1 $\alpha$ -Expression durch GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ .** HepG2-Zellen wurden 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden dann mit GSK-3-Expressionsvektoren transfiziert und für weitere 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Anschließend erfolgte eine Kultivierung für 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>). Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HIF-1 $\alpha$ , einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  und einem polyklonalen Antikörper gegen die Golgi-Membran analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GSK-3: Glycogen-Synthase-Kinase-3; Golgi-M.: Golgi-Membran.

mit diesem System erfaßt werden. Um diese Einfüsse untersuchen zu können, wurden Genkonstrukte benutzt, die einerseits den Bereich von HIF-1 $\alpha$  von der N-TAD bis zur C-TAD und andererseits nur die N-TAD bzw. die C-TAD besaßen. Diese Genkonstrukte wurden dann mit dem Luciferase-Genkonstrukt (p5GE1B-Luc) und Vektoren für GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  cotransfiziert (Abb. 23).

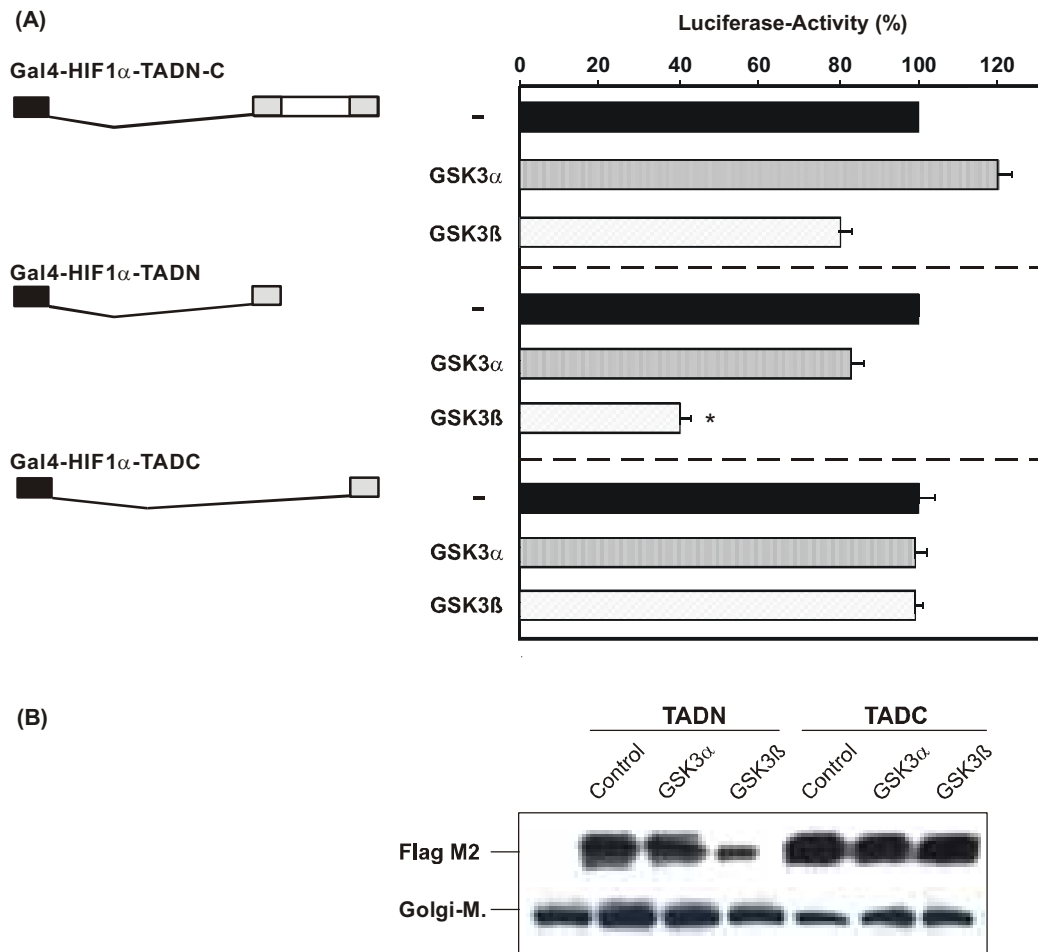
Die HepG2-Zellen wurden am Tag nach der Transfektion für weitere 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Wurden die Zellen mit p5GE1B-Luc-, pCMV2-Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-C- und GSK-3 $\alpha$ -Genkonstrukten cotransfiziert zeigte sich eine Steigerung der Luc-Aktivität auf das 1,2-fache, wohingegen es mit GSK-3 $\beta$  zu einer Reduktion der Luc-Aktivität auf 80% kam. Cotransfiziert man die HepG2-Zellen mit p5GE1B-Luc- und pCMV2-Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN kommt es bereits in Gegenwart von GSK-3 $\alpha$  zu einer Reduktion der Luc-Aktivität auf 80%, mit GSK-3 $\beta$  sogar zu einer Reduktion der Luc-Aktivität auf 40%. Die Cotransfektionen mit p5GE1B-Luc, pCMV2-Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADC, GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  zeigten keinen Einfluß auf die Luc-Aktivität. Es konnte somit gezeigt werden, daß sowohl GSK-3 $\alpha$  als auch GSK-3 $\beta$  den größten Einfluß auf die N-terminale Transaktivierungsdomäne von HIF-1 $\alpha$  haben (Abb. 23A).

Um dieses Ergebnis auf Proteinebene zu bestätigen, wurden COS-7-Zellen mit den Gal4-TAD-HIF-1 $\alpha$ -Genkonstrukten und den GSK-3 $\alpha$ - bzw. GSK-3 $\beta$ -Vektoren cotransfiziert. Die Zellen wurden am Tag nach der Transfektion für 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Die Proteinmengen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen FlagM2 und einem polyklonalen Antikörper gegen die Golgi-Membran gemessen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Proteinmenge durch GSK-3 $\alpha$  um etwa 20% reduziert wurde. Die Cotransfektion mit GSK-3 $\beta$  zeigte sogar eine Verminderung der Proteinmenge um 80%. Im Gegensatz dazu wurde die Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADC-Proteinmenge weder bei Cotransfektion mit GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  verändert (Abb. 23B). Somit konnten die Ergebnisse aus den Luciferase-Versuchen bestätigt werden, was darauf hinweist, daß die Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge durch GSK-3 an der N-TAD erfolgt.

#### 4.4 Modulation des gesamten humanen HIF-1 $\alpha$ Proteins durch die GSK-3 in HepG2-Zellen

In dieser Versuchreihe sollte geprüft werden, inwieweit die GSK-3 auch das gesamte humane HIF-1 $\alpha$ -Protein beeinflussen kann. Dazu wurde zum einen ein Konstrukt benutzt, was die gesamte cDNA des humanen HIF-1 $\alpha$ -Protein enthielt (pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$ ) und zum



**Abb. 23: Modulation des HIF-1 $\alpha$ -Transaktivierungspotentials und der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel unter arteriellem pO<sub>2</sub> nach Cotransfektion von GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Expressionsvektoren in HepG2- und COS-7-Zellen.** (A) HepG2-Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 5h mit Expressionsvektoren für GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADCN-, Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-, Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADC- und p5GE1B-Luc-Genkonstrukten cotransfiziert und bis 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. In jedem Experiment wurde die Luc-Aktivität in mit p5GE1B-Luc, Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADCN, Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN und Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADC transfizierten Zellen = 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte: \* signifikante Differenzen, p<sub>≤</sub> 0.05. (B) COS-7-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 16h mit Expressionsvektoren für HIF-1 $\alpha$ -TADN, HIF-1 $\alpha$ -TADC, GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  cotransfiziert und nach einem Mediumwechsel für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen Flag M2 und einem polyklonalen Antikörper gegen die Golgi-Membran analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GSK-3: Glycogen-Synthase-Kinase-3; Golgi-M.: Golgi-Membran.

anderen ein Konstrukt, welches drei Punktmutationen innerhalb der cDNA des humanen HIF-1 $\alpha$ -Proteins (pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  PPN) enthielt. Diese Mutationen sind kritisch für die Bindung des von-Hippel-Lindau-Proteins (VHL) und den Cofaktor p300 und somit für die Degradation von HIF-1 $\alpha$ , was bedeutet, daß ein derartig mutiertes Protein nicht mehr durch das Proteasom abgebaut werden sollte. Daher sollte untersucht werden, ob die GSK3-vermittelte Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel VHL unabhängig ist und ob Hemmung der Proteasomen mit MG132 einen Einfluß auf die GSK-3-vermittelte Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins hat.

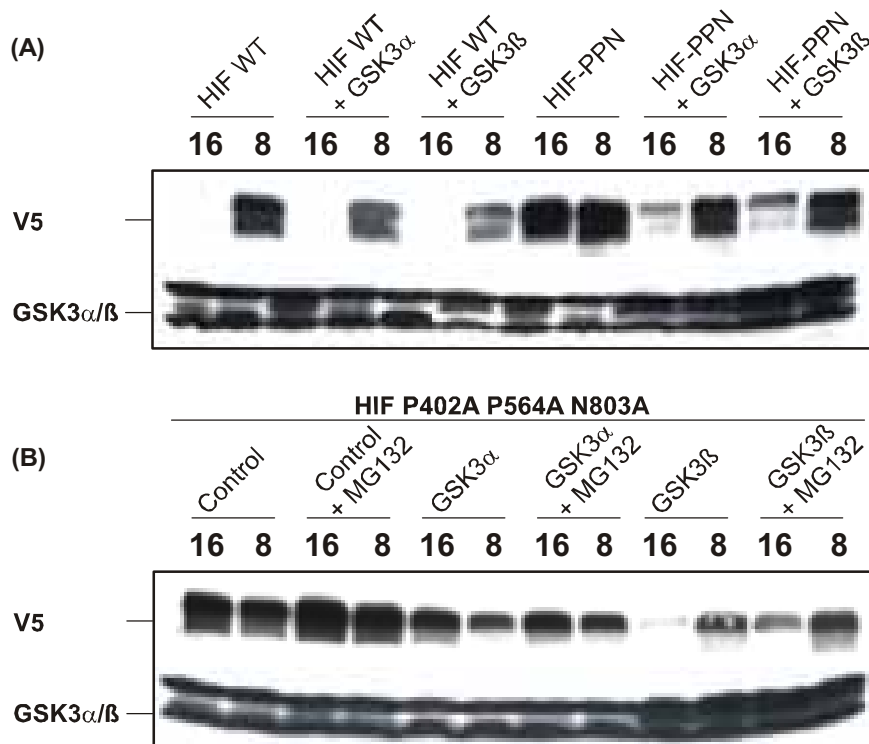
Zur Untersuchung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel wurden HepG2-Zellen für 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert und anschließend transfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>) weiterkultiviert. Die Proteinmengen wurden im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen V5 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  gemessen.

Es konnte gezeigt werden, daß es bei der Cotransfektion von pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  und GSK-3 $\alpha$  unter venösem pO<sub>2</sub> zu einer Abnahme des hHIF-1 $\alpha$ -Proteins um die Hälfte kommt. Bei Cotransfektion mit GSK-3 $\beta$  wird diese Abnahme noch gesteigert, so daß nur noch 20% der Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrollzellen zu messen sind. Unter arteriellem pO<sub>2</sub> ist bei der Cotransfektion sowohl mit GSK-3 $\alpha$  als auch mit GSK-3 $\beta$  keine Veränderung zu den Kontrollzellen festzustellen. Wird nun die pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  PPN Mutante transfiziert, die nicht durch VHL der proteasomalen Degradation zugeführt werden kann, kommt es zu einer Zunahme der Proteinmenge von HIF-1 $\alpha$ . Cotransfiziert man diese Mutante nun zusätzlich mit GSK-3 $\alpha$  wird insbesondere unter arteriellem pO<sub>2</sub> etwa wieder die gleiche Proteinmenge wie in den Kontrollzellen erreicht, während auch hier unter venösem pO<sub>2</sub> das HIF-1 $\alpha$ -Protein etwa so stabil ist wie in den Kontrollzellen. Cotransfektion der Mutante mit GSK-3 $\beta$  zeigt in etwa das gleiche Ergebnis wie mit der GSK-3 $\alpha$ , so daß besonders unter arteriellem pO<sub>2</sub> das HIF-1 $\alpha$ -Protein destabilisiert ist. Jedoch auch hier sind die HIF-1 $\alpha$ -Spiegel immer noch unter venösem pO<sub>2</sub> etwa 3-fach gesteigert (Abb 24A).

Wenn die HepG2-Zellen 4h vor der Ernte noch zusätzlich mit MG132 stimuliert wurden, konnte gezeigt werden, daß die HIF-1 $\alpha$  PPN Mutante sowohl unter arteriellem pO<sub>2</sub> als auch unter venösem pO<sub>2</sub> stabiler wird. Das heißt, daß trotz der Mutationen ein proteasomaler Abbau von HIF-1 $\alpha$  stattfindet, und daß die Degradation von HIF-1 $\alpha$  durch MG132 verlangsamt wird. Bei Cotransfektion von der HIF-1 $\alpha$  PPN Mutante und GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  kommt es sowohl unter arteriellem pO<sub>2</sub> als auch unter venösem pO<sub>2</sub> zu einer Abnahme des HIF-1 $\alpha$ -Proteins. Mit GSK-



3 $\beta$  ist das HIF-1 $\alpha$ -Protein sogar völlig degradiert. Auch unter venösem pO<sub>2</sub> kommt es bei Cotransfektion sowohl mit GSK-3 $\alpha$  als auch mit GSK-3 $\beta$  ebenfalls zu einer schnelleren Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins im Vergleich zu den Kontrollzellen. Durch Zugabe von MG132 für 4h kann dieser Effekt in beiden Fällen teilweise aufgehoben werden, daß heißt, das auch hier die Degradation von HIF-1 $\alpha$  verlangsamt wird. Zusammenfassend kann man sagen, daß hier gezeigt wurde, daß die GSK-3 die Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch die Proteasomen vermittelt, und daß diese Degradation von VHL unabhängig ist (Abb. 24B).



**Abb. 24: Modulation der HIF-1 $\alpha$ -Expression durch GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$  und MG132 in HepG2-Zellen.** (A) HepG2-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 16h mit HIF-1 $\alpha$ -, sowie deren Mutante HIF-1 $\alpha$  PPN-, GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Expressionsplasmiden cotransfiziert und nach einem Mediumwechsel bis 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Danach wurden die Zellen für 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>) weiterkultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen V5 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). (B) HepG2-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 5h mit HIF-1 $\alpha$  PPN-, GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Expressionsplasmiden cotransfiziert und wie unter Abb. 24 (A) beschrieben kultiviert. Vor der Ernte wurden die Zellen noch mit MG132 für 4h stimuliert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen V5 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GSK-3: Glycogen-Synthase-Kinase-3; Golgi-M.: Golgi-Membran.

