

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und  
dem Institut für Pharmakologie  
der Charité-Universitätsmedizin Berlin

# **Untersuchung neuer Regulatoren der Glukose-stimulierten Genexpression**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Miriam Knauer  
Tierärztin aus Tübingen

Berlin 2015

Journal-Nr: 3777

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael Schupp  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

mice, animal models, liver cells, glycolysis, binding proteins, gene expression,  
hydroxyproline, immunoprecipitation tests

Tag der Promotion: 09.07.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-638-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abbildungsverzeichnis .....	XIII
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Leber als zentrales Stoffwechselorgan .....	1
1.2 Glukose als Energielieferant und Signalmolekül in der Leber .....	1
1.3 Der Transkriptionsfaktor ChREBP .....	2
1.3.1 Gen und Protein.....	2
1.3.2 Interaktionspartner MLX und ChoRE-Motiv der Zielgene.....	4
1.3.3 Regulation von ChREBP durch Glukose und posttranslationale Modifikation...	5
1.3.4 Expression und Regulation der Expression.....	7
1.3.5 ChREBP beta.....	7
1.3.6 ChREBP: Funktion und Zielgene in der Leber .....	7
1.4 Prolylhydroxylasen .....	10
1.4.1 Isoformen und Proteinstruktur .....	10
1.4.2 Klassisches Zielprotein HIF $\alpha$ .....	12
1.4.3 Enzymatische Aktivität .....	13
1.4.4 EGLN3: Besonderheiten in Expression, Stabilität und Lokalisation.....	15
1.4.5 EGLN3: Funktionen und Nicht-HIF-Zielproteine .....	16
1.5 Zielsetzung.....	17
1.5.1 Vorausgehende Daten .....	17
1.5.2 Hypothese.....	18
1.5.3 Zielsetzung der Arbeit.....	18
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien .....	19

---

2.1.2	Reaktionskits .....	21
2.1.3	Medien und Zellkultur.....	21
2.1.4	Zelllinien und Kulturbedingungen .....	22
2.1.5	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	22
2.1.6	Adenoviren .....	23
2.1.7	Plasmide .....	24
2.1.8	siRNA.....	24
2.1.9	Primer für qRT-PCR .....	24
2.1.10	Antikörper für Western Blot .....	25
2.1.11	Puffer und Lösungen .....	26
2.1.12	Verbrauchsmaterialien .....	29
2.1.13	Geräte und Hilfsmittel.....	29
2.1.14	Software .....	31
2.2	Methoden .....	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1	RNA-Extraktion.....	32
2.2.1.2	Quantifizierung von RNA.....	32
2.2.1.3	cDNA-Synthese .....	32
2.2.1.4	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) .....	33
2.2.1.5	Kompetente Bakterien und Transformation.....	34
2.2.1.6	Minipräparation zur Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	36
2.2.1.7	Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	36
2.2.1.8	Maxipräparation zur Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	36
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden .....	36
2.2.2.1	Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen.....	36
2.2.2.2	Extraktion von Gesamtprotein aus Lebergewebe .....	37
2.2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	37
2.2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	37
2.2.2.5	Western Blot .....	39
2.2.2.6	Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....	40

---

2.2.2.7	Proteinanalyse mittels Massenspektrometrie .....	42
2.2.2.8	Alkylierung der Proteine.....	43
2.2.2.9	Coomassie-Färbung des SDS-Gels .....	44
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	44
2.2.3.1	Passagierung von HEK-Zellen.....	44
2.2.3.2	Isolation primärer Maushepatozyten.....	45
2.2.3.3	Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmiden .....	46
2.2.3.4	Transfektion primärer Maushepatozyten mit siRNA.....	47
2.2.3.5	Behandlung von Zellen mit Cobaltchlorid.....	48
2.2.3.6	Adenoviraler Gentransfer.....	49
2.2.3.7	Adenovirusinfektion von HEK-Zellen.....	49
2.2.3.8	Adenovirusinfektion von primären Maushepatozyten.....	50
2.2.4	Tierversuche .....	51
2.2.4.1	Zucht der geflochten Mauslinie EGLN3 flox/flox .....	51
2.2.4.2	EGLN3 Knockout/Deletion mittels Cre/loxP-System.....	51
2.2.4.3	Versuchsgruppen.....	52
2.2.4.4	Injektion adenoviraler Partikel und Dosierung .....	52
2.2.4.5	Versuchsablauf.....	53
2.2.4.6	Bestimmung der Blutglukose-Werte.....	53
2.2.4.7	Bestimmung der Seruminsulin-Werte.....	54
2.2.5	Statistische Auswertung .....	54
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
3.1	Untersuchung der beobachteten Effekte auf Mediation durch HIF1 $\alpha$ .....	55
3.1.1	Einfluss einer EGLN3-Depletion auf HIF1 $\alpha$ -Protein .....	55
3.1.2	Einfluss einer EGLN3-Depletion auf HIF1 $\alpha$ -Zielgene .....	56
3.2	Identifikation und Charakterisierung einer physikalischen Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3 .....	57
3.2.1	Bestätigung der Interaktionspartner mittels Co-IP .....	57
3.2.1.1	Co-IP von EGLN3 und ChREBP.....	57
3.2.1.2	Co-IP von ChREBP und EGLN3.....	59

3.2.1.3	Co-IP von verkürztem ChREBP und EGLN3 .....	60
3.2.2	Untersuchung der Regulation und Interaktion auf Spezifität von EGLN3 .....	61
3.2.2.1	Regulation von ChREBP-Zielgenen durch EGLNs.....	61
3.2.2.2	Co-IP von ChREBP und EGLNs .....	62
3.2.3	Bestätigung der Interaktion mit endogenem Protein.....	63
3.2.3.1	Co-IP von ChREBP und EGLN3 aus primären Hepatozyten.....	64
3.2.3.2	Co-IP von ChREBP und EGLN3 aus Lebergewebe.....	65
3.3	Untersuchung von ChREBP auf Prolinhydroxylierung mittels Massenspektrometrie .....	66
3.4	Funktionelle Konsequenz der Prolinhydroxylierung von ChREBP .....	69
3.4.1	Einfluss einer EGLN3-Depletion auf ChREBP .....	69
3.4.2	Einfluss einer EGLN3-Hemmung auf ChREBP .....	70
3.5	Funktioneller Zusammenhang zwischen EGLN3 und ChREBP .....	71
3.6	Untersuchung der ChREBP-Regulation in Mäusen.....	73
3.6.1	Deletion von EGLN3 in der Leber.....	73
3.6.2	Metabolische Phänotypisierung nach EGLN3-Deletion .....	74
3.6.3	Einfluss der EGLN3-Deletion auf ChREBP-Protein in der Leber.....	74
3.6.4	Einfluss der EGLN3-Deletion auf ChREBP-Zielgene in der Leber .....	76
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
4.1	Interaktion von ChREBP und EGLN3.....	77
4.1.1	Interaktion von überexprimiertem Protein .....	77
4.1.2	Interaktion von endogenem Protein .....	78
4.1.3	Nachweis direkter Protein-Protein-Interaktion .....	79
4.1.4	Charakterisierung des Interaktionspartners EGLN3 .....	79
4.1.5	Charakterisierung des Interaktionspartners ChREBP .....	80
4.1.6	Interaktion von ChREBP und EGLN1 .....	80
4.2	Prolinhydroxylierung im ChREBP-Protein .....	81
4.2.1	Identifikation der Prolinhydroxylierung.....	81
4.2.2	Positionen der Prolinhydroxylierung .....	82
4.2.3	Quantitativer Nachweis der Prolinhydroxylierung .....	83

---

4.3	Regulation von ChREBP durch EGLN3 .....	83
4.3.1	Einfluss auf ChREBP-Proteinexpression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	83
4.3.2	Einfluss auf ChREBP-Zielgenexpression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	85
4.3.3	Einfluss auf Glukose- und Fettstoffwechsel <i>in vivo</i> .....	86
4.4	Andere Effektoren von EGLN3 .....	87
4.5	Andere Regulatoren von ChREBP .....	88
4.5.1	Insulin, LXR und SREBP-1c .....	88
4.5.2	Retinol Saturase.....	88
4.6	Beeinflussung der ChREBP-Aktivität als therapeutischer Ansatz .....	89
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
	Ein herzliches Dankeschön ... ..	XV
	Selbständigkeitserklärung .....	XVII





## Abkürzungsverzeichnis

(PDH)-E1 $\beta$	<i>pyruvate dehydrogenase, subunit E1-beta (engl.)</i>
$\mu$ M	Mikromolar
2-OG	2-Oxoglutarat
36B4	<i>ribosomal protein, large, P0 (engl.)</i>
A	Adenin
ACC1	<i>acetyl-Coenzyme A carboxylase 1 (engl.)</i>
Adeno	Adenovirus
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCA	<i>bicinchoninic acid (engl.);</i> Bicinchoninsäure
bHLHZip	<i>basic helix-loop-helix/leucine-zipper domain (engl.)</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid (engl.);</i> Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChoRE	<i>carbohydrate response element (engl.)</i>
ChREBP	<i>carbohydrate response element-binding protein (engl.)</i>
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
Cre	Cre-Rekombinase
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (engl.)</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid (engl.);</i> Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution (engl.)</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence (engl.)</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid (engl.);</i> Tetraanion der Ethylendiamintetraessigsäure
EGLN	<i>Egl(egg-laying deficiency)-nine family hypoxia-inducible factor (engl.)</i>
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid (engl.);</i> Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay (engl.)</i>
F <sub>1</sub> -Generation	Filialgeneration 1, Nachkommen der ersten Generation
Fab-Region	<i>fragment antigen binding (engl.);</i> Antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
FASN	<i>fatty acid synthase (engl.)</i>

---

FBS	<i>fetal bovine serum (engl.);</i> Fetales Kälberserum
Fc-Region	<i>fragment crystallisable (engl.);</i> Kristallisierbares konstantes Fragment eines Antikörpers
FK	<i>fructokinase (engl.)</i>
G	Guanin
G6PC	<i>glucose-6-phosphatase, catalytic subunit (engl.)</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (engl.)</i>
GCK	<i>glucokinase (engl.)</i>
GFP	<i>green fluorescent protein (engl.);</i> Grün fluoreszierendes Protein
GLUT1	<i>glucose transporter 1 (engl.)</i>
GLUT2	<i>glucose transporter 2 (engl.)</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor (engl.)</i>
GRACE	<i>glucose-response activation conserved element (engl.)</i>
GSM	<i>glucose-sensing module (engl.)</i>
GST	Glutathiontransferase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution (engl.)</i>
HCl	Salzsäure
HCLK2	<i>human homolog of the Caenorhabditis elegans biological clock protein CLK-2 (engl.)</i>
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney cells (engl.);</i> Menschliche embryonale Nierenzellen
HIF	<i>hypoxia-inducible factor (engl.)</i>
HIF $\alpha$	<i>hypoxia-inducible factor, alpha subunit (engl.)</i>
HIF $\beta$	<i>hypoxia-inducible factor, beta subunit (engl.)</i>
HPRT	<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (engl.)</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase (engl.);</i> Meerrettich-Peroxidase
ifu	<i>infectious units (engl.);</i> Infektiöse Einheiten
Input	Totalprotein aus Gesamtzelllysat
IP	Immunopräzipitation
kDa	Kilodalton
LB-Agar	<i>lysogeny broth (engl.);</i> Festes Nährmedium für Bakterienkultur
LB-Medium	<i>lysogeny broth (engl.);</i> Flüssiges Nährmedium für Bakterienkultur
LID	<i>low-glucose inhibitory domain (engl.)</i>
LXR	<i>liver X receptor (engl.)</i>
M	Molar
MCR	<i>mondo conserved region (engl.)</i>
MG	Molekulargewicht
MLX	<i>Max-like protein X (engl.)</i>
MLXIPL	<i>Max-like protein X interacting protein-like (engl.)</i>
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid (engl.);</i> Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
MYND	<i>MYND-type zinc finger domain (engl.)</i>
NADPH	Nicotinsäure Adenin-Dinukleotid-Phosphat

---

NES1	<i>nuclear export signal 1 (engl.)</i>
NES2	<i>nuclear export signal 2 (engl.)</i>
NLS	<i>nuclear localization signal (engl.)</i>
ODD	<i>oxygen dependent degradation domain (engl.)</i>
P	Prolin
P/S/A	Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B
P4Hc	<i>prolyl-4-hydroxylase containing sequence (engl.)</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline (engl.)</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction (engl.)</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PHD	<i>prolyl-4-hydroxylase domain protein (engl.)</i>
PKLR	<i>pyruvate kinase liver and red blood cell (engl.)</i>
PKM2	<i>muscle pyruvate kinase 2 (engl.)</i>
PP2A	<i>proteinphosphatase 2A (engl.)</i>
PPP	<i>pentose phosphate pathway (engl.)</i> ; Pentosephosphatweg
pro-rich	<i>proline-rich region (engl.)</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR rel.	<i>quantitative real-time PCR (engl.)</i> ; Quantitative Echtzeit-PCR relativ(e)
RETSAT	<i>retinol saturase (engl.)</i>
RGS16	<i>regulator of G-protein signaling 16 (engl.)</i>
RISC	<i>ribonucleic acid-induced silencing complex (engl.)</i>
RNA	<i>ribonucleic acid (engl.)</i> ; Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species (engl.)</i>
Rpm	<i>round per minute (engl.)</i> ; Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCD1	<i>stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (engl.)</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat (engl.)</i> ; Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
Ser	Serin
siRNA	<i>small/short interfering ribonucleic acid (engl.)</i> ; Kurze interferierende Ribonukleinsäure
SREBP-1c	<i>sterol regulatory element binding protein 1c (engl.)</i>
Stabw.	Standardabweichung
T	Thymin
TBS	<i>tris-buffered saline (engl.)</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	<i>tris-buffered saline and Tween<sup>®</sup> 20 (engl.)</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween <sup>®</sup> 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TR $\beta$	<i>thyroid hormon receptor beta (engl.)</i>

TXNIP	<i>thioredoxin interacting protein (engl.)</i>
u	<i>unit (engl.); Einheit</i>
U	Uridin
unspezif.	Unspezifische Proteinbande
V. cava. caud.	<i>vena cava caudalis (lat.); Hintere Hohlvene</i>
V. facialis	<i>vena facialis (lat.); Gesichtsvene</i>
V. portae	<i>vena portae (lat.); Portalvene, Pfortader</i>
VEGF $\alpha$	<i>vascular endothelial growth factor alpha (engl.)</i>
VHL	<i>von Hippel-Lindau protein (engl.)</i>
WBSCR14	<i>Williams-Beuren syndrome critical region 14 protein (engl.)</i>
well	<i>well (engl.); Loch/Vertiefung in einer Zellkulturplatte</i>
Wo	Wochen
wt	Wildtyp
X5P	Xylulose-5-Phosphat
Zip-like	<i>leucine-zipper-like domain (engl.)</i>
ZZ	Zitratzyklus
$\beta$ 2-AR	<i><math>\beta</math>2-adrenergic receptor (engl.)</i>
$\beta$ -ACTIN	<i>beta-actin (engl.)</i>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Funktionelle Motive des ChREBP-Proteins. ....	3
Tabelle 2:	Ausgewählte ChREBP-Zielgene in der Leber .....	8
Tabelle 3:	Benennung und Proteingröße der drei EGLN-Isoformen von Maus und Mensch..	11
Tabelle 4:	Übersicht über verwendete Reaktionskits.....	21
Tabelle 5:	Übersicht über verwendete Adenoviren.....	23
Tabelle 6:	Übersicht über verwendete Plasmide.....	24
Tabelle 7:	Übersicht über verwendete siRNA .....	24
Tabelle 8:	Primer für qRT-PCR .....	25
Tabelle 9:	Antikörper für Western Blot .....	25
Tabelle 10:	Übersicht über verwendete Software .....	31
Tabelle 11:	Mastermix für qRT-PCR.....	33
Tabelle 12:	Bedingungen für qRT-PCR.....	34
Tabelle 13:	Trenngele für SDS-Page .....	38
Tabelle 14:	Sammelgel für SDS-Page.....	38
Tabelle 15:	Immunologische Detektion von Proteinen.....	40
Tabelle 16:	Coomassie-Färbung des SDS-Gels .....	44
Tabelle 17:	Injektionsnarkose zur Isolation primärer Maushepatozyten .....	45
Tabelle 18:	Verwendung von Adenoviren zur Infektion von HEK-Zellen.....	50
Tabelle 19:	Verwendung von Adenoviren zur Infektion von primären Maushepatozyten....	50
Tabelle 20:	Zuchtkennzahlen der 1:1 Verpaarung .....	51
Tabelle 21:	Versuchsgruppen der Tierversuche.....	52
Tabelle 22:	Metabolische Kennwerte nach EGLN3-Deletion in der Leber.....	74



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	ChREBP-Proteinstruktur.....	4
Abbildung 2:	Proteinstruktur der drei humanen EGLN-Isoformen .....	12
Abbildung 3:	Enzymatische Aktivität der EGLNs und Zusammenhang mit dem Zellstoffwechsel .....	14
Abbildung 4:	Depletion von EGLN3 in primären Hepatozyten führt zu reduzierter Expression von ChREBP-Zielgenen .....	18
Abbildung 5:	Schema zur cDNA-Synthese.....	33
Abbildung 6:	Transformation von <i>E. coli</i> XL1-blue .....	35
Abbildung 7:	Schema zur SDS-Page.....	39
Abbildung 8:	Pipettierschema für die Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmiden.....	47
Abbildung 9:	Pipettierschema für die Transfektion von primären Maushepatozyten mit siRNA.....	48
Abbildung 10:	Ablauf des Tierversuchs in schematischer Darstellung .....	53
Abbildung 11:	Keine Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ -Protein durch EGLN3-Depletion in primären Hepatozyten.....	56
Abbildung 12:	Keine Induktion von HIF1 $\alpha$ -Zielgenen durch EGLN3-Depletion in primären Hepatozyten.....	57
Abbildung 13:	EGLN3 interagiert mit ChREBP.....	58
Abbildung 14:	ChREBP interagiert mit EGLN3.....	60
Abbildung 15:	ChREBP in verkürzter Form interagiert mit EGLN3.....	61
Abbildung 16:	Depletion von EGLNs in primären Hepatozyten .....	62
Abbildung 17:	Regulation von ChREBP-Zielgenen durch EGLNs in primären Hepatozyten...	62
Abbildung 18:	ChREBP interagiert mit EGLN1 und EGLN3 .....	63
Abbildung 19:	Interaktion von endogenem ChREBP und endogenem EGLN3 in primären Hepatozyten.....	65
Abbildung 20:	Interaktion von endogenem ChREBP und endogenem EGLN3 in Lebergewebe.....	66
Abbildung 21:	Die Aminosäure Prolin im ChREBP-Protein .....	67
Abbildung 22:	Massenspektrometrie-Analyse des ChREBP-Proteins mit sicherer oder potentieller Prolinhydroxylierung .....	68
Abbildung 23:	Konservierung der sicher oder potentiell hydroxylierten Prolinreste im ChREBP-Protein. ....	69
Abbildung 24:	Depletion von EGLN3 in primären Hepatozyten führt zur Reduktion von ChREBP .....	70
Abbildung 25:	Hemmung von EGLN3 in primären Hepatozyten führt zur Reduktion von ChREBP .....	71

---

Abbildung 26: Deletion von EGLN3 in primären Hepatozyten mit gleichzeitiger Überexpression von ChREBP .....	72
Abbildung 27: Der Effekt der Deletion von EGLN3, die reduzierte Expression von ChREBP-Zielgenen, wird durch ektope Zugabe von ChREBP vollständig aufgehoben ...	73
Abbildung 28: Deletion von EGLN3 in der Leber .....	74
Abbildung 29: Deletion von EGLN3 in der Leber führt zu reduzierter Expression von ChREBP-Protein. ....	75
Abbildung 30: Proteinquantifizierung von ChREBP .....	75
Abbildung 31: Deletion von EGLN3 in der Leber führt zu reduzierter Expression von ChREBP-Zielgenen .....	76



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Leber als zentrales Stoffwechselorgan

Es gibt verschiedene Regulationsmechanismen über die sich der Organismus an wechselnde nutritive Versorgungssituationen anpassen kann. Für die Regulation des Glukose- und Fettstoffwechsels spielt die Leber eine zentrale Rolle. Hierbei ermöglichen unter anderem die Hormone Insulin und Glukagon das Konstanthalten des Blutglukosespiegels (Berg *et al.* 2013).

Unter Nahrungsentzug sinkt der Glukosespiegel im Blut, Glukagon steigt an. Glukagon stimuliert in der Leber den Abbau von Glykogen (Glykogenolyse) und die Synthese von Glukose (Glukoneogenese) und hält damit die Glukosekonzentration im Blut aufrecht. Gleichzeitig hemmt Glukagon den Abbau von Glukose (Glykolyse) sowie die Synthese von Glykogen und Fettsäuren. Außerdem wird der Abbau von Fettsäuren in der  $\beta$ -Oxidation zu einer wichtigen Energiequelle. Bei länger anhaltenden Hungerperioden bildet die Leber zudem in großen Mengen Ketonkörper aus Acetyleinheiten, die im Fettsäureabbau entstehen. Zahlreichen extrahepatischen Geweben können Ketonkörper als Energielieferant dienen. Besonders das Gehirn ist in der Lage, nach längerem Glukosemangel, zur partiellen Nutzung von Ketonkörpern überzugehen. Die Verwertung von Ketonkörpern reduziert den Glukosebedarf des Organismus erheblich. Dadurch kann die Glukoseversorgung von Geweben, wie beispielsweise Erythrozyten, die auf Glukose als Energielieferant angewiesen sind, gesichert werden (Berg *et al.* 2013, Ameer *et al.* 2014, Rui 2014).

Bei ausreichendem Nahrungsangebot steigen Glukose- und Insulinspiegel im Blut an. Die Leber nimmt, vor allem konzentrationsgesteuert über den Glucose transporter 2 (GLUT2), vermehrt Glukose auf. Dementsprechend reduziert die Leber insulinvermittelt die endogene Glukoseproduktion (Glykogenolyse und Glukoneogenese), erhöht den Abbau von Glukose über die Glykolyse und steigert die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen (Glykogensynthese). Nach dem Auffüllen der Glykogenspeicher beginnt die Leber überschüssige Glukose in der De-Novo-Lipidsynthese in Triglyzeride umzuwandeln und als langfristige Energiereserve zu speichern (Berg *et al.* 2013, Ameer *et al.* 2014, Rui 2014).

## 1.2 Glukose als Energielieferant und Signalmolekül in der Leber

Aus dem Blut wird Glukose über GLUT2 in die Leber aufgenommen. Dort wird Glukose vor allem durch die Glucokinase (GCK) phosphoryliert (Rehner und Daniel 2010). Das gebildete

Glukose-6-Phosphat wird in den Hepatozyten angereichert und kann in verschiedene Stoffwechselwege eingespeist werden: die Glykolyse, die Glykogensynthese oder den Pentosephosphatweg (PPP). Der PPP ist ein alternativer Stoffwechselweg zum Abbau und zur Umwandlung verschiedener Kohlenhydrate, wobei das Reduktionsmittel NADPH gebildet wird. Das entstandene NADPH dient als Coenzym für die Lipidsynthese. Auch Pyruvat, als Endprodukt der Glykolyse, ist über den Zitratzyklus in den Stoffwechselweg der Lipidsynthese eingebunden. So besteht in der Leber ein enger Zusammenhang zwischen Glukose- und Fettstoffwechsel (Postic *et al.* 2004, Horn 2012, Rui 2014).

Glukose übernimmt dabei nicht nur die Funktion eines Energielieferanten, sondern fungiert, unter anderem in der Leber, auch als Signalmolekül. Dies geschieht vor allem durch die glukoseabhängige Regulation von Zielgenen des Glukose- und Fettstoffwechsels (Girard *et al.* 1997). Auch dafür muss Glukose zunächst in den Hepatozyten durch die GCK zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt werden (Prip-Buus *et al.* 1995). Die Expression der GCK ist insulinabhängig und wird hauptsächlich über den Transkriptionsfaktor Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) reguliert (Foretz *et al.* 1999, Dentin *et al.* 2004).

### 1.3 Der Transkriptionsfaktor ChREBP

Der Transkriptionsfaktor Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reguliert in der Leber die Expression verschiedener Gene des Glukose- und Fettstoffwechsels (Iizuka *et al.* 2004, Ishii *et al.* 2004, Ma *et al.* 2006). Die Bezeichnung verweist zum einen auf die Funktion, dass ChREBP im Stoffwechsel der Zelle auf „Kohlenhydrate“ anspricht, zum anderen darauf, dass ChREBP als Transkriptionsfaktor an die DNA binden und damit die Expression seiner Zielgene beeinflussen kann. ChREBP gilt als ein Schlüsselmediator, der in der Leber zentral an der Umwandlung von Kohlenhydraten in Fette beteiligt ist.

Identifiziert wurde ChREBP ursprünglich als Williams-Beuren syndrome critical region 14 protein (WBSCR14). Es ist eines von mindestens 17 deletierten Genen des Chromosoms 7 bei Patienten mit Williams-Beuren-Syndrom (de Luis *et al.* 2000). Weitere Synonyme sind Max-like protein X interacting protein-like (MLXIPL) und MondoB (NCBI(1) 2015). Diese Bezeichnungen leiten sich von Eigenschaften oder Strukturen des Proteins ab, die nachfolgend erwähnt sind.

#### 1.3.1 Gen und Protein

Das ChREBP-Gen liegt beim Menschen am Genlocus 7q11.23 und umfasst 33 Kilobasenpaare. Es enthält 17 Exons und 16 Introns. Bei der Maus liegt das Gen auf Chromosom 5.

Das humane Protein ChREBP besteht aus 852, das ChREBP-Protein der Maus aus 864 Aminosäuren und ist damit ein relativ großes Protein mit etwa 93 bzw. 95 kDa Molekulargewicht (de Luis *et al.* 2000).

Das ChREBP-Protein enthält mehrere funktionelle Motive, die in Tabelle 1 mit der zugehörigen Position aufgeführt und nachfolgend kurz erläutert sind. Abschließend zeigt Abbildung 1 eine schematische Darstellung der Proteinstruktur von ChREBP einschließlich der genannten funktionellen Elemente.

**Tabelle 1: Funktionelle Motive des ChREBP-Proteins.** Die Position ist mit Hilfe der Aminosäuresequenz des ChREBP-Proteins der Maus angegeben. AS = Aminosäure.