#### 4.5 Modulation der HIF-1 $\alpha$ N-terminalen Transaktivierungsdomäne bei Punktmutation der GSK-3-Phosphorylierungsstellen in HepG2- und COS-7-Zellen

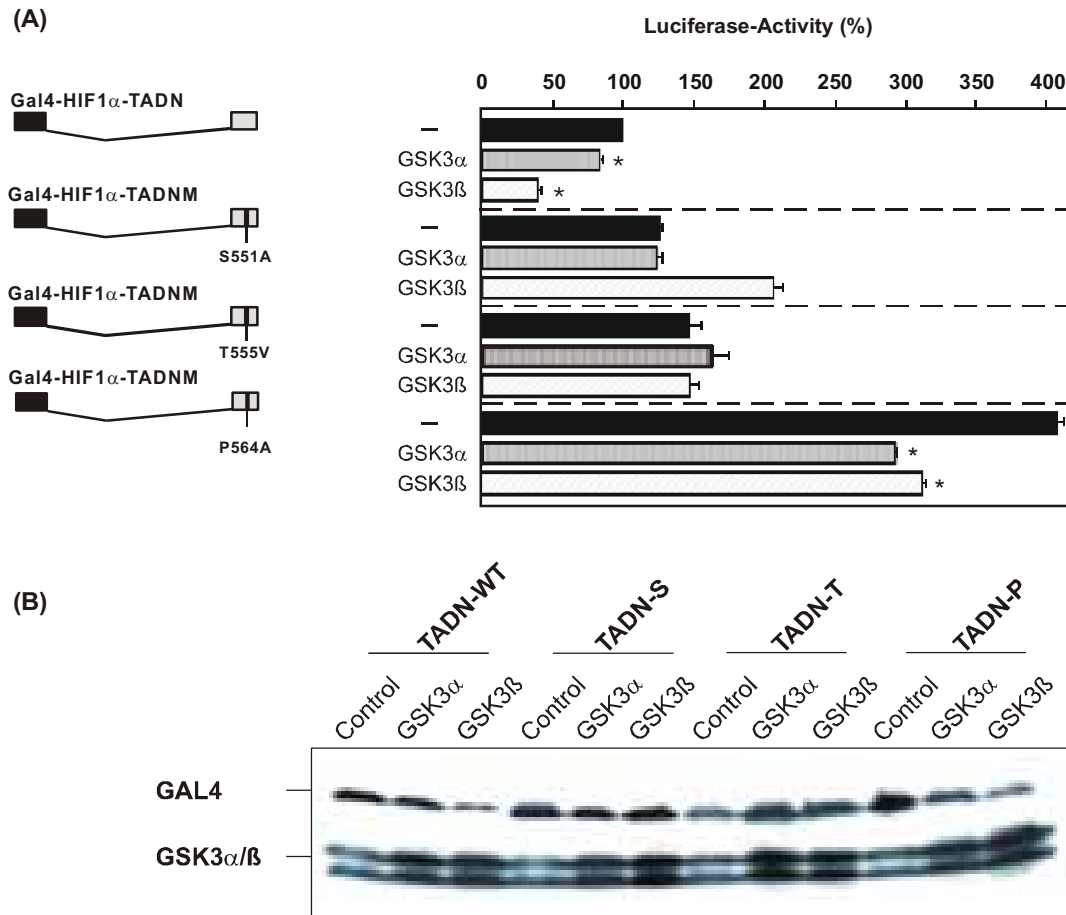
Die GSK-3 benötigt eine bestimmte DNA-Sequenz (SXXXS/T) um ihre Substrate zu phosphorylieren. Um mögliche Einflüsse der GSK-3 auf die N-terminale Transaktivierungsdomäne von HIF-1 $\alpha$  zu untersuchen, wurden putative Phosphorylierungsstellen, S551 und T555, innerhalb dieser TADN-Domäne mutiert. Zur Analyse der Auswirkungen dieser Mutationen wurde wieder das "two hybrid-system" benutzt.

Dazu wurden HepG2-Zellen 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert, dann mit den Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Konstrukten und den GSK-3-Vektoren cotransfiziert und für weitere 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Bei Cotransfektion des Wildtyps Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN mit GSK-3 $\alpha$  oder GSK-3 $\beta$  ist eine Reduktion der Luciferase-Aktivität um 20% bzw. 60% festzustellen. Bei Transfektion der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A Mutante erhöht sich die basale Luc-Aktivität 1,2-fach. Cotransfektion dieser Mutante mit GSK-3 $\alpha$  hatte keinen Einfluß auf die Luc-Aktivität, wohingegen GSK-3 $\beta$  die Luc-Aktivität um den Faktor 2,1 steigert. Expression der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN T555V Mutante steigert die Luc-Aktivität 1,5-fach. Cotransfiziert man diese Mutante zusätzlich noch mit GSK-3 $\alpha$  oder GSK-3 $\beta$  wird die Luc-Aktivität 1,6 bzw. 1,5-fach gesteigert. Bei Transfektion der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN P564A Mutante konnte eine Steigerung der Luc-Aktivität um den Faktor 4,1 festgestellt werden. Durch Cotransfektion dieser Mutante mit GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  verringert sich jetzt die Luc-Aktivität auf 2,8- bzw. 3,2-fach. Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß durch die S551A und T555V Punktmutationen der Effekt der Reduktion der Luc-Aktivität durch GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  aufgehoben werden kann (Abb. 25A).

Um dieses Ergebnis auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden COS-7-Zellen mit den oben genannten Konstrukten cotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Die Proteinmengen wurden im Western-Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gal4 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  gemessen.

Durch die Western-Blot Analyse konnte das Ergebnis aus dem Luciferase-Versuch bestätigt werden. Auch hier kommt es bei der HIF-1 $\alpha$  Wildtyp TADN zu einer Reduktion der Proteinmenge durch Cotransfektion mit GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$ , wohingegen bei der S551A Mutante und der T555V Mutante die Proteinmenge durch Cotransfektion mit GSK-3 nicht beeinflußt bzw. sogar gesteigert werden kann. Bei der P564A Mutante zeigt sich, daß zwar im

Vergleich zum Wildtyp die Proteinmenge gesteigert werden kann, aber diese Proteinmenge durch Cotransfektion mit GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  reduziert wird (Abb. 25B).



**Abb. 25: Modulation der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -Transaktivität und der Gal4-Spiegel nach Punktmutation unter arteriellem pO<sub>2</sub> durch GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  in HepG2- und COS-7-Zellen.** (A) HepG2-Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 5h mit Expressionsvektoren für GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Wildtyp-, sowie deren Mutanten Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A-, Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN T555V-, Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN P564A- und p5GE1B-Luc-Genkonstrukten cotransfiziert und bis 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. In jedem Experiment wurde die Luc-Aktivität in mit p5GE1B-Luc und dem Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Wildtyp transfizierten Zellen = 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte: \* signifikante Differenzen,  $p \leq 0.05$ . (B) COS-7-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 16h mit Expressionsvektoren für HIF-1 $\alpha$ -TADN-Wildtyp (TADN-WT), HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A (TADN-S), Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN T555V (TADN-T), Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN P564A (TADN-P), GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  cotransfiziert und nach einem Mediumwechsel für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gal4 und einem monoklonalen Antikörper gegen die GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GSK-3: Glycogen-Synthase-Kinase-3.

In der nächsten Versuchsreihe wurden die GSK-Phosphorylierungsstellen der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von HIF-1 $\alpha$  allein oder in Kombination untersucht. Dazu wurden die Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Konstrukte durch Doppel- und Dreifachmutationen verändert. Zunächst wurde hier wieder das "two hybrid-system" benutzt.

Bei Cotransfektion des Wildtyps Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN mit GSK-3 $\alpha$  oder GSK-3 $\beta$  ist in beiden Fällen eine Reduktion der Luciferase-Aktivität festzustellen; im Fall der GSK-3 $\alpha$  auf 80% und im Fall der GSK-3 $\beta$  auf 40%. Bei Transfektion der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A T555V Mutante erhöht sich die basale Luc-Aktivität 1,5-fach. Durch Cotransfektion dieser Mutante mit GSK-3 $\alpha$  steigert sich die Luc-Aktivität um den Faktor 1,2 und mit GSK-3 $\beta$  um den Faktor 1,3. Bei der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A P564A Mutante ist keine Veränderung der basalen Luc-Aktivität im Bezug auf die Kontrolle festzustellen. Cotransfiziert man diese Mutante zusätzlich noch mit GSK-3 $\alpha$  oder GSK-3 $\beta$  verändert sich die Luc-Aktivität ebenfalls nicht. Bei Transfektion der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A T555V P564A Mutante kann eine Steigerung der basalen Luc-Aktivität um den Faktor 2,3 festgestellt werden. Durch Cotransfektion dieser Mutante mit GSK-3 $\alpha$  erhöht sich die Luc-Aktivität 2,8-fach, wohingegen GSK-3 $\beta$  keinen Einfluß auf die Luc-Aktivität hat. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch die S551A T555V Doppelmutante und die S551A T555V P645A Dreifachmutante der Effekt der Reduktion der Luc-Aktivität durch GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  beim Wildtyp aufgehoben werden kann (Abb. 26A).

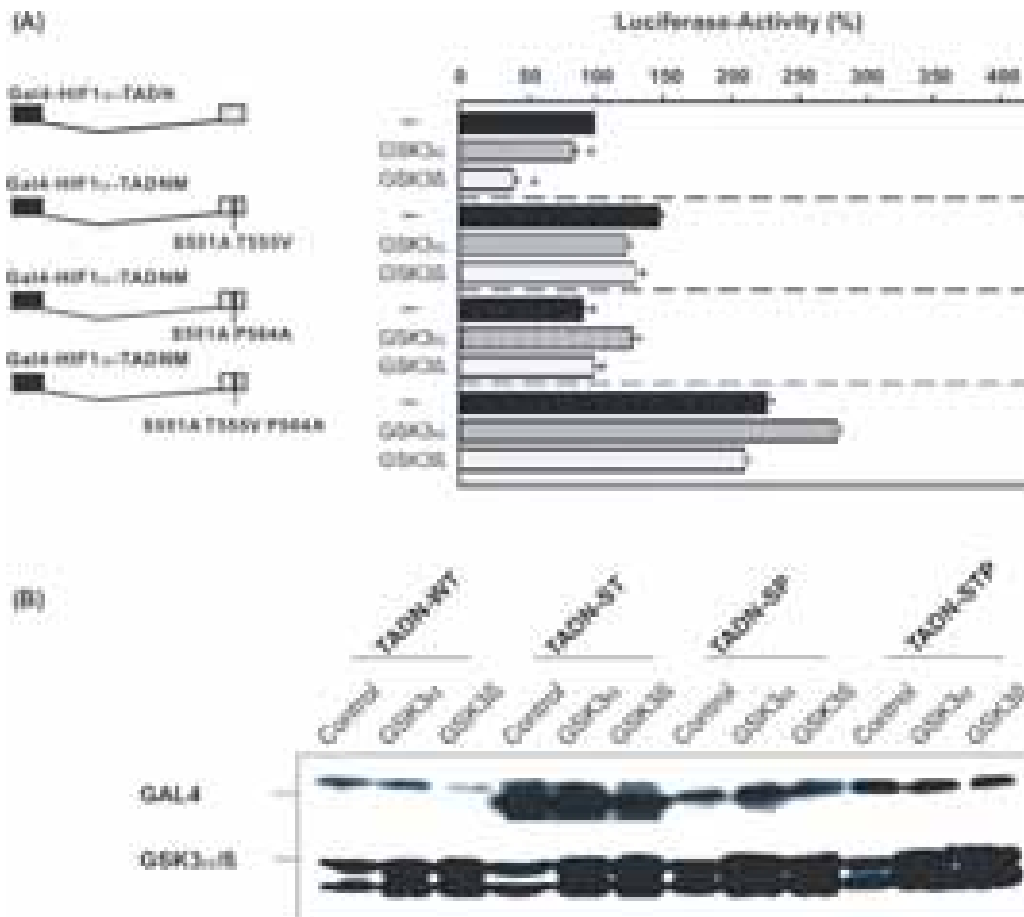
Um dieses Ergebnis auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden COS-7-Zellen mit den oben genannten Konstrukten cotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Die Proteinmengen wurden im Western-Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gal4 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  gemessen.

Durch die Western-Blot Analyse konnte das Ergebnis aus dem Luciferase-Versuch bestätigt werden. Auch hier kommt es beim Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN Wildtyp zu einer Reduktion der Proteinmenge bei Cotransfektion mit GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$ , wohingegen bei allen anderen Cotransfektionen die Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrollzellen gesteigert werden kann. Abweichend vom Luciferase-Versuch ist hier die beachtliche Steigerung der Proteinmenge bei Transfektion mit der S551A T555V Doppelmutante (Abb. 26B).

Da in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von HIF-1 $\alpha$  noch eine weitere putative GSK-3 Zielsequenz existiert, in der das Serin 589 phosphoryliert werden könnte, wurde diese noch zusätzlich mutiert. Dazu wurde eine Punktmutante (S589A) hergestellt und eine

Dreifachmutante (S551A T555V S589A), in der alle putativen Aminosäuren, die durch GSK-3 phosphoryliert werden könnten, mutiert waren.

Nach Transfektion der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S589A Mutante erhöhte sich die basale Luc-Aktivität 2,5-fach. Durch Cotransfektion dieser Mutante mit GSK-3 $\alpha$  war die Luc-Aktivität ebenfalls um den Faktor 2,6 und mit GSK-3 $\beta$  um den Faktor 2,5 im Vergleich zu der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN Wildtyp Kontrolle gesteigert. Bei Transfektion der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A T555V S589A Mutante war die basale Luc-Aktivität um den Faktor 2,7 erhöht. Durch Cotransfektion dieser Mutante mit GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  wurde die Luc-Aktivität auf das 3,5- bzw. 3,6-fache im



**Abb. 26: Modulation von Gal4-HIF-1 $\alpha$ -Transaktivität und der Gal4-Spiegel nach Doppel- und Dreifachmutation unter arteriellem pO<sub>2</sub> durch GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$  in HepG2- und COS-7-Zellen.** (A) HepG2-Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 5 h mit Expressionsvektoren für GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Wildtyp-, sowie deren Mutanten Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A T555V-, Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A P564A-, Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A T555V P564A- und p5GE1B-Luc-Genkonstrukten cotransfiziert und bis 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. In jedem Experiment wurde die Luc-Aktivität in mit p5GE1B-Luc und dem Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Wildtyp transfizierten Zellen = 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte: \* signifikante Differenzen, p $\leq$  0.05. (B) COS-7-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 16h mit Expressionsvektoren für HIF-1 $\alpha$ -TADN-Wildtyp (TADN-WT), HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A T555V (TADN-ST), Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A P564A (TADN-SP), Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A T555V P564A (TADN-STP), GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  cotransfiziert und nach einem Mediumwechsel für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gal4 und einem monoklonalen Antikörper gegen die GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GSK-3: Glycogen-Synthase-Kinase-3.

Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sowohl durch die S589A Punktmutante als auch durch die S551A T555V S589A Tripelmutante der Effekt der Reduktion der Luc-Aktivität durch GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  beim HIF-1 $\alpha$ -TADN Wildtyp aufgehoben werden kann (Abb. 27A).

Um auch dieses Ergebnis wieder auf Proteinebene zu bestätigen, wurden COS-7-Zellen mit den oben genannten Konstrukten cotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Die Proteinmengen wurden im Western-Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gal4 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  gemessen.

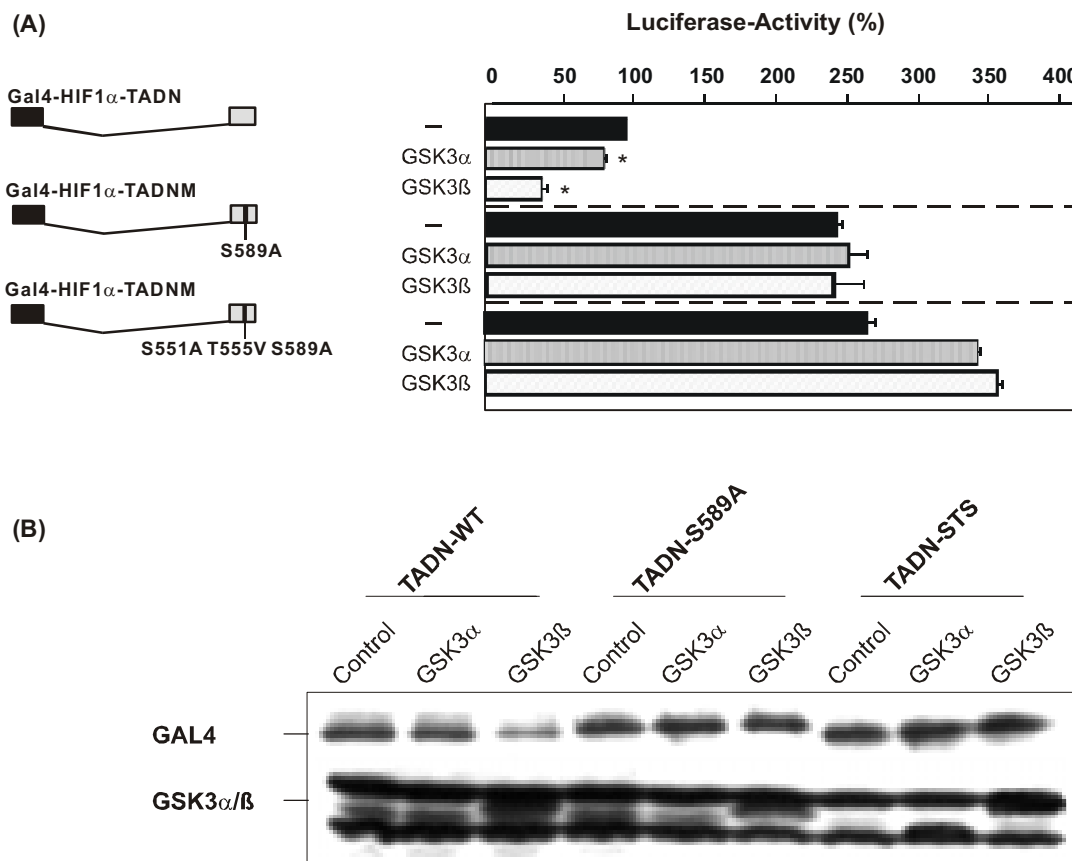
Auch in dieser Versuchsreihe konnte das Ergebnis aus dem Luciferase-Versuch auf Proteinebene bestätigt werden. Es kommt im Gegensatz zum Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN Wildtyp bei der Cotransfektion der Zellen mit der S589A Punktmutante und auch mit der S551A T555V S589A Tripelmutante zu keiner Reduktion der Proteinmenge durch GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  (Abb. 27B). Dadurch kann angenommen werden, daß durch diese Mutationen innerhalb der N-terminalen Transaktivierungsdomäne die Regulierung durch die GSK-3 ausgeschaltet wurde.

#### **4.6 Modulation des gesamten humanen HIF-1 $\alpha$ Proteins durch die GSK-3 in HepG2-Zellen**

Es sollte geprüft werden, inwieweit die Regionen der N-terminalen Transaktivierungsdomäne vom HIF-1 $\alpha$  entscheidend für die Regulation des gesamten humanen HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch die GSK-3 sind. Dazu wurde das pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$  Genkonstrukt, das die cDNA für das gesamte HIF-1 $\alpha$  enthält, an den äquivalenten Stellen mutiert (pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$  S551A, pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$  T555V und pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$  S551A T555V S589A). Die Proteinmengen wurden im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen c-Myc und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  gemessen.

Dazu wurden HepG2-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten cotransfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 48h weiterkultiviert. Es konnte gezeigt werden, daß es bei der Cotransfektion des HIF-1 $\alpha$  Wildtyps mit GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  zu einer Verringerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge kommt. Transfiziert man jedoch die HepG2-Zellen mit der pCMV-Myc-

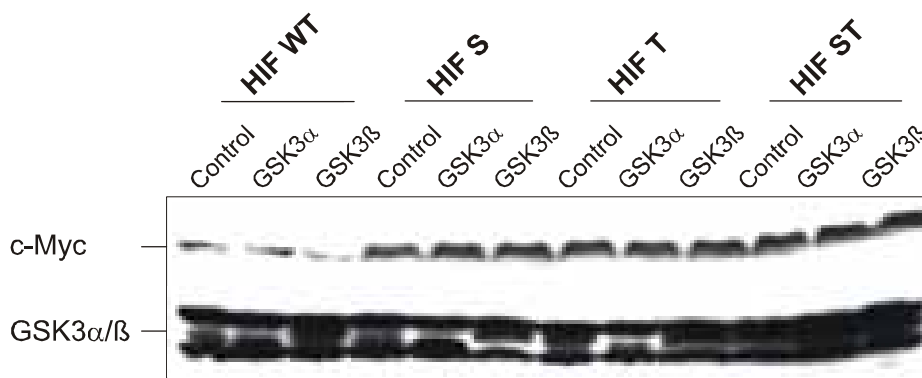
hHIF-1 $\alpha$  S551A Mutante kommt es zu einer Stabilisierung des Proteins. Diese Stabilisierung bleibt auch bei der Cotransfektion dieser Mutante mit GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  bestehen. Die gleichen Ergebnisse erzielt man auch bei Transfektion bzw. Cotransfektion der HepG2-Zellen mit den pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$  T555V und pCMV-Myc-hHIF-1 $\alpha$  S551A T555V Mutanten. Auch hier kann keine Reduktion in der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge bei Cotransfektion mit GSK-3 $\alpha$  oder GSK-3 $\beta$  festgestellt werden (Abb. 28).



**Abb. 27: Modulation von Gal4-HIF-1 $\alpha$ -Transaktivität und der Gal4-Spiegel nach Punkt- und Dreifachmutation unter arteriellem pO<sub>2</sub> durch GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$  in HepG2- und COS-7-Zellen.** (A) HepG2-Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 5 h mit Expressionsvektoren für GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Wildtyp-, sowie deren Mutanten Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S589A-, Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A T555V S589A- und p5GE1B-Luc-Genkonstrukten cotransfiziert und bis 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. In jedem Experiment wurde die Luc-Aktivität in mit p5GE1B-Luc und dem Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Wildtyp transfizierten Zellen = 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte: \* signifikante Differenzen,  $p \leq 0.05$ . (B) COS-7-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 16h mit Expressionsvektoren für HIF-1 $\alpha$ -TADN-Wildtyp (TADN-WT), HIF-1 $\alpha$ -TADN S589A (TADN-S589A), Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN S551A T555V S589A (TADN-STS), GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  cotransfiziert und nach einem Mediumwechsel für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gal4 und einem monoklonalen Antikörper gegen die GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL (enhanced chemiluminescence). HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GSK-3: Glycogen-Synthase-Kinase-3.

Da die bisherigen Experimente gezeigt haben, daß die Degradation der HIF-1 $\alpha$ -TADN durch GSK-3 nicht durch die für die VHL-Bindung wichtigen Prolinreste vermittelt wird, sollte weiter geprüft werden, ob eine "VHL"-resistente HIF-Mutante noch durch GSK-3 reguliert wird. Desweiteren sollte untersucht werden, inwieweit die Dreifachmutante des humanen HIF-1 $\alpha$  (pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  PPN) durch zusätzliche Doppel- und Dreifachmutationen in den GSK-3-Sites (pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  PSTPN und pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  PSTPSN) noch stabiler und resistenter gegen die Degradation durch GSK-3 gemacht werden kann. Die Proteinmengen wurden im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen V5 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  gemessen.

Dazu wurden HepG2-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten cotransfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 48h weiterkultiviert. Wurde der pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  Wildtyp zusätzlich mit GSK-3 $\alpha$  cotransfiziert, kam es zu einer Verringerung der Proteinmenge auf 80%, mit GSK-3 $\beta$  sogar auf 20% im Vergleich zu der Kontrolle. Die Transfektion mit der pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  PPN Mutante machte das Protein zwar stabiler, aber auch hier konnte durch Cotransfektion mit GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  eine Reduktion der Proteinmenge festgestellt werden. Erst bei der Cotransfektion mit der pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  PSTPN Mutante und der pcDNA3.1D/V5-hHIF-1 $\alpha$  PSTPSN Mutante konnte dieser Effekt der Reduktion durch GSK-3 aufgehoben werden und die zusätzlichen STS Mutationen führten zu einer nochmaligen Erhöhung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge (Abb. 29).



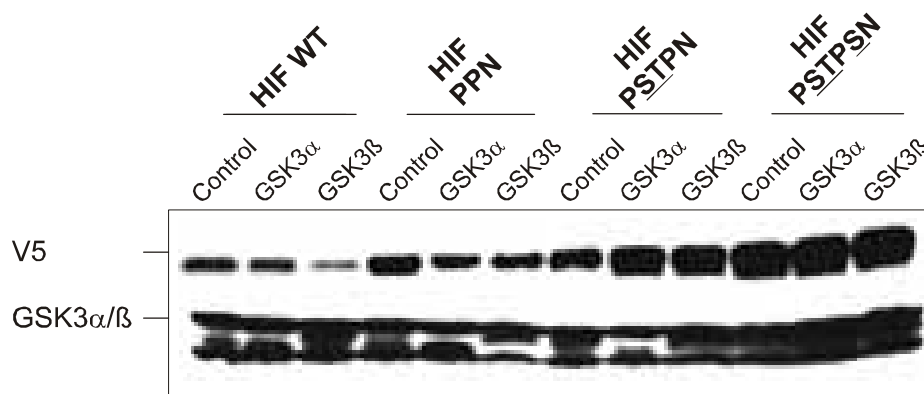
**Abb. 28: Aktivierung der HIF-1 $\alpha$ -Expression durch verschiedene Mutationen innerhalb der GSK-3-Sites.** HepG2-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 16 h mit HIF-1 $\alpha$ - Wildtyp (HIF-WT), sowie deren Mutanten HIF-1 $\alpha$  S551A (HIF-S)-, HIF-1 $\alpha$  T555V (HIF-T)-, HIF-1 $\alpha$  S551A T555V (HIF-ST)-, GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Expressionsplasmiden cotransfiziert und nach einem Mediumwechsel bis 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Danach wurden die Zellen für 24 h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>) kultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen c-Myc und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL. HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GSK-3: Glycogensynthase-Kinase-3.



#### 4.7 Phosphorylierung der HIF-1 $\alpha$ -TADN durch GSK-3

Die Transfektionsversuche und die Untersuchungen auf Proteinebene deuten darauf hin, daß S551, T555 und S589 durch GSK-3 phosphoryliert werden können. Es sollte daher untersucht werden, inwieweit die vorgenommenen Mutationen eine mögliche Phosphorylierung durch die aktive GSK-3 $\beta$  verhindern. Dazu wurde das Konstrukt pGEX-5X-1-TADN-HIF-1 $\alpha$  sowie dessen Derivate, die an verschiedenen Stellen mutiert waren (pGEX-5X-1-TADN-HIF-1 $\alpha$  S551A, pGEX-5X-1-TADN-HIF-1 $\alpha$  T555V, pGEX-5X-1-TADN-HIF-1 $\alpha$  S589A, pGEX-5X-1-TADN-HIF-1 $\alpha$  S551A T555V, pGEX-5X-1-TADN-HIF-1 $\alpha$  S551A T555V S589A) verwendet. Mit diesen Konstrukten wurden dann gereinigte GST-HIF-1 $\alpha$ -TADN-Proteine hergestellt, die dann in einen GSK-3-Kinase-Assay eingesetzt wurden.

Es konnte gezeigt werden, daß das TADN-HIF-1 $\alpha$ -Protein durch GSK-3 phosphoryliert werden konnte und das es bei der pGEX-5X-1-TADN-HIF-1 $\alpha$  S551A Mutante zu einer Verstärkung der Phosphorylierung kommt. Eine Steigerung an phosphoryliertem Protein erhält man auch bei den pGEX-5X-1-TADN-HIF-1 $\alpha$  T555V, TADN-HIF-1 $\alpha$  S589A, TADN-HIF-1 $\alpha$  S551A T555V Mutanten. Erst bei Verwendung des TADN-HIF-1 $\alpha$  S551A T555V S589A Proteins zeigt sich eine völlige Reduktion der Phosphorylierung. Entgegen den Erwartungen reichte es nicht aus, nur eine der vermeindlichen GSK-3 Phosphorylierungsstellen in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne auszuschalten. Erst bei Ausschaltung aller, kann die aktive GSK-3 $\beta$  das HIF-1 $\alpha$ -Protein nicht mehr phosphorylieren (Abb. 30).



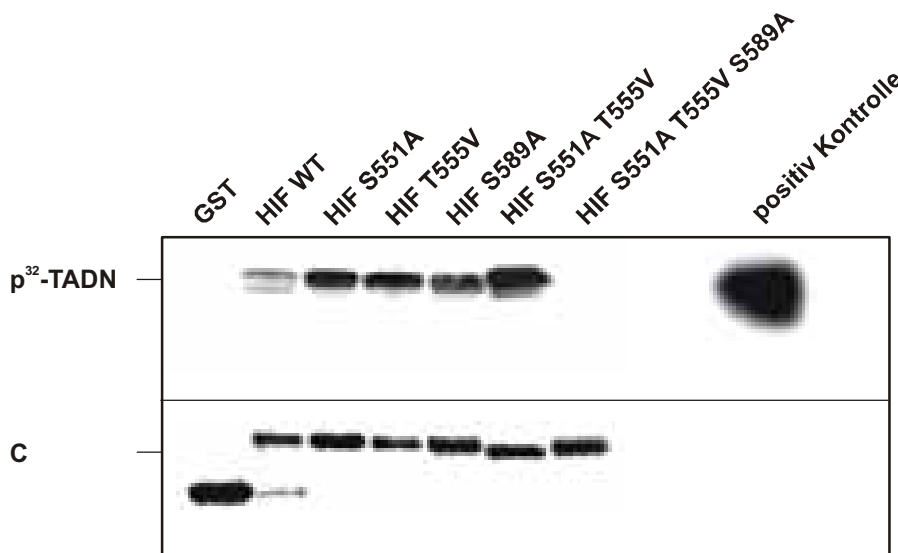
**Abb. 29: Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel durch Mutation der Hydroxylierungs- und GSK-3-Phosphorylierungsstellen.** HepG2-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 16h mit HIF-1 $\alpha$ - Wildtyp (HIF-WT), sowie deren Mutanten HIF-1 $\alpha$  P402A P564A N803A (HIF-PPN)-, HIF-1 $\alpha$  P402A S551A T555V P564A N803A (HIF-PSTPN)-, HIF-1 $\alpha$  P402A S551A T555V P564A S589A N803A (HIF-PSTPSN)-, GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Expressionsplasmiden cotransfiziert und nach einem Mediumwechsel bis 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Danach wurden die Zellen für 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> (16% O<sub>2</sub>) und venösem pO<sub>2</sub> (8% O<sub>2</sub>) weiterkultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen V5 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL. HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GSK-3: Glycogensynthase-Kinase-3.