Motiv	Name	Position	Referenz
bHLHZip	basic helix-loop-helix/leucine-zipper domain	AS 661-728	de Luis <i>et al.</i> 2000
Zip-like	leucine-zipper-like domain	AS 729-742 AS 806-846	
pro-rich	proline-rich region	AS 387-596	
NLS	nuclear localization signal	AS 158-175	
NES1	nuclear export signal 1	AS 5-15	Fukasawa <i>et al.</i> 2010
NES2	nuclear export signal 2	AS 85-95	
GSM	glucose-sensing module	AS 37-298	Li <i>et al.</i> 2006
LID	low-glucose inhibitory domain	AS 37-192	
GRACE	glucose-response activation conserved element	AS 197-298	

ChREBP gehört zu den basic helix-loop-helix/leucine-zipper (bHLHZip) Transkriptionsfaktoren der Mondo-Familie (de Luis *et al.* 2000, Yamashita *et al.* 2001, Poupeau und Postic 2011). Das C-terminale bHLHZip-Motiv ermöglicht ChREBP die Ausbildung von Heterodimeren mit dem obligaten Interaktionspartner MLX sowie die spezifische DNA-Bindung an die E-Box-Sequenzen des ChoRE-Motivs der Zielgene, siehe auch Kapitel 1.3.2 (Interaktionspartner MLX und ChoRE-Motiv der Zielgene).

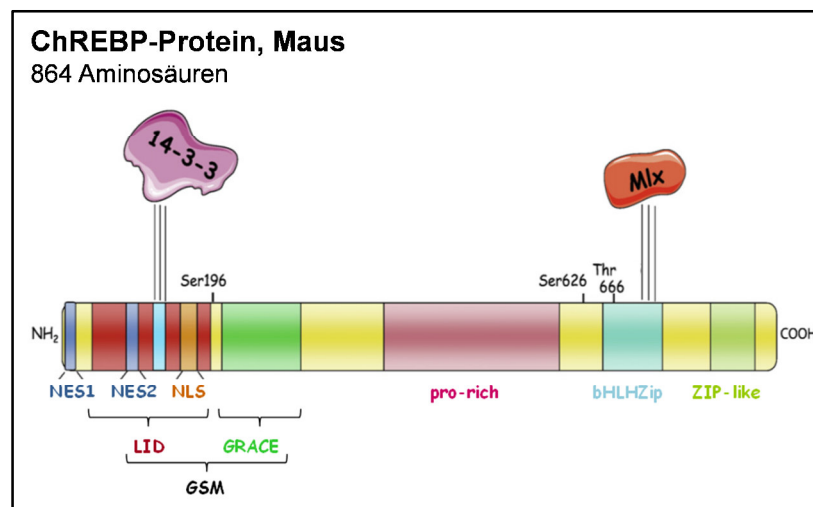
Zusätzlich wurden zwei leucine-zipper-like domains (Zip-like) und ein Abschnitt mit besonderer Häufung der Aminosäure Prolin identifiziert, dieser wird als proline-rich region (pro-rich) bezeichnet (de Luis *et al.* 2000). Sowohl die leucine-zipper-like domains als auch die proline-rich region werden funktionell mit der Ausbildung weiterer Protein-Protein-Interaktionen oder Dimerisierung in Zusammenhang gebracht (Yamashita *et al.* 2001).

ChREBP wird durch Glukose aktiviert und durch Translokation zwischen Zellplasma (Zytosol) und Zellkern (Nukleus) reguliert, siehe auch Kapitel 1.3.3 zur ChREBP-Regulation. Das nuclear localisation signal (NLS) ist hierbei essentiell für den glukoseinduzierten Transport von ChREBP in den Nukleus und die darauffolgende Aktivierung der Transkription von Zielgenen (Kawaguchi *et al.* 2001, Davies *et al.* 2008). Die Inaktivierung von ChREBP erfolgt bei niedrigem Glukoseangebot durch Export vom Nukleus in das Zytosol, vermittelt

über nuclear export signal 1/2 (NES1, NES2) (Fukasawa *et al.* 2010). Alle drei Motive (NLS, NES1, NES2) sind N-terminal lokalisiert.

Für die glukoseinduzierte Aktivierung wurden spezielle Elemente im ChREBP-Protein identifiziert. ChREBP enthält ein glucose-sensing module (GSM), welches die fünf Submodule mondo conserved regions I-V (MCRs I-V) beinhaltet. Das GSM besteht aus zwei Teilen: der low-glucose inhibitory domain (LID) und dem glucose-response activation conserved element (GRACE). LID hemmt intramolekular die Aktivität von GRACE bei niedrigen Glukosekonzentrationen. Diese Hemmung von GRACE durch LID wird unter hohen Glukosekonzentrationen aufgehoben und GRACE vermittelt die Transaktivierung von ChREBP (Li *et al.* 2006).

Für die N-terminale Region von ChREBP (AS 116-135) wurde eine Interaktion mit dem Protein 14-3-3 nachgewiesen, welche ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der subzellulären Lokalisation von ChREBP spielt. Abhängig vom Phosphorylierungsstatus bindet Protein 14-3-3 an ChREBP, hemmt die Region des NLS und hält damit ChREBP im Zytosol zurück (Merla *et al.* 2004, Li *et al.* 2008, Sakiyama *et al.* 2008).



**Abbildung 1: ChREBP-Proteinstruktur** mit Angabe wichtiger funktioneller Motive aus Tabelle 1. Zusätzlich gezeigt sind die C-terminale Interaktion mit MLX und die N-terminale Interaktion mit Protein 14-3-3. Serin 196 (Ser196), Serin 626 (Ser626) und Threonin 666 (Thr666) kennzeichnen drei Aminosäuren des Mausproteins, die durch Proteinkinase A phosphoryliert werden. Abbildung modifiziert nach Poupeau und Postic 2011.

### 1.3.2 Interaktionspartner MLX und ChoRE-Motiv der Zielgene

Obligate Voraussetzung für die Funktion von ChREBP, glukoseabhängig die Genregulation zu beeinflussen, ist die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Max-like protein X (MLX). MLX ist ebenfalls ein Mitglied der bHLHZip-Transkriptionsfaktoren und bildet mit ChREBP Heterodimere (Cairo *et al.* 2001, Stoeckman *et al.* 2004, Ma *et al.* 2005).

MLX ist ein stabiles Protein, welches in großen Mengen vorkommt und nicht auf nutritive Faktoren oder hormonelle Signale reagiert. Es erhöht vor allem die DNA-Bindungs Kapazität des ChREBP/MLX-Komplexes. ChREBP ist mit einer Halbwertszeit von 30 min ein eher instabiles Protein und fungiert in diesem Komplex als sensorische Komponente, um auf metabolische Einflüsse zu reagieren (Cairo *et al.* 2001, Uyeda und Repa 2006).

Nach der glukoseinduzierten Translokation in den Nukleus bilden ChREBP und MLX ein Heterodimer. Zwei solcher Heterodimere bilden einen Heterotetramer-Komplex, welcher an die Promotorregion der ChREBP-Zielgene binden kann (Ma *et al.* 2006, Uyeda und Repa 2006, Ma *et al.* 2007).

Die Promotorregion glukoseregulierter Zielgene zeichnet sich durch ein carbohydrate response element (ChoRE) aus, welches für die Ansprechbarkeit auf Glukose gebraucht wird (Thompson und Towle 1991). Das ChoRE-Motiv beinhaltet zwei E-Box-Sequenzen, die durch fünf Nukleotide voneinander getrennt sind: 5'-CACGTGnnnnnCACGTG-3' (Shih *et al.* 1995).

Im ChREBP/MLX-Komplex vermittelt hauptsächlich das bHLHZip-Motiv von MLX die Bindung des Heterotetramers an die E-Box-Sequenzen des ChoRE-Motivs (Ma *et al.* 2006, Ma *et al.* 2007).

### **1.3.3 Regulation von ChREBP durch Glukose und posttranslationale Modifikation**

Die Aktivierung von ChREBP erfolgt durch Glukose, posttranslationale Modifikationen und einen Translokationsprozess zwischen Zytosol und Nukleus. Der Regulation liegen komplexe Mechanismen zugrunde, die unter anderem auf Nahrungsbestandteile wie Glukose oder Fettsäuren und nahrungsgesteuerte Hormone wie Glukagon reagieren.

Ein Modell zur Aktivierung von ChREBP ist das „PP2A/X5P-Modell“. In diesem Modell wird Xylulose-5-Phosphat (X5P) als entscheidende Komponente betrachtet, die über Proteinphosphatase 2A (PP2A) und Dephosphorylierung den nukleären Transport von ChREBP und seine Aktivierung vermittelt (Kabashima *et al.* 2003). Ergänzend dazu wurden intramolekulare glukosesensitive Elemente im ChREBP-Protein gefunden (Li *et al.* 2006). Diese sind in Kapitel 1.3.1 (Gen und Protein) beschrieben.

Das „PP2A/X5P-Modell“ beruht auf der Entstehung von X5P in der Leber im nicht-oxidativen Abschnitt des PPP und der daraus resultierenden Aktivierung der zytosolischen PP2A. Durch PP2A wird ChREBP, welches in inaktiver Form im Zytosol vorliegt, an Position Ser196 in der Nähe des NLS dephosphoryliert (Kabashima *et al.* 2003). Diese

Dephosphorylierung bewirkt die Dissoziation von Protein 14-3-3 und den Transport von ChREBP in den Nukleus (Li *et al.* 2008, Sakiyama *et al.* 2008).

Im Nukleus dephosphoryliert die nukleäre Form der PP2A weitere Positionen an ChREBP nahe bzw. innerhalb der bHLHZip-Region (Ser626, Thr666), wodurch ChREBP aktiviert wird. Nach Heterodimerbildung mit MLX bindet der Komplex an die Promotorregion der Zielgene und vermittelt deren Transkription (Kawaguchi *et al.* 2001, Kabashima *et al.* 2003).

Studien in primären Hepatozyten haben gezeigt, dass dieser Regulationsmechanismus sehr schnell abläuft. Die Akkumulation von ChREBP im Nukleus war innerhalb von drei Stunden zu beobachten (Kabashima *et al.* 2003).

Unter Nahrungsentzug oder bei niedrigem Glukoseangebot steigt der Glukagon- und cAMP-Spiegel in den Hepatozyten und führt zur Aktivierung der Proteinkinase A. Außerdem löst ein erhöhtes Angebot an Fettsäuren (Hochfettdiät) die Aktivierung der Adenosinmonophosphatkinase aus. Beide Enzyme katalysieren die Phosphorylierung der oben genannten Schlüsselstellen im ChREBP-Protein, hemmen die DNA-Bindungskapazität von ChREBP und reduzieren somit die Transkription der Zielgene. Schließlich erfolgt ein Export des phosphorylierten ChREBP-Proteins zurück ins Zytosol (Kawaguchi *et al.* 2001, Kawaguchi *et al.* 2002, Kabashima *et al.* 2003). Dort bewirken weitere Phosphorylierungen eine Interaktion mit dem Protein 14-3-3, was eine Sequestrierung von inaktivem ChREBP im Zytosol zur Folge hat (Merla *et al.* 2004).

Inzwischen ist jedoch, durch aktuellere Studien, die Rolle von PP2A als primärer Aktivator in Frage gestellt. Trotzdem scheint der Mechanismus der Phosphorylierung/Dephosphorylierung ein wichtiger Modulator der ChREBP-Aktivität zu sein. Es konnten mittlerweile für weitere Positionen im ChREBP-Protein Phosphorylierungen nachgewiesen werden, die teilweise nur bei hoher cAMP- oder nur bei hoher Glukosekonzentration zu beobachten waren. Somit hat die Phosphorylierung möglicherweise sowohl positive als auch negative regulatorische Funktionen für ChREBP (Tsatsos *et al.* 2008, Havula und Hietakangas 2012). Auch andere posttranslationale Modifikationen von ChREBP mit Einfluss auf Proteinlevel und Zielgenexpression wurden identifiziert. Dazu gehören beispielsweise Acetylierung und O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine Modifikation (Bricambert *et al.* 2010, Sakiyama *et al.* 2010, Guinez *et al.* 2011, Park *et al.* 2014).

Mittlerweile wurde auch gezeigt, dass andere Metabolite, wie beispielsweise Glukose-6-Phosphat, eine wichtige Funktion für den nukleären Transport und die Aktivierung von ChREBP haben (Dentin *et al.* 2012). Andere Studien ergänzen, dass auch Ketonkörper eine wichtige Rolle bei der Regulation von ChREBP einnehmen und eine Retention des Proteins im Zytosol bewirken (Nakagawa *et al.* 2013). Außerdem wurde inzwischen auch Fructose-2,6-bisphosphat als ChREBP-Aktivator identifiziert (Arden *et al.* 2012).

### 1.3.4 Expression und Regulation der Expression

Das Expressionsmuster von ChREBP spiegelt die Funktion des glukoseregulierten Transkriptionsfaktors wieder. ChREBP wird ubiquitär exprimiert, jedoch besonders stark in Geweben des Glukose- und Fettstoffwechsels (Iizuka *et al.* 2004).

Die höchste ChREBP-Expression findet sich in der Leber (de Luis *et al.* 2000). Danach folgen in absteigender Reihenfolge: braunes und weißes Fettgewebe, Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum), Niere und Muskel (Yamashita *et al.* 2001, Iizuka *et al.* 2004). Außerdem wurde ChREBP auch in verschiedenen Gehirnregionen, vor allem im Kleinhirn (Cairo *et al.* 2001) und in Inselzellen von Ratten nachgewiesen (Wang und Wollheim 2002).

Durch Nahrungsentzug oder Hochfettdiät wird die ChREBP-Expression in der Leber reduziert und durch kohlenhydratreiches Futter induziert (Dentin *et al.* 2005). Insulin induziert ebenfalls die ChREBP-Genexpression (Sirek *et al.* 2009). Außerdem sind die nukleären Rezeptoren Thyroid hormon receptor beta (TR $\beta$ ) und Liver X receptor (LXR) an der positiven Regulation der ChREBP-Expression beteiligt (Gauthier *et al.* 2010).

### 1.3.5 ChREBP beta

Neben der ursprünglichen Form von ChREBP, auch als ChREBP $\alpha$  oder ChREBPwt bezeichnet, wurde in Fettgewebe eine zweite Isoform entdeckt und als ChREBP $\beta$  definiert. Durch Translation von einem alternativen Promotor entsteht ein Protein mit einer Länge von nur 687 Aminosäuren. Es wird vermutet, dass Glukose zuerst die Transkription von ChREBP $\alpha$  und dieses wiederum die Transkription der Isoform beta induziert. Der kürzeren Form ChREBP $\beta$  fehlen die N-terminalen 177 Aminosäuren, die unter anderem LID sowie die Bindungsstelle für Protein 14-3-3 beinhalten. Dies führt dazu, dass ChREBP $\beta$  eine höhere transkriptionelle Aktivität aufweist als ChREBP $\alpha$  und diese von der Glukosekonzentration unabhängig ist. Momentan ist noch unklar, ob es die Hauptaufgabe von ChREBP $\alpha$  ist, in der Zelle durch die Induktion der Expression von ChREBP $\beta$  eine spezifische Verstärkung der Zielgenexpression zu bewirken (Herman *et al.* 2012, Filhoulaud *et al.* 2013). Im Nachfolgenden ist die Isoform alpha als ChREBP oder ChREBP $\alpha$  und die Isoform beta als ChREBP $\beta$  bezeichnet.

### 1.3.6 ChREBP: Funktion und Zielgene in der Leber

Stimuliert durch Glukose hat ChREBP eine zentrale Funktion in der Regulation glykolytischer und lipogener Gene und vermittelt in der Leber die Aufnahme von Kohlenhydraten

und ihre Umwandlung in Fette zur langfristigen Speicherung von Energie (Uyeda und Repa 2006, Havula und Hietakangas 2012).

Der Großteil der ChREBP-Zielgene wird durch ChREBP induziert. Es gibt jedoch auch Gene, die durch ChREBP negativ reguliert sind (Ma *et al.* 2006).

Eine Auswahl wichtiger Glukose-aktivierter hepatischer ChREBP-Zielgene aus verschiedenen Stoffwechselwegen ist in Tabelle 2 dargestellt. Dazu gehören beispielsweise der Glucose transporter 2 (GLUT2), glykolytische und lipogene Enzyme wie die Pyruvate kinase liver and red blood cell (PKLR), die Fatty acid synthase (FASN) und die Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 (SCD1). Außerdem gehört Regulator of G-protein signaling 16 (RGS16) zu den ChREBP-Zielgenen.

Überraschenderweise induziert ChREBP auch die Expression von Glucose-6-phosphatase (G6PC), einem Enzym der Glukoneogenese. Zunächst erscheint diese gleichzeitige Induktion glykolytischer und glukoneogenetischer Enzyme paradox. Davon ausgehend, dass Glukose-6-Phosphat als Metabolit selbst ChREBP aktiviert, lässt sich jedoch ein negativer Feedback-Mechanismus vermuten: die Induktion von G6PC, welche durch Hydrolyse Glukose-6-Phosphat zu Glukose dephosphoryliert, kann eine Überaktivität von ChREBP verhindern.

Zusätzlich zu glykolytischen und lipogenen Zielgenen reguliert ChREBP auch die Expression des Thioredoxin interacting protein (TXNIP). Interessanterweise hemmt TXNIP die Aufnahme von Glukose in die Zelle. Seine Hochregulation wird ebenfalls als negativer Feedback-mechanismus zum Schutz der Zelle vor einer Überladung mit Glukose und zur Reduktion der Glykolyse betrachtet (Yu *et al.* 2010, Havula und Hietakangas 2012).

**Tabelle 2: Ausgewählte ChREBP-Zielgene in der Leber.** Tabelle modifiziert nach Iizuka 2013.

Kategorie	ChREBP-Zielgene	Referenz
Glukoseaufnahme	GLUT2	Iizuka <i>et al.</i> 2004
Glykolyse	PKLR FK	Yamashita <i>et al.</i> 2001, Iizuka <i>et al.</i> 2004
Glukoneogenese	G6PC	Iizuka <i>et al.</i> 2004, Iizuka <i>et al.</i> 2006, Pedersen <i>et al.</i> 2007
Lipogenese/ Fettsäuredesaturierung	FASN ACC1 SCD1	Iizuka <i>et al.</i> 2004, Ishii <i>et al.</i> 2004, Iizuka <i>et al.</i> 2006, Ma <i>et al.</i> 2006
GPCR-Signalweg	RGS16	Pashkov <i>et al.</i> 2011
Redox-Signalweg	TXNIP	Ma <i>et al.</i> 2006, Cha-Molstad <i>et al.</i> 2009



Wichtige Einblicke in die ChREBP-Funktion im Glukose- und Fettstoffwechsel liefert die Charakterisierung von ChREBP-Knockout Mäusen. Tiere dieser Linie zeigen keine erhöhte embryonale Letalität, sind lebensfähig und scheinen keine Beeinträchtigung der Lebenserwartung zu haben. In ChREBP-Knockout Mäusen ist die Glykolyse in der Leber, aufgrund reduzierter Expression von PKLR, vermindert. Infolgedessen sind Blutglukose- und Insulinwerte sowie Glykogenspeicherung in der Leber erhöht. Metabolisch zeigen diese Mäuse Anzeichen einer Insulinresistenz. Da ChREBP lipogene Enzyme wie FASN und ACC1 induziert, weisen Tiere mit ChREBP-Knockout weniger freie Fettsäuren im Plasma und weniger epididymales und braunes Fettgewebe auf, die Fettsäuresynthese in der Leber ist um ca. 65% reduziert. Zusammenfassend kann ohne ChREBP Glukose nicht mehr adäquat in die Leber aufgenommen und für die Produktion von Pyruvat und Fettsäuren umgesetzt werden (Iizuka *et al.* 2004, Uyeda und Repa 2006).

Interessanterweise zeigt auch ein Großteil der Patienten mit Williams-Beuren-Syndrom, welches unter anderem die Deletion des ChREBP-Gens umfasst, Störungen des Glukosestoffwechsels. Bei etwa 75% der Betroffenen kann Insulinresistenz (Prä-Diabetes) oder bereits Diabetes Typ 2 diagnostiziert werden (Pober 2010).

Andere Modelle zur Aufklärung der ChREBP-Funktion nutzen Untersuchungen an genetisch adipösen Mäusen (ob/ob-Mäuse). Diese Tiere entwickeln aufgrund einer Leptin-Defizienz Hyperphagie, Adipositas, Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, resultierend in Hyperglykämie und Hyperlipidämie. Außerdem stellen sie eine Art natürliches Modell für hepatische Steatose (Fettleber) dar, da sie aufgrund der gesteigerten glykolytischen und lipogenen Stoffwechselwege spontan hepatische Steatose entwickeln (Denechaud *et al.* 2008).

Sowohl im gefütterten als auch im gefasteten Zustand zeigten diese Mäuse eine erhöhte hepatische ChREBP-Expression und nukleäre Proteinmenge. Außerdem wurden im Vergleich zu Kontrolltieren nach 24 h Fasten erhöhte Lipidsyntheseraten gemessen. Das unterstützt die Hypothese, dass ChREBP an der Entwicklung der Fettleber in genetisch adipösen Mäusen beteiligt ist (Dentin *et al.* 2006). Es wird vermutet, dass die chronische Konfrontation mit Hyperglykämie die gesteigerte ChREBP-Expression in der Leber bewirkt (Denechaud *et al.* 2008).

Nach leberspezifischem Knockdown von ChREBP in diesem Modell konnte eine Reduktion lipogener Enzyme wie FASN, ACC1 und SCD1 beobachtet werden. Dadurch war die Lipidsynthese in der Leber reduziert, was zu vermindertem Leberfettgehalt sowie weniger freien Fettsäuren und Triglyzeriden im Plasma führte. Der Rückgang der hepatischen Steatose verbesserte die Insulinsensitivität der Leber und bewirkte eine Abnahme der Blutglukosewerte. Auch die Normalisierung der Triglyzeride und Fettsäuren im Blut erhöhte systemisch die Insulinsensitivität und verbesserte infolgedessen auch die Hyperinsulinämie und Hyperglykämie (Dentin *et al.* 2006).

Auch der Ganzkörper-Knockout von ChREBP in ob/ob-Mäusen führte zu ähnlichen (metabolischen) Effekten. Die Expression lipogener Enzyme in der Leber, die hepatische Fettsäuresynthese, Plasmatriglyzeride und freie Fettsäuren, Blutglukosewerte sowie Körpergewicht und Futterraufnahme waren reduziert (Iizuka *et al.* 2006).

## 1.4 Prolylhydroxylasen

Obwohl Sauerstoff für das Überleben von Zellen notwendig ist, hat dieses Molekül, bedingt durch die Bildung von Radikalen, auch hochreaktive und potentiell zerstörerische Eigenschaften. Die Fähigkeit von Zellen, wechselnde Sauerstoffbedingungen der Umgebung zu registrieren und den Sauerstoffverbrauch innerhalb der Zelle anzupassen, ist somit ein unentbehrlicher Mechanismus (Place und Domann 2013).

In Wirbeltieren übernehmen diese Funktion im Wesentlichen drei intrazelluläre Enzyme, sogenannte Prolylhydroxylasen (EGLN1-3) (Place und Domann 2013).

Prolylhydroxylasen katalysieren mit Hilfe von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) die Hydroxylierung von Prolinresten in Zielproteinen. Damit steht der Zelle ein Mechanismus zur Verfügung, um auf Veränderungen der umgebenden  $O_2$ -Konzentration reagieren zu können. Daraus resultiert eine direkte Beteiligung von Umweltsignalen (wechselnde  $O_2$ -Konzentration) an der posttranslationalen Modifikation und infolgedessen auch an der Aktivierung von Proteinen und Signalwegen (Jaakkola und Rantanen 2013, Place und Domann 2013).

Lange wurde die Hydroxylierung des Hypoxia-inducible factor (HIF) als Hauptfunktion der Prolylhydroxylasen EGLN1-3 betrachtet, siehe Kapitel 1.4.2 (Klassisches Zielprotein HIF $\alpha$ ) (Bruick und McKnight 2001, Epstein *et al.* 2001).

Inzwischen ist jedoch bekannt, dass diese Enzyme weit mehr regulieren als den HIF-Signalweg. Im Besonderen scheint EGLN3 ein breites Spektrum intrazellulärer Nicht-HIF-Zielproteine zu besitzen, die in viele Signalwege eingebunden sind (Jaakkola und Rantanen 2013). Beispielsweise wird EGLN3-vermittelte Prolinhydroxylierung mit Zelldifferenzierung und Zellstoffwechsel, Apoptose sowie septischen und immunogenen Prozessen in Verbindung gebracht, siehe Kapitel 1.4.5 (EGLN3: Funktionen und Nicht-HIF-Zielproteine).

### 1.4.1 Isoformen und Proteinstruktur

In Metazoen gehören zur Familie der Prolylhydroxylasen die drei schon erwähnten intrazellulären Prolylhydroxylasen 1-3 (= prolyl-4-hydroxylase domain protein 1-3 = PHD1-3). Ein Synonym für diese Proteine ist Egl(egg-laying deficiency)-nine family hypoxia-inducible

factor 1-3 (NCBI(2) 2015). Im Folgenden sind die drei Prolylhydroxylasen kollektiv als EGLNs bzw. EGLN1-3 und separat als EGLN1, EGLN2 und EGLN3 bezeichnet. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die numerische Zuordnung nicht analog erfolgte (siehe Tabelle 3).

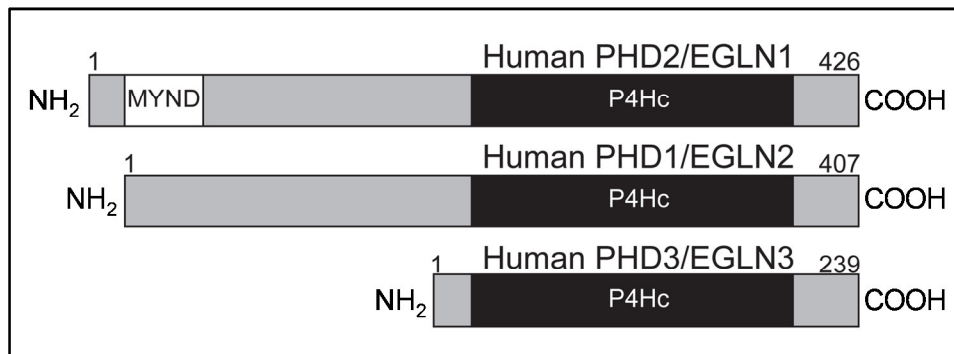
Außerdem sind noch zwei Collagen prolyl-4-hydroxylase Enzyme (Myllyharju 2003) und eine mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums assoziierte Form (Koivunen *et al.* 2007) bekannt. Diese Enzyme zeigen wenig Sequenzhomologie mit den drei EGLNs (Myllyharju 2003, Koivunen *et al.* 2007). Die vorliegende Arbeit untersuchte nur die Isoformen EGLN1, EGLN2 und EGLN3. Tabelle 3 listet die drei EGLN-Proteine inklusive ihrer Größe für Maus und Mensch auf.