#### 4.8 Modulation des HIF-2 $\alpha$ Proteins durch GSK-3 in HepG2- und COS-7-Zellen

Es sollte geprüft werden, ob sich die Ergebnisse, die sich für das HIF-1 $\alpha$ -Protein ergaben, auch auf das HIF-2 $\alpha$ -Protein übertragen lassen. Dazu wurde wieder das "two hybrid-system" benutzt.

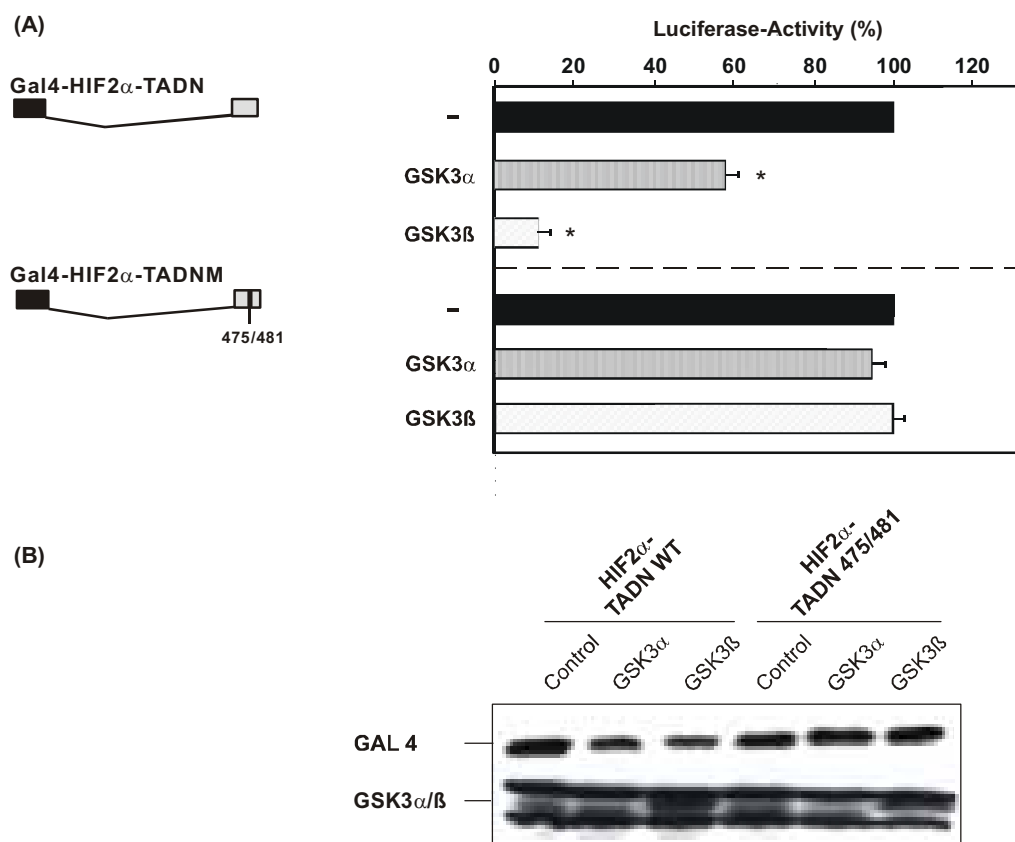
HepG2-Zellen wurden mit dem p5GE1B-Luc-, einem Gal4-HIF-2 $\alpha$ -TADN-, einem Gal4- HIF-2 $\alpha$ -TADN-Konstrukt, in dem die "GSK-Sites" mutiert waren und der GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  cotransfiziert. Die Zellen wurden am Tag nach der Transfektion noch für 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Nach Cotransfektion mit dem Gal4-HIF-2 $\alpha$ -TADN Wildtyp und GSK-3 $\alpha$  war die Luciferase-Aktivität auf 60%, mit GSK-3 $\beta$  auf 15% im Vergleich zu der Kontrolle reduziert. Im Gegensatz dazu fand bei der Cotransfektion mit der Gal4-HIF-2 $\alpha$ -TADN Mutante und der GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  keine signifikante Veränderung in der Luciferase-Aktivität statt (Abb. 31 A).

Um dieses Ergebnis auf Proteinebene zu bestätigen, wurden COS-7-Zellen mit den Gal4- HIF-2 $\alpha$ -TAD- Genkonstrukten und GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  cotransfiziert. Die Zellen wurden am Tag nach der Transfektion für 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Die Proteinmengen wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gal4 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  gemessen.



**Abb. 30: Phosphorylierung der HIF-1 $\alpha$ -TADN durch GSK-3.** Verwendet wurden aufgereinigte GST-HIF-TADN-Fusionsproteine aus E.Coli. 20  $\mu$ g dieser Fusionsproteine wurden mit 50 mU aktiver GSK-3 $\beta$  und 10  $\mu$ Ci ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP analysiert. Die Ansätze wurden zunächst für 30 min. bei 30°C inkubiert und anschließend auf ein 10 %iges Agarosegel aufgetragen. Als positiv Kontrolle diente ein Peptid mit bekannter GSK-3-Phosphorylierungsstelle. HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 $\alpha$ ; GST: Gluthation-S-Transferase; C: Coomassie-Färbung

Es konnte gezeigt werden, daß auf Proteinebene bei Cotransfektion von GSK-3 $\alpha$  mit dem Gal4-TADN-HIF-2 $\alpha$ -Genkonstrukt eine Reduktion der Proteinmenge um etwa 60% vorliegt. Die Cotransfektion von GSK-3 $\beta$  mit Gal4-HIF-2 $\alpha$ -TADN zeigte sogar eine Verminderung der Proteinmenge auf 20%. Bei Cotransfektion mit dem Gal4-HIF-2 $\alpha$ -TADN-Mutante-Genkonstrukt und den GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$ -Vektoren konnten wiederum keine signifikanten Veränderungen in der Proteinmenge im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden. Damit wurden zum einen die Ergebnisse aus dem Luciferase-Versuch bestätigt und zum anderen gezeigt, daß die Modulation, die die GSK-3 auf die N-terminale Transaktivierungsdomäne vom HIF-1 $\alpha$ -Protein ausübt, auch auf die N-terminale Transaktivierungsdomäne des HIF-2 $\alpha$ -Proteins zutrifft (Abb. 31B).



**Abb. 31: Modulation von HIF-2 $\alpha$ -Gal4-Genkonstrukten und der Gal4-Spiegel unter arteriellem pO<sub>2</sub> durch GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  in HepG2- und COS-7-Zellen.** (A) HepG2-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 5h mit Expressionsvektoren für GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , Gal4-HIF-2 $\alpha$ -TADN-Wildtyp, sowie deren Mutante Gal4-HIF-2 $\alpha$ -TADN 475/481 und p5GE1B-Luc-Genkonstrukten cotransfiziert und bis 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. In jedem Experiment wurde die Luc-Aktivität in mit p5GE1B-Luc und dem Gal4-HIF-2 $\alpha$ -TADN-Wildtyp transfizierten Zellen = 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte: \* signifikante Differenzen,  $p \leq 0.05$ . (B) COS-7-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 16h mit Expressionsvektoren für HIF-2 $\alpha$ -TADN-Wildtyp, sowie deren Mutante Gal4-HIF-2 $\alpha$ -TADN-475/481, GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  cotransfiziert und nach einem Mediumwechsel für 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und 100  $\mu$ g im Western-Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gal4 und einem monoklonalen Antikörper gegen GSK3 $\alpha/\beta$  analysiert.

#### 4.9 Modulation des HIF-3 $\alpha$ Proteins in HepG2-Zellen

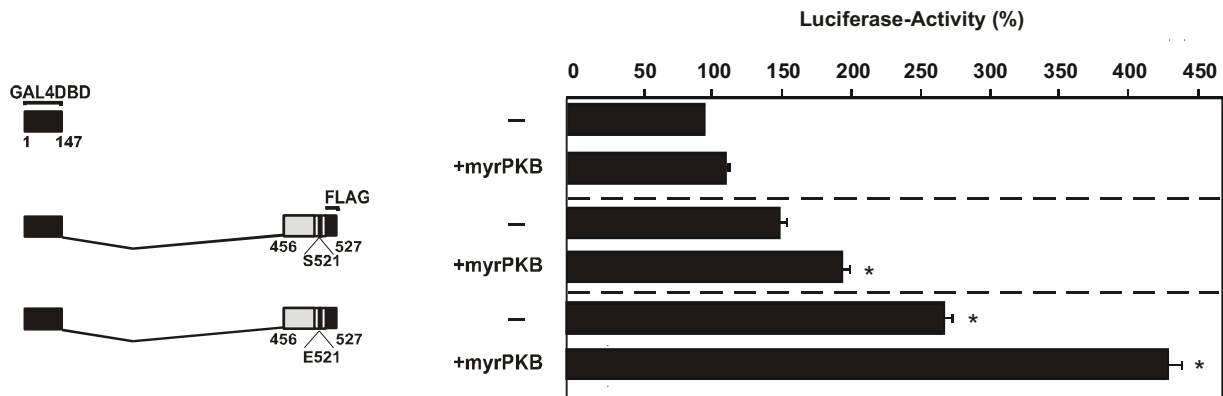
Im Gegensatz zu HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  enthält das HIF-3 $\alpha$  Protein keine Phosphorylierungsstellen für die GSK-3. Vielmehr könnte HIF-3 $\alpha$  ein direktes Substrat der PKB sein, da im Bereich der Aminosäure Serin 521 eine putative PKB-Phosphorylierungsstelle lokalisiert ist.

Im Folgenden sollte somit ansatzweise geprüft werden, inwieweit das HIF-3 $\alpha$ -Protein durch die Proteinkinase B moduliert werden kann. Hierbei wurde auch wieder das "two hybrid-system" benutzt, in dem auch eine HIF-3 $\alpha$ -Mutante verwendet wurde, die in dem putativen PKB Bereich mutiert war.

HepG2-Zellen wurden mit dem p5GE1B-Luc-Genkonstrukt, den verschiedenen Gal4-TAD-HIF-3 $\alpha$  und einem Proteinkinase B-Genkonstrukt cotransfiziert. Die Zellen wurden am Tag nach der Transfektion noch für 24h unter arteriellem pO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Als Kontrolle diente ein Vektor der nur die Gal4DBD enthielt. Wurde zusätzlich noch eine konstitutiv aktive PKB in die Zellen transfiziert, zeigte sich ein Anstieg in der Luciferase-Aktivität um den Faktor 1,2 (Abb. 32).

Bei Cotransfektion von PKB mit dem p5GE1B-Luc-Genkonstrukt und dem Wildtyp Gal4-HIF3 $\alpha$ -TAD-Konstrukt mit dem S521 erhöhte sich die Luciferase-Aktivität 1,5-fach. Wird nun wieder PKB cotransfiziert, war die Luciferase-Aktivität 2-fach gesteigert. Cotransfektionen mit dem p5GE1B-Luc-Genkonstrukt und der Gal4-HIF-3 $\alpha$ -TAD-E521 Mutante zeigt die Luciferase-Aktivität eine Steigerung um den Faktor 2,7. Auch hier kann die Luciferase-Aktivität durch zusätzliche Cotransfektion von PKB nochmals um den Faktor 4,3 im Vergleich zu den Kontrollzellen gesteigert werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß das Serin 521 eine Funktion für die Transaktivierung von HIF-3 $\alpha$  hat, und daß eine putative Phosphorylierung von S521 durch PKB die HIF-3 $\alpha$  Stabilität negativ regulieren würde. Zusätzlich zeigen die Daten, daß weitere PKB-vermittelte Modifikationen am HIF-3 $\alpha$  stattfinden, die zu einer gesteigerten Aktivität von HIF-3 $\alpha$  führen.



**Abb. 32: Aktivierung von Gal4-HIF-3 $\alpha$ -Genkonstrukten unter arteriellem pO<sub>2</sub> nach Cotransfektion von PKB-Expressionsvektoren in HepG2-Zellen.** HepG2-Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Copräzipitation unter arteriellem pO<sub>2</sub> 5h mit Expressionsvektoren für PKB, Gal4-HIF-3 $\alpha$ -TADN S521-Wildtyp, sowie deren Mutante Gal4-HIF-3 $\alpha$ -TADN S521E und p5GE1B-Luc-Genkonstrukten cotransfiziert und bis 48h unter arteriellem pO<sub>2</sub> kultiviert. In jedem Experiment wurde die Luc-Aktivität in mit p5GE1B-Luc und dem Gal4-HIF-3 $\alpha$ -TADN-Wildtyp transfizierten Zellen = 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: Student's t-Test für gepaarte Werte: \* signifikante Differenzen,  $p \leq 0.05$ . HIF-3 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer Faktor-3 $\alpha$ ; PKB: Proteinkinase B; myr: myristoyliert

## 5. Diskussion

### 5.1 Insulin-vermittelte Aktivierung der PAI-1-Genexpression über PI3K, PKB und den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Insulin die PAI-1-mRNA-Menge und die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie steigerte. Neben der PAI-1 Genexpression kann auch die vieler anderer Gene, die durch Hypoxie reguliert werden, wie Erythropoetin (Masuda et al., 1997), vascular endothelial growth factor (VEGF) (Sato et al., 1995) und glykolytische Enzyme (Granner et al., 1990), durch Insulin induziert werden (Loike et al., 1992; Semenza et al., 1996; Melillo et al., 1995). Unter Hypoxie wird über Hypoxie-responsive Elemente (HRE) im Ratten-PAI-1-Promotor die PAI-1-Genexpression, durch Bindung von HIF-1, induziert. Die Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge konnte dabei durch den PI3K-Hemmstoff Wortmannin und LY294002 sowie durch Überexpression einer Kinase-defizienten PKB-Variante aufgehoben werden (Kietzmann et al. 2003). Reziprok konnte die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge durch Expression einer konstitutiv aktiven PKB gesteigert werden. Diese Befunde decken sich auch mit früheren Studien, die gezeigt haben, daß die PI3K und die PKB eine große Rolle bei der Regulation der HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung unter Hypoxie spielen (Mazure, et al., 1997; Hirota et al., 2001; Zhong et al., 2000; Chandel et al., 2000; Zundel et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, daß HIF-1 $\alpha$  kein direktes Substrat der PKB ist (Arsham et al., 2002), aber die Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit durch PKB erfolgen kann. Unabhängig davon konnte gezeigt werden, daß unter Hypoxie der PI3K/PKB Signalweg für die Inaktivierung des PKB Substrates GSK-3 verantwortlich ist (Chen et al., 2001). Daraus kann man den Schluß ziehen, daß die GSK-3, als ein „downstream target“ der PKB, darin involviert sein könnte.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, daß der GSK-3 Hemmstoff Lithiumchlorid (LiCl) die Hypoxie- und Insulin-vermittelte PAI-1-Induktion imitieren konnte (Abb. 18). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin (Rapa) die Hypoxie-abhängige Induktion der PAI-1-mRNA- und der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge kaum beeinflusst wurde (Abb. 19). Diese Daten deuten darauf hin, daß die GSK-3 über eine Regulierung der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel an der Insulin-induzierten PAI-1-Expression beteiligt sein könnte. Dies wurde weiterhin durch die Befunde unterstützt, die zeigen, daß nach Cotransfektionen von GSK-3 $\alpha$  als auch GSK-3 $\beta$  mit PAI-1-Promotor-Luc-Genkonstrukten die Luc-Aktivität gesenkt war, und daß dieser Effekt völlig aufgehoben war, wenn ein PAI-1-Konstrukt benutzt wurde, welches in einem Hypoxie-responsiven Element (HRE) mutiert war. Es scheint also, daß die GSK-3 $\alpha$  und die GSK-3 $\beta$  die PAI-1-Expression über HIF-1 $\alpha$  regulieren können (Abb. 20).

## 5.2 Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel durch GSK-3 $\alpha$ und GSK-3 $\beta$ auf Ebene der Translation und Proteinstabilität

Neben Insulin wird HIF-1 $\alpha$  auch durch insulin-like growth factors (IGF) (Stiehl et al., 2002; Zelzer et al., 1998; Feldser et al., 1999), Interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Thornton et al., 2000; Hellwig-Burgel et al., 1999), Angiotensin II (Richard et al., 2000) und Thrombin (Görlach et al., 2001) unter normoxischen Bedingungen aktiviert. Wie Hypoxie regulieren diese Stimuli, insbesondere Insulin die HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel, die dann zur gesteigerten HIF-1 DNA-Bindungsaktivität und HIF-1 Transkriptionsaktivität beiträgt. In primären Rattenhepatocyten zeigte eine Behandlung mit Insulin für die Dauer von 1 h keinen Effekt auf die Transkription der HIF-1 $\alpha$ -mRNA. Somit scheint der Effekt von Insulin auf der translationalen Ebene oder auf der Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Stabilität bzw. Degradation zu liegen. Einige Daten deuten darauf hin, daß Insulin HIF-1 $\alpha$  durch einen Translations-abhängigen Mechanismus reguliert. Es scheint, daß die HIF-1 $\alpha$  Synthese durch die Aktivierung des eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B) durch den PI3K/ PKB/ GSK-3-Signalweg stimuliert wird (Welsh et al., 1997; Welsh et al., 1998). Es könnte allerdings auch sein, daß der PI3K/ PKB/ mTOR-Signalweg und die Phosphorylierung des eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein-1 (4E-BP-1) in die Insulinwirkung auf HIF-1 involviert ist (Sonenberg et al., 1998; Takata et al., 1999; Lawrence et al., 1997, Treins et al., 2002).

Die Befunde dieser Arbeit ergänzen diese Ergebnisse und zeigen, daß möglicherweise ein GSK-3-vermittelter translationaler Effekt vorliegt, wenn die GSK-3 durch LiCl gehemmt wird. Wurden HepG2-Zellen mit LiCl behandelt kam es zu einer HIF-1 $\alpha$ -Stabilisierung unter arteriellem pO<sub>2</sub>. Im Gegensatz dazu konnte bei den HepG2-Zellen, die mit Cycloheximid behandelt wurden sowohl unter arteriellem pO<sub>2</sub> als auch unter venösem pO<sub>2</sub> kein HIF-1 $\alpha$ -Protein im Western-Blot mehr nachgewiesen werden, was dafür spricht, daß mindestens die de-novo Proteinsynthese mit an diesem Effekt beteiligt ist (Abb. 21).

Ein ähnlicher Effekt konnte gezeigt werden, wenn GSK-3 $\alpha$ - und GSK-3 $\beta$ -Expressionsvektoren in HepG2-Zellen transfiziert wurden. So kam es in transfizierten HepG2-Zellen zu einer Reduktion des HIF-1 $\alpha$ -Proteins von 50 % unter venösem pO<sub>2</sub>, nach Transfektion mit GSK-3 $\beta$ . GSK-3 $\alpha$  hatte keinen so großen Einfluß auf die HIF-1 $\alpha$ -Expression (Abb. 22). Die Isoformen der GSK-3 weisen eine Übereinstimmung von etwa 97 % in ihrer Sequenz innerhalb der katalytischen Domänen auf. Es ist jedoch noch nicht geklärt, warum die GSK-3 $\beta$  einen größeren Einfluß auf die HIF-1 $\alpha$ -Expression zu haben scheint.

Insofern deuten die Daten darauf hin, daß Insulin einerseits HIF-1 $\alpha$  durch einen Translations-abhängigen Mechanismus regulieren kann, der durch die Aktivierung von eIF2B durch den PI3K/ PKB/ GSK-3 Signalweg stimuliert wird. Auf der anderen Seite zeigen die Befunde der

vorliegenden Arbeit mit den Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TAD-Konstrukten, daß GSK-3 auch direkt das HIF-1 $\alpha$ -Protein modifizieren kann.

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer HIF-1 $\alpha$ - und HIF-1 $\beta$ -Untereinheit besteht. Die HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit beinhaltet eine N-terminale- (N-TAD) und eine C-terminale- (C-TAD) Transaktivierungsdomäne. Die N-TAD überlappt mit der O<sub>2</sub>-abhängigen Degradierungsdomäne (ODD) und ist notwendig für die Proteinstabilität: Die C-TAD interagiert mit Coaktivatoren, wie p300/ CBP. Sie hat keinen Einfluß auf die Proteinstabilität, wird allerdings für die komplette HIF-1-Aktivität benötigt (Lando et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß es durch Cotransfektion von HepG2-Zellen mit einem Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TADN-C-Expressionsplasmid, das den HIF-1 $\alpha$ -Bereich von der N-TAD bis zum Ende der C-TAD enthält, und mit einem Genkonstrukt für die GSK-3 $\alpha$  zu einer geringfügigen Steigerung der LUC-Aktivität kam, wohingegen es mit GSK-3 $\beta$  zu einer drastischen Reduktion kam. Wurden nun die Domäne getrennt und die Cotransfektionen mit einem Konstrukt durchgeführt, welches nur die HIF-1 $\alpha$ -TAD-N enthielt, konnte sowohl mit GSK-3 $\alpha$  als auch mit GSK-3 $\beta$  eine Reduktion der Luc-Aktivität aufgezeigt werden. Cotransfektionen mit einem HIF-1 $\alpha$ -TAD-C-Konstrukt zeigten keine Veränderung im Bezug auf die Luc-Aktivität. Auch auf Proteinebene in COS-7-Zellen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Abb. 23). Diese Befunde stehen im Einklang mit Vorbefunden, die innerhalb der ODD des HIF-1 $\alpha$ -Proteins eine potentielle Consensus-Sequenz für die GSK-3, die eine Rolle bei der Regulation der HIF-1 $\alpha$  Proteinstabilität spielt, postuliert haben (Sodhi et al., 2001).

### **5.3 Mutationen der GSK-3-Phosphorylierungsstellen innerhalb der HIF-1 $\alpha$ N-terminalen Transaktivierungsdomäne steigern die Proteinstabilität**

Die GSK-3 benötigt eine bestimmte DNA-Sequenz (SXXXS/T) um ihre Substrate phosphorylieren zu können. Innerhalb der mit der ODD überlappenden N-terminalen Transaktivierungsdomäne vom HIF-1 $\alpha$  konnten drei Aminosäuren ausgemacht werden, die als putative GSK-3-Targets fungieren könnten. Diese waren das Serin 551 (S551), Threonin 555 (T555) und Serin 589 (S589). Durch Mutation von insbesondere S551 und T555 konnte in den Gal4-Two-Hybrid-Assays mit HepG2-Zellen eine Steigerung der Luc-Aktivität sowohl mit GSK-3 $\alpha$  als auch mit GSK-3 $\beta$  festgestellt werden (Abb. 25A). Auch auf Proteinebene konnte diese Stabilisierung gezeigt werden (Abb. 25B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch die Mutationen von jeweils einer putativen Phosphorylierungsstelle die Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins verlangsamt werden kann. Diese Effekte wurden auch durch Doppel- und Dreifachmutationen untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß



durch die Doppelmutante S551A T555V sowie mit der Dreifachmutante S551A T555V P564A eine Steigerung der Luc-Aktivität gezeigt werden konnte (Abb. 26A). Übereinstimmend zeigen die Ergebnisse auf Proteinebene auch eine beachtliche Steigerung der Gal4-HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge bei Verwendung der S551A T555V Mutante auf (Abb. 26B). Es deutet auch hier alles wieder daraufhin, daß durch die vorgenommenen Mutationen eine Verlangsamung der Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Protein stattfindet. Da der Effekt der Reduktion der Luc-Aktivität durch GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  durch die Mutationen im Bereich S551 und T555 noch nicht ganz aufgehoben werden konnte, wurde noch eine weitere putative GSK-3 Phosphorylierungsstelle innerhalb der N-terminalen Transaktivierungsdomäne des HIF-1 $\alpha$ -Proteins, das Serin 589, mutiert. Sowohl in den Luciferase-Versuchen als auch auf Proteinebene zeigte sich durch Punkt- (S589A) und Dreifachmutationen (S551A T555V S589A) eine deutliche Stabilisierung der Luc-Aktivität bzw. des HIF-1 $\alpha$ -Proteins (Abb. 27A bzw. 27B). Diese Befunde deuten darauf hin, daß durch die Mutation aller putativen Phosphorylierungsstellen innerhalb der N-terminalen Transaktivierungsdomäne des HIF-1 $\alpha$ -Proteins die Regulation durch die GSK-3 ausgeschaltet werden konnte.

Dies konnte dann wiederum durch Cotransfektionen der verschiedenen GSK-3-Expressionsplasmide mit Expressionsplasmiden für das gesamte HIF-1 $\alpha$  mit Myc-Tag gezeigt werden. In cotransfizierten HepG2-Zellen mit dem HIF-1 $\alpha$  Wildtyp und GSK-3 $\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  zeigte sich auch hier wieder eine Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Proteinspiegel. Das heißt, daß die GSK-3 die Degradation des gesamten HIF-1 $\alpha$ -Proteins beeinflussen kann. Werden allerdings die möglichen Bindungsstellen für die GSK-3 (S551 und T555) mutiert, verlangsamt sich die Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins sowohl mit GSK-3 $\alpha$  als auch mit GSK-3 $\beta$ . Transfiziert man die Doppelmutante vom HIF-1 $\alpha$  so addiert sich dieser Effekt noch und das HIF-1 $\alpha$ -Protein wird noch stabiler. Diese Befunde unterstützten die Ergebnisse aus den Versuchen, wo nur die N-terminale Transaktivierungsdomäne vom HIF-1 $\alpha$ -Protein vorhanden war. Auch bei dem gesamten HIF-1 $\alpha$ -Protein kann durch die Mutationen am S551 und am T555 die Regulierung durch die GSK-3 weitestgehend ausgeschaltet werden (Abb. 28).

### **5.3.1 Die VHL-Bindungsstellen haben keinen Einfluss auf die Regulation von HIF-1 $\alpha$ durch die GSK-3**

Die Proteininstabilität der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit wird durch einen niedrigen Sauerstoffgehalt reguliert. Diese Regulation beinhaltet post-translationale Modifikationen. Unter Normoxie sind die Prolin-Reste 402 und 564 in der ODD des HIF-1 $\alpha$ -Proteins hydroxyliert. Diese

hydroxylierten Proteine sind die Voraussetzung für die Bindung des von Hippel-Lindau Proteins (pVHL), das zu einem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex gehört. Dieser Komplex vermittelt dann die Ubiquitinylierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins, was dann zur Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch das 26 S Proteasom führt (Kallio et al., 1999). Hinzu kommt die Hydroxylierung von Asparagin 803, das die Rekrutierung des Coaktivators p300 und damit die volle transkriptionelle Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  inhibiert. Somit ist eine HIF-1 $\alpha$ -Variante, die in diesen drei Positionen mutiert ist, resistent gegen die VHL-vermittelte Degradation und sollte auch über maximale transkriptionelle Aktivität verfügen. Da die GSK-3, wie im Falle von  $\beta$ -Catenin, die proteasomale Degradation eines Proteins durch Phosphorylierungen initiieren kann, war die Frage, inwieweit die VHL-vermittelte Degradation und die GSK-3-vermittelte Degradation voneinander abhängen und das Proteasom involvieren.

Transfektionsanalysen in HepG2-Zellen mit einem HIF-1 $\alpha$ -Expressionsplasmid, welches die gesamte cDNA vom hHIF-1 $\alpha$  besaß, mit GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  zeigten, daß es auch im Bezug auf das gesamte hHIF-1 $\alpha$ -Protein wieder zu einer Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge kam. Bei Benutzung der HIF-1 $\alpha$  PPN-Mutante kommt es zu einer Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge in den HepG2-Zellen. Bei Cotransfektion dieser Mutante mit GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  zeigt sich insbesondere unter arteriellem pO<sub>2</sub> eine Destabilisierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins (Abb. 24A). MG132 hemmt die Proteasomen und somit ebenfalls die Degradation vom HIF-1 $\alpha$ . Wird nun MG132 im Zusammenhang mit der HIF-1 $\alpha$  PPN-Mutante gebracht, so addiert sich die Wirkung und die Degradation wird noch weiter verlangsamt. Durch Transfektion der HIF-1 $\alpha$  PPN-Mutante konnte in HepG2-Zellen bei Benutzung von MG132 gezeigt werden, daß es zu einer Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins kommt. Die Cotransfektionen der HIF-1 $\alpha$  PPN-Mutante mit GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  zeigten dann, daß bei Zugabe von MG132 die Reduktion des HIF-1 $\alpha$ -Proteins teilweise aufgehoben werden kann (Abb. 24B). Wurden allerdings in diese "VHL"-restistente Mutante noch zusätzlich Mutationen, die für die GSK-3-Bindung verantwortlich zu sein scheinen, eingebracht, so zeigte sich durch Cotransfektion dieser Mutanten eine wesentliche Erhöhung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge. Durch diese eingebrachten Mutationen konnte gezeigt werden, daß diese HIF-1 $\alpha$  PSTPSN-Mutante, da sie weder durch die Bindung von VHL noch durch die Regulierung durch GSK-3 einer Degradation unterzogen werden konnte, sehr stabil ist (Abb. 29). Somit zeigen die Daten, daß die GSK-3-vermittelte HIF-1 $\alpha$ -Degradation durch die Proteasomen in einer VHL-unabhängigen Art und Weise erfolgt.