**Tabelle 3: Benennung und Proteingröße der drei EGLN-Isoformen von Maus und Mensch.** AS = Aminosäure. MG = Molekulargewicht.

Isoform	Protein Maus		Protein Mensch	
	Anzahl AS	MG in kDa	Anzahl AS	MG in kDa
<b>EGLN1 = PHD2</b>	400	43,1	426	46,0
<b>EGLN2 = PHD1</b>	419	45,1	407	43,7
<b>EGLN3 = PHD3</b>	239	27,2	239	27,2

Die Anzahl der Aminosäuren wurde der CCDS Database des National Center for Biotechnology Information (NCBI) entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi>). Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe des Onlineprogramms „PeptideMass“ der Internetseite SIB ExpASY Bioinformatics Resources Portal ([http://web.expasy.org/peptide\\_ mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/)) berechnet.

Strukturell weisen alle drei EGLNs eine hoch konservierte C-terminale Region auf (Villar *et al.* 2007). Diese enthält auch das katalytische Zentrum der Enzyme und wird in Abbildung 2 als Prolyl-4-hydroxylase containing sequence (P4Hc) bezeichnet. Das katalytische Zentrum beinhaltet die Bindungsstelle für Eisen und 2-Oxoglutarat (McDonough *et al.* 2006), siehe Kapitel 1.4.3 zur Enzymatischen Aktivität der EGLNs. Beachtenswert ist, dass EGLN3 N-terminal über 150 Aminosäuren kürzer ist als EGLN1 und EGLN2. Das legt nahe, dass die Variabilität im N-Terminus auch für die funktionelle Diversität der EGLNs verantwortlich ist (Villar *et al.* 2007, Place und Domann 2013).



**Abbildung 2: Proteinstruktur der drei humanen EGLN-Isoformen.** Übereinstimmend enthalten alle drei Enzyme C-terminal die Prolyl-4-hydroxylase containing sequence (P4Hc). EGLN3 ist N-terminal deutlich kürzer als die beiden anderen Isoformen. EGLN1 ist die längste Isoform und weist N-terminal eine MYND-type zinc finger domain (MYND) auf. Abbildung modifiziert nach Place und Domann 2013.

Zwischen Wirbeltierspezies bestehen für den Aufbau der einzelnen EGLN-Isoformen nur minimale Variationen (Place und Domann 2013). Eine Ausnahme stellt jedoch EGLN3 bei der Ratte dar, welches sowohl in Bezug auf Proteinstruktur als auch subzelluläre Lokalisation einige Unterschiede aufweist (Lipscomb *et al.* 1999, Lipscomb *et al.* 2001). Auf diese Besonderheiten wird jedoch nachfolgend nicht näher eingegangen, da keine Experimente mit Rattenprotein durchgeführt wurden.

Das mRNA-Expressionsmuster der murinen EGLNs ist, je nach Gewebe, teilweise überlappend für alle drei Isoformen, teilweise spezifisch. Für EGLN3 findet sich die höchste Expression im Herzmuskel. Außerdem wird EGLN3 stark in der Leber und im Gehirn sowie schwach in der Niere exprimiert (Lieb *et al.* 2002).

### 1.4.2 Klassisches Zielprotein HIF $\alpha$

Die bekanntesten und zuerst entdeckten Zielproteine der EGLNs sind HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$ , zusammengefasst als HIF $\alpha$  (Epstein *et al.* 2001). HIF $\alpha$ -Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die Prozesse wie Zellzyklus und -stoffwechsel sowie Gefäßneubildung in Anpassung an das Sauerstoffangebot der Zelle regulieren. HIF1 $\alpha$  wird vor allem während kurzer Phasen (2-24 h) starker Hypoxie oder Anoxie (<0,1% O<sub>2</sub>) aktiviert, wohingegen HIF2 $\alpha$  bei länger anhaltender (48-72 h) und milder oder physiologischer (<5% O<sub>2</sub>) Hypoxie aktiv ist bzw. bleibt (Semenza 2009, Koh und Powis 2012).

Schlüsselmechanismus der HIF $\alpha$ -Regulation ist die posttranslationale Modifikation in Form von Prolinhydroxylierung durch EGLNs. Dafür wurden zwei konservierte Prolinreste innerhalb der zwei oxygen dependent degradation domains (ODD) der HIF $\alpha$ -Proteine identifiziert, welche die drei EGLNs mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität hydroxylieren (Appelhoff *et al.* 2004, Landazuri *et al.* 2006, Villar *et al.* 2007).

Unter ausreichender Sauerstoffversorgung (Normoxie) hydroxylieren die EGLNs diese beiden Prolinreste, was die Bindung der Ubiquitinligase von Hippel-Lindau protein (VHL) erlaubt und zur Degradation von HIF $\alpha$ -Protein führt (Bruick und McKnight 2001, Epstein *et al.* 2001, Ivan *et al.* 2001, Jaakkola *et al.* 2001). In Normoxie wird die Isoform EGLN1 als wichtigste Hydroxylase und Hauptregulator von HIF $\alpha$  (insbesondere HIF1 $\alpha$ ) betrachtet (Appelhoff *et al.* 2004).

Unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) ist die enzymatische Aktivität der EGLNs reduziert, die Prolinhydroxylierung am HIF $\alpha$ -Protein nimmt ab. Infolgedessen findet keine Bindung des VHL statt und HIF $\alpha$ -Protein wird stabilisiert und akkumuliert. Damit verbunden sind eine erhöhte nukleäre Lokalisation von HIF $\alpha$ -Protein, die Dimerbildung mit der Untereinheit HIF $\beta$  und die Induktion der Zielgene (Wang *et al.* 1995, Kallio *et al.* 1998). Unter hypoxischen Bedingungen behält EGLN3 signifikant mehr Aktivität als die beiden anderen Isoformen (Appelhoff *et al.* 2004).

Die Zielgene von HIF $\alpha$  sind sehr vielfältig und dienen vor allem der Steuerung von Prozessen, die die Anpassung an die Sauerstoffversorgung und deren Effizienz regulieren. Es gibt sowohl gemeinsame HIF $\alpha$ -Zielgene als auch Zielgene, die spezifisch sind für HIF1 $\alpha$  oder HIF2 $\alpha$ . Beispiele für HIF $\alpha$ -Zielgene sind der Glucose transporter 1 (GLUT1) (Ebert *et al.* 1995), der Vascular endothelial growth factor alpha (VEGF $\alpha$ ) (Forsythe *et al.* 1996) sowie das Hormon Erythropoetin (Wang und Semenza 1993) und Transferrin, ein Transportprotein für Eisen (Rolfs *et al.* 1997).

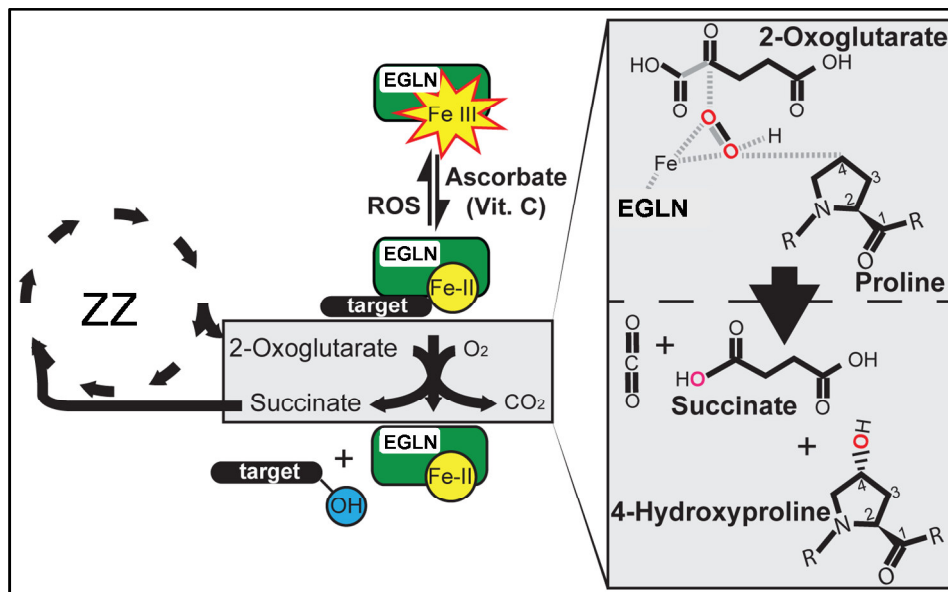
Interessanterweise sind auch EGLN1 (Metzen *et al.* 2005) und EGLN3 (Pescador *et al.* 2005) selbst Zielgene von HIF $\alpha$ . Es wird vermutet, dass die Induktion dieser Zielgene, die ja ihrerseits an der Regulation von HIF $\alpha$  beteiligt sind, einen negativen Feedback-Mechanismus darstellt. So soll EGLN3 bei länger anhaltender Hypoxie in einem negativen Feedback die HIF $\alpha$ -Akkumulation und die Induktion der HIF $\alpha$ -Zielgene limitieren. Diese kompensatorische Rolle von EGLN3 bestätigen auch *in vivo* Experimente mit EGLN1- und EGLN1/EGLN3-defizienten Mäusen. Der zusätzliche Verlust von EGLN3 führt zu einer verstärkten HIF $\alpha$ -Akkumulation und einer erhöhten HIF $\alpha$ -Zielgenaktivierung im Vergleich zu den Auswirkungen die bei Tieren mit alleiniger EGLN1-Defizienz beobachtet werden (Minamishima *et al.* 2009). Andere Autoren vermuten, dass die Induktion von EGLN1 und EGLN3 durch HIF $\alpha$  zum Ziel hat, eine schnellere Degradation von HIF $\alpha$ -Protein nach der Reoxygenierung sicherzustellen (Demidenko *et al.* 2005).

### 1.4.3 Enzymatische Aktivität

Die enzymatische Aktivität der EGLNs wird über einen komplexen Mechanismus gesteuert, welcher sensitiv auf verschiedene Parameter innerhalb einer Zelle reagiert. EGLNs sind

eisenabhängige Dioxygenasen und setzen molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ), 2-Oxoglutarat (2-OG) und den Prolinrest des Substrates zu Succinat, Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) und einem hydroxylierten Prolinrest um (Cardinale *et al.* 1971, Epstein *et al.* 2001, Schofield und Ratcliffe 2005).

Abbildung 3 zeigt diesen Mechanismus im Detail und verdeutlicht den engen Zusammenhang zwischen Zellstoffwechsel und enzymatischer Aktivität der EGLNs.



**Abbildung 3: Enzymatische Aktivität der EGLNs und Zusammenhang mit dem Zellstoffwechsel.** In der Reaktion werden molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ), 2-Oxoglutarat (2-OG) und der Prolinrest des Substrates zu Succinat, Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) und einem hydroxylierten Prolinrest im Substrat umgesetzt. EGLN = EGLN1-3, ZZ = Zitratzyklus, target = Substrat/Zielprotein, ROS = reactive oxygen species. Abbildung modifiziert nach Place und Domann 2013.

2-OG, ein Zwischenprodukt aus dem Zitratzyklus und molekularer Sauerstoff werden genutzt um einen Prolinrest am vierten Kohlenstoffatom des Substrates zu hydroxylieren. Gleichzeitig zum Einbau eines Sauerstoffatoms in die Hydroxygruppe wird 2-OG zu Succinat decarboxyliert, wodurch die Reaktion  $CO_2$  produziert.

Neben Sauerstoff kommen auch anderen Bestandteilen aus diesem Reaktionskomplex wichtige regulatorische Funktionen zu.

Störungen des Zellstoffwechsels, die zum Beispiel durch Erkrankungen oder Mutationen von Enzymen des Zitratzyklus hervorgerufen werden, führen zu Einschränkungen der enzymatischen Aktivität der EGLNs. Diese sensitive Reaktion der EGLNs resultiert in einer Akkumulation von HIF $\alpha$ -Protein (Maxwell 2005, Pollard *et al.* 2005).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Regulation der enzymatischen Aktivität durch oxidativen Stress über sogenannte Reactive oxygen species (ROS). ROS inaktivieren EGLNs durch die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$ , welches für EGLNs nicht mehr kompatibel ist. Das führt ebenfalls zu einer Stabilisierung von HIF $\alpha$ -Protein (Tuderman *et al.* 1977, Schofield und Ratcliffe 2005). Ebenso resultieren auch andere Einschränkungen der Eisenverfügbarkeit der Zelle in einer Hemmung der EGLNs. Basierend darauf kann beispielsweise Cobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) als *in vitro* Inhibitor von EGLNs eingesetzt werden. Es wird vermutet, dass  $\text{CoCl}_2$  Eisen aus dem aktiven Zentrum der Enzyme verdrängt (Ho und Bunn 1996, Epstein *et al.* 2001).

Aufgrund der Abhängigkeit der EGLNs von  $\text{Fe}^{2+}$  kommt auch Ascorbinsäure (Vitamin C) eine bedeutende Rolle in der Prolinhydroxylierung zu. Ascorbinsäure bewirkt die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  und kann damit die Auswirkungen der Eisenoxidation durch ROS rückgängig machen (Myllylä *et al.* 1978). Zellkulturexperimente mit ascorbinsäurefreiem Medium bestätigten *in vitro* Auswirkungen auf den HIF-Signalweg (Knowles *et al.* 2003, Page *et al.* 2008).

#### 1.4.4 EGLN3: Besonderheiten in Expression, Stabilität und Lokalisation

Obwohl sich die Eigenschaften und Funktionen der drei EGLNs überschneiden, gibt es auch wesentliche Unterschiede zwischen diesen Isoformen. Sie zeigen beispielsweise verschiedene Expressionsmuster und unterscheiden sich in ihrer Proteinstabilität und subzellulären Lokalisation. Die Regulation der drei genannten Parameter erfolgt dabei sauerstoffabhängig. Diese Variabilität innerhalb der EGLNs kann als Hinweis für verschiedene insbesondere auch mögliche HIF $\alpha$ -unabhängige Funktionen gedeutet werden.

In Normoxie weist EGLN3 die niedrigste mRNA-Expression auf, gefolgt von EGLN2, vorherrschend ist EGLN1. In Hypoxie wird EGLN3 am stärksten induziert, EGLN1 ebenfalls, aber in geringerem Ausmaß, EGLN2 ist unverändert oder reduziert (Appelhoff *et al.* 2004). Mögliche Interpretationen für die Bedeutung dieser Hochregulation von EGLN3 unter hypoxischen Bedingungen sind in Kapitel 1.4.2 (Klassisches Zielprotein HIF $\alpha$ ) beschrieben. Eine weitere Option, wie die EGLN3-Expression durch die Zelle reguliert werden kann, ist alternatives Splicing. In vielen Geweben und Zelllinien konnten zumindest drei verschiedene Transkripte unterschiedlicher Größe detektiert werden (Cervera *et al.* 2006). Ihre Funktion bzw. Funktionalität ist noch nicht aufgeklärt, da bisher kein endogenes Protein dieser alternativen Transkripte nachgewiesen werden konnte (Place und Domann 2013).

Untersuchungen zur Proteinstabilität in Zellkulturexperimenten haben gezeigt, dass in Normoxie das EGLN3-Proteinlevel signifikant unter dem von EGLN1 und EGLN2 liegt. In Hypoxie steigt die EGLN3-Proteinmenge erheblich an, vermutlich vor allem durch erhöhte

Proteinstabilität, zusätzlich zu verstärkter Transkription. Der zugrundeliegende Mechanismus scheint eine reduzierte Degradation von EGLN3 unter hypoxischen Bedingungen zu sein (Appelhoff *et al.* 2004, Nakayama *et al.* 2007).

Bezüglich der Lokalisation ist die Isoform EGLN1 überwiegend zytosolisch, die Isoform EGLN2 überwiegend nukleär exprimiert. Im Gegensatz dazu ist EGLN3 sowohl im Nukleus als auch im Zytosol lokalisiert (Metzen *et al.* 2003). Außerdem konnte EGLN3 inzwischen in den Mitochondrien einzelner Zelllinien nachgewiesen werden (Kikuchi *et al.* 2014).

### 1.4.5 EGLN3: Funktionen und Nicht-HIF-Zielproteine

Ursprünglich wurden EGLNs als Hauptregulatoren des HIF-Signalweges betrachtet. EGLN3 scheint jedoch, zumindest unter Normoxiebedingungen, keine physiologisch-relevante Bedeutung in der HIF-Regulation zu besitzen.

Diese Vermutung bestätigen auch Studien an EGLN3-Knockout Mäusen. Embryonen dieser Mauslinie zeigen zum Beispiel keine erhöhte embryonale Letalität und keine Abnormitäten in der Plazentafunktion und -entwicklung. Die Plazenta ist in ihrer Organentwicklung besonders abhängig von einem funktionierenden HIF-Signalweg. Zudem sind an den Embryonen auch keine anderen Einschränkungen oder Defekte erkennbar. Im Vergleich dazu sterben Embryonen von EGLN1-Knockout Mäusen bereits pränatal und es lassen sich Plazentadysfunktionen mit erhöhter HIF $\alpha$ - und VEGF $\alpha$ -Proteinexpression sowie Veränderungen der Herzmuskulatur nachweisen (Takeda *et al.* 2006, Dunwoodie 2009). Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass EGLN3 unter hypoxischen Bedingungen regulatorische Effekte auf HIF2 $\alpha$ -Protein hat (Appelhoff *et al.* 2004).

Publikationen der letzten Jahre identifizieren eine Vielzahl von Nicht-HIF-Zielproteinen und Interaktionspartnern und unterstreichen damit die Vermutung, dass EGLN3 auch an Prozessen außerhalb des HIF-Signalweges beteiligt ist.

Dazu gehören unter anderem die Regulation des Immunsystems über Makrophagenaktivierung und Zytokinproduktion (Kiss *et al.* 2012), Muskelzelldifferenzierung (Fu *et al.* 2007), Apoptose in neuronalen Zellen (Lipscomb *et al.* 1999), Zellentwicklung (Högel *et al.* 2011) und Zellmotilität (Luo *et al.* 2014). Vermutlich sind die hierbei beobachteten, vermeintlich gegensätzlichen Eigenschaften von EGLN3 („pro-apoptischen“ gegen „pro-survival“) von der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Sauerstoff abhängig (Place und Domann 2013).

Eines der identifizierten Zielproteine, welches nachweislich von EGLN3 hydroxyliert wird, ist beispielsweise Muscle pyruvate kinase 2 (PKM2), ein Enzym des Muskelstoffwechsels (Chen *et al.* 2011, Luo *et al.* 2011). PKM2 ist ein HIF1 $\alpha$ -Zielgen, kann außerdem direkt an HIF1 $\alpha$  binden und fungiert als ein Coaktivator der HIF1 $\alpha$ -Zielgenexpression in Krebszellen.



Die EGLN3-vermittelte Hydroxylierung an zwei Prolinresten in PKM2 stimuliert diesen Effekt. Da PKM2 und EGLN3 selbst Zielgene von HIF1 $\alpha$  sind, kommt ein positiver Feedbackmechanismus zustande (Luo *et al.* 2011).

Ein anderes direktes enzymatisches EGLN3-Zielprotein ist der  $\beta$ 2-adrenergic receptor ( $\beta$ 2-AR), ein wichtiger Bestandteil des sympathischen Nervensystems. Die Autoren identifizieren  $\beta$ 2-AR als physiologisches Substrat von EGLN3 und zeigen, dass die Hochregulation des Rezeptors sauerstoffabhängig gesteuert ist. Analog dem Mechanismus der Regulation von HIF $\alpha$  durch EGLNs wird  $\beta$ 2-AR in Normoxie durch EGLN3 prolinhydroxyliert, was zu dessen Degradation über den VHL-Signalweg führt und akkumuliert infolgedessen unter hypoxischen Bedingungen (Xie *et al.* 2009).

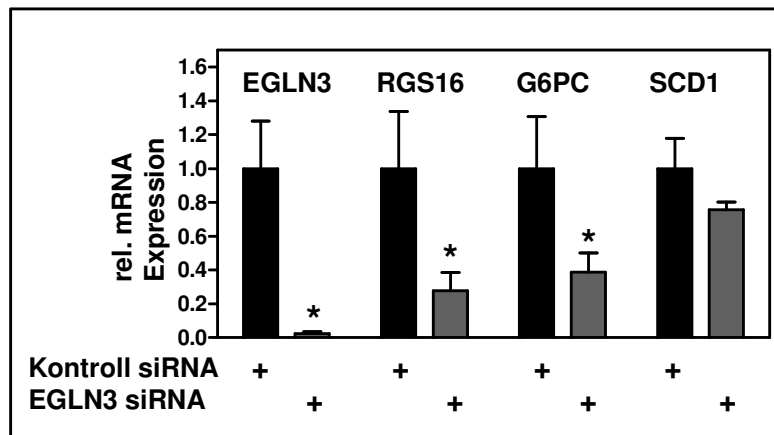
## 1.5 Zielsetzung

### 1.5.1 Vorausgehende Daten

Dieser Arbeit vorausgehende Experimente haben gezeigt, dass eine reduzierte Expression von EGLN3 in primären Hepatozyten eine Herunterregulation von ChREBP-Zielgenen zur Folge hat. In Abbildung 4 sind bisher unveröffentlichte Daten aus der Dissertation von Nicole Witte dargestellt (Witte 2015). In einer selbst durchgeführten Wiederholung des Experiments konnten diese Ergebnisse reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Im gezeigten Experiment (siehe Abbildung 4) wurde die Expression von EGLN3 durch Transfektion mit siRNA um >97% reduziert, als Kontrolle wurden Zellen mit Kontroll siRNA behandelt. Es erfolgte eine Untersuchung der mRNA-Expression ausgewählter ChREBP-Zielgene mittels qRT-PCR Analyse. Dabei handelte es sich um Gene, die beispielsweise an der Aufnahme und Verarbeitung von Glukose und deren Umwandlung in Triglyzeride in der Leber beteiligt sind. Gemessen wurden Glucose-6-Phosphatase (G6PC), ein Enzym der Glukoneogenese und der Regulator of G-protein signaling 16 (RGS16). Außerdem Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), ein Schlüsselenzym des Fettsäurestoffwechsels, welches für die Ausbildung von Doppelbindungen verantwortlich ist.

Wie bereits beschrieben, führte die Depletion von EGLN3 zu einer signifikanten Reduktion der gemessenen ChREBP-Zielgene.



**Abbildung 4: Depletion von EGLN3 in primären Hepatozyten führt zu reduzierter Expression von ChREBP-Zielgenen.** qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von EGLN3 und ausgewählten ChREBP-Zielgenen (RGS16, G6PC, SCD1) in primären Hepatozyten nach Behandlung mit siRNA. (\* $p < 0,05$  zur jeweiligen Kontrolle). Abbildung modifiziert nach Abbildung 37 aus Witte 2015.

## 1.5.2 Hypothese

Aus den gezeigten Effekten der EGLN3-Depletion auf ChREBP-Zielgene leitet sich die Hypothese ab, dass EGLN3 ein neuer Regulator der ChREBP-Aktivität ist. Als möglicher Mechanismus ist die Prolinhydroxylierung von ChREBP durch EGLN3 denkbar. Die Funktion der Prolinhydroxylierung anderer Proteine ist für EGLN3 bereits bekannt. Die beobachtete Herunterregulation von ChREBP-Zielgenen könnte die Folge verminderter ChREBP-Proteinstabilität und/oder -aktivität sein. Im Umkehrschluss könnte dann eine Prolinhydroxylierung von ChREBP durch EGLN3 eine Stabilisierung und/oder Aktivierung von ChREBP bedeuten.

## 1.5.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese der Regulation von ChREBP durch EGLN3 zu überprüfen und auch daraus folgende funktionelle Konsequenzen für ChREBP zu untersuchen.

Dabei wurde zunächst ermittelt, ob ChREBP und EGLN3 physikalisch interagieren. Danach erfolgte eine massenspektrometrische Analyse von ChREBP zur Charakterisierung der Aminosäure Prolin in diesem Protein und zur Untersuchung auf Prolinhydroxylierung. Fernerhin sollte die funktionelle Konsequenz einer Prolinhydroxylierung von ChREBP betrachtet werden. Dazu wurden ChREBP und seine Zielgenexpression in Zellen und Tieren mit reduzierter EGLN3-Expression untersucht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Acrylamid-Lösung (30%)	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, CH)
ANTI-FLAG <sup>®</sup> M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Calciumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Cobaltchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue R250 Powder	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
dNTP-Set	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
EGTA	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Entwicklerlösung Developer G153 X-Ray Agfa	Agfa HealthCare NV (Mortsel, B)
Essigsäure	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt, D)
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Roche (Mannheim, D)
Fixierlösung Rapid Fixer G354 X-Ray Agfa	Agfa HealthCare NV (Mortsel, B)
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Iodacetamid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Kaliumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Ketavet <sup>®</sup> 100 mg/ml Injektionslösung	Pfizer, Pharmacia GmbH (Berlin, D)
Magnesiumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, D)

---

Methanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Milchpulver, fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
M-MLV Reaction Buffer 5x	Promega GmbH (Mannheim, D)
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH (Mannheim, D)
Na-Desoxycholat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Nonidet™ P-40	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer 5x	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)
PBS (10x)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets (PhosSTOP EASY pack)	Roche (Mannheim, D)
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)
ProSieve® Color Protein Marker	Lonza Rockland, Inc. (Rockland, USA)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-frei	Roche (Mannheim, D)
Protein A Sepharose™	GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, S)
Random Primers	Invitrogen® Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
RNase/DNase freies Wasser (water DEPC-treated and sterile)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Rompun® 2% Injektionslösung Salzsäure	Bayer Vital GmbH Tiergesundheit (Leverkusen, D) Merck KGaA (Darmstadt, D)
TEMED	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Trizma® base (Tris-Base)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trizma® HCl (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tween® 20	Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, D)

## 2.1.2 Reaktionskits

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Reaktionskits

Reaktionskit	Verwendung	Hersteller
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid Kit	Minipräparation Plasmid-DNA	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, D)
Pierce <sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit	Proteinquantifizierung	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)
QIAGEN <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit	Maxipräparation Plasmid-DNA	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
Rat Insulin ELISA Kit	Insulinmessung	Crystal Chem Inc. (Downers Grove, USA)
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	RNA-Isolation	QIAGEN GmbH (Hilden, D)

## 2.1.3 Medien und Zellkultur

### Material

### Hersteller

Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Anti-Anti (100x)	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
DMEM (+ 4,5 g/l Glukose, + L-Glutamin, - Pyruvat)	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Easycoll Separating Solution	Biochrom AG (Berlin, D)
EBSS (- CaCl <sub>2</sub> , - MgCl <sub>2</sub> )	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Falcon <sup>®</sup> 6-Loch-Zellkulturplatte	Corning Inc. (Corning, USA)
Falcon <sup>®</sup> Zellkulturschale 100x20 mm	Corning Inc. (Corning, USA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
HBSS	Biochrom AG (Berlin, D)
Kollagenase (Collagenase, Type 1 )	Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, USA)
Kollagenbeschichtete 12-Loch-Zellkulturplatte	Biocoat <sup>®</sup> cell environments <sup>™</sup> , Becton Dickinson Labware (Bedford, UK)
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Lipofectamine <sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent	Invitrogen <sup>®</sup> Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Opti-MEM <sup>®</sup> Reduced Serum Medium	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)

PBS (1x) pH 7,2 (- CaCl <sub>2</sub> , - MgCl <sub>2</sub> )	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, CH)
Trypsin 2,5% (10x)	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies GmbH (Darmstadt, D)
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, CH)

#### 2.1.4 Zelllinien und Kulturbedingungen

Für die Experimente mit humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) wurden Zellen der Linie 293[HEK293] ATCC<sup>®</sup> der Firma LGC Standards GmbH (Wesel, D) verwendet. Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Kultivierung im Brutschrank erfolgte bei 37 °C, in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5%.

Die genannten Kulturbedingungen gelten ebenfalls für die Primärzellen, die aus Mausleber isoliert und für 48-72 h im Experiment kultiviert wurden. Die Isolation primärer Maushepatozyten wird in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben.

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Zellarten in DMEM mit 10% Fetalem Kälberserum und 1% Anti-Anti, einem Kombinationsprodukt aus den Antibiotika Penicillin und Streptomycin sowie dem Antimykotikum Amphotericin B, kultiviert. Nachfolgend wird die Zusammensetzung des Mediums mit der Abkürzung DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A angegeben.

#### 2.1.5 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die in den Tierversuchen eingesetzten C57BL/6J Mäuse wurden aus der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin bezogen.

Für die vorliegende Arbeit wurden außerdem Mäuse der Linie EGLN3 flox/flox aus instituts-eigener Zucht verwendet, siehe Kapitel 2.2.4.1 (Zucht der geflochten Mauslinie EGLN3 flox/flox).

Die Durchführung der Tierversuche war durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) genehmigt und wurde in Übereinstimmung mit den europäischen und nationalen gesetzlichen Bestimmungen für Versuchstiere umgesetzt. Der Tierversuchsantrag war unter der Nummer G 0100/11 genehmigt, die Organentnahme unter der Nummer O 0354/10 angezeigt.

Die Tierversuche wurden in der Tierhaltung des Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Die Tierhaltung ist spezifisch pathogenfrei und die Mäuse werden unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 21 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45-50% und einem künstlichen Lichtregime mit 12 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Haltung erfolgte in individuell ventilierten Käfigen vom Typ II lang in Gruppen von maximal sechs bis acht Tieren. Die Tiere wurden einmal wöchentlich umgesetzt und auf Einstreu für Labormäuse (FS14/Fichte der Firma Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, D) gehalten. Soweit nachfolgend nicht anders angegeben, erhielten die Tiere das Alleinfuttermittel „Maus-Erhaltungsstoffwechsel“ (V1535-3 der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D) und Wasser *ad libitum*.

### 2.1.6 Adenoviren

Die nachfolgende Tabelle 5 listet alle in der Arbeit verwendeten Adenoviren auf. Die Viren Adeno-ChREBP und Adeno-ChREBP (AS 239-864) wurden von Professor Susanne Mandrup (University of Southern Denmark, Odense, DK) zur Verfügung gestellt. Die Viren Adeno-Cre, Adeno-EGLN3 und Adeno-GFP hatte die Arbeitsgruppe Schupp selbst kloniert und über Caesiumchlorid aufgereinigt. Die Viren waren im Labor bereits mit ermitteltem Titer verfügbar.

**Tabelle 5: Übersicht über verwendete Adenoviren**

<b>Virus</b>	<b>Titer [ifu/ml]</b>	<b>Herkunft</b>
Adeno-ChREBP (= Adeno-ChREBP $\alpha$ -GFP)	$7,7 \times 10^9$	S. Mandrup
Adeno-ChREBP (AS 239-864) (= Adeno-ChREBP-GFP (AS 239-864))	$6,5 \times 10^9$	S. Mandrup
Adeno-Cre	$1,1 \times 10^{11}$	Arbeitsgruppe Schupp
Adeno-EGLN3	$1,07 \times 10^9$	Arbeitsgruppe Schupp
Adeno-GFP	$3,45 \times 10^{10}$	Arbeitsgruppe Schupp

## 2.1.7 Plasmide

Tabelle 6: Übersicht über verwendete Plasmide

Konstrukt	Spezies	Vektor	Konzentration*	Herkunft
ChREBP (= ChREBP $\alpha$ )	Maus	pCMV4 (flag)	1457,3 ng/ $\mu$ l	erhalten von: Prof. Howard C. Towle, University of Minnesota (Stoeckman <i>et al.</i> 2004)
EGLN1	Maus	pcDNA3 (flag)	426,96 ng/ $\mu$ l	erhalten von: Liang Xie, Ph. D., University of North Carolina (Xie <i>et al.</i> 2012)
EGLN2	Maus	pcDNA3 (flag)	898,14 ng/ $\mu$ l	Liang Xie (s.o.)
EGLN3	Maus	pcDNA3 (flag)	506,12 ng/ $\mu$ l	Liang Xie (s.o.)
EGLN3, AS 1-116	Maus	pcDNA3 (flag)	1538,55 ng/ $\mu$ l	Liang Xie (s.o.)
EGLN3, AS 117-239	Maus	pcDNA3 (flag)	947,07 ng/ $\mu$ l	Liang Xie (s.o.)
empty	Maus	pcDNA3 (flag)	1254,06 ng/ $\mu$ l	Liang Xie (s.o.)

\* Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm am Gerät „NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000“ der Firma Peqlab.

## 2.1.8 siRNA

Tabelle 7 zeigt die Sequenzen der verwendeten siRNA, die von der Firma Eurogentec Deutschland GmbH (Köln, D) hergestellt wurden.

Tabelle 7: Übersicht über verwendete siRNA

Name	Sequenz
Kontroll siRNA	5'-UAGCGACUAAACACAUCAAUU-3'
EGLN1 siRNA	5'-GAUAAACGGCCGAACGAAAUU-3'
EGLN2 siRNA	5'-GGUAGAAGGUCACGAGCCAUU-3'
EGLN3 siRNA	5'-GGAAAUCGUUUGUAGCAGAUU-3'

## 2.1.9 Primer für qRT-PCR

Alle für die qRT-PCR genutzten Primer wurden mit Hilfe der Onlineplattform „Primer3“ ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) entworfen und über die SMB Services in Molecular Biology GmbH (Rüdersdorf, D) bezogen. Die Herstellung erfolgte durch die Firma Invitrogen<sup>®</sup> Life Technologies GmbH (Darmstadt, D).



Die nachfolgende Tabelle 8 listet die Forward und Reverse Primersequenz für die untersuchten Gene.

**Tabelle 8: Primer für qRT-PCR**

Name	Spezies	Forward-Primer (5'→3')	Reverse-Primer (5'→3')
36B4	Maus	TCATCCAGCAGGTGTTTGACA	GGCACCGAGGCAACAGTT
ChREBP	Maus	CAGCCCAGCCTAGATGACTT	CAAAGCTGGGGGACTCTATG
ChREBP $\beta$	Maus	TCTGCAGATCGCGTGGAG	CTTGTCCCCGGCATAGCAAC
EGLN1	Maus	TACAGGATAAACGGCCGAAC	TGTCACGCATCTTCCATCTC
EGLN2	Maus	CTGGGCAACTACGTCATCAA	GTGGGGATTGTCAACATGC
EGLN3	Maus	GGCCGCTGTATCACCTGTAT	GCTACAAACGATTTCCCTTCC
FASN	Maus	CACCAATACAGATGGCAGCA	CCAGCTGGCTGATACAGAGA
G6PC	Maus	CGAGGAAAGAAAAGCCAAC	GGGACAGACAGACGTTTCAGC
GLUT1	Maus	CCTTATTGCCAGGTGTTTG	GGCTGGGATGAAGATGACAC
GLUT2	Maus	CCCTGGGTACTCTTCACCAA	GCCAAGTAGGATGTGCCAAT
HPRT	Maus	TGCTGACCTGCTGGATTACA	TATGTCCCCCGTTGACTGAT
PKLR	Maus	TAGGAGCACCAGCATCATTG	CATCCCTGCCTTGATCATCT
RGS16	Maus	TGGGCCAGTAAGCATAACAA	TTCAGCAGCAAATCGAAAGA
SCD1	Maus	CCGGGAGAATATCCTGGTTT	GCGGTACTCACTGGCAGAGT
TXNIP	Maus	GGTCTCAGCAGTGCAAACAG	GGCCTCATGATCACCATCTC
VEGF $\alpha$	Maus	GGAGAGCAGAAGTCCCATGA	TCGGGGTACTCCTGGAAGAT

## 2.1.10 Antikörper für Western Blot

**Tabelle 9: Antikörper für Western Blot**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
ChREBP	rabbit	1:650 - 1:1000	Novus Biologicals (Cambridge, UK) NB400-135 (Lot J-1)
EGLN3	rabbit	1:1000	Novus Biologicals (Cambridge, UK) NB100-303
HIF1 $\alpha$	rabbit	1:1000	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA) 10006421
FLAG, HRP-Konjugat	mouse	1:2000 - 1:10000	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) A8592
GAPDH	rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA) #2118
$\beta$ -ACTIN	mouse	1:1000	Santa Cruz Biotechnologie, Inc. (Santa Cruz, USA) sc-47778
Anti-Rabbit, HRP-Konjugat	goat	1:1000 - 1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA) #7074
Anti-Mouse, HRP-Konjugat	horse	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA) #7076

### 2.1.11 Puffer und Lösungen

#### Proteinlysepuffer (Ripa)

Reagenzien	Volumen/Gewicht	Endkonzentration
1 M Tris-HCl (pH 7,2)	2,5 ml	50 mM
10% Nonidet <sup>™</sup> P-40	5 ml	1%
Na-Desoxycholat	0,25 g	0,5%
10% SDS	0,5 ml	0,1%
5 M NaCl	1,5 ml	150 mM
0,5 M EDTA (pH 8,0)	0,2 ml	2 mM
0,5 M NaF	5 ml	50 mM
ddH <sub>2</sub> O	bis 50 ml	
Gesamtvolumen	50 ml	

+ 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-frei

#### Lysepuffer für Co-Immunopräzipitation (RSB-100)

Reagenzien	Volumen [ml]	Endkonzentration
1 M Tris-HCl (pH 7,4)	0,5	10 mM
1 M NaCl	5	100 mM
1 M MgCl <sub>2</sub>	0,125	2,5 mM
10% Triton X	0,5	0,1%
ddH <sub>2</sub> O	bis 50	
Gesamtvolumen	50	

+ 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-frei

+ 5 Tabletten Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets (PhosSTOP EASY pack)

#### 10xElektrophoresepuffer für SDS-Page

Reagenzien	Volumen/Gewicht	Endkonzentration
Tris-Base	30,3 g	0,25 M
Glycin	144 g	1,92 M
10% SDS	100 ml	1%
ddH <sub>2</sub> O	bis 1000 ml	
Gesamtvolumen	1000 ml	

Verwendung: 1:10 Verdünnung in ddH<sub>2</sub>O

## Transferpuffer für Western Blot

Reagenzien	Volumen/Gewicht	Endkonzentration
Tris-Base	5,85 g	48 mM
Glycin	2,95 g	39 mM
100% Methanol	200 ml	20%
10% SDS	3,75 ml	0,0375%
ddH <sub>2</sub> O	bis 1000 ml	
Gesamtvolumen	1000 ml	

pH-Wert auf 9,0 – 9,4 einstellen (mit HCl)

## 10xTBS (tris-buffered saline)

Reagenzien	Volumen/Gewicht	Endkonzentration
Tris-Base	24,23 g	200 mM
NaCl	80,07 g	1,37 M
ddH <sub>2</sub> O	bis 1000 ml	
Gesamtvolumen	1000 ml	

pH-Wert auf 7,6 einstellen (mit HCl)

Verwendung: 1:10 Verdünnung in ddH<sub>2</sub>O

TBST (tris-buffered saline and Tween<sup>®</sup> 20)

Reagenzien	Volumen [ml]	Endkonzentration
10xTBS	100	1x
100% Tween <sup>®</sup> 20	1	0,1%
ddH <sub>2</sub> O	bis 1000	
Gesamtvolumen	1000	

## TE-Puffer, steril (für die Isolation von Plasmid-DNA)

Reagenzien	Volumen [ml]	Endkonzentration
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	5	10 mM
0,5 M EDTA (pH 8,0)	1	1 mM
ddH <sub>2</sub> O	494	
Gesamtvolumen	500	

pH-Wert auf 7,5 einstellen (mit HCl)

### Perfusionspuffer für Isolation primärer Maushepatozyten

Reagenzien	Volumen [ml]
1xEBSS (ohne CaCl <sub>2</sub> , ohne MgCl <sub>2</sub> )	500
50 mM EGTA	5

Verwendung: ca. 20 ml pro Maus/Leber

### Digestionspuffer für Isolation primärer Maushepatozyten

Reagenzien	Volumen [ml]
HBSS (ohne Phenolrot)	50
Collagenase, Type 1 Aktivität: 52552 u/ml	0,1

Verwendung: ca. 40-50 ml pro Maus/Leber

### Easycoll-Lösung für Isolation primärer Maushepatozyten

Reagenzien	Volumen [ml]
Easycoll Separating Solution	22,5
PBS (10x)	2,5

Verwendung: 25 ml pro Maus/Leber

### Lösungen für die Coomassie-Färbung des SDS-Gels

Lösung	Zusammensetzung/ Endkonzentration
Fixierlösung	50% Ethanol, 10% Essigsäure, in ddH <sub>2</sub> O
Waschlösung	50% Methanol, 10% Essigsäure, in ddH <sub>2</sub> O
Färbelösung	0,1% Coomassie <sup>®</sup> R250, 20% Methanol, 10% Essigsäure, in ddH <sub>2</sub> O
Konservierungslösung	5% Essigsäure, in ddH <sub>2</sub> O

## 2.1.12 Verbrauchsmaterialien

### Material

0,5 ml Insulinspritzen Myjector<sup>®</sup> U-100  
0,4 mm (27 G) x 12 mm

1 ml Insulinspritzen BD Micro-Fine<sup>™</sup> +  
0,33 mm (29 G) x 12,7 mm

96-well PCR-Platte Halbrand

Abdeckfolie PCR-Platte (96-well)

Optically Clear Adhesive Seal Sheets

CONTOUR<sup>®</sup> Sensoren zur  
Blutzuckerbestimmung

Falcon<sup>®</sup> 15 ml High-Clarity PP Conical Tube

Falcon<sup>®</sup> 50 ml PP Conical Tube

Filterpapier (Blot Absorbent Filter Paper)

Multiply<sup>®</sup>-µStrip Pro 8er Kette  
(PCR-Tubes)

Nylon-Siebgewebe 250 µm Maschenweite

Parafilm<sup>®</sup> PM-996

Pasteurpipetten 230 mm

Petrischalen, Standardausführung, steril

Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)

SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml

SafeSeal Reagiergefäß 2 ml PP

Sterican<sup>®</sup> Einmalkanülen Gr.16

Tube, 14 ml, PS, sterile

Vasofix<sup>®</sup> Safety Venenverweilkatheter 22 G

### Hersteller

Terumo Medical Corporation (Elkton, USA)

Becton Dickinson BD Medical Diabetes Care  
(Cedex, F)

SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)

Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)

Bayer Vital GmbH (Leverkusen, D)

Corning Inc. (Corning, USA)

Corning Inc. (Corning, USA)

Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)

SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)

Klein & Wieler oHG (Königswinter, D)

Bemis Company, Inc. (Neenah, USA)

Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)

Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)

SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)

SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)

SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, D)

B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)

Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)

B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)

## 2.1.13 Geräte und Hilfsmittel

### Gerät

Bakterienschüttler HT unitron infors

Biofuge 13-R Zentrifuge

Biozym<sup>®</sup> SPROUT<sup>™</sup> Minizentrifuge

Brutschrank „Sanyo CO<sub>2</sub> Inkubator“

### Hersteller

Infors AG (Bottmingen, CH)

Heraeus Sepatech (Berlin, D)

Heathrow Scientific<sup>®</sup> LLC (Vernon Hills, USA)

Panasonic Biomedical Sales Europe BV  
(Etten Leur, NL)

ChemiDoc™ XRS+ (Gel Imaging System)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
CONTOUR® LINK Blutzuckermessgerät	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, D)
Eppendorf Research® plus Pipetten (2,5 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, D)
GPR Zentrifuge	Beckman Coulter, Inc. (Brea, USA)
Homogenisator „Mikrohomogenisator“	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Homogenisator Tissue Tearor™	Biospec Products, Inc. (Breda, NL)
Mikroprozessor-pH-Meter Typ 743	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin, D)
Mikroskop Leica DM IL LED	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, D)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (Elektrophoresekammer)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
MiniSpin® plus Tischzentrifuge	Eppendorf AG (Hamburg, D)
MiniTrans-Blot® Cell (Western Blot System)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, D)
Multitechnologie Mikroplattenleser	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik (Lancing, UK)
Pierce® 96-well Polystyrol Platte	Thermo SCIENTIFIC (Rockford, USA)
Polyacrylamidgele Zubehör (Glasplatten, Kämmen)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Inc. (Watertown, USA)
Restrainer Rotating Tail Injector RTI	Braintree Scientific, Inc. (Braintree, USA)
Röntgenfilmentwickler Agfa CURIX 60	Agfa HealthCare NV (Mortsel, B)
Röntgenfilmkassette Amersham™ Hypercassette™	GE Healthcare GmbH (München, D)
STA-Vielfach-Schlauchpumpe 131900	DESAGA GmbH (Heidelberg, D)
Stratagene® Mx3000P™ Real-Time PCR System	Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, USA)
Thermomixer Compact® 5360	Eppendorf AG (Hamburg, D)

Ultraschall-Homogenisator Bandelin SONOPULS GM 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, D)
Ultrazentrifuge SORVALL <sup>®</sup> RC 50 Plus	Sorvall GmbH (Bad Homburg, D)
Vortexer „vortex-genie2“	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, USA)
Wärmeschrank Memmert Universalschrank UN30	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, D)
Wasserbad (+Ultraschallreiniger) EMMI <sup>®</sup> 20HC	EMAG AG (Mörfelden-Walldorf, D)
Wasserbad Köttermann 3042	Köttermann GmbH & Co. KG (Uetze/Hänigsen, D)
xMark <sup>™</sup> Microplate Absorbance Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)

## 2.1.14 Software

**Tabelle 10: Übersicht über verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
GraphPad PRISM <sup>®</sup> 4	Graphische Darstellung der qRT-PCR Daten und Western Blot Quantifizierung	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
Image Lab <sup>™</sup>	Proteindetektion Western Blot, ChemiDoc <sup>™</sup> XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
ImageJ 1.45s	Quantifizierung Western Blot	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
Microplate Manager <sup>™</sup> 6, Version 6.3	Protein-Quantifizierung, xMark <sup>™</sup> Microplate Absorbance Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
MikroWin 2000	Insulinmessung, Mithras LB 940 Multi-technologie Mikroplattenleser	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, D)
MS Office 2010 (Excel, Word, Power Point)	Datenbearbeitung und Darstellung	Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim, D)
ND-1000, Version 3.5.2	RNA-Quantifizierung, NanoDrop <sup>®</sup> ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
Stratagene MXPro	Auswertung qRT-PCR, Stratagene <sup>®</sup> Mx3000P <sup>™</sup>	Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung von RNA aus Zellen oder murinem Lebergewebe erfolgte mit Hilfe des „RNeasy® Mini Kit“ der Firma Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers. Die verwendete Methode bindet mittels einer Kieselsäure-Gel-Membran RNA-Moleküle ab einer Länge von 200 Basenpaaren und gewährleistet so eine Anreicherung von mRNA während der Isolierung. Zellen wurden in einem ersten Schritt lysiert, das Lebergewebe zusätzlich mechanisch homogenisiert. In den darauffolgenden Arbeitsschritten inaktivieren Pufferlösungen RNasen, die mRNA bindet an die Membran und Verunreinigungen werden durch Waschschritte entfernt. Die intakte mRNA wurde in 30-50 µl RNase/DNase freiem Wasser eluiert.

#### 2.2.1.2 Quantifizierung von RNA

Die RNA-Konzentration wurde über eine spektralphotometrische Messung ermittelt.

Das Gerät „NanoDrop® ND-1000“ der Firma Peqlab misst in 1 µl der unverdünnten Probe sowohl Konzentration als auch Qualitätsparameter der isolierten RNA.

Gemäß Herstellerangaben erfolgte die Konzentrationsmessung in der Einheit [ng/µl], beruhend auf dem Standard-Extinktionskoeffizienten für RNA (40 ng-cm/µl) und dem Absorptionskoeffizienten von 260 nm. Die 260/280-Ratio spiegelt das Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu dem bei 280 nm wieder und dient als Maß für die Reinheit der RNA. Hier wurde ein Wert von >2,0 als „rein“ für RNA angesehen, Werte <1,8 geben einen Hinweis auf Protein-, Phenol- oder andere Verunreinigungen.

#### 2.2.1.3 cDNA-Synthese

Das nachfolgende Schema (Abbildung 5) zeigt die Methode für die Synthese komplementärer DNA (cDNA) aus der isolierten RNA, katalysiert durch das Enzym Reverse Transkriptase.



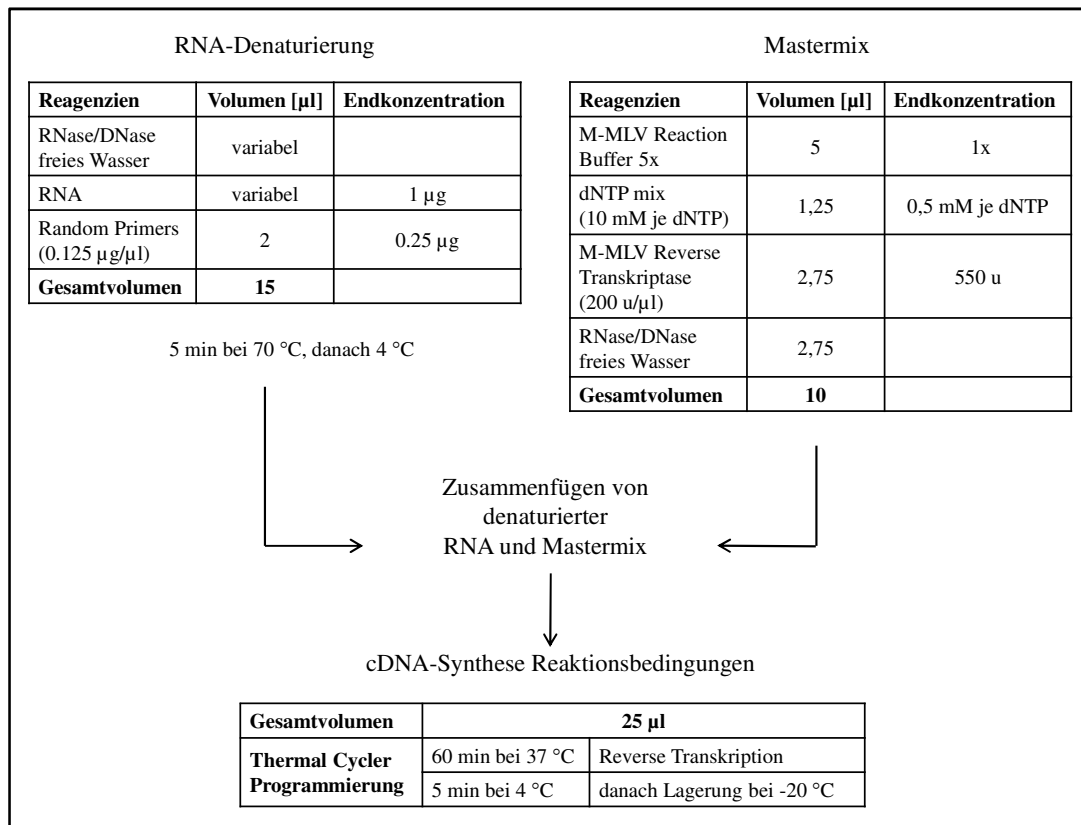


Abbildung 5: Schema zur cDNA-Synthese

### 2.2.1.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR), basierend auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, erlaubt neben der Vervielfältigung der Nukleinsäuren auch eine quantitative Einschätzung der synthetisierten cDNA (Mülhardt 2013).

Für die qRT-PCR wurde das Protokoll der Firma Roche in modifizierter Form verwendet. Der Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 15  $\mu$ l, zusammengesetzt aus 5  $\mu$ l verdünnter cDNA und 10  $\mu$ l Mastermix. Der Mastermix enthielt den interkalierenden DNA-Farbstoff SYBR Green der Firma Roche (FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)). Die genaue Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: Mastermix für qRT-PCR

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]
Forward Primer (5 $\mu$ M)	0,3
Reverse Primer (5 $\mu$ M)	0,3
SYBR Green	7,5
RNase/DNase freies Wasser	1,9
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10</b>

Die spezifische Amplifikation und Auswertung erfolgte am Gerät „Stratagene® Mx3000P™“ der Firma Agilent Technologies mit der Software „Stratagene MXPro“. Das Temperaturprogramm lief nach den in Tabelle 12 aufgelisteten Bedingungen ab. Zur Qualitätskontrolle erfolgte nach jeder qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse. Die weiterführende Auswertung wurde, nach Konvertierung der Daten, in Microsoft Excel durchgeführt.

**Tabelle 12: Bedingungen für qRT-PCR**

<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 µl</b>		
<b>qRT-PCR System Programmierung</b>	Schritt 1:		
	10 min	95 °C	Aktivierung der Polymerase
	Schritt 2: (40 Zyklen)		
	15 s	95 °C	Denaturierung der DNA
	1 min	60 °C	Primerhybridisierung und Amplifikation
	Schritt 3:		
	60 → 95 °C	Schmelzkurve (in 0,5 °C Schritten)	

Zur Messung gehörte außerdem eine Standardkurve für jedes Gen und zur relativierten Auswertung der Genexpression erfolgte die Messung der Referenzgene (housekeeping genes) ribosomal protein, large, P0 (36B4) oder hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) (Wiedemann *et al.* 2004). Die Ergebnisse aus Abbildung 4, 16 und 17 wurden mit HPRT ausgewertet, alle anderen qRT-PCR-Ergebnisse mit 36B4. Eine Liste der verwendeten Primer ist in Kapitel 2.1.9 (Primer für qRT-PCR) dargestellt.