### 5.3.2 Die HIF-1 $\alpha$ -TADN ist Substrat der GSK-3

Durch einen Kinase-Assay konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, daß die TADN von HIF-1 $\alpha$  direkt durch GSK-3 phosphoryliert werden kann und daß die vorgenommenen Mutationen eine mögliche Phosphorylierung durch die GSK-3 verhindern. Diese Befunde stehen im Einklang mit Vorbefunden, die innerhalb der ODD des HIF-1 $\alpha$ -Proteins eine potentielle Consensus-Sequenz für die GSK-3 postuliert haben (Sodhi et al., 2001) und die gezeigt haben, daß Aktivierung der GSK-3 durch chronische Hypoxie zu einer Degradation von HIF-1 $\alpha$  führt (Mottet et al. 2002).

Die Transfektionsversuche dieser Arbeit und die Versuche auf der Proteinebene deuteten darauf hin, daß S551, T555 und S589 im HIF-1 $\alpha$  durch die GSK-3 phosphoryliert werden können. Interessanterweise zeigen die Kinase-Assays, daß die einzelne Mutation von entweder S551, T555 oder S589 nicht zu einem Verlust der Phosphorylierung führen, wohingegen Mutation aller die Phosphorylierung verhindert (Abb. 30). Diese Befunde lassen sich dadurch erklären, daß die GSK-3 immer eine sogenannte "priming"-Kinase benötigt, die eine ihrer Target-Sites phosphoryliert. Diese Rolle kann zum einen die GSK-3 selber übernehmen, oder aber andere Serin/Threonin-Kinasen wie z.B. die Caseinkinase insofern die entsprechenden Voraussetzungen (Überlappen der GSK-Sites mit den Target-Sites anderer Kinasen) vorliegen. Da die Kinase-Assays zeigen, daß erst bei Ausschaltung aller vermeintlichen GSK-3 Phosphorylierungsstellen die aktive GSK-3 $\beta$  das HIF-1 $\alpha$ -Protein nicht mehr phosphorylieren kann, deutet dies darauf hin, daß die GSK-3 hier durch einen "selbst-priming" Mechanismus reguliert.

### 5.4 Bedeutung der Mutationen der GSK-3-Phosphorylierungsstellen innerhalb der HIF-2 $\alpha$ N-terminalen Transaktivierungsdomäne

Das HIF-2 $\alpha$  Molekül auch bekannt als endothelial PAS protein-1 (EPAS-1) weist in seiner Sequenz eine hohe Übereinstimmung mit HIF-1 $\alpha$  auf. Obwohl bekannt ist, daß auch HIF-2 $\alpha$ , wie HIF-1 $\alpha$ , mit dem Arylhydrocarbon-Rezeptor nukleärem Translokator (ARNT) dimerisieren kann, sind die regulatorischen Mechanismen von HIF-2 $\alpha$  noch nicht ganz geklärt. Aus diesem Grund wurden Cotransfektionen mit einem Wildtyp von HIF-2 $\alpha$ -TADN, sowie deren Mutante, in der die möglichen Phosphorylierungsstellen der GSK-3 mutiert waren durchgeführt. Die Transfektionen mit dem HIF-2 $\alpha$ -TADN-Wildtyp zeigten, daß auch hier, wie bei HIF-1 $\alpha$ , eine deutliche Reduktion in der Luc-Aktivität, bei Cotransfektion mit GSK-3 $\beta$  mehr als mit GSK-3 $\alpha$ , zu verzeichnen war. Wurde hingegen die HIF-2 $\alpha$ -TADN-Mutante mit GSK-

$3\alpha$  bzw. GSK-3 $\beta$  cotransfiziert, konnte dieser Effekt aufgehoben werden (Abb. 31). Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Modulation, die die GSK-3 auf die N-terminale Transaktivierungsdomäne vom HIF-1 $\alpha$ -Protein ausübt, konserviert ist und auch auf die N-terminale Transaktivierungsdomäne vom HIF-2 $\alpha$  zutrifft.

### 5.5 Einfluß der Proteinkinase B auf das Transaktivierungspotential von HIF-3 $\alpha$

Experimente an primären Rattenhepatocyten haben gezeigt, daß Insulin neben HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  auch die HIF-3 $\alpha$ -Proteinmenge steigern kann. In Analogie zu HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  war diese Induktion auch nicht transkriptionell bedingt (Kietzmann 2003). Dies legt die Vermutung nahe, daß auch hier ein translationaler Mechanismus oder eine Regulation der Proteinstabilität erfolgt. Das HIF-3 $\alpha$ -Protein enthält im Gegensatz zu HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  keine möglichen Phosphorylierungsstellen für die GSK-3. Allerdings könnte es ein direktes Substrat der PKB sein, da im Bereich der Aminosäure Serin 521 eine putative PKB-Phosphorylierungsstelle lokalisiert ist. Um einen ersten Anhalt darüber zu erhalten, inwieweit diese Phosphorylierungsstelle eine Rolle für die Regulation von HIF-3 $\alpha$  spielt, wurden in der vorliegenden Arbeit in erster Linie Transfektionsanalysen mit dem Two-Hybrid-System durchgeführt. Bei Cotransfektion der Gal4-HIF-3 $\alpha$ -TAD Konstrukte und einem Expressionsvektor für eine konstitutiv aktive Form der PKB (myrPKB) in HepG2-Zellen zeigte sich eine Steigerung der Transaktivität um 50%. Interessanterweise war die Transaktivität weiter gesteigert und nicht aufgehoben, wenn ein Gal4-HIF-3 $\alpha$ -TAD Konstrukt verwendet wurde, daß im Bereich der Aminosäure 521 mutiert war. Zusätzliche Expression der myrPKB führte nun zu einer nochmaligen Steigerung der Transaktivität (Abb. 32). Die Befunde aus diesen Transfektionen deuten schon darauf hin, daß das Serin 521 eine Funktion für die Transaktivierung von HIF-3 $\alpha$  durch die PKB hat, daß aber eine putative Phosphorylierung durch PKB an S521 die HIF-3 $\alpha$  Stabilität negativ reguliert. Zusätzlich scheint die PKB entweder weitere Phosphorylierungsstellen in HIF-3 $\alpha$  zu modifizieren, oder weitere Mechanismen zu aktivieren, die eine verstärkte Transaktivierung bedingen. Eine detaillierte Analyse der HIF-3 $\alpha$ -Proteinsequenz zeigte jedoch außer S521 keine weitere putative PKB-Phosphorylierungsstelle, so daß möglicherweise zusätzliche Coaktivatoren durch PKB rekrutiert werden. Dies könnte der Coaktivator p300 sein, der durch PKB modifiziert werden kann und für den gezeigt werden konnte, daß diese PKB-vermittelte Phosphorylierung für die Insulin-induzierte Glucokinase-Expression von Bedeutung ist (Roth et al., 2004). Offen bleibt jedoch noch inwieweit jetzt aber PKB wirklich HIF-3 $\alpha$  phosphorylieren kann, was in weitergehenden Untersuchungen, die die entsprechenden Kinase-Assays umfassen, getestet werden müßte.

## 5.6 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der HIF-1 $\alpha$ Regulation durch die GSK-3

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die GSK-3 über den PI3K/ PKB Signalweg an der Regulation der HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung beteiligt sein könnte. Dies konnte dadurch gezeigt werden, daß durch LiCl, einem Hemmer der GSK-3, der Insulineffekt imitiert werden konnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß LiCl keinen transkriptionellen Effekt, sondern eher einen translationalen oder post-translationalen Mechanismus reguliert. Mit Cycloheximid, einem Hemmer der Translokaseaktivität der eukaryoten Ribosomen, konnte kein HIF-1 $\alpha$  mehr nachgewiesen werden, was dafür spricht, daß die Aktivierung von eIF2B durch den PI3K/ PKB/ GSK-3 Signalweg stimuliert wird. Weiterhin konnte aber auch gezeigt werden, daß die GSK-3 die Proteinstabilität von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in der ODD überlappenden N-terminalen Transaktivierungsdomäne (N-TAD) vom HIF-1 $\alpha$ -Protein reguliert. Durch weitere Untersuchungen konnten die putativen Phosphorylierungsstellen innerhalb der ODD vom HIF-1 $\alpha$ -Protein ermittelt werden. Es zeigte sich, daß S551, T555 und S589 die möglichen Phosphorylierungsstellen der GSK-3 sind. Denn durch Ausschaltung aller drei möglichen Phosphorylierungsstellen innerhalb der N-TAD konnte die Regulation und Phosphorylierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch die GSK-3 ausgeschaltet werden. Weiterhin zeigte sich, daß die Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch die GSK-3 durch Proteasomen vermittelt wird, aber VHL unabhängig ist.

Durch alle diese Befunde kann die These aufgestellt werden, daß sowohl Insulin als auch Hypoxie für die Inaktivierung des PKB Substrates GSK-3 verantwortlich sind. Unter normoxischen Bedingungen wird die GSK-3 über den PI3K und PKB Signalweg nicht phosphoryliert. Das bedeutet, daß die N-terminalen Serin-Reste, bei GSK-3 $\alpha$  Ser9 und bei GSK-3 $\beta$  Ser21, nicht phosphoryliert sind und die GSK-3 somit in der aktiven Form vorliegt. In der aktiven Form kann die GSK-3 HIF-1 $\alpha$  an S551, T555 und S589 in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne phosphorylieren und via proteasomaler Degradation inaktivieren. Unter hypoxischen Bedingungen oder unter Einfluß von Insulin wird die GSK-3 durch Phosphorylierung der N-terminalen Serinreste durch die PKB inaktiviert. Durch die Inaktivierung kann die GSK-3 HIF-1 $\alpha$  nicht phosphorylieren, die proteasomale Degradation unterbleibt und HIF-1 $\alpha$  akkumuliert (Abb. 33).

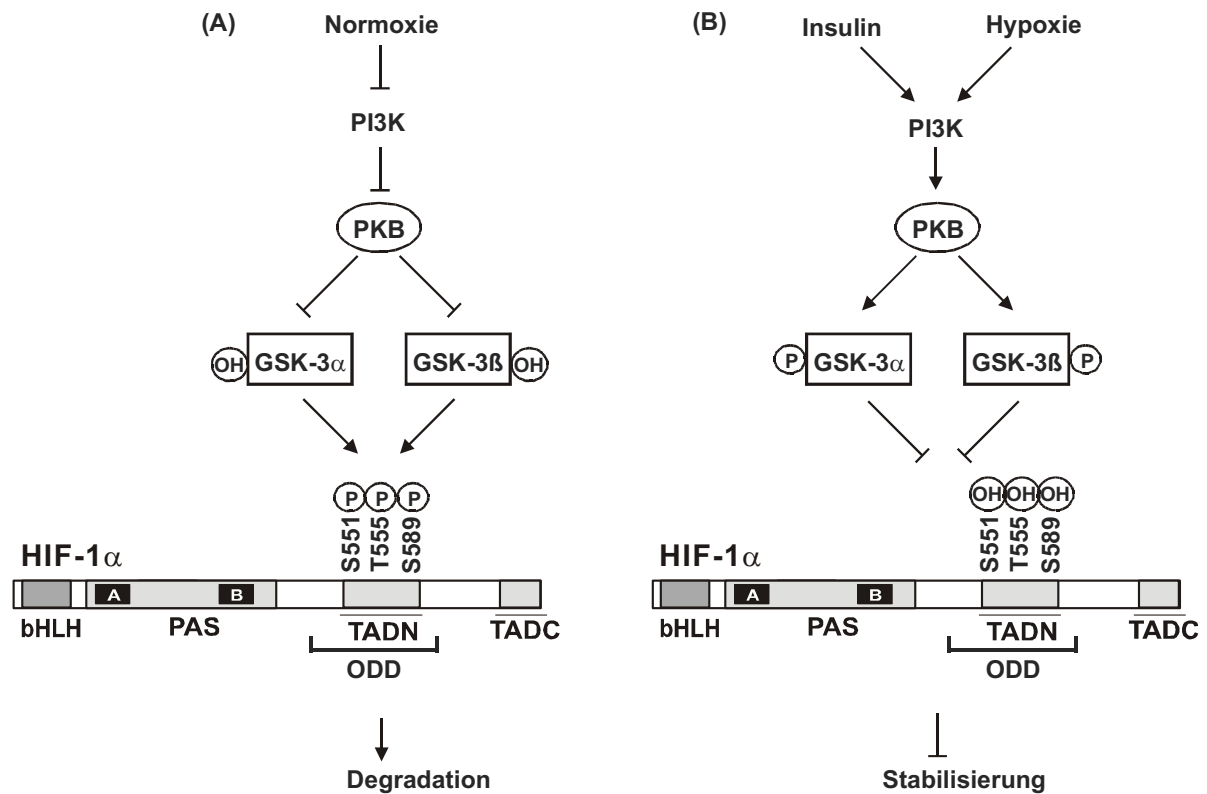
Die Inaktivierung der GSK-3 und somit die Aktivierung von HIF-1 hat besondere Konsequenzen im Rahmen von Prozessen wie Depressionen, Alzheimer und Tumorprogression. Insbesondere bei Depressionen sind und werden LiCl bzw. Lithium-Derivate zur Therapie eingesetzt. Die molekulare Basis war lange unbekannt. Heute weiß man, daß Hemmung der GSK-3 durch Lithium die Dynamik der Mikrotubuli, die Motilität der Axone und das Auswachsen von Fortsätzen beeinflusst. So geht man davon aus, daß unter

der Voraussetzung der adulten Neurogenese insbesondere das Wachstum und dabei der Zellzyklus moduliert wird. Dabei spielt auch HIF-1 eine wichtige Rolle, denn Verlust der Hydroxylase Aktivität und Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  hemmt das CyclinD/Cyclin-abhängige Kinase-4 (CycD/Cdk4) vermittelte Wachstum aber nicht die Proliferation in Drosophila (Frei und Edgar 2004).