### 2.2.1.5 Kompetente Bakterien und Transformation

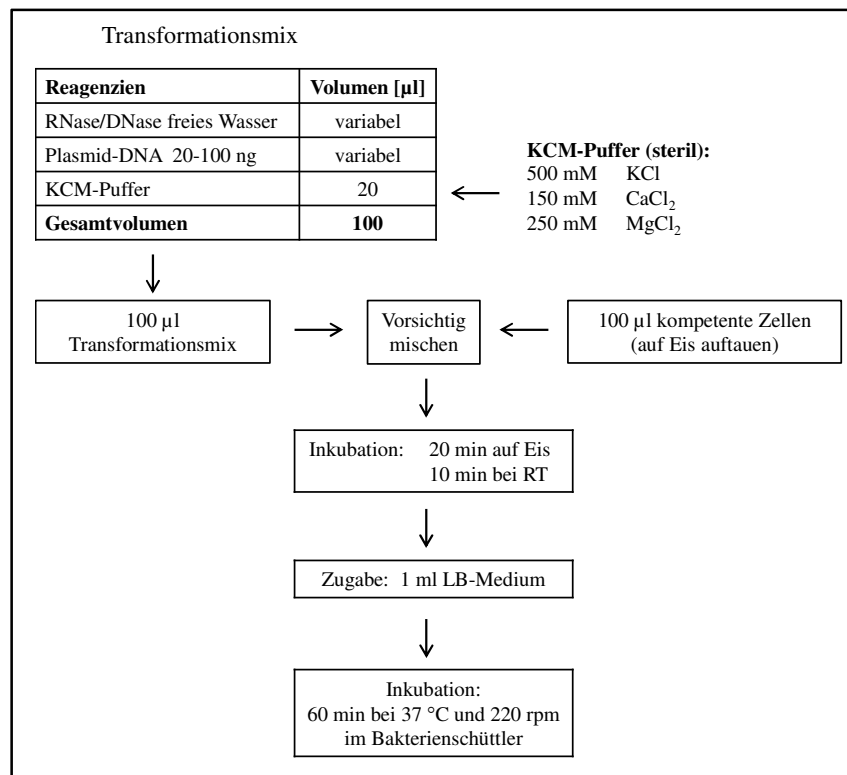
Die Transformation beschreibt das Übertragen von DNA in Bakterienzellen. Normalerweise nehmen die meisten Bakterienarten, darunter auch *Escherichia coli* (*E. coli*), spontan keine DNA auf oder nur in sehr geringem Umfang. Zur wirksamen Transformation solcher Bakterien können die Zellen physikalisch und/oder chemisch kompetent gemacht werden. Dann sind zwar die Fähigkeiten zur Aufnahme von DNA verstärkt, trotzdem bleibt die Transformation ein unvollständiger Vorgang (Brown 2007). Die Selektion erfolgte mittels Ampicillinresistenz, wobei Ampicillin im Medium in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt wurde.

Die Amplifikation von Plasmid-DNA für diese Arbeit fand in zwei verschiedenen Zelllinien statt. Zum einen wurden kommerziell erhältliche kompetente *E. coli*, Stamm HST08 verwendet. Hierbei handelte es sich um die Linie „Stellar™ Competent Cells“ der Firma Takara Bio Europe/Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F). Diese wurden nach Protokoll des Herstellers (PT5055-2) transformiert. Zum anderen wurden Zellen der Linie *E. coli* XL1-blue

der Firma Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, USA) chemisch kompetent gemacht. Der Transformationsvorgang für diese Zelllinie ist nachfolgend beschrieben.

Details zu den verwendeten Plasmiden inklusive Herkunft und Konzentration sind in Kapitel 2.1.7 (Plasmide) aufgelistet.

Für den Transformationsvorgang wurden 100  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen und 20-100 ng Plasmid-DNA eingesetzt und nach dem in Abbildung 6 gezeigten Protokoll transformiert.



**Abbildung 6: Transformation von *E. coli* XL1-blue**

Nach der Inkubation im Bakterienschüttler wurden 200  $\mu\text{l}$  der Kultur auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Bis zum darauffolgenden Morgen bildeten sich Einzelkolonien.

Diese waren Ausgangsmaterial einer Übernachtskultur (37 °C und 220 rpm) in 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium. Daraus wurde die Plasmid-DNA wie im nachfolgenden Kapitel 2.2.1.6 (Minipräparation zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*) beschrieben isoliert. Nach Sequenzierung, siehe Kapitel 2.2.1.7 (Sequenzierung der Plasmid-DNA), wurden die Plasmide in größerem Maßstab amplifiziert. Dafür wurden, mit der zur Sequenzierung eingesetzten Minikultur, 250 ml ampicillinhaltiges LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert (37 °C und 150 rpm). Die DNA-Isolation daraus wird in Kapitel 2.2.1.8 (Maxipräparation zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*) erläutert.

### **2.2.1.6 Minipräparation zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Isolation der Plasmid-DNA zur Sequenzierung und weiteren Klonierung wurde mit Hilfe des Kits „NucleoSpin® Plasmid Kit“ der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG durchgeführt. Aus der 5 ml Übernachtskultur wurde 1 ml nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

### **2.2.1.7 Sequenzierung der Plasmid-DNA**

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von SMB Services in Molecular Biology GmbH (Rüdersdorf, D) mit Standardprimern durchgeführt.

### **2.2.1.8 Maxipräparation zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde die 250 ml Übernachtskultur mit Hilfe des „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen**

Zur Proteinisolation wurden die Zellen auf Eis gestellt, einmal mit eiskaltem 1xPBS gewaschen und anschließend in eiskaltem 1xPBS mit Hilfe von Zellschabern von der Zellkulturplatte abgekratzt. Die gelösten Zellen wurden 3 min bei 9000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in einer adäquaten Menge Proteinlysepuffer (Ripa) resuspendiert und zur besseren Lyse der Zellen mindestens einmal bei -20 °C eingefroren.

Das wieder aufgetaute Protein wurde in einem nächsten Schritt mit Ultraschall behandelt, ebenfalls eine Maßnahme zur Verbesserung der Zellyse. Dafür wurden fünf Einzelimpulse mit niedrigster Intensität eingesetzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zum Abtrennen von nicht gelösten Zellbestandteilen. Der klare Überstand mit gelöstem Zellprotein wurde abgenommen und das Lysat bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Extraktion von Gesamtprotein aus Lebergewebe

Für die Isolation von Gesamtprotein aus murinem Lebergewebe wurde ein bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagertes Leberstück in eiskalten Proteinlysepuffer (Ripa) gegeben. Das eingesetzte Puffer-volumen für ca. 50 mg Gewebe betrug  $700\text{ }\mu\text{l}$ . Mit Hilfe des Homogenisators „Tissue Tearor<sup>TM</sup>“ der Firma Biospec Products wurde das Gewebe zerkleinert und nachfolgend mit Ultraschall behandelt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten identisch zur oben beschriebenen Proteinextraktion aus Zellen.

### 2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die weitere Verwendung der Lysate im Western Blot erforderte eine Quantifizierung des Proteingehaltes der Proben. Diese wurde mittels der sogenannten Bicinchoninsäure-Reaktion (BCA) durchgeführt.

Die BCA-Methode basiert auf der Eigenschaft, dass zweiwertige Kupferionen in alkalischer Lösung mit Protein zu einwertigen Kupferionen reduziert werden, die dann mit Bicinchoninsäure zu einem violetten Farbstoff reagieren. Die maximale Absorption des Farbstoffs wird photometrisch bei einer Wellenlänge von  $562\text{ nm}$  gemessen, wobei der gebildete Komplex ein nahezu lineares Verhältnis mit steigender Proteinkonzentration zeigt (Smith *et al.* 1985).

Die Quantifizierung des Proteins wurde mit dem „Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit“ der Firma Thermo Scientific nach den Angaben des Herstellers realisiert. Die Standardisierung erfolgte durch eine Verdünnungsreihe mit mitgeliefertem Bovinem Serum Albumin (BSA) in einem Messbereich von  $0,02\text{-}2,0\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung gemessen und nach Umrechnung mit Hilfe der Standardkurve ein Mittelwert aus der Proteinkonzentration gebildet. Zur Messung wurde das Gerät „xMark<sup>TM</sup> Microplate Absorbance Spectrophotometer“ der Firma Bio-Rad inklusive der Software „Microplate Manager<sup>TM</sup> 6“ genutzt.

### 2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wird genutzt um verschiedene Proteine je nach ihrer Größe während der Wanderung durch eine Gelmatrix aufzutrennen. Durch Natriumdodecylsulfat (SDS) als Detergens werden die nicht-kovalenten Wechselwirkungen in den Proteinen zerstört. Um die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten enthält der Proteinladepuffer das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol. Außerdem vervollständigt eine Hitzebehandlung ( $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min) die Denaturierung der Proteine (siehe Abbildung 7). Zusammenfassend ermöglichen diese Manipulationen eine Auftrennung der Proteine nach Kettenlänge, proportional zu ihrer Molekülmasse (Rehm und Letzel 2010).

Als Trenngel wurden Polyacrylamidgele (10-15%) mit einer Dicke von 1,5 mm in der in Tabelle 13 gezeigten Zusammensetzung hergestellt.

**Tabelle 13: Trenngel für SDS-Page**

Reagenzien	10% Trenngel	12% Trenngel	15% Trenngel
ddH <sub>2</sub> O	4,1 ml	3,4 ml	2,4 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl
30% Acrylamid	3,3 ml	4 ml	5 ml
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 ml</b>	<b>10 ml</b>	<b>10 ml</b>
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Über das Trenngel wurde nach dem Polymerisieren ein ebenfalls 1,5 mm dickes Sammelgel mit 10-15 Taschen zum Pipettieren der Proben geschichtet. Die Zusammensetzung des Sammelgels ist in Tabelle 14 angegeben.

**Tabelle 14: Sammelgel für SDS-Page**

Reagenzien	Volumen für 1 Gel
ddH <sub>2</sub> O	3,05 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
10% SDS	50 µl
30% Acrylamid	650 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>5 ml</b>
10% APS	50 µl
TEMED	6 µl

Zum Gießen der Gele wurden Apparaturen und Zubehör (Glasplatten, Kämmen) der Firma Bio-Rad verwendet. Für die Gelelektrophorese wurden die fertigen Gele in eine Elektrophoresekammer des „Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell Systems“, ebenfalls von der Firma Bio-Rad, eingespannt.

Durch die vorangegangene Proteinquantifizierung mittels BCA konnte für jede Probe eine identische Proteinmenge auf das Gel aufgetragen werden. Je nach Fragestellung wurden 20-100 µg Protein eingesetzt und das fehlende Volumen mit Proteinlysepuffer (Ripa) ausgeglichen. Außerdem wurde der Proteinprobe ein Proteinladepuffer hinzugefügt. Dieser bestand aus Probenpuffer (Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer 5x der Firma Thermo Scientific) und 2-Mercaptoethanol. Das genaue Protokoll für die SDS-Page fasst Abbildung 7 zusammen. Zur Bestimmung der Proteingröße lief auf jedem Gel zusätzlich ein Proteingrößenmarker mit (ProSieve<sup>®</sup> Color Protein Marker der Firma Lonza).

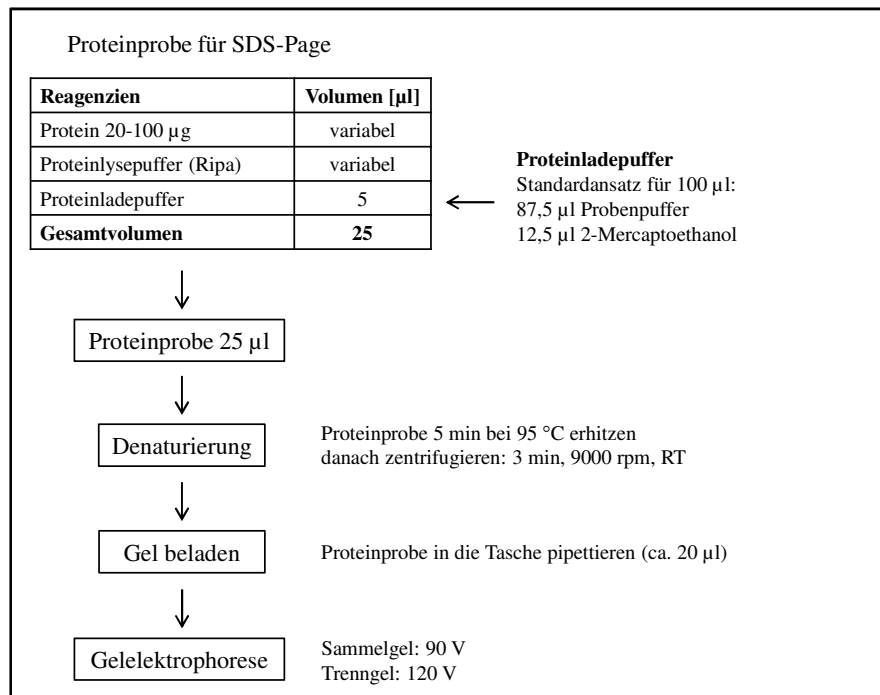


Abbildung 7: Schema zur SDS-Page

### 2.2.2.5 Western Blot

Im Western Blot werden die durch die SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen und über ein Chemilumineszenz-Verfahren sichtbar gemacht (Rehm und Letzel 2010).

Die Übertragung (Transfer) der Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes erfolgte als sogenannter „Nassblot“ in einem dafür hergestellten Transferpuffer. Als Trägermembran diente eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran, die vor Verwendung 1 min in 100% Methanol aktiviert wurde. Alle Einzelkomponenten des Transfers wurden luftblasenfrei in gekühltem Transferpuffer nach dem Sandwichprinzip zusammengebaut (Reihenfolge: Anode – Schwamm – Filterpapier – Membran – Gel – Filterpapier – Schwamm – Kathode). Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 80 V über 2 h gekühlt bei 4 °C.

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung wurde die Membran nach dem Transfer in 4% Milchpulverlösung für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Danach erfolgten Inkubations- und Waschschrte, welche in Tabelle 15 chronologisch aufgeführt sind.

**Tabelle 15: Immunologische Detektion von Proteinen**

Arbeitsschritt	Ziel	Temperatur Zeit
Inkubation mit 1. Antikörper	Markierung des Zielproteins durch den spezifischen primären Antikörper	4 °C 16 h
Waschen in TBST	Entfernen von unspezifisch gebundenem Antikörper	RT 3x15 min
Inkubation mit 2. Antikörper	Bindung des Sekundärantikörpers mit Reporterenzym Horseradish Peroxidase (HRP) an die Fc-Region des Primärantikörpers	RT 60 min
Waschen in TBST	Entfernen von unspezifisch gebundenem Antikörper	RT 3x15 min
Inkubation mit ECL-Lösung	Umsetzung von Luminol durch HRP und Sichtbarmachen der Proteinposition durch Chemilumineszenz	RT 1 min

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Proteinbanden auf der Membran mittels ECL-Lösung detektiert. Das „Pierce® ECL Western Blotting Substrate“ der Firma Thermo Scientific wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet, die Darstellung erfolgte mittels Entwicklung eines Röntgenfilms oder Detektion durch das Digitale System „ChemiDoc™ XRS+“ der Firma Bio-Rad.

Zur Kontrolle ob die jeweiligen Proteinproben eines Blots gleichmäßig geladen waren, wurde mindestens ein Referenzprotein (housekeeping protein) untersucht. Als interne Ladekontrolle diente in dieser Arbeit die Detektion der Proteine glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) und/oder beta-actin ( $\beta$ -ACTIN). Die Milchpulverlösung zum Blocken der Membran (4% Milch) sowie zum Inkubieren mit Antikörper (4-5% Milch) enthielt als Lösungsmittel TBS und TBST im Verhältnis 1:1 (Rehm und Letzel 2010, Gorr und Vogel 2015).

### 2.2.2.6 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Die Methode der Co-Immunopräzipitation dient der Anreicherung eines Proteins und der Identifikation von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Das Zielprotein wird mit an eine stationäre Phase gebundenen Antikörpern (Beads) aus einer Lösung angereichert (präzipitiert). Dabei werden auch alle am Zielprotein gebundenen Interaktionspartner mit angereichert und können als Copräzipitate ebenfalls nachgewiesen werden. Durch die Anreicherung solcher Proteinkomplexe ist die Co-Immunopräzipitation zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen geeignet (Phizicky und Fields 1995, Berggard *et al.* 2007).



In den durchgeführten Experimenten kamen für die Co-Immunopräzipitation zwei verschiedene Formen der stationären Phase zum Einsatz. Einerseits kommerziell erhältliche Anti-Flag-Agarose-Beads (mit Flag-Antikörper gegen überexprimiertes Flag-markiertes Protein), andererseits selbst hergestellte Beads aus Sepharose und ChREBP-Antikörper (gegen endogenes ChREBP-Protein).

Das Protokoll der Proteinextraktion und Durchführung der Co-Immunopräzipitation wird nachfolgend erläutert. Die angewendeten Verfahren zur Auftrennung und zum Nachweis der Proteine sind in Kapitel 2.2.2.4 (SDS-Page) und Kapitel 2.2.2.5 (Western Blot) beschrieben.

#### *Co-Immunopräzipitation mit Anti-Flag-Agarose-Beads*

Für die Co-Immunopräzipitation aus HEK-Zellen wurden kommerziell erhältliche Anti-Flag-Agarose-Beads der Firma Sigma-Aldrich eingesetzt. Das Protokoll des Herstellers wurde modifiziert und die Vorgehensweise ist nachfolgend aufgeführt.

In den untersuchten HEK-Zellen war jeweils Flag-markiertes Protein überexprimiert. Dieses Protein wird von an die Agarose-Beads gebundenen Flag-Antikörpern erkannt und einschließlich möglicher Interaktionspartner des Proteins präzipitiert.

Zur Co-Immunopräzipitation wurden HEK-Zellen zweimal mit eiskaltem 1xPBS gewaschen, dann wurde eine adäquate Menge eiskalten Lysepuffers (RSB-100) auf die Zellen getropft und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen von der Zellkulturplatte abgekratzt und in einem Reagiergefäß gesammelt. Zur besseren Lyse diente eine Behandlung mit Ultraschall, jeweils 5 s eines durchgehenden Ultraschallimpulses mit niedrigster Intensität. Die Behandlung wurde dreimal wiederholt und die Zellen dazwischen jeweils 2 min auf Eis gekühlt. Es folgte ein Inkubationsschritt von 15 min auf Eis, die Zellen wurden im Abstand von 2 min jeweils 4 s auf dem Vortexer „vortex-genie2“ bei höchster Stufe gründlich durchmischt. Die Zellysate wurden danach 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der klare Überstand mit gelöstem Zellprotein abgenommen. Die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben.

Die eingesetzte Proteinmenge für die Co-Immunopräzipitation aus HEK-Zellen betrug 1500 µg. Die entsprechende Menge Proteinextrakt wurde auf 1000 µl Volumen mit eiskaltem RSB-100 verdünnt und die Input-Probe entnommen. Es erfolgte das Hinzufügen von 40 µl einer 50% Lösung Anti-Flag-Agarose-Beads (ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 Affinity Gel in RSB-100) und die Inkubation für 2 h, rotierend bei 4 °C. Nach der Inkubation wurden die Proben kurz und vorsichtig zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbleibende Agarosepellet 5x5 min mit eiskaltem RSB-100 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die IP-Proben mit 60 µl Puffer versetzt und bei -20 °C gelagert. Der Puffer bestand zu 1,5 Teilen aus Proteinladepuffer und zu 3,5 Teilen aus Proteinlysepuffer (Ripa). Die Zusammensetzung

des Proteinladepuffers ist in Abbildung 7 (Schema zur SDS-Page) in Kapitel 2.2.2.4 (SDS-Page) angegeben.

#### *Co-Immunopräzipitation mit Sepharose-Beads*

Für die Co-Immunopräzipitation mit endogenem Protein aus primären Maushepatozyten oder murinem Lebergewebe wurden Beads aus Sepharose mit ChREBP-Antikörper selbst hergestellt. Das Protokoll des Herstellers (GE Healthcare Bio-Sciences AB) für die Verwendung von Protein A Sepharose<sup>™</sup> wurde modifiziert und die Vorgehensweise ist nachfolgend erläutert.

Zur Co-Immunopräzipitation aus primären Maushepatozyten wurden Zellen analog zur Vorgehensweise für HEK-Zellen (siehe oben) geerntet und Protein extrahiert und quantifiziert.

Zur Co-Immunopräzipitation aus murinem Lebergewebe wurden ca. 160 mg frisches Lebergewebe fein zerkleinert und in ca. 1000 µl eiskaltem Lysepuffer (RSB-100) mit einem Mikrohomogenisator homogenisiert, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubationsphase auf Eis. Die weitere Proteinextraktion entsprach der oben beschriebenen Behandlung für Protein aus HEK-Zellen.

Die eingesetzte Proteinmenge betrug für Protein aus primären Maushepatozyten 2300 µg und für Protein aus murinem Lebergewebe 8000 µg. Die entsprechende Menge Proteinextrakt wurde ebenfalls auf 1000-1500 µl Volumen mit eiskaltem RSB-100 verdünnt und Input-Proben entnommen.

In einem ersten Inkubationsschritt von 4 h bei 4 °C erfolgte das Binden von ChREBP-Antikörper an endogenes Protein. Dafür wurden 10-25 µg Antikörper eingesetzt.

In einem zweiten Schritt wurden 40-100 µl einer 50% Lösung Sepharose-Beads (Protein A Sepharose<sup>™</sup> in RSB-100 + 0,5% BSA) hinzugefügt und für 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Dies ermöglicht eine Bindung zwischen der Fc-Region des ChREBP-Antikörpers und der Protein A-Sepharose, welche eine Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen besitzt. Davon unbeeinflusst bleibt die Bindung zu ChREBP und möglichen Interaktionspartnern über die Fab-Region des ChREBP-Antikörpers. Die Arbeitsschritte nach der Inkubation mit Sepharose-Beads entsprachen dem oben erläuterten Verfahren für die Co-Immunopräzipitation mit Anti-Flag-Agarose-Beads.

#### **2.2.2.7 Proteinanalyse mittels Massenspektrometrie**

Die massenspektrometrischen Untersuchungen und deren Auswertung für diese Arbeit wurden von Heike Stephanowitz und Dr. Eberhard Krause am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie im Forschungsverbund Berlin e.V. (FMP) durchgeführt.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie können Proteine identifiziert und analysiert werden. Hierfür wird das Protein zunächst durch sequenzspezifische Proteasen in kleine Untereinheiten (Peptide) aufgespalten, hier erfolgte ein Trypsin-Verdau im Gel (Shevchenko *et al.* 2006).

Im Massenspektrometer wird anschließend die exakte Masse dieser Peptide als sogenannter Peptidmassen-Fingerabdruck ermittelt und die Peptide werden sequenziert. Die resultierenden Fragment-Spektren werden analysiert und im Anschluss mit Fragmenten aus Proteindatenbanken abgeglichen. So lassen sich Proteine identifizieren und auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Hydroxylierungen nachweisen. Die Modifikation zeigt sich in einer veränderten Molekülmasse. Bei der Hydroxylierung eines Proteins ist dies die Zunahme um die Molekülmasse einer Hydroxygruppe, was einer Zunahme um ca. 16 Da entspricht.

Als Ausgangsmaterial für die Massenspektrometrie dienten Coomassie-gefärbte Gel-Banden eines SDS-Gels.

Massenspektrometrisch untersucht wurde überexprimiertes Flag-markiertes ChREBP-Protein aus HEK-Zellen und endogenes ChREBP-Protein aus murinem Lebergewebe. Die Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmiden ist in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben. Bis auf untenstehende Abweichungen wurde die Proteinisolation und -aufbereitung, wie in Kapitel 2.2.2.6 für die Co-Immunopräzipitation beschrieben, durchgeführt.

Für die Co-Immunopräzipitation aus HEK-Zellen zur späteren massenspektrometrischen Analyse wurden 4000 µg Protein und 100 µl einer 50% Lösung Beads eingesetzt. Der Proteinladepuffer für Massenspektrometrie-Proben enthielt kein 2-Mercaptoethanol, sondern 5 mM DL-Dithiothreitol. Ein zusätzlicher Arbeitsschritt, die Alkylierung der Proteine vor der Gelelektrophorese, wird im nachfolgenden Kapitel 2.2.2.8 (Alkylierung der Proteine) beschrieben. Die im Anschluss an die Gelelektrophorese durchgeführte Coomassie-Färbung ist in Kapitel 2.2.2.9 (Coomassie-Färbung des SDS-Gels) dokumentiert. Die angefärbten Proteinbanden wurden mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und zur Analyse an das FMP verschickt.

### **2.2.2.8 Alkylierung der Proteine**

Die Proteine für die Analyse mittels Massenspektrometrie wurden vor der Gelelektrophorese mit Iodacetamid alkyliert. Dadurch wird verhindert, dass die zuvor mittels DL-Dithiothreitol aufgespaltenen Cysteinbrücken im Protein sich wieder zusammenlagern (Sechi und Chait 1998). Das Auftrennen der Disulfidbrücken der Cysteine ermöglicht eine bessere Entfaltung des Proteins. DL-Dithiothreitol war bei der angewendeten Vorgehensweise Bestandteil des Proteinladepuffers (siehe Kapitel 2.2.2.7), die Alkylierung mit Iodacetamid erfolgte als separater Arbeitsschritt vor der Gelelektrophorese. Dazu wurden die Proben nach dem

Denaturieren der Proteine (7 min bei 95 °C) auf RT abgekühlt und 3 min bei 9000 rpm und RT zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit 15 mM Iodacetamid versetzt und 30 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Nach der Inkubation und nochmaligem Zentrifugieren erfolgte das Beladen des Gels.

### 2.2.2.9 Coomassie-Färbung des SDS-Gels

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (Coomassie-Färbung) wird zum unspezifischen Anfärben von Proteinen genutzt. Durch die Bildung von Protein-Farbstoff-Komplexen im Gel werden die aufgetrennten Proteine sichtbar (Ren *et al.* 2012). Tabelle 16 fasst das Protokoll der Coomassie-Färbung zusammen. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Waschen in Schritt vier dient der Entfärbung des Gels und muss unter Sichtkontrolle erfolgen, um ein Entfärben der Proteinbanden zu verhindern. Die dazugehörige Zeitangabe ist somit nur als Anhaltspunkt zu betrachten.

**Tabelle 16: Coomassie-Färbung des SDS-Gels**

Arbeitsschritt	Zeit	Lösung
1. Fixieren	1 h	Fixierlösung
2. Waschen	2x30 min	Waschlösung
3. Färben	16 h	Färbelösung
4. Waschen	5x1 h	Waschlösung
5. Konservieren	1 h	Konservierungslösung

Die Zusammensetzung der Lösungen für die Coomassie-Färbung ist in Kapitel 2.1.11 (Puffer und Lösungen) aufgeführt.