Beim Alzheimer Syndrom, das neuropathologisch durch extrazelluläre Amyloid-Plaques gekennzeichnet ist, soll auch die GSK-3 eine wichtige Rolle spielen. So bestehen die Plaques zu einem großen Anteil aus dem neurotoxischen Amyloid- $\beta$ -Peptid (A $\beta$ ), welches proteolytisch aus dem Amyloid-Precursor-Protein in Gegenwart von Presenilin-1 durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase gebildet wird. Interessanterweise kann A $\beta$  GSK-3 aktivieren, die dann gleichzeitig mit Presenilin-1 interagieren kann (Grimes und Jope 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß A $\beta$  in Neuronenkulturen eine glycolytische Stoffwechsellage induziert. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, daß eine vermehrte HIF-1-vermittelte Expression der glycolytischen Enzyme nachzuweisen war (Soucek et al., 2003). Somit könnte man spekulieren, daß A $\beta$  über GSK-3 die Stoffwechsellage und die Aktivität von HIF-1 regulieren kann. Inwieweit Aktivierung der GSK-3 durch A $\beta$ , was nach den Befunden dieser Arbeit zur HIF-Degradation führen sollte, mit der Induktion in Einklang gebracht werden kann ist unklar. Möglicherweise können zellspezifische Faktoren hierbei eine Rolle spielen.

Weiterhin ist HIF-1 auch an der Angiogenese von Tumoren beteiligt. Durch das Wachstum der Tumorzellen kommt es zu einer Hypoxie, was die vermehrte Akkumulation von HIF-1 zur Folge hat. HIF-1 löst die Expression von VEGF aus, wodurch die Proliferation von Endothelzellen und die Gefäßneubildung in Tumoren stimuliert wird. Diese Stimulation von VEGF kann ebenfalls durch Insulin wahrscheinlich via GSK-3 ausgelöst werden. Neben HIF-1 $\alpha$  kann die GSK-3 auch andere Transkriptionsfaktoren wie  $\beta$ -catenin, c-Jun, C/EBP oder p53 phosphorylieren. Interessanterweise findet man eine direkte Interaktion von p53 mit GSK-3 im Zellkern, was dann die transkriptionelle und die apoptotische p53-Antwort induziert (Watcharasi et al., 2002). Gleichzeitig findet man, daß das Tumorsuppressorprotein p53 mit HIF-1 $\alpha$  interagieren kann. Dabei wird die Ubiquitin-Ligase MDM2 vom p53-Protein rekrutiert, was letztendlich auch zur Ubiquitylierung von HIF-1 $\alpha$  und so zur Destabilisierung und zum proteasomalen Abbau führt (Semenza 2001). Hemmung von GSK-3 oder Mutationen im p53-Gen die zur Inaktivierung von p53 führen, bedingen eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  und führen somit zu einer Tumorprogression via Aktivierung der HIF-Zielgenexpression.

Somit wird klar, daß die Mechanismen die die GSK-3 regulieren, als auch die Identifizierung von GSK-3-Substraten sowie deren pharmakologische und molekulare Beeinflussung eine wichtige Rolle im Verständnis vieler pathologischer Zustände hat.



**Abb. 33: Schematische Darstellung der HIF-1 $\alpha$  Regulation durch GSK-3 über PI3K und PKB.** Bei Normoxie kommt es zu keiner Phosphorylierung der GSK-3 $\alpha$  am Serin9 und der GSK-3 $\beta$  an Serin 21, was zur Folge hat, daß die GSK-3 aktiv ist und somit HIF-1 $\alpha$  zusätzlich zum VHL-abhängigen Weg destabilisiert wird. Unter Insulineinfluss und unter Hypoxie kommt es via PI3K und PKB zu einer Phosphorylierung der Serinreste der GSK-3 und dadurch zur Inaktivierung, so daß HIF-1 $\alpha$  nicht phosphoryliert und damit stabilisiert wird. PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PKB: Proteinkinase B; GSK-3: Glycogen-Synthase-Kinase; HIF-1 $\alpha$ : Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 $\alpha$ .

**Literaturverzeichnis**

- Abate,C, Patel,L, Rauscher,FJ, Curran,T. 1990.** Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249:1157-1161.
- Aberle,H, Bauer,A, Stappert,J, Kispert,A, Kemler,R. 1997.** beta-catenin is a target for ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16:3797-3804
- Acker,H. 1994.** Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir.Physiol.* 95:1-10.
- Acker,H, Bolling,B, Delpiano,MA, Dufau,E, Gorlach,A, Holtermann,G. 1992.** The meaning of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in carotid body cells for PO<sub>2</sub> chemoreception. *J.Auton.Nerv.Syst.* 41:41-51.
- Alessi,DR, Caudwell,FB, Andjelkovic,M, Hemmings,BA, Cohen,P. 1996.** Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 399:333-338.
- Alessi,DR, Cohen,P. 1998b.** Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8:55-62.
- Alessi,DR, Cohen,P. 1998a.** Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8:55-62.
- Alessi,DR, Kozlowski,MT, Weng,QP, Morrice,N, Avruch,J. 1998c.** 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr.Biol* 8:69-81.
- Arsham,AM, Plas,DR, Thompson,CB, Simon,MC. 2002.** Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 alpha nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *J Biol Chem* 277:15162-15170.
- Armstrong,JL, Bonavaud,SM, Toole,BJ, Yeaman,SJ. 2001.** Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells. *J Biol Chem.* 276:952-956
- Beck,I, Weinmann,R, Caro,J. 1993.** Characterization of hypoxia-responsive enhancer in the human erythropoietin gene shows presence of hypoxia-inducible 120-Kd nuclear DNA-binding protein in erythropoietin-producing and nonproducing cells. *Blood* 82:704-711.
- Behrens,J, Jerchow,BA, Wurtele,M, Grimm,J, Asbrand,C, Wirtz,R, Kuhl,M, Wedlich,D, Birchmeier,W. 1998.** Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC and GSK-3beta. 1998. *Science* 280:596-599
- Bellacosa,A, Chan,TO, Ahmed,NN, Datta,K, Malstrom,S, Stokoe,D, McCormick,F, Feng,J, Tsichlis,P. 1998.** Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17:313-325.
- Berry,MN, Friend,DS. 1969.** High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* 43:506-520
- Bichet,S, Wenger,RH, Camenisch,G, Rolfs,A, Ehleben,W, Porwol,T, Acker,H, Fandrey,J, Bauer,C, Gassmann,M. 1999.** Oxygen tension modulates beta-globin switching in embryoid bodies. *FASEB J.* 13:285-295.



- Borg,LA, Cagliero,E, Sandler,S, Welsh,N, Eizirik,DL. 1992.** Interleukin-1 beta increases the activity of superoxide dismutase in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 130:2851-2857.
- Bratke,J, Kietzmann,T, Jungermann,K. 1999.** Identification of an oxygen-responsive element in the 5'-flanking sequence of the rat cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase-1 gene, modulating its glucagon-dependent activation. *Biochem.J* 339:563-569.
- Bullions,LC, Levine,AJ. 1998.** The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction and cancer. 1998. *Curr. Opin Oncol.* 10:81-87
- Bunn,HF, Poyton,RO. 1996.** Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev.* 76:839-885.
- Chandel,NS, McClintock,DS, Feliciano,CE, Wood,TM, Melendez,JA, Rodriguez,AM, Schumacker,PT. 2000.** Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *Journal of Biological Chemistry* 275:25130-25138.
- Chen,EY, Mazure,NM, Cooper,JA, Giaccia,AJ. 2001.** Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res.* 61:2429-2433
- Cohen,P, Nimmo,HG, Proud,CG. 1978.** How does insulin stimulate glycogen synthesis? *Biochem.Soc.Symp.* 43:69-95
- Cohen,SN, Chang,AC, Hsu,L. 1972.** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110-2114
- Cross,AR, Henderson,L, Jones,OT, Delpiano,MA, Hentschel,J, Acker,H. 1990.** Involvement of an NAD(P)H oxidase as a pO<sub>2</sub> sensor protein in the rat carotid body. *Biochem.J.* 272:743-747.
- Cross,DA, Alessi,DR, Cohen,P, Andjelkovich,M, Hemmings,BA. 1995.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.
- Cross,DA, Alessi,DR, Vandenheede,JR, McDowell,HE, Hundal,HS, Cohen,P. 1994.** The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem. J.* 303:21-26
- Ehleben,W, Porwol,T, Fandrey,J, Kummer,W, Acker,H. 1997.** Cobalt and desferrioxamine reveal crucial members of the oxygen sensing pathway in HepG2 cells. *Kidney Int.* 51:483-491.
- Ema,M, Taya,S, Yokotani,N, Sogawa,K, Matsuda,Y, Fujii-Kuriyama,Y. 1997.** A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:4273-4278.

- Embi,N, Rylatt,DB, Cohen,P. 1980.** Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur.J.Biochem.* 107:519-527
- Fandrey,J, Frede,S, Jelkmann,W. 1994a.** Oxygen sensing by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating heme proteins. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 718:341-343.
- Fandrey,J, Frede,S, Jelkmann,W. 1994b.** Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem.J.* 303:507-510.
- Feldser,D, Agani,F, Iyer,NV, Pak,B, Ferreira,G, Semenza,GL. 1999.** Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha and insulin-like growth factor 2. *CANCER RESEARCH.* 59:3915-3918.
- Firth,JD, Ebert,BL, Pugh,CW, Ratcliffe,PJ. 1994.** Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:6496-6500.
- Firth,JD, Ebert,BL, Ratcliffe,PJ. 1995.** Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *Journal of Biological Chemistry* 270:21021-21027.
- Fiol,CJ, Wang,A, Roeske,RW, Roach,PJ. 1990.** Ordered multisite protein phosphorylation. Analysis of glycogen synthase kinase-3 action using model peptide substrates. 1990. *Journal of Biological Chemistry* 265:6061-6065
- Flamme,I, Frohlich,T, von Reutern,M, Kappel,A, Damert,A, Risau,W. 1997.** HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech.Dev.* 63:51-60.
- Frei,C, Edgar,BA. 2004.** Drosophila cyclinD/Cdk4 requires Hif-1 prolyl hydroxylase to drive cell growth. *Dev. Cell.* 6:241-251
- Gleadle,JM, Ebert,BL, Firth,JD, Ratcliffe,PJ. 1995a.** Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am.J.Physiol.* 268:C1362-C1368.
- Gleadle,JM, Ebert,BL, Ratcliffe,PJ. 1995b.** Diphenylene iodonium inhibits the induction of erythropoietin and other mammalian genes by hypoxia. Implications for the mechanism of oxygen sensing. *Eur.J.Biochem.* 234:92-99.
- Goldberg,MA, Dunning,SP, Bunn,HF. 1988.** Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242:1412-1415.
- Goldberg,MA, Schneider,TJ. 1994.** Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry* 269:4355-4359.
- Gorlach,A, Diebold,I, Schini-Kerth,VB, Berchner-Pfannschmidt,U, Roth,U, Brandes,RP, Kietzmann,T, Busse,R. 2001.** Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ.Res.* 89:47-54.

- Gorlach,A, Holtermann,G, Jelkmann,W, Hancock,JT, Jones,SA, Jones,OT, Acker,H. 1993.** Photometric characteristics of haem proteins in erythropoietin-producing hepatoma cells (HepG2). *Biochem.J.* 290:771-776.
- Graeber,TG, Peterson,JF, Tsai,M, Monica,K, Fornace-AJ,J, Giaccia,AJ. 1994.** Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol.Cell Biol.* 14:6264-6277.
- Granner,D Pilkis,S. 1990.** The genes of hepatic glucose metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 265:10173-10176
- Graven,KK, Troxler,RF, Kornfeld,H, Panchenko,MV, Farber,HW. 1994.** Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 269:24446-24453.
- Grimes,CA, Jope,RS. 2001.** CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3beta and facilitated by lithium. 2001. *J. Neurochem.* 78:1219-1232
- Grimes,CA, Jope,RS. 2001.** The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. 2001. *Prog. Neurobiol.* 65:391-426
- Gu,YZ, Moran,SM, Hogenesch,JB, Wartman,L, Bradfield,CA. 1998.** Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr.* 7:205-213.
- Hazinski,TA, Noisin,E, Hamon,I, DeMatteo,A. 1995.** Sheep lung cytochrome P4501A1 (CYP1A1): cDNA cloning and transcriptional regulation by oxygen tension. *J.Clin.Invest.* 96:2083-2089.
- Hellkamp,J, Christ,B, Bastian,H, Jungermann,K. 1991.** Modulation by oxygen of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in rat hepatocyte cultures. *Eur.J.Biochem.* 198:635-639.
- Hellwig-Burgel,T, Rutkowski,K, Metzen,E, Fandrey,J, Jelkmann,W. 1999.** Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94:1561-1567.
- Hill,MM, Andjelkovic,M, Brazil,DP, Ferrari,S, Fabbro,D, Hemmings,BA. 2001.** Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J Biol Chem.* 276:25643-25646.
- Hirota,K, Semenza,GL. 2001.** Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 276:21166-21172.
- Hoffmann,EC, Reyers,H, Chu,FF, Sander,F, Conley,LH, Brooks,BA, Hankinson,O. 1991.** Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252:954-958
- Hogenesch,JB, Chan,WK, Jackiw,VH, Brown,RC, Gu,YZ, Pray,GM, Perdew,GH, Bradfield,CA. 1997.** Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272:8581-8593.

- Hon,WC, Wilson,MI, Harlos,K, Claridge,TD, Schofield,CJ, Pugh,CW, Maxwell,PH, Ratcliffe,PJ, Stuart,DI, Jones,EY. 2002.** Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 417:975-978.
- Huang,LE, Arany,Z, Livingston,DM, Bunn,HF. 1996b.** Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry* 271:32253-32259.
- Huang,LE, Arany,Z, Livingston,DM, Bunn,HF. 1996a.** Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J.Biol.Chem.* 271:32253-32259.
- Jeong,JW, Bae,MK, Ahn,MY, Kim,SH, Sohn,TK, Bae,MH, Yoo,MA, Song,EJ, Lee,KJ, Kim,KW. 2002.** Regulation and Destabilization of HIF-1alpha by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell* 111:709-720.
- Jiang,BH, Rue,E, Wang,GL, Roe,R, Semenza,GL. 1996.** Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 271:17771-17778.
- Jungermann,K, Kietzmann,T. 2000.** Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* 31:255-260.
- Kallio,PJ, Okamoto,K, O'Brien,S, Carrero,P, Makino,Y, Tanaka,H, Poellinger,L. 1998.** Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.* 17:6573-6586.
- Kallio,PJ, Pongratz,I, Gradin,K, McGuire,J, Poellinger,L. 1997.** Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:5667-5672.
- Kallio,PJ, Wilson,WJ, O'Brien,S, Makino,Y, Poellinger,L. 1999.** Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274:6519-6525.
- Kane,LP, Shapiro,VS, Stokoe,D, Weiss,A. 1999.** Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr.Biol* 9:601-604.
- Kazlauskas, A. 1994.** Receptor tyrosin kinase and their targets. *Curr Opin Genet Dev.* 4:5-14
- Kietzmann,T, Bratke,J, Jungermann,K. 1997a.** Diminution of the O<sub>2</sub> responsiveness of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in rat hepatocytes by long-term culture at venous PO<sub>2</sub>. *Kidney Int.* 51:542-547.
- Kietzmann,T, Freimann,S, Bratke,J, Jungermann,K. 1996.** Regulation of the gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glycolytic aldolase A gene expression by O<sub>2</sub> in rat hepatocyte cultures. Involvement of hydrogen peroxide as mediator in the response to O<sub>2</sub>. *FEBS Lett.* 388:228-232.
- Kietzmann,T, Immenschuh,S, Katz,N, Jungermann,K, Muller,EU. 1995.** Modulation of hemopexin gene expression by physiological oxygen tensions in primary rat hepatocyte cultures. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 213:397-403.

- Kietzmann,T, Jungermann,K. 1997b.** Modulation by oxygen of zonal gene expression in liver studied in primary rat hepatocyte cultures. *Cell Biol.Toxicol.* 13:243-255.
- Kietzmann,T, Porwol,T, Zierold,K, Jungermann,K, Acker,H. 1998.** Involvement of a local Fenton reaction in the reciprocal modulation by O<sub>2</sub> of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene and the insulin-dependent activation of the glucokinase gene in rat hepatocytes. *Biochem.J.* 335:425-432.
- Kietzmann,T, Roth,U, Freimann,S, Jungermann,K. 1997c.** Arterial oxygen partial pressures reduce the insulin-dependent induction of the perivenously located glucokinase in rat hepatocyte cultures: mimicry of arterial oxygen pressures by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem.J.* 321:17-20.
- Kietzmann,T, Roth,U, Jungermann,K. 1999.** Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 94:4177-4185.
- Kietzmann,T, Samoylenko,A, Roth,U, Jungermann,K. 2003.** Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by insulin in primary rat hepatocytes. *Blood* 101:907-914.
- Kietzmann,T, Schmidt,H, Unthan,FK, Probst,I, Jungermann,K. 1993.** A ferro-heme protein senses oxygen levels, which modulate the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in rat hepatocyte cultures. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 195:792-798.
- King,SJ, Booyse,FM, Lin,PH, Traylor,M, Narkates,AJ, Oparil,S. 1989.** Hypoxia stimulates endothelial cell angiotensin-converting enzyme antigen synthesis. *Am.J Physiol.* 256:C1231-C1238.
- Lando,D, Peet,DJ, Whelan,DA, Gorman,JJ, Whitelaw,ML. 2002.** Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295:858-861.
- Lawrence,JC Jr., Fadden,P, Haystead,TA, Liu,TA.1997.** PHAS proteins as mediators of the action of insulin growth factors and cAMP on protein synthesis and cell proliferation. *Adv. Enzyme Regl.* 37:239-267
- Lee,PJ, Jiang,BH, Chin,BY, Iyer,NV, Alam,J, Semenza,GL, Choi,AM. 1997.** Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 272:5375-5381.
- Lehrach,H, Diamond,D, Wozney,JM, Boedtke,H. 1977.** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16:4743-4751
- Liu,Q, Berchner-Pfannschmidt,U, Moller,U, Brecht,M, Wotzlaw,C, Acker,H, Jungermann,K, Kietzmann,T. 2004.** A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:4302-4307.
- Loike,JD, Cao,L, Brett,J, Ogawa,S, Silverstein,SC, Stern,D. 1992.** Hypoxia induces glucose transporter expression in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 263:326-333

- Louis,CA, Reichner,JS, Henry-WL,J, Mastrofrancesco,B, Gotoh,T, Mori,M, Albina,JE. 1998.** Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages: regulation by oxygen tension. *Am.J.Physiol.* 274:R775-R782.
- Masuda,S, Chikuma,M, Sasaki,R. 1997.** Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res* 746:63-70.
- Mathew,R, Omar,HA, Cherry,PD, Gewitz,MH, Wolin,MS. 1992.** Role of cGMP mechanisms in response of rat pulmonary arteries to hypoxia. *Am.J.Physiol.* 263:H141-H146.
- Mazure,NM, Chen,EY, Laderoute,KR, Giaccia,AJ. 1997.** Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 90:3322-3331.
- Melillo,G, Musso,T, Sica,A, Taylor,LS, Cox,GW, Varesio,L. 1995.** A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J.Exp.Med.* 182:1683-1693.
- Min,JH, Yang,H, Ivan,M, Gertler,F, Kaelin,WG, Jr., Pavletich,NP. 2002.** Structure of an HIF-1 $\alpha$  -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296:1886-1889.
- Mottet,D, Dumont,V, Deccache,Y, Demazy,C, Ninane,N, Raes,M, Michiels,C. 2003.** Regulation of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  Protein Level during Hypoxic Conditions by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Pathway in HepG2 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278:31277-31285
- Myers-MG, J, White, MF. 1996.** Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:615-658
- Nauck,M, Wolfle,D, Katz,N, Jungermann,K. 1981.** Modulation of the glucagon-dependent induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine aminotransferase by arterial and venous oxygen concentrations in hepatocyte cultures. *Eur.J.Biochem.* 119:657-661.
- O'Brien,RM, Granner,DK. 1996.** Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev* 76:1109-1161
- Pawson, T. 1995.** Protein modules and signalling networks. *Nature* 373:573-580
- Pinsky,DJ, Liao,H, Lawson,CA, Yan,SF, Chen,J, Carmeliet,P, Loskutoff,DJ, Stern,DM. 1998.** Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition. *J.Clin.Invest.* 102:919-928.
- Pognonec,P, Kato,H, Roeder,RG. 1992.** The helix-loop-helix/leucine repeat transcription factor USF can be functionally regulated in a redox-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 267:24563-24567.
- Polakis,P. 1999.** The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr. Opin Genet. Dev.* 9:15-21

- Reif,K, Nobes,CD, Thomas,G, Hall,A, Cantrell,DA. 1996.** Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr Biol.* 6:1445-1455
- Reisz,PS, Probst,MR, Fukunaga,BN, Hankinson,O. 1994.** Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol.Cell Biol.* 14:6075-6086.
- Richard,DE, Berra,E, Gothie,E, Roux,D, Pouyssegur,J. 1999.** p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J.Biol.Chem.* 274:32631-32637.
- Richard,DE, Berra,E, Pouyssegur,J. 2000.** Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 275:26765-26771.
- Rivard,A, Berthou-Soulie,L, Principe,N, Kearney,M, Curry,C, Branellec,D, Semenza,GL, Isner,JM. 2000.** Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J.Biol.Chem.* 275:29643-29647.
- Roth,U, Curth,K, Unterman,TG, Kietzmann,T. 2004.** The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 279:2623-2631.
- Rouault,T, Klausner,R. 1997.** Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Curr.Top.Cell Regul.* 35:1-19.
- Rubinfeld,B, Albert,I, Porfiri,E, Fiol,C, Munemitsu,S, Polakis,P. 1996.** Binding of GSK3 $\beta$  to the APC- $\beta$ -catenin complex and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.* 9:207-210
- Sato,K, Yamazaki,K, Shizume,K, Kanaji,Y, Obara,T, Ohsumi,K, Demura,H, Yamaguchi,S, Shibuya,M. 1995.** Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and VEGF mRNA expression in the rat thyroid in vivo. *J Clin.Invest* 96:1295-1302.
- Semenza,GL, Jiang,BH, Leung,SW, Passantino,R, Concordet,JP, Maire,P, Giallongo,A. 1996.** Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J.Biol.Chem.* 271:32529-32537.
- Shaw,M, Cohen,P. 1999.** Role of protein kinase B and MAP kinase cascade in mediating the EGF-dependent inhibition of glycogen synthase kinase-3 in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 461:120-124
- Shimizu,S, Eguchi,Y, Kosaka,H, Kamiike,W, Matsuda,H, Tsujimoto,Y. 1995.** Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* 374:811-813.
- Sodhi,A, Montaner,S, Miyazaki,H, Gutkind,JS. 2001.** MAPK and AKT act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 287:292-300

- Soucek,T, Cumming,R, Dargusch,R, Maher,P, Schubert,D. 2003.** The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotectiv response to amyloid beta peptide. *Neuron.* 39:43-56
- Sonenberg,N, Gingras,AC. 1998.** The mRNA 5'cap binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin Cell Biol.* 10:268-275
- Stephens,L, Anderson,K, Stokoe,D, Erdjument,BH, Painter,GF, Holmes,AB, Gaffney,PR, Reese,CB, McCormick,F, Tempst,P, Coadwell,J, Hawkins,PT. 1998.** Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B (see comments). *Science* 279:710-714
- Stiehl,DP, Jelkmann,W, Wenger,RH, Hellwig-Burgel,T. 2002.** Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett.* 512:157-162.
- Suzuki,T, Hiroki,A, Watanabe,T, Yamashita,T, Takei,I, Umezawa,K. 2001.** Potentiation of insulin-related signal transduction by a novel protein-tyrosine phosphatase inhibitor, Et-3,4-dephostatin, on cultured 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* %20;276:27511-27518.
- Takata,M, Ogawa,W, Kitamura,T, Hino,Y, Kuroda,S, Kotani,K, Klip,A, Gingras,AC, Sonenberg,N, Kasuga,M. 1999.** Requirement for Akt (protein kinase B) in insulin-induced activation of glycogen synthase and phosphorylation of 4E-BP1 (PHAS-1). *J Biol Chem.* 274:20611-20618.
- Tazuke,SI, Mazure,NM, Sugawara,J, Carland,G, Faessen,GH, Suen,LF, Irwin,JC, Powell,DR, Giaccia,AJ, Giudice,LC. 1998.** Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:10188-10193.
- Thornton,RD, Lane,P, Borghaei,RC, Pease,EA, Caro,J, Mochan,E. 2000.** Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem.J.* 350 Pt 1:307-312.
- Tian,H, McKnight,SL, Russell,DW. 1997.** Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11:72-82.
- Treins,C, Giorgetti-Peraldi,S, Murdaca,J, Semenza,GL, Van Obberghen,E. 2002.** Insulin stimulates hypoxia-inducible factor-1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277:27975-27981
- VanOtteren,GM, Standiford,TJ, Kunkel,SL, Danforth,JM, Strieter,RM. 1995.** Alterations of ambient oxygen tension modulate the expression of tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein-1 alpha from murine alveolar macrophages. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 13:399-409.
- Wang,GL, Jiang,BH, Rue,EA, Semenza,GL. 1995b.** Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:5510-5514.



- Wang, GL, Jiang, BH, Rue, EA, Semenza, GL. 1995a.** Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:5510-5514.
- Wang, GL, Semenza, GL. 1993.** Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82:3610-3615.
- Watcharasit, P, Bijur, GN, Zmijewski, JW, Song, L, Zmijewski, A, Chen, X, Johnson, GV, Jope, RS. 2002.** Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and p53 after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:7951-7955
- Welsh, DJ, Scott, P, Plevin, R, Wadsworth, R, Peacock, AJ. 1998.** Hypoxia enhances cellular proliferation and inositol 1,4, 5-triphosphate generation in fibroblasts from bovine pulmonary artery but not from mesenteric artery. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 158:1757-1762.
- Welsh, GI, Proud, CG. 1993.** Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem. J.* 294:625-629
- Welsh, GI, Miller, CM, Loughlin, AJ, Price, NT, Proud, CG. 1998.** Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serin which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett.* 421:125-130
- Woodgett, JR. 1990.** Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9:2431-2438
- Woodgett, JR. 1991.** cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3. *Methods Enzymol.* 200:564-577
- Yamamoto, H, Kishida, S, Kishida, M, Ideka, S, Takada, S, Kikuchi, A. 1999.** Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates its stability. *J. Biol. Chem.* 274:10681-10684
- Zelzer, E, Levy, Y, Kahana, C, Shilo, BZ, Rubinstein, M, Cohen, B. 1998.** Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ /ARNT. *EMBO J.* 17:5085-5094.
- Zhong, H, Chiles, K, Feldser, D, Laughner, E, Hanrahan, C, Georgescu, MM, Simons, JW, Semenza, GL. 2000.** Modulation of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: Implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *CANCER RESEARCH.* 60:1541-1545.
- Zundel, W, Schindler, C, Haas, KD, Koong, A, Kaper, F, Chen, E, Gottschalk, AR, Ryan, HE, Johnson, RS, Jefferson, AB, Stokoe, D, Giaccia, AJ. 2000.** Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 14:391-396.

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Detlef Doenecke, der nach dem Tod von Herrn Prof. Dr. Kurt Jungermann sofort bereit war, diese Dissertationsarbeit zu übernehmen.

Prof. Dr. Thomas Kietzmann, dem Betreuer dieser Arbeit, danke ich ganz besonders für die gute Betreuung, die vielen Tipps, die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen hilfreichen Anregungen und Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hardeland danke ich für die Übernahme der Korreferentschaft.

Katja möchte ich für die vielen wertvollen Tipps im Bezug auf das "Klonieren" danken, und daß sich auch außerhalb des Labors eine Freundschaft entwickelt hat.

Ulrike möchte ich für die viele Unterstützung und die vielen Ratschläge bei der Aufreinigung der Expressionsproteine, für das angenehme Arbeiten im Labor und den vielen Spaß, den wir hatten, danken.

Elitsa, Doreen, Qing und Tolja möchte ich ebenfalls für die tolle Zusammenarbeit, das tolle Arbeitsklima und die viele Hilfsbereitschaft danken.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Abteilung, die mir immer behilflich waren, immer für mich da waren und für ein nettes Arbeitsklima sorgten.

Den Mitgliedern der Werkstatt, des Servicelabors, der Fotoabteilung und des Sekretariats danke ich für die immer freundliche Zusammenarbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an Schorse, der immer für mich da war und der mir besonders in den letzten Tagen vor Abgabe dieser Arbeit zur Seite gestanden hat.

Ein herzliches Dankeschön an meine Eltern und an meine Brüder für ihre Unterstützung, ihr Verständnis, und daß sie immer für mich da waren.



## LEBENS LAUF

### Angaben zur Person:

Name:	Flügel geb. Mennerich
Vorname:	Daniela
Geburtsdatum:	19.12.1971
Geburtsort:	Northeim
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Schulbildung:	
1978-1982	Grundschule Angerstein
1982-1984	Orientierungsstufe Lutherschule Göttingen
1984-1993	Max Planck Gymnasium Göttingen mit Abschluß Abitur
Studium:	
Oktober 1993	Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Studiengang Biologie
April 1996	Vordiplom in den Fächern Zoologie, Mikrobiologie, anorganische Chemie und physikalische Chemie
November 2000	Hauptdiplomprüfung in den Fächern Biochemie, Mikrobiologie und physikalische Chemie
Dezember 2000- Dezember 2001	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Georg- August-Universität Göttingen (Leiter Prof. Dr. K. Jungermann) mit dem Titel: "Modulation der O <sub>2</sub> - abhängigen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 Genexpression mittels Überexpression von Superoxiddismutase, Glutathion-Peroxidase und Catalase in primären Hepatocyten und HepG2- Zellen"
Januar 2002	Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Georg-August-Universität Göttingen (Leiter Prof. Dr. Detlef Doenecke)
seit April 2002	Assistentin des biochemischen Praktikums für Mediziner
März 2005	Abgabe der vorliegenden Dissertation