## 2.2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Passagierung von HEK-Zellen

Die Kultivierung, Passagierung und Behandlung der HEK-Zellen erfolgte zu jedem Zeitpunkt unter sterilen Bedingungen.

Die HEK-Zellen wurden in Zellkulturmedium (DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A) in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Die Zellen erhielten im Abstand von maximal 48 h frisches Medium, das Volumen pro 10 cm Zellkulturschale betrug 10 ml.

Zur Passage kamen die HEK-Zellen alle drei bis vier Tage, nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90%. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit 1xPBS (RT) gewaschen. Danach erfolgte das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale sowie das Auflösen von Zell-Zell-Kontakten durch Inkubation mit 1xTrypsin (37 °C). Die Inkubationszeit im Brutschrank betrug 5-10 min, die Wirkung des Trypsins wurde mikroskopisch kontrolliert. Sobald sich alle Zellen vom Boden der Zellkulturschale und voneinander abgelöst hatten, wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium (DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A) gestoppt. Der Proteinanteil im Serum des Mediums inaktiviert das Trypsin. Je nach gewünschter Verdünnung wurde Medium hinzugefügt und die Zellen neu ausgesät.

Die durchgeführten Experimente basierten auf HEK-Zellen von ca. 80% Konfluenz in 10 cm Zellkulturschalen oder 6-Loch-Zellkulturplatten.

### 2.2.3.2 Isolation primärer Maushepatozyten

Versuchstiere für die Isolation primärer Maushepatozyten waren männliche C57BL/6J Mäuse oder männliche Tiere der Linie EGLN3 flox/flox. Die Tiere waren zwischen 8 und 16 Wochen alt.

Für die Isolation primärer Hepatozyten wurden die Mäuse mit einer Injektionsnarkose aus Ketamin und Xylazin betäubt. Die Dosierungen und Handelspräparate zeigt nachfolgende Tabelle 17.

**Tabelle 17: Injektionsnarkose zur Isolation primärer Maushepatozyten**

Wirkstoff	Präparat	Dosierung
Ketaminhydrochlorid	Ketavet <sup>®</sup> 100 mg/ml	80 mg/kg
Xylazinhydrochlorid	Rompun <sup>®</sup> 2%	12 mg/kg

Die Injektion erfolgte intraperitoneal, das Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft (Reflex negativ). Nachfolgend wurde die Abdominalgegend des Tieres großflächig eröffnet, um alle Strukturen für die Präparation freizulegen. Insbesondere benötigt wurde eine gute Sicht auf die Leber und die Gefäße V. cava. caud. und V. portae.

Es folgte die Punktion der V. cava. caud. in Richtung kranial mit einem Venenkatheter und das Anschließen eines vorgewärmten Perfusionspuffers. Der Perfusionspuffer wurde nur kurz in die Leber gepumpt, bis eine Schwellung der Leber und der Beginn einer Farbveränderung von dunkelbraun-rot nach hellbraun-gelb sichtbar wurde. Daraufhin erfolgte die Durchtrennung der V. portae und eine Spülung mit Perfusionspuffer bis die Leber sichtbar heller und möglichst blutleer war (Puffermenge: ca. 20 ml, Geschwindigkeit: 4 ml/min). In einem

zweiten Schritt wurde die Leber mit vorgewärmtem Digestionspuffer gespült, um die Leberzellen aus ihrem bindegewebigen Verband zu lösen. Eine erfolgreiche Verdauung war an einem Schwellen des Lebergewebes und der weicher werdenden Konsistenz zu erkennen (Puffermenge: ca. 50 ml, Geschwindigkeit: 4 ml/min). Die Leber wurde entnommen und nach Entfernen der Gallenblase in eine 10 cm Zellkulturschale überführt.

Im nächsten Schritt wurde die Leber in Zellkulturmedium (DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A) mit Zellschabern zerkleinert und durch ein Nylon-Siebewebe mit Maschenweite 250 µm gefiltert. Die so grob gereinigte Zellsuspension wurde 3 min bei 770 rpm und RT zentrifugiert, um ein Zellpellet zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium resuspendiert und zusätzlich mit Easycoll-Lösung versetzt. Dies ermöglichte das Separieren von toten Zellen über eine Dichtegradienten-Zentrifugation (10 min, 770 rpm, RT). Es folgten zwei Waschschriffe und am Ende das Aufnehmen der isolierten Zellen in Zellkulturmedium. Nach Anfärben mit Trypanblau-Lösung und Auszählen in der Neubauer-Zählkammer wurden die Hepatozyten mit einer Dichte von 250.000 lebenden Zellen pro Vertiefung in kollagenbeschichtete Zellkulturplatten im 12-Loch-Format ausgesät. Als Medium diente oben aufgeführtes Zellkulturmedium mit einem Volumen von 1 ml pro Vertiefung und die Zellen bekamen mindestens 4 h Zeit zum Adhären. Danach wurden sie für Experimente genutzt, die Überlebensdauer von primären Maushepatozyten in Kultur beträgt ca. 4-7 Tage.

### 2.2.3.3 Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmiden

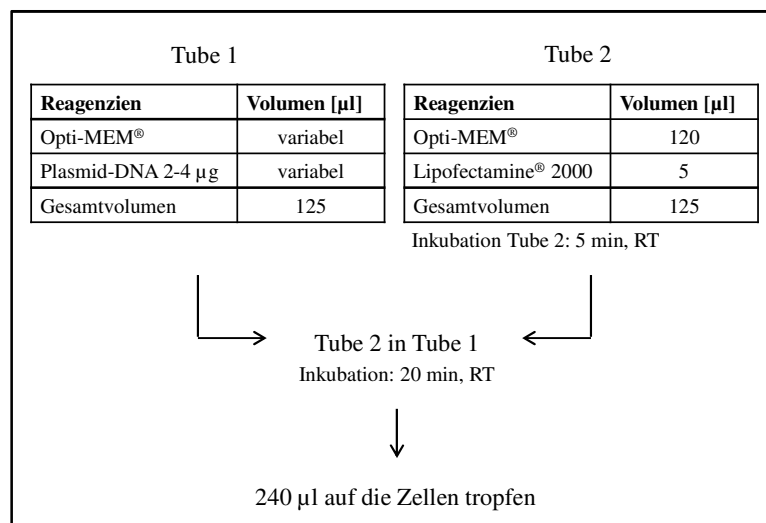
Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Moleküle, die sich selbständig in Wirtszellen replizieren können und als Vektoren dienen, um Fremd-DNA in eine Zelle zu übertragen (Brown 2007).

In den Experimenten mit HEK-Zellen wurde mit Hilfe von Plasmid-DNA Flag-markiertes Mausprotein überexprimiert und danach über Co-Immunopräzipitation auf mögliche Protein-Protein-Interaktion untersucht. Eine Tabelle der verwendeten Plasmide ist in Kapitel 2.1.7 (Plasmide) dargestellt.

Als Methode für die Transfektion von Plasmiden wurde die Lipofektion gewählt, wobei die Plasmid-DNA, eingeschlossen in Liposomen, über Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Das verwendete Transfektionsreagenz „Lipofectamine<sup>®</sup> 2000“ der Firma Invitrogen<sup>®</sup> Life Technologies GmbH enthält kationische Lipide, sodass über Komplexbildung mit der negativ geladenen Nukleinsäure Liposomen entstehen. Das Protokoll des Herstellers wurde modifiziert und die Durchführung der Transfektion ist nachfolgend zusammengefasst.

Pro Vertiefung wurde 1 ml Zellkulturmedium (DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A) vorgelegt und zwei Reaktionsansätze entsprechend dem in Abbildung 8 gezeigten Schema vorbereitet.

Alle Angaben beziehen sich auf eine Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte, für 10 cm Zellkulturschalen gelten die fünffachen Mengen bzw. Volumina.



**Abbildung 8: Pipettierschema für die Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmiden**

Die Inkubation erfolgte über Nacht für 16 h, am darauffolgenden Morgen wurde das Medium gewechselt, die Zellen erhielten 2 ml/Vertiefung frisches Zellkulturmedium (DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A) und wurden 48 h nach der Transfektion geerntet.

#### 2.2.3.4 Transfektion primärer Maushepatozyten mit siRNA

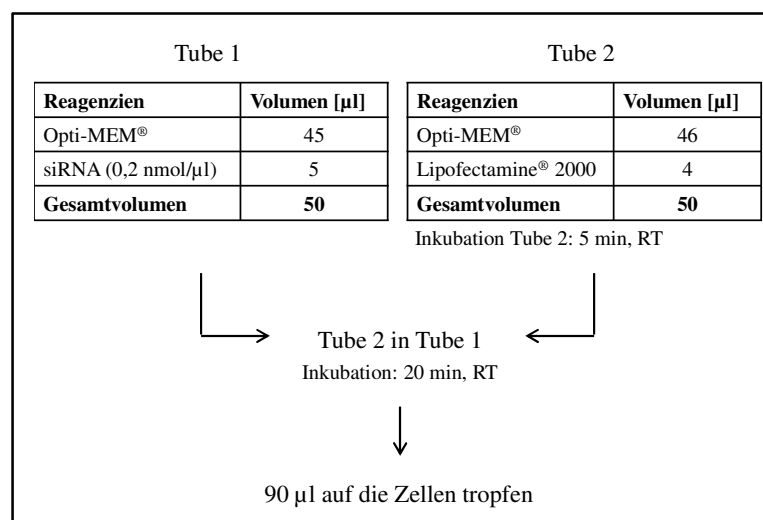
Mit Hilfe von small interfering RNA (siRNA), kleinen doppelsträngigen Ribonukleinsäurefragmenten, können bestimmte Zielgene in einer Zelle ausgeschaltet werden. Die siRNA wird in der Zelle, vermittelt durch den RNA-induced silencing complex (RISC-Proteinkomplex), in Einzelstränge aufgetrennt. Diese sind komplementär zu einem Bereich des Zielgens und binden an die entsprechende mRNA, sodass keine Translation und infolgedessen auch keine Expression des Zielproteins mehr stattfinden kann. Der Komplex aus siRNA und mRNA wird von der Zelle abgebaut. Es findet nur noch Translation von mRNA statt, die nicht durch siRNA gebunden wurde, was die Expression des korrespondierenden Proteins stark reduzieren kann (Eggert und Fischer 2003).

In den durchgeführten Zellkulturexperimenten wurde die Transfektion, also das Einbringen von siRNA in eine Zelle, genutzt, um die Konsequenzen herunterregulierter bzw. reduzierter Proteinexpression eines Gens zu untersuchen. Bei der Transfektion von siRNA in Zellen findet keine Integration in das Genom der Wirtszelle statt, die hemmende Wirkung auf die Zielgene ist deshalb zeitlich begrenzt. Details über die verwendete siRNA sind in Kapitel 2.1.8 (siRNA) dargestellt.

Für die Transfektion von primären Maushepatozyten mit siRNA wurde ebenfalls die Methode der Lipofektion mit „Lipofectamine® 2000“ angewendet, welche in Kapitel 2.2.3.3 für die Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmiden beschrieben ist.

Die Transfektion von primären Maushepatozyten mit siRNA wurde jeweils nach der Adhäsion der isolierten Zellen, frühestens 4 h nach Aussäen in die Zellkulturplatte, durchgeführt.

Nach Vorlegen von 500 µl Zellkulturmedium (DMEM, ohne FBS, ohne P/S/A) pro Vertiefung wurden zwei Reaktionsansätze vorbereitet. Das Schema in Abbildung 9 zeigt die beiden Reaktionsansätze und das weitere Verfahren, bezogen auf eine Vertiefung einer 12-Loch-Zellkulturplatte.



**Abbildung 9: Pipettierschema für die Transfektion von primären Maushepatozyten mit siRNA**

Nach Inkubation über Nacht für 16 h bekamen die Zellen am darauffolgenden Morgen 1 ml frisches Zellkulturmedium pro Vertiefung (DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A) und wurden entsprechend des jeweiligen Versuchsprotokolls weiterbehandelt und in der Regel für mRNA 72 h und für Protein 48 oder 72 h nach der Transfektion geerntet.

### 2.2.3.5 Behandlung von Zellen mit Cobaltchlorid

Die Behandlung von Zellen mit Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>) fand durch Inkubation mit CoCl<sub>2</sub>-haltigem Zellkulturmedium (DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A) statt. In der Regel erfolgte die Behandlung über Nacht für 16 h, bevor die Zellen am darauffolgenden Morgen geerntet wurden. CoCl<sub>2</sub> wurde dem Medium in einer Konzentration von 250 µM zugesetzt.



### 2.2.3.6 Adenoviraler Gentransfer

Vektoren viralen Ursprungs sind sehr effiziente Systeme des Gentransfers. Für die vorliegende Arbeit wurden Adenoviren des Serotyps 5 eingesetzt, die in Kapitel 2.1.6 (Adenoviren) aufgelistet sind.

Bestimmte virale Gene dieser Adenoviren sind durch die entsprechenden Zielgene ersetzt. Diese Viren können die Zelle infizieren und effektiv die gewünschten Gene in die Zielzelle einschleusen. Die Aufnahme von Adenoviren in die Zelle findet durch Endozytose statt und wird vom Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) vermittelt. Durch die Deletion der E1-Region verlieren die Viren jedoch die Fähigkeit infektiöse Partikel zu bilden, sind also replikationsdefizient. Limitierend bei der Verwendung von Adenoviren als Vektoren sind deren toxische und immunogene Eigenschaften. Außerdem wird bei der Adenovirusinfektion der Zielzelle die DNA der Zielgene nicht ins Genom integriert, sodass es sich nur um eine transiente Genexpression handelt (Volpers und Kochanek 2004).

Die Adenovirusinfektion von Zellen in Zellkultur, einschließlich der Dosierung, ist in Kapitel 2.2.3.7 für HEK-Zellen und in Kapitel 2.2.3.8 für primäre Maushepatozyten beschrieben.

In den durchgeführten Tierversuchen wurden die adenoviralen Partikel über die Schwanzvene der Maus injiziert. Nach intravenöser Injektion erreichen diese über die Portalvene die Leber und akkumulieren dort innerhalb von Minuten (Alemany *et al.* 2000). Begründet wird dieses Phänomen mit der Mikroarchitektur der Leber und dem Aufbau des Blutgefäßsystems. Adenovirale Partikel gelangen aufgrund ihrer Größe sehr effizient aus dem Blut durch das Sinusoidendothel in die Hepatozyten. *In vivo* scheint die Interaktion mit dem CAR für die Infektion von Leberzellen eine untergeordnete Rolle zu spielen (Fechner *et al.* 1999, Alemany und Curiel 2001, Shayakhmetov *et al.* 2004). Die Durchführung der Adenovirusinjektion sowie Details zur Methode und den eingesetzten Viren sind in Kapitel 2.2.4.4 (Injektion adenoviraler Partikel und Dosierung) zusammengefasst.

Als Kontrolle in sämtlichen Experimenten mit Adenoviren wurde jeweils die Infektion mit Adeno-GFP eingesetzt. Dieser Vektor sorgt für die Expression von Grün fluoreszierendem Protein (GFP) in der Zielzelle, welches fluoreszenzmikroskopisch erfasst werden kann. Durch den Einsatz einer vergleichbaren Zahl an infektiösen Partikeln kann über diese Information die Effizienz der Methode bzw. der Erfolg der Infektion überprüft werden. Für bestimmte Zielgene standen auch GFP-fusionierte Proteine zur Verfügung.

### 2.2.3.7 Adenovirusinfektion von HEK-Zellen

Die Adenovirusinfektion von HEK-Zellen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit virus-haltigem Medium (1 ml/Vertiefung) über Nacht (16 h). Am darauffolgenden Morgen erhielten

die Zellen frisches Zellkulturmedium (DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A) ohne Virus, jeweils 2 ml/Vertiefung und wurden 48 h nach der Infektion geerntet. Die genannten Mengenangaben für Medium beziehen sich auf Zellkulturplatten im 6-Loch-Format. Für 10 cm Zellkultur-schalen wurde die fünffache Menge eingesetzt.

Die nachfolgende Tabelle 18 zeigt die Dosierung von Adenoviren zur Infektion von HEK-Zellen. Alle Zellen wurden mit der gleichen Zahl infektiöser Partikel behandelt, die Kontrolle mit Adeno-GFP wurde entsprechend an die jeweilige Dosierung angepasst.

**Tabelle 18: Verwendung von Adenoviren zur Infektion von HEK-Zellen**

<b>Virus</b>	<b>Titer [ifu/ml]</b>	<b>Dosierung</b>
Adeno-EGLN3	$1,07 \times 10^9$	0,3 $\mu$ l/ml
Adeno-ChREBP	$7,7 \times 10^9$	0,1 $\mu$ l/ml
Adeno-ChREBP (AS 239-864)	$6,5 \times 10^9$	0,1 $\mu$ l/ml
Adeno-GFP	$3,45 \times 10^{10}$	variabel

### 2.2.3.8 Adenovirusinfektion von primären Maushepatozyten

Zur Infektion mit Adenoviren wurden primäre Maushepatozyten, wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben, isoliert und in kollagenbeschichtete 12-Loch-Platten ausgesät. Nach Anheftung der Hepatozyten wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit virushaltigem Medium (500  $\mu$ l/Vertiefung) über Nacht (16 h) inkubiert. Am darauffolgenden Morgen erhielten die Zellen frisches Medium ohne Virus (1 ml/Vertiefung). Es wurde jeweils DMEM, +10% FBS, +1% P/S/A verwendet.

Die nachfolgende Tabelle 19 zeigt die Dosierung der verwendeten Viren. Für Experimente mit primären Maushepatozyten wurden die Viren in verdünnter Form eingesetzt, Adeno-GFP wurde in der Dosierung angepasst und diente als Kontrolle.

**Tabelle 19: Verwendung von Adenoviren zur Infektion von primären Maushepatozyten**

<b>Virus</b>	<b>Titer [ifu/ml]</b>	<b>Dosierung</b>
Adeno-Cre	$1,1 \times 10^{11}$	3 $\mu$ l auf 1000 $\mu$ l PBS → davon 10 $\mu$ l/Vertiefung
Adeno-ChREBP	$7,7 \times 10^9$	6 $\mu$ l auf 1000 $\mu$ l PBS → davon 10 $\mu$ l/Vertiefung
Adeno-GFP	$3,45 \times 10^{10}$	Verdünnung variabel → davon 10 $\mu$ l/Vertiefung

## 2.2.4 Tierversuche

### 2.2.4.1 Zucht der geflochten Mauslinie EGLN3 flox/flox

Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse der Linie EGLN3 flox/flox stammten aus instituts-eigener Zucht. Die Elterntiere zum Aufbau der Zucht wurden von Dr. Ben Wielockx (Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden, Dresden, D) zur Verfügung gestellt. Auch die Genotypisierung der Mäuse übernahm die Arbeitsgruppe von Dr. Ben Wielockx. Die Mauslinie EGLN3 flox/flox generierte Guo-Hua Fong, Ph. D. (University of Connecticut Health Center, Farmington, USA) (Takeda *et al.* 2006); sie wurde achtmal mit C57BL/6-Mäusen rückgekreuzt.

Für die Zucht wurden zwei Zuchtpaare eingesetzt, die Verpaarung von männlichen und weiblichen Tieren erfolgte im Verhältnis 1:1. Die Zuchtphase umfasste 20 Wochen und wurde mit dem Absetzen des jeweils sechsten Wurfs abgeschlossen. Zu Beginn der Zucht waren die weiblichen Tiere 10 Wochen, die Männchen 10 und 14 Wochen alt. Die Haltungsbedingungen entsprechen den in Kapitel 2.1.5 (Versuchstiere und Haltungsbedingungen) genannten Angaben. Abweichend davon erhielten die Zuchttiere inklusive ihrer Nachzucht das Alleinfuttermittel „Maus-Zucht“ (V1124-300 der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D). Nachfolgende Tabelle 20 zeigt die Zuchtkennzahlen.

**Tabelle 20: Zuchtkennzahlen der 1:1 Verpaarung**

<b>Kennzahl</b>	<b>MW ± Stabw.</b>
Durchschnittliche Wurfgröße	6,33 ± 2,15
Durchschnittliche Aufzuchtverluste	0,92 ± 0,35
Kolonie-Index (mittlere Anzahl der Nachkommen pro Weibchen pro 30 Tage)	5,95 ± 1,94

Für die Tierversuche mit dieser geflochten Mauslinie wurden männliche Wurfgeschwister der F<sub>1</sub>-Generation aus insgesamt sechs Würfen verwendet, die zum Versuchszeitpunkt zwischen 12 und 20 Wochen alt waren.

### 2.2.4.2 EGLN3 Knockout/Deletion mittels Cre/loxP-System

Die Generierung eines EGLN3 Knockout in Mäusen und primären Hepatozyten wurde mit Hilfe des sogenannten Cre/loxP-Systems umgesetzt (Orban *et al.* 1992). Die Mauslinie EGLN3 flox/flox ist für beide EGLN3 Allele „geflocht“, das heißt das EGLN3-Gen wird an beiden Seiten von loxP-Stellen flankiert. Das Enzym Cre-Rekombinase (Cre) erkennt diese Markierung, bindet und entfernt gezielt die markierten DNA-Bereiche (= Deletion).

In Mäusen kann über den Vektor des Adenovirus Cre-Rekombinase leberspezifisch exprimiert werden und führt zu einem gewebespezifischen Knockout von EGLN3 in den Hepatozyten. Die Infektion von primären Maushepatozyten in Zellkultur mit Adeno-Cre hat denselben Effekt.

### 2.2.4.3 Versuchsgruppen

Die in den Tierversuchen eingesetzten Mausgruppen sind in nachfolgender Tabelle 21 zusammengefasst. Details zu den verwendeten Adenoviren sind in Kapitel 2.1.6 (Adenoviren) aufgeführt.

**Tabelle 21: Versuchsgruppen der Tierversuche**

Versuch	Stamm/ Linie	Anzahl	Geschlecht	Alter in Wo	Gruppen (Anzahl der Mäuse pro Gruppe)
Vorversuch	EGLN3 flox/flox	4	männlich	12	→ Adeno-GFP (1) → Adeno-Cre 5 µl (1) → Adeno-Cre 10 µl (1) → Adeno-Cre 20 µl (1)
Hauptversuch	EGLN3 flox/flox	18	männlich	13-20	→ Adeno-GFP (9) → Adeno-Cre 15 µl (9)

### 2.2.4.4 Injektion adenoviraler Partikel und Dosierung

Die Infektion der Mäuse erfolgte durch Injektion adenoviraler Partikel in die Schwanzvene. Hierfür wurden die Mäuse für den Moment der Injektion in einem Restraîner fixiert und der Schwanz für ca. 30 s in 42 °C warmes Wasser getaucht, um die Vene zu dilatieren. Die adenoviralen Partikel, mit isotoner Kochsalzlösung auf ein Volumen von 200 µl verdünnt, wurden injiziert und die Maus wieder aus der Fixierung befreit. In den nachfolgenden Tagen wurden die Tiere täglich auf ihr Allgemeinbefinden kontrolliert.

Für den Vorversuch zur Dosisfindung wurden 5 µl, 10 µl und 20 µl Adeno-Cre eingesetzt. Die Injektionsmenge von Adeno-GFP für die Kontrollmaus wurde den infektiösen Einheiten entsprechend an die Dosierung von 20 µl Adeno-Cre angepasst.

Die Virusmenge für den Hauptversuch betrug 15 µl Adeno-Cre pro Maus, was einer Dosierung von  $1,65 \times 10^9$  ifu/Maus entspricht. Die Virusmenge für die Kontrollgruppe wurde mit 40 µl Adeno-GFP pro Maus adäquat angepasst.

Das grundlegende Prinzip des adenoviralen Gentransfers wurde bereits in Kapitel 2.2.3.6 erläutert.

### 2.2.4.5 Versuchsablauf

Die Adenovirus-Injektion erfolgte an Tag 0. An Tag 8 wurden die Tiere nach sechsständigem Fasten durch zervikale Dislokation getötet.

Zur Dokumentation der Gewichtsentwicklung wurden die Tiere einmal vor der Injektion (an Tag -2) und vor dem Töten (an Tag 8) gewogen. Zwischen Tag 5 und Tag 8 wurde zusätzlich die Futteraufnahme im Abstand von jeweils 24 h durch Wiegen des Futters ermittelt.

Die Messung der Blutglukosewerte (*ad libitum* gefüttert) erfolgte an Tag 6 (10 Uhr), vor dem Töten wurde die Nüchternblutglukose nach sechs Stunden Fasten ermittelt.

Nach der zervikalen Dislokation der Tiere wurden Herzblut zur Serumgewinnung und Leber entnommen. Das Lebergewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung der Proben für die Untersuchung von hepatischer mRNA- und Proteinexpression bei -80 °C gelagert. Die Blutproben wurden nach dem Gerinnen (60 min bei RT) für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde abgenommen und bis zur Bestimmung des Insulinwertes bei -80 °C gelagert.

Abbildung 10 fasst schematisch den Ablauf der Tierversuche zusammen.

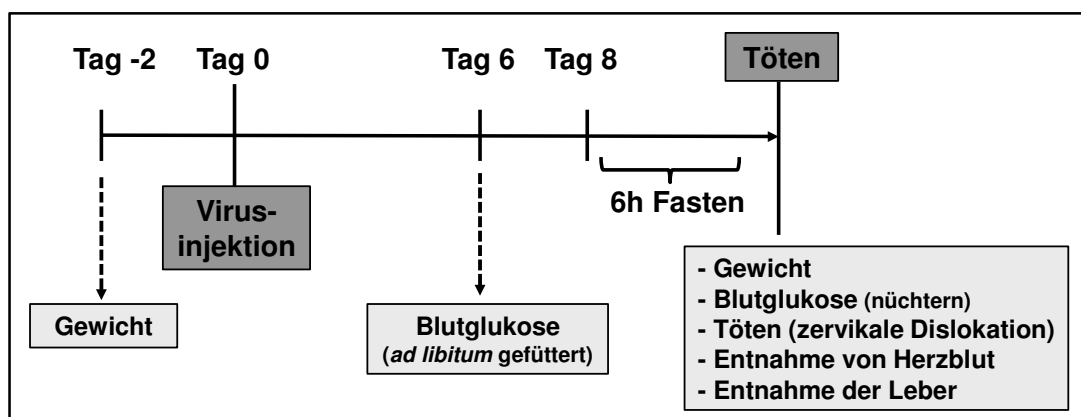


Abbildung 10: Ablauf des Tierversuchs in schematischer Darstellung

### 2.2.4.6 Bestimmung der Blutglukose-Werte

Die Messung der Blutglukose-Werte erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Blutzuckermessgerätes für die Messung aus Kapillarblut. Es wurde das Gerät „CONTOUR® LINK“ der Firma Bayer Vital GmbH mit dazugehörigen Teststreifen (CONTOUR® Sensoren) verwendet. Für die Messung wurde bei den Mäusen durch Punktion der V. facialis mit einer Kanüle ein Tropfen Vollblut gewonnen.

#### **2.2.4.7 Bestimmung der Seruminsulin-Werte**

Der Seruminsulinspiegel wurde mit dem „Rat Insulin ELISA Kit“ der Firma Crystal Chem Inc. ermittelt. Die Messung erfolgte in 5 µl Serum nach den Angaben des Herstellers, wobei der sensitive Messbereich bei 0,156-10 ng/ml liegt. Das verwendete Kit basiert auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Dabei wird im letzten Schritt durch das antikörpergekoppelte Enzym HRP das zugegebene Substrat TMB oxidiert, wobei die Enzymaktivität proportional zur Menge des gebundenen Insulins ist. Die Absorption des gebildeten Farbstoffs wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm am Gerät „Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser“ mit der Software „MikroWin 2000“ gemessen.

Das Kit ist zur Bestimmung von Insulin in Mausserum geeignet. Dafür bietet der Hersteller einen Mausstandard (Mouse Insulin Standard 2 ng) an, der analog zum Rattenstandard des Kits nach Herstellerangaben verwendet wird. Über die gemessene Standardkurve kann durch Interpolation der Messwerte die Insulinkonzentration im Mausserum ermittelt werden.

#### **2.2.5 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten und Tierversuchen wurden zunächst die Mittelwerte der zu gruppierenden Daten gebildet. Danach wurden Standardabweichung und Standardfehler der Mittelwerte berechnet.

Für die Zellkulturexperimente ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens dreimaliger Wiederholung des Experiments dargestellt. Die Abbildungen der Zellkulturexperimente enthalten jeweils Mittelwert plus Standardabweichung, bei den Tierexperimenten sind Mittelwerte plus Standardfehler dargestellt.

Als Signifikanztest wurden die Gruppenunterschiede mit Hilfe des zweiseitigen T-Tests analysiert. Ein Wert von  $*p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Aufgrund bisheriger Erfahrung wurde eine Normalverteilung der Daten angenommen.

## 3 ERGEBNISSE

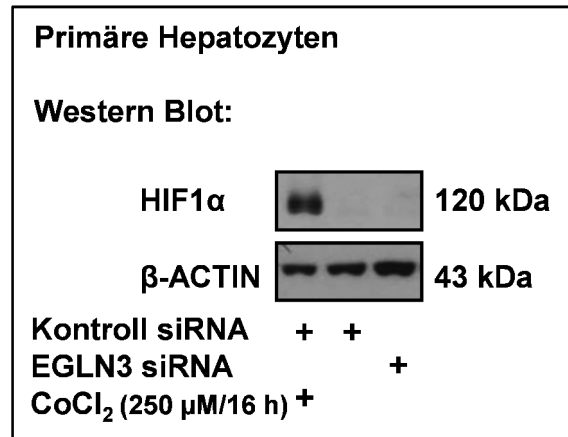
### 3.1 Untersuchung der beobachteten Effekte auf Mediation durch HIF1 $\alpha$

In Voruntersuchungen (siehe Kapitel 1.5.1) wurde eine Reduktion von ChREBP-Zielgenen in primären Hepatozyten durch eine Depletion von EGLN3 mittels siRNA erreicht. Als Ursache hierfür sind eine Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ -Protein und eine Induktion von HIF1 $\alpha$ -Zielgenen denkbar. Somit besteht auch die Möglichkeit, dass ChREBP-Zielgene nicht direkt durch EGLN3, sondern durch HIF1 $\alpha$  reguliert sind. Deshalb sollte ermittelt werden, ob HIF1 $\alpha$  als Mediator der Regulation fungiert oder ob der Zusammenhang zwischen EGLN3 und ChREBP als HIF1 $\alpha$ -unabhängig betrachtet werden kann.

#### 3.1.1 Einfluss einer EGLN3-Depletion auf HIF1 $\alpha$ -Protein

In primären Hepatozyten wurde mittels siRNA EGLN3 depletiert, die Kontrollzellen wurden mit Kontroll siRNA behandelt. Als Positivkontrolle für HIF1 $\alpha$ -Protein wurde ein Teil dieser Kontrollzellen zusätzlich über Nacht für 16 h mit Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>) inkubiert. CoCl<sub>2</sub> gehört zu einer Gruppe von Metallen, die in Zellen den Zustand einer Hypoxie simulieren können. Für CoCl<sub>2</sub> wird angenommen, dass es Eisen aus dem aktiven Zentrum der EGLN-Enzyme verdrängt. Da diese Enzyme unter anderem eisenabhängig sind, kommt es zu einer Inaktivierung aller drei Isoformen durch CoCl<sub>2</sub> (Ho und Bunn 1996, Epstein *et al.* 2001). Infolgedessen akkumuliert HIF1 $\alpha$ -Protein, was durch Analyse im Western Blot für die CoCl<sub>2</sub>-behandelten Zellen bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 11). In primären Hepatozyten ohne CoCl<sub>2</sub>-Behandlung war die HIF1 $\alpha$ -Proteinmenge sehr gering. Für die Kontrollzellen ließ sich keine HIF1 $\alpha$ -Bande detektieren. Die Depletion von EGLN3 führte eindeutig nicht zu einer Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ -Protein, was der Vergleich zwischen Kontroll siRNA- und EGLN3 siRNA-behandelten Zellen zeigte.

Daraus lässt sich ableiten, dass eine spezifische Reduktion von EGLN3 nicht zu einer Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ -Protein führt und der regulatorische Effekt von EGLN3 auf ChREBP-Zielgene nicht durch HIF1 $\alpha$ -Protein vermittelt wird.



**Abbildung 11: Keine Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ -Protein durch EGLN3-Depletion in primären Hepatozyten.** Western Blot des Proteins HIF1 $\alpha$  aus primären Hepatozyten nach Behandlung mit siRNA. Als Positivkontrolle dienten mit Kontroll siRNA und CoCl<sub>2</sub> behandelte Zellen.  $\beta$ -ACTIN diene als Ladekontrolle.

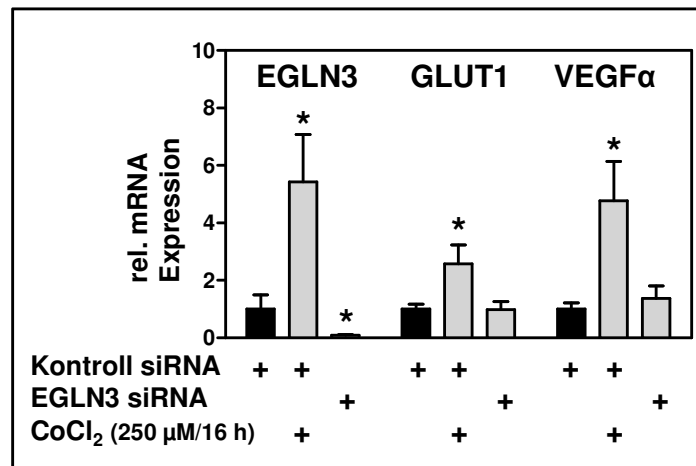
### 3.1.2 Einfluss einer EGLN3-Depletion auf HIF1 $\alpha$ -Zielgene

In primären Hepatozyten war durch EGLN3-Depletion eine Änderung von HIF1 $\alpha$  auf Proteinebene nicht nachweisbar. Im nächsten Experiment sollte überprüft werden, ob durch EGLN3-Depletion HIF1 $\alpha$ -Zielgene beeinflusst sind. Durch die oben genannten Ergebnisse in Bezug auf HIF1 $\alpha$ -Protein wurde eine Induktion von HIF1 $\alpha$ -Zielgenen nicht erwartet.

Zur Untersuchung von HIF1 $\alpha$ -Zielgenen wurden ebenfalls primäre Hepatozyten mit Kontroll siRNA und EGLN3 siRNA behandelt. Wieder diene CoCl<sub>2</sub> zur Generierung einer Positivkontrolle. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR Analyse. Die mRNA-Expression von EGLN3 wurde durch die siRNA um >90% reduziert. Außerdem wurde EGLN3 als HIF1 $\alpha$ -Zielgen durch CoCl<sub>2</sub> stark induziert. Die HIF1 $\alpha$ -Zielgene Glucose transporter 1 (GLUT1) und Vascular endothelial growth factor alpha (VEGF $\alpha$ ) wurden durch die Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> um das zweieinhalb- bzw. fünffache erhöht. Eine Induktion dieser beiden Zielgene durch EGLN3-Depletion fand jedoch nicht statt: die mRNA-Expression blieb in EGLN3 siRNA-behandelten Zellen unverändert im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll siRNA behandelt wurden.

Zusammenfassend finden sich auch auf Ebene der HIF1 $\alpha$ -Zielgenexpression keine Hinweise auf eine Stabilisierung oder Aktivierung von HIF1 $\alpha$ -Protein durch EGLN3-Depletion in primären Hepatozyten.





**Abbildung 12: Keine Induktion von HIF1 $\alpha$ -Zielgenen durch EGLN3-Depletion in primären Hepatozyten.** qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von EGLN3 und ausgewählten HIF1 $\alpha$ -Zielgenen (GLUT1, VEGF $\alpha$ ) in primären Hepatozyten nach Behandlung mit siRNA. Als Positivkontrolle dienten mit Kontroll siRNA und CoCl<sub>2</sub> behandelte Zellen. (\*p<0,05 zur jeweiligen Kontrolle)

## 3.2 Identifikation und Charakterisierung einer physikalischen Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3

### 3.2.1 Bestätigung der Interaktionspartner mittels Co-IP

In den nachfolgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob durch EGLN3 eine direkte Modifikation und Regulation von ChREBP in Form von Prolinhydroxylierung stattfindet. Voraussetzung für die Prolinhydroxylierung von ChREBP durch EGLN3 ist eine physikalische Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Eine solche direkte Interaktion mit EGLNs konnte beispielsweise auch für das gut charakterisierte Zielprotein HIF $\alpha$  nachgewiesen werden (Appelhoff *et al.* 2004, Landazuri *et al.* 2006, Villar *et al.* 2007). Um eine mögliche Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3 zu identifizieren und zu charakterisieren kam die Methode der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) zum Einsatz. Zuerst wurden beide potentiellen Interaktionspartner in HEK-Zellen überexprimiert und auf Bindung untersucht.

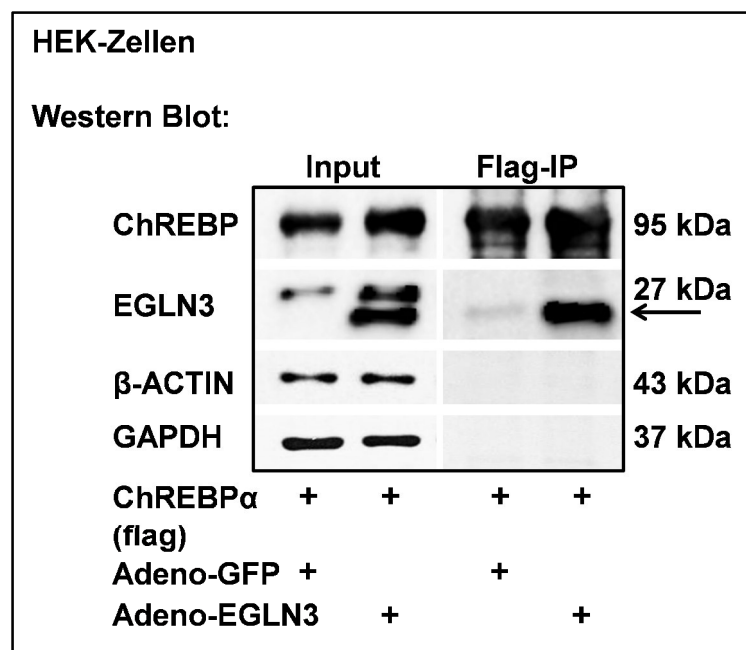
#### 3.2.1.1 Co-IP von EGLN3 und ChREBP

Im ersten Experiment wurde ein Plasmid, welches Flag-markiertes ChREBP (ChREBP $\alpha$ ) exprimiert, in HEK-Zellen transfiziert. Gleichzeitig wurde EGLN3 durch adenovirale Infektion (über-)exprimiert, die Kontrollzellen erhielten Adeno-GFP. Die Proteinextraktion und -aufbereitung erfolgte nach Co-IP-Protokoll, hierbei wurde das Flag-markierte ChREBP-Protein über Anti-Flag-Agarose-Beads präzipitiert. Abbildung 13 zeigt die aufgetrennten

Proteine im Western Blot. Im Input war die Überexpression von ChREBP in beiden Proben und die Überexpression von EGLN3 in den Zellen mit Adeno-EGLN3 gut zu erkennen. Die Anreicherung von ChREBP in der IP mit Hilfe der Flag-Antikörper war erfolgreich. Des Weiteren zeigten  $\beta$ -ACTIN und GAPDH, dass nicht-gebundene Proteine in der IP kaum nachweisbar waren. Die IP-Probe der Zellen mit Adeno-EGLN3 zeigte, dass dieses EGLN3 erfolgreich als Interaktionspartner präzipitiert werden konnte. Auch in den Kontrollzellen mit Adeno-GFP tauchte eine schwache Bande EGLN3-Protein auf. Dabei handelte es sich höchstwahrscheinlich um endogenes EGLN3, welches im Input nicht detektiert werden konnte und erst nach Anreicherung in der IP als Co-Präzipitat sichtbar wurde.

Daraus lässt sich schließen, dass sowohl überexprimiertes als auch endogenes EGLN3 mit überexprimiertem ChREBP interagieren.

Interessanterweise zeigten die Inputproben mit überexprimiertem EGLN3 im Vergleich zu Zellen mit GFP, dass mehr ChREBP-Protein detektiert werden konnte. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass entweder die Anwesenheit von EGLN3, die nachgewiesene Bindung von EGLN3 an ChREBP oder auch die mutmaßliche Modifikation von ChREBP durch EGLN3 die Stabilität von ChREBP erhöht.



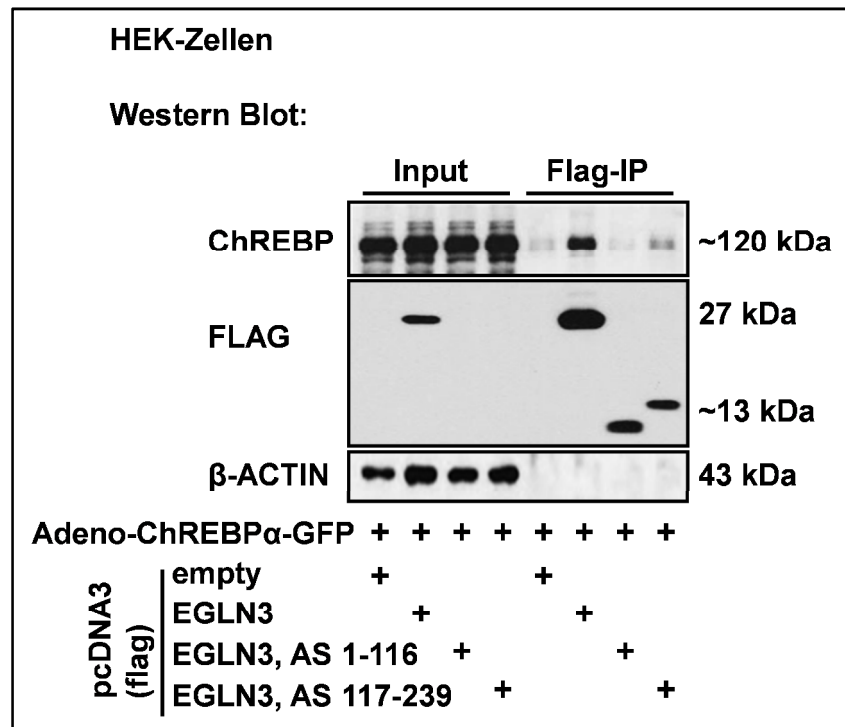
**Abbildung 13: EGLN3 interagiert mit ChREBP.** Co-IP aus HEK-Zellen mit überexprimiertem ChREBP $\alpha$  (flag) und Infektion mit Adenovirus zur Überexpression von EGLN3 bzw. GFP. Das Flag-markierte ChREBP wurde mit einem Flag-Antikörper präzipitiert. Als Co-Präzipitat von ChREBP konnte sowohl exogenes als auch endogenes EGLN3 nachgewiesen werden.

### 3.2.1.2 Co-IP von ChREBP und EGLN3

Die nachgewiesene Interaktion von EGLN3 mit ChREBP sollte im nächsten Schritt auch mit anderen Konstrukten bestätigt werden. Dafür wurden HEK-Zellen mit Adeno-ChREBP (= Adeno-ChREBP $\alpha$ -GFP) infiziert. Zusätzlich wurde Flag-markiertes EGLN3 überexprimiert. Dafür kamen drei EGLN3-Plasmide zum Einsatz: das Protein in voller Länge, ein vorderes Fragment mit den Aminosäuren 1-116 und ein hinteres Fragment mit den Aminosäuren 117-239. Als Kontrolle wurde in Zellen ein leerer pcDNA3-Vektor (= Leervektor = empty) transfiziert. Mit dem Experiment sollte zum einen die Interaktion von ChREBP mit EGLN3 nachgewiesen werden, zum anderen die Bindungsstelle an EGLN3 näher charakterisiert werden. Die Proteinextraktion und -aufbereitung erfolgte nach Co-IP-Protokoll, hierbei wurden die jeweils Flag-markierten EGLN3-Proteine/-Proteinfragmente über Anti-Flag-Agarose-Beads präzipitiert. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Co-IP. Die Expression der transfizierten EGLN3-Plasmide war unterschiedlich stark. EGLN3 war stärker (über-)exprimiert als seine beiden Fragmente. Mit einem Flag-Antikörper ließ sich im Input nur EGLN3 detektieren, die Fragmente mit einer Größe von etwa 13 kDa waren nicht nachweisbar. Die Überexpression von ChREBP war in allen vier Input-Proben gut zu erkennen. Die Co-IP hatte erfolgreich alle drei Flag-markierten Proteine angereichert. Sie waren in der IP-Probe nachweisbar, in welcher außerdem nicht-gebundenes Protein schwach zu detektieren war, siehe  $\beta$ -ACTIN. Das überexprimierte ChREBP tauchte eindeutig in der IP-Probe von EGLN3 als Co-Präzipitat wieder auf. Für die beiden Fragmente von EGLN3 war die Interaktion nicht eindeutig. ChREBP schien mit den Aminosäuren 117-239 von EGLN3 zu interagieren, wurde jedoch nur schwach in der IP präzipitiert. Die Bande von ChREBP für das vordere Fragment von EGLN3, Aminosäure 1-116, unterschied sich nicht vom empty-Vektor, was darauf hinweist, dass dieses EGLN3-Proteinfragment nicht mit ChREBP interagieren kann.

Zusammenfassend lässt sich mit dieser Co-IP die Interaktion von überexprimiertem ChREBP mit überexprimiertem EGLN3 nachweisen. Die Bindung der vermuteten Interaktionspartner ist damit für überexprimiertes Protein in beide Richtungen bestätigt.

Welche Aminosäuren für die Bindung von ChREBP an EGLN3 benötigt werden, konnte für EGLN3 nicht eindeutig identifiziert werden. Eine Präzipitation von ChREBP durch die C-terminalen 123 Aminosäuren von EGLN3 war möglich, aber schwächer ausgeprägt als mit dem vollständigen Protein. Eine Präzipitation von ChREBP alleine durch die N-terminalen 116 Aminosäuren von EGLN3 konnte nicht nachgewiesen werden bzw. scheint nicht möglich zu sein.

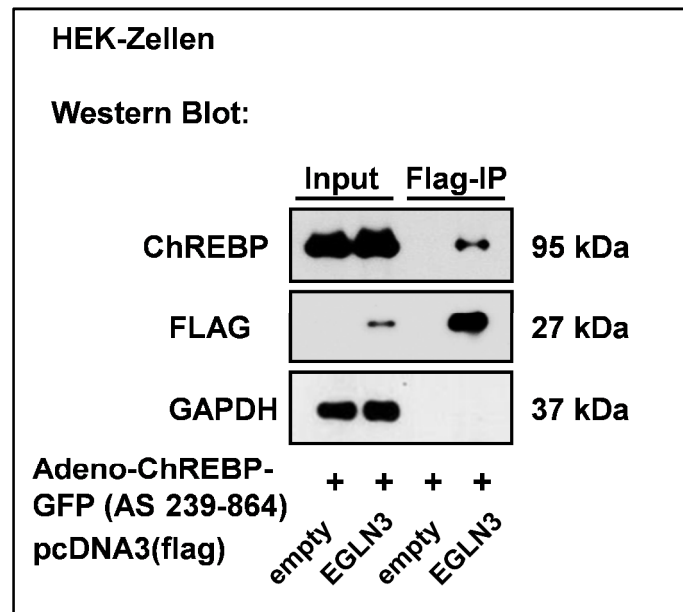


**Abbildung 14: ChREBP interagiert mit EGLN3.** Co-IP aus HEK-Zellen mit Überexpression von ChREBP, EGLN3 sowie zwei EGLN3-Fragmenten. Die jeweils Flag-markierten EGLN3-Proteine/-Proteinfragmente wurden mit einem Flag-Antikörper präzipitiert. ChREBP konnte als Co-Präzipitat von EGLN3 und dem hinteren Fragment von EGLN3 (AS 117-239) nachgewiesen werden.

### 3.2.1.3 Co-IP von verkürztem ChREBP und EGLN3

Eine weitere Co-IP sollte mit Hilfe einer verkürzten Form von ChREBP eingrenzen, welche Aminosäuren von ChREBP für die Bindung mit EGLN3 benötigt werden. Dafür wurde in HEK-Zellen eine ChREBP-Mutante mittels Adenovirusinfektion überexprimiert und auf Interaktion mit EGLN3 untersucht. Dabei handelte es sich um eine ChREBP-Mutante, welcher die N-terminalen 238 Aminosäuren fehlen (Adeno-ChREBP-GFP (AS 239-864)). Flag-markiertes EGLN3 wurde erneut als Plasmid in die Zellen transfiziert, die Kontrollzellen erhielten entsprechend den Leervektor (= empty). Die Proteinextraktion und -aufbereitung erfolgte nach Co-IP-Protokoll, hierbei wurde das Flag-markierte EGLN3-Protein über Anti-Flag-Agarose-Beads präzipitiert. Das Ergebnis der Co-IP ist in Abbildung 15 dargestellt. Der Flag-Antikörper detektierte das überexprimierte EGLN3 im Input und die erwartete Anreicherung in der IP. ChREBP war in beiden Input-Proben überexprimiert. Wie GAPDH zeigte, war in der IP kaum nicht-gebundenes Protein nachweisbar, ChREBP (AS 239-864) konnte hingegen als Co-Präzipitat detektiert werden.

Abschließend zeigte dieses Experiment, dass auch ChREBP in verkürzter Form mit EGLN3 interagiert, woraus sich ableiten lässt, dass die ersten 238 Aminosäuren von ChREBP für die Interaktion nicht notwendig sind.



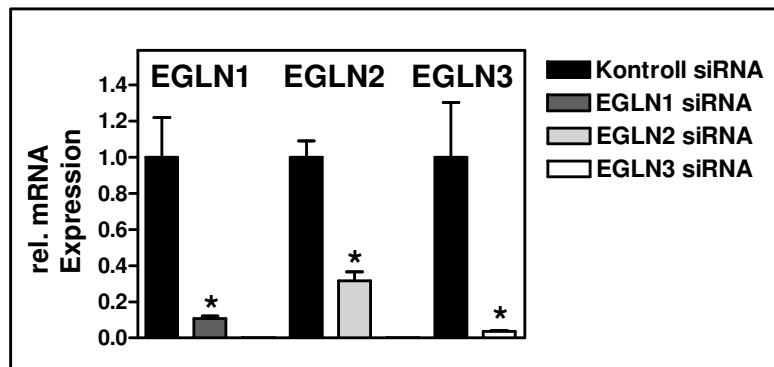
**Abbildung 15: ChREBP in verkürzter Form interagiert mit EGLN3.** Co-IP aus HEK-Zellen mit Überexpression von Flag-markiertem EGLN3 durch Plasmidtransfektion und ChREBP (AS 239-864) durch Adenovirusinfektion. Das Flag-markierte EGLN3 wurde mit einem Flag-Antikörper präzipitiert. Es konnte ChREBP in verkürzter Form als Co-Präzipitat von EGLN3 nachgewiesen werden.

### 3.2.2 Untersuchung der Regulation und Interaktion auf Spezifität von EGLN3

Nach Identifikation einer Interaktion zwischen den Proteinen ChREBP und EGLN3 stellte sich als nächstes die Frage, ob diese Interaktion und die beobachteten regulatorischen Effekte spezifisch sind für EGLN3 oder auch bei den Isoformen EGLN1 und/oder EGLN2 auftreten.

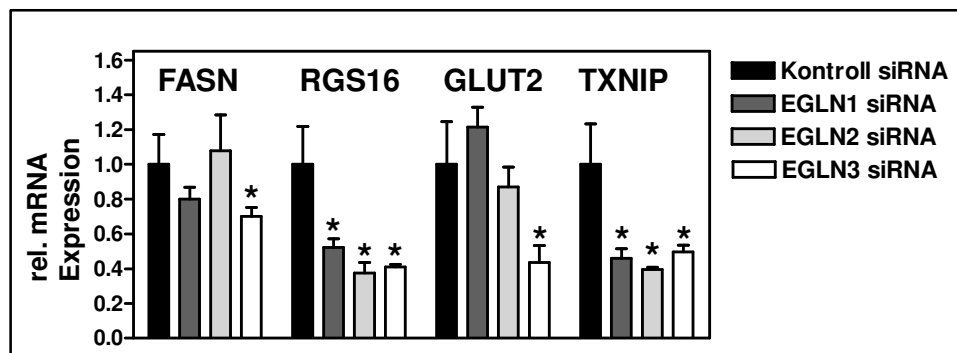
#### 3.2.2.1 Regulation von ChREBP-Zielgenen durch EGLNs

Im nachfolgend gezeigten Experiment sollte untersucht werden, ob die Regulation von ChREBP-Zielgenen neben EGLN3 auch für EGLN1 und/oder EGLN2 beobachtet werden kann. Dafür wurde in primären Hepatozyten nicht nur EGLN3 durch siRNA depletiert, sondern auch EGLN1 und EGLN2. Die Kontrollzellen wurden mit Kontroll siRNA behandelt. Abbildung 16 zeigt zur Validierung der siRNA-vermittelten Depletion die mRNA-Expression der drei EGLNs. Die Effizienz der Depletion lag für EGLN1 und EGLN3 bei ca. 90%, für EGLN2 bei ca. 70%.



**Abbildung 16: Depletion von EGLNs in primären Hepatozyten.** qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von EGLN1, EGLN2 und EGLN3 in primären Hepatozyten nach Behandlung mit EGLN-spezifischer siRNA. (\* $p < 0,05$  zur jeweiligen Kontrolle)

Mittels qRT-PCR Analyse wurden in diesem Experiment verschiedene ausgewählte ChREBP-Zielgene gemessen. Dazu gehörten neben Thioredoxin interacting protein (TXNIP) und Regulator of G-protein signaling 16 (RGS16) auch der Glucose transporter 2 (GLUT2) und das Enzym Fatty acid synthase (FASN). Die bereits beobachtete Reduktion der Expression von ChREBP-Zielgenen durch EGLN3-Depletion konnte für die untersuchten Zielgene bestätigt werden. Für EGLN1 und EGLN2 war dieser Effekt nur bei einem Teil der gemessenen Zielgene (RGS16 und TXNIP) zu beobachten, siehe Abbildung 17.



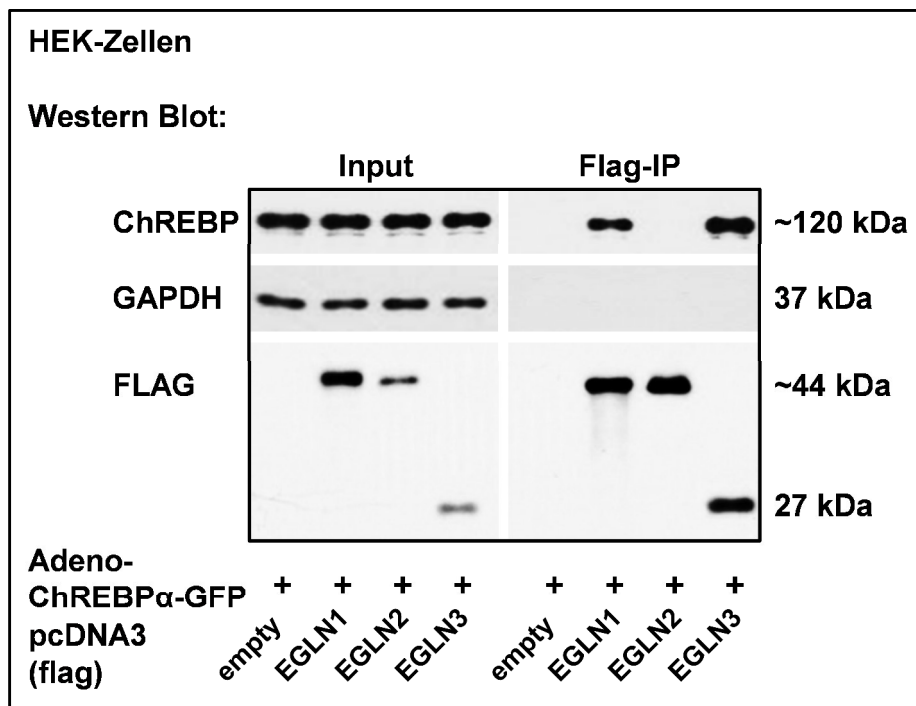
**Abbildung 17: Regulation von ChREBP-Zielgenen durch EGLNs in primären Hepatozyten.** qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression ausgewählter ChREBP-Zielgene (FASN, RGS16, GLUT2, TXNIP) in primären Hepatozyten nach Behandlung mit EGLN-spezifischer siRNA. (\* $p < 0,05$  zur jeweiligen Kontrolle)

### 3.2.2.2 Co-IP von ChREBP und EGLNs

Allein aus der Betrachtung der Expression von ChREBP-Zielgenen lässt sich nicht auf potentielle Regulation von ChREBP durch andere EGLN-Isoformen schließen. Deshalb sollte in einer weiteren Co-IP überprüft werden, ob eine Protein-Protein-Interaktion mit ChREBP auch für die anderen EGLN-Isoformen nachgewiesen werden kann. Dafür wurden HEK-Zellen zur Überexpression von ChREBP mit Adeno-ChREBP (= Adeno-ChREBP $\alpha$ -GFP) infiziert. Durch

Transfektion von Plasmiden wurde zudem Flag-markiertes EGLN1, EGLN2 und EGLN3 überexprimiert, als Kontrolle wurde ein Leervektor (= empty) transfiziert. Die Proteinextraktion und -aufbereitung erfolgte nach Co-IP-Protokoll, hierbei wurden die jeweils Flag-markierten EGLN-Proteine über Anti-Flag-Agarose-Beads präzipitiert. Das Ergebnis der Co-IP ist in Abbildung 18 zusammengestellt. Im Input wurde die Expression der Flag-markierten EGLN-Proteine mittels Flag-Antikörper kontrolliert: EGLN1 war deutlich stärker exprimiert als EGLN2 und EGLN3. Die Überexpression von ChREBP war gleichmäßig. Die drei EGLN-Isoformen waren, wie erwartet, in der IP angereichert. GAPDH zeigte, dass nicht-gebundenes Protein in der IP kaum detektierbar war. Eine Präzipitation von ChREBP war in der IP sowohl für EGLN1 als auch für EGLN3 nachweisbar, wobei EGLN3 am meisten ChREBP präzipitierte.

Zusammenfassend ergab sich eine Interaktion von ChREBP mit EGLN1 und EGLN3.



**Abbildung 18: ChREBP interagiert mit EGLN1 und EGLN3.** Co-IP aus HEK-Zellen mit Überexpression von Flag-markierten EGLNs mittels Plasmidtransfektion und überexprimiertem ChREBP durch Adenovirusinfektion. Die jeweils Flag-markierten EGLN-Proteine wurden mit einem Flag-Antikörper präzipitiert. ChREBP konnte als Co-Präzipitat von EGLN1 und EGLN3 nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Bestätigung der Interaktion mit endogenem Protein

Weiterführende Untersuchungen der Protein-Protein-Interaktion sollten in einem nächsten Schritt ohne überexprimiertes Protein durchgeführt werden um endogen-exprimierte Proteinmengen in einem physiologischeren System zu betrachten. Dafür wurde die Methode der

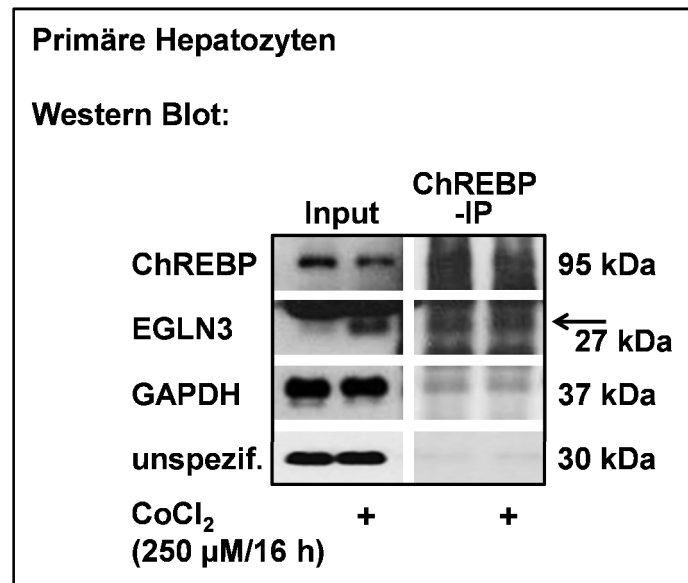
Co-Immunopräzipitation in modifizierter Form angewendet. Die Anreicherung von endogenem ChREBP-Protein fand mit Hilfe von an Sepharose-Beads gebundenem ChREBP-Antikörper statt.

### 3.2.3.1 Co-IP von ChREBP und EGLN3 aus primären Hepatozyten

Für die Co-IP aus primären Hepatozyten wurde Protein von unbehandelten primären Hepatozyten nach Co-IP-Protokoll geerntet. Zusätzlich wurde eine zweite Gruppe von Zellen über Nacht für 16 h mit  $\text{CoCl}_2$  behandelt. Die Ergebnisse der Co-IP zeigt Abbildung 19. Im Input der Proben war sehr gut zu erkennen, dass  $\text{CoCl}_2$  eine Induktion von EGLN3 als HIF1 $\alpha$ -Zielgen auslöste: die Proteinmenge war im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich erhöht. Durch die  $\text{CoCl}_2$ -vermittelte Verdrängung von Eisen aus dem aktiven Zentrum des Enzyms war dieses EGLN3 jedoch biochemisch inaktiv. ChREBP war im Input für beide Proben gut detektierbar. Interessanterweise war ChREBP nach Hemmung von EGLN3 durch  $\text{CoCl}_2$  reduziert. Die Anreicherung von ChREBP in der IP konnte gezeigt werden, gelang aber deutlich schlechter als die bisher gezeigte Anreicherung über Anti-Flag-Agarose-Beads. In der IP war noch schwach nicht-gebundenes Protein nachweisbar, wie GAPDH und eine weitere unspezifische Proteinbande zeigten. Trotzdem konnte EGLN3 in der IP für beide Proben präzipitiert werden.

Daraus lässt sich schließen, dass die Interaktion auch für endogenes ChREBP und endogenes EGLN3 in primären Hepatozyten nachweisbar war. Zudem wurde die Protein-Protein-Interaktion von ChREBP und EGLN3 durch eine Hemmung von EGLN3 mittels  $\text{CoCl}_2$  nicht verhindert. Letzteres Ergebnis bestätigten auch Experimente mit überexprimiertem Protein und  $\text{CoCl}_2$  (Daten nicht gezeigt).



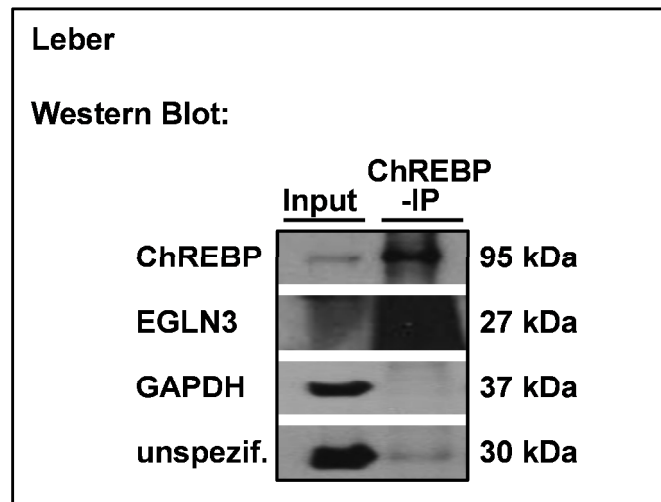


**Abbildung 19: Interaktion von endogenem ChREBP und endogenem EGLN3 in primären Hepatozyten.** Co-IP aus primären Hepatozyten. Es konnte mittels endogenem ChREBP endogenes EGLN3 präzipitiert werden.

### 3.2.3.2 Co-IP von ChREBP und EGLN3 aus Lebergewebe

Für die Untersuchung einer Interaktion wurde Gesamtproteinextrakt aus der Leber einer C57BL/6J-Maus gewonnen und nach Co-IP-Protokoll aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. ChREBP ließ sich im Input nachweisen, EGLN3 war trotz großer eingesetzter Proteinmengen im Input nur schwach zu detektieren. Für ChREBP gelang eine gut sichtbare Anreicherung in der IP. Die Kontrolle durch GAPDH und eine unspezifische Proteinbande zeigten, dass noch schwach nicht-gebundenes Protein in der IP detektiert werden konnte. Endogenes EGLN3 schien durch ChREBP in der IP angereichert zu werden. Die Visualisierung einer konkreten Bande für EGLN3 mit Hilfe der verwendeten Antikörper war jedoch durch Schmierbildung limitiert.

Diese Daten legen nahe, dass auch endogenes ChREBP und endogenes EGLN3 in der Leber interagieren.



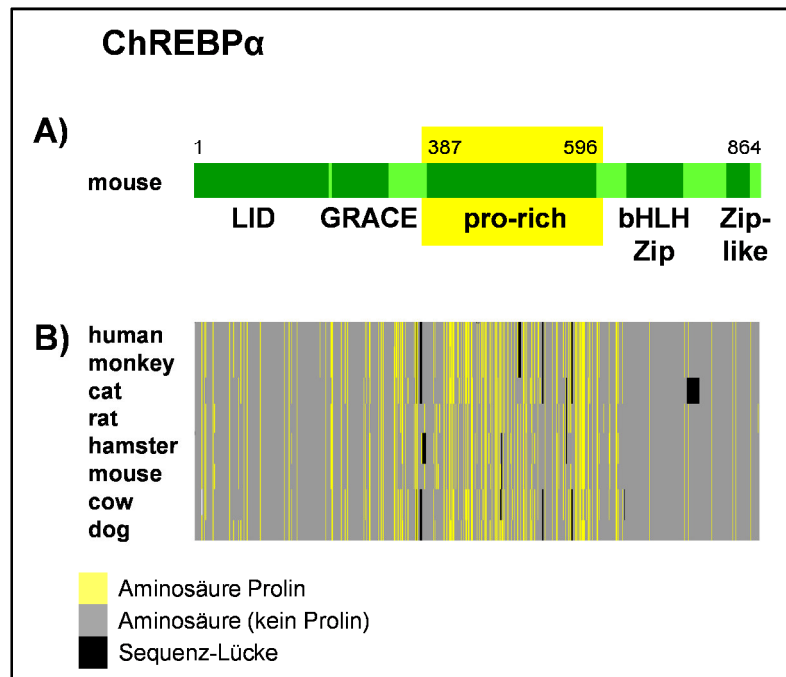
**Abbildung 20: Interaktion von endogenem ChREBP und endogenem EGLN3 in Lebergewebe.** Co-IP aus Mausleber. Es konnte mittels endogenem ChREBP endogenes EGLN3 präzipitiert werden.

### 3.3 Untersuchung von ChREBP auf Prolinhydroxylierung mittels Massenspektrometrie

Um eine Hydroxylierung der Aminosäure Prolin im ChREBP-Protein nachzuweisen, wurde ChREBP massenspektrometrisch analysiert.

Einleitend dazu stellt Abbildung 21 die Verteilung und Häufigkeit der Aminosäure Prolin im ChREBP-Protein der Maus dar. Abbildung 21A) zeigt schematisch die ChREBP-Proteinstruktur mit den wichtigsten funktionellen Elementen. Hervorgehoben ist die besonders prolinreiche Region (pro-rich) deren Funktion mit Protein-Protein-Interaktion in Verbindung gebracht wird. Im Mausprotein liegt etwa die Hälfte aller Prolin-Aminosäuren in diesem Abschnitt.

Um die Prolinreste des Proteins näher zu charakterisieren, stellt Abbildung 21B) schematisch einen Proteinsequenzabgleich verschiedener Wirbeltierspezies dar (= multiples Alignment). Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms „ClustalW2“ erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), die graphische Darstellung wurde über das Programm „STRAP“ umgesetzt (<http://www.bioinformatics.org/strap/>). Die Mehrzahl der Proline ist innerhalb dieser verschiedenen Wirbeltierspezies hoch konserviert.



**Abbildung 21: Die Aminosäure Prolin im ChREBP-Protein.** A) Schema der Proteinstruktur von murinem ChREBP $\alpha$ . LID = low-glucose inhibitory domain. GRACE = glucose-response activation conserved element. Pro-rich = proline-rich region. bHLHZip = basic helix-loop-helix/leucine-zipper domain. Zip-like = leucine-zipper-like domain. B) Graphische Darstellung des Alignments der ChREBP-Sequenz verschiedener Wirbeltierespezies. Die Aminosäure Prolin ist gelb hervorgehoben, alle anderen Aminosäuren sind grau dargestellt.

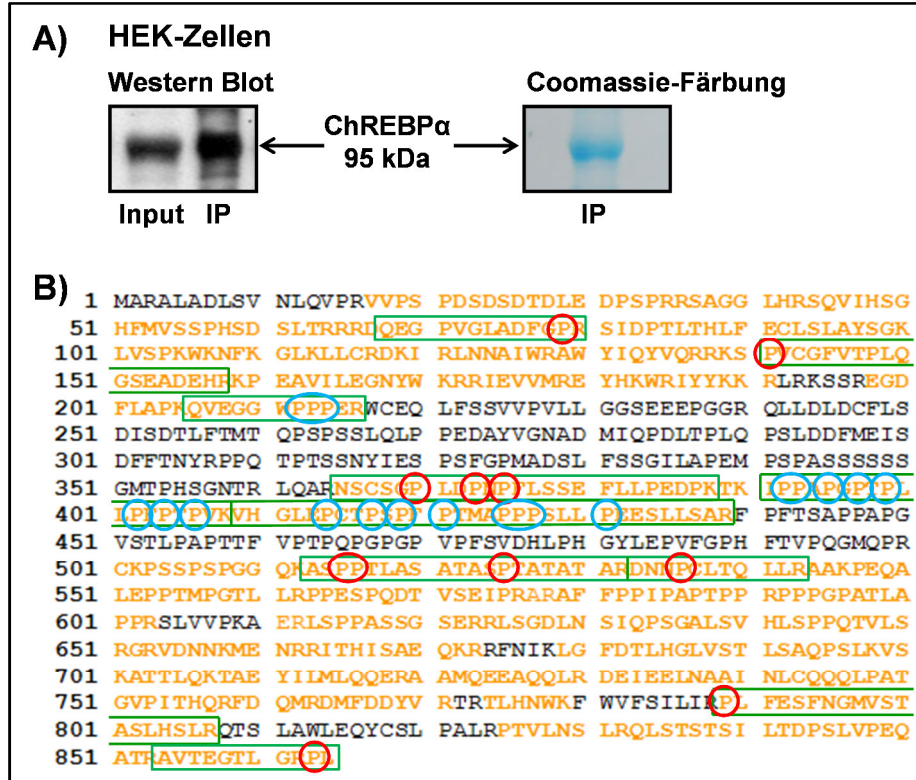
Für die Analyse mit dem Massenspektrometer wurde Flag-markiertes ChREBP in HEK-Zellen überexprimiert und durch IP mit Hilfe von Flag-Antikörpern angereichert. Außerdem wurde endogenes ChREBP aus der Mausleber untersucht, ebenfalls nach Anreicherung durch IP mittels ChREBP-Antikörper. Abbildung 22A) zeigt die Anreicherung von ChREBP-Protein aus HEK-Zellen im Western Blot, ergänzend die Coomassie-gefärbte Gelbande, die zur Analyse ausgeschnitten wurde.

Abbildung 22B) stellt die Ergebnisse der Massenspektrometrie-Analyse des ChREBP-Proteins aus HEK-Zellen dar. Das Protein ChREBP konnte in dieser Untersuchung mit einer Sequenzabdeckung von 65% sicher nachgewiesen werden. Die detektierten Peptide sind orange dargestellt. Für die grün hervorgehobenen Peptide ist die Prolinhydroxylierung die wahrscheinlichste Modifikation.

Die Bestimmung der Prolinhydroxylierung als Modifikation und teilweise auch die genaue Position der Hydroxylierung war nur bei folgenden Prolinresten möglich: P79, P141, P370 und/oder P373/P375, P515 oder P516 oder P525, P536, P789, P863; diese sind in der Abbildung rot gekennzeichnet.

Für die übrigen Peptide war die Modifikation der Prolinhydroxylierung nicht eindeutig von anderen Proteinmodifikationen abgrenzbar. Zusätzlich war bei manchen Peptiden die genaue Position der Prolinhydroxylierung unklar. Dabei handelte es sich um die Proteinabschnitte:

<sup>206</sup>QVEGGWPPER<sup>216</sup>, <sup>391</sup>IPPAPGPTLLPFPTPVK<sup>408</sup>, <sup>409</sup>VHGLEPCTPSPFPTMAPPPSL PEESLLSAR<sup>439</sup>. Für diese Peptide sind in der Darstellung der Ergebnisse alle vorhandenen Prolinreste blau gekennzeichnet.

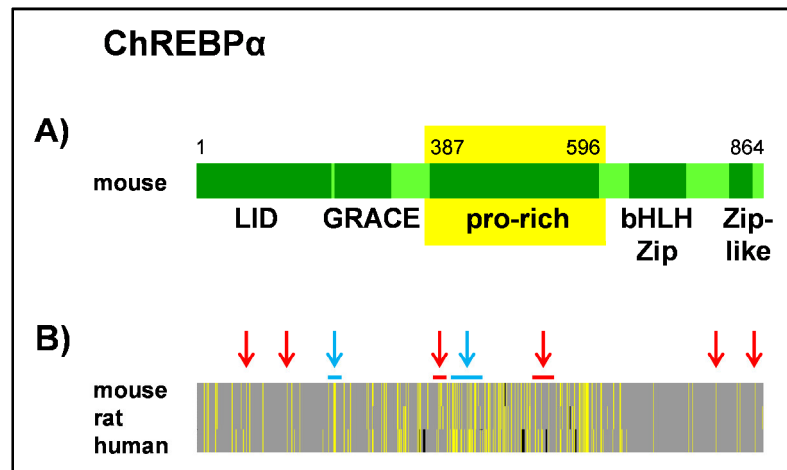


**Abbildung 22: Massenspektrometrie-Analyse des ChREBP-Proteins mit sicherer oder potentieller Prolinhydroxylierung.** A) IP-angereichertes ChREBP $\alpha$ -Protein aus HEK-Zellen im Western Blot und im SDS-Gel nach Coomassie-Färbung. B) Aminosäuresequenz des translationierten Abschnitts von ChREBP mit Ergebnissen aus der Massenspektrometrie. Orange = detektiertes Peptid. Grün = Peptid, für das Prolinhydroxylierung nachgewiesen wurde. Rot = Prolin mit sicherer Hydroxylierung. Blau = Prolin mit potentieller Hydroxylierung.

Die massenspektrometrische Untersuchung von endogenem ChREBP-Protein aus murinem Lebergewebe identifizierte nur einen Teil der für das ChREBP-Protein aus HEK-Zellen gezeigten Prolinhydroxylierungen. Die Details zur nachgewiesenen Prolinhydroxylierung im Lebergewebe (Position und Art der Modifikation) stimmten jedoch mit den Ergebnissen aus der Analyse des ChREBP-Proteins aus HEK-Zellen überein (Daten nicht gezeigt).

Für die im ChREBP-Protein aus HEK-Zellen nachgewiesene Prolinhydroxylierung erfolgte eine Betrachtung der Konservierung der entsprechenden Prolinpositionen. Von den identifizierten 30 Prolinresten mit sicherer oder potentieller Hydroxylierung sind für die Spezies Maus, Ratte und Mensch 25 konserviert. Dieses hohe Maß der Konservierung legt die Vermutung nahe, dass den Aminosäuren funktionelle Bedeutung zukommt. Etwa zwei Drittel dieser 30 Prolinreste waren dabei in der prolinreichen Region (pro-rich) des Proteins zu finden.

Abbildung 23 zeigt das Schema der ChREBP-Proteinstruktur der Maus (A) in Kombination mit dem Sequenzalignment für Maus, Ratte und Mensch (B). Die Pfeile markieren die Positionen der sicheren (rote Pfeile) und potentiellen (blaue Pfeile) Prolinhydroxylierung, die in der Massenspektrometrie nachgewiesen wurde. Mehrere nahe beieinander liegende Prolinreste sind durch einen horizontalen Balken unterhalb des Pfeils gekennzeichnet.



**Abbildung 23: Konservierung der sicher oder potentiell hydroxylierten Prolinreste im ChREBP-Protein.** A) Schema der Proteinstruktur von murinem ChREBP $\alpha$ . LID = low-glucose inhibitory domain. GRACE = glucose-response activation conserved element. Pro-rich = proline-rich region. bHLHZip = basic helix-loop-helix/leucine-zipper domain. Zip-like = leucine-zipper-like domain. B) Sequenzalignment für Maus, Ratte und Mensch mit den Positionen der sicher oder potentiell hydroxylierten Prolinreste. Roter Pfeil = Prolin(e) mit sicherer Hydroxylierung. Blauer Pfeil = Prolin(e) mit potentieller Hydroxylierung.

## 3.4 Funktionelle Konsequenz der Prolinhydroxylierung von ChREBP

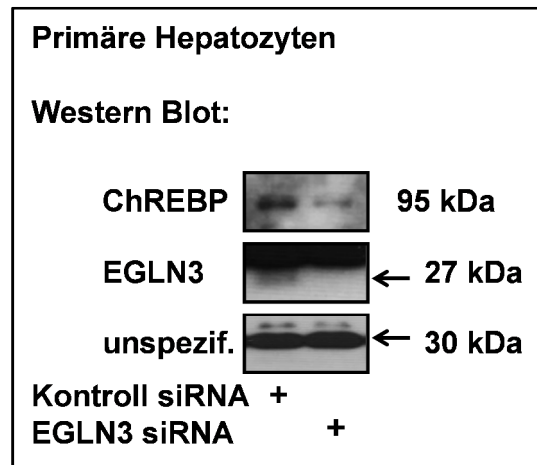
### 3.4.1 Einfluss einer EGLN3-Depletion auf ChREBP

Die vorausgehenden Daten hatten gezeigt, dass mit reduzierter EGLN3-Expression in primären Hepatozyten ChREBP-Zielgene herunterreguliert waren. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Reduktion von EGLN3 und damit auch die Reduktion der EGLN3-vermittelten Prolinhydroxylierung die Aktivität und/oder Stabilität von ChREBP vermindern.

Zur Beurteilung der funktionellen Konsequenz der Prolinhydroxylierung von ChREBP wurde in primären Hepatozyten die Expression von EGLN3 reduziert und die Auswirkung auf ChREBP-Protein betrachtet. Im nachfolgend gezeigten Experiment wurden primäre Hepatozyten mit EGLN3 siRNA behandelt, die Kontrollgruppe entsprechend mit Kontroll siRNA.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, war in primären Hepatozyten, die mit EGLN3 siRNA behandelt wurden, wie erwartet, weniger EGLN3-Protein und als Konsequenz dessen auch weniger ChREBP-Protein zu detektieren als in Kontroll siRNA-behandelten Zellen.

Im Umkehrschluss bedeutet die Anwesenheit von EGLN3 eine Stabilisierung von ChREBP, wie bereits schon in der Co-IP von EGLN3 und ChREBP vermutet wurde, siehe Kapitel 3.2.1.1.



**Abbildung 24: Depletion von EGLN3 in primären Hepatozyten führt zur Reduktion von ChREBP.** Western Blot des Proteins ChREBP in primären Hepatozyten nach Behandlung mit siRNA. Die unspezifische Bande diente als Ladekontrolle.

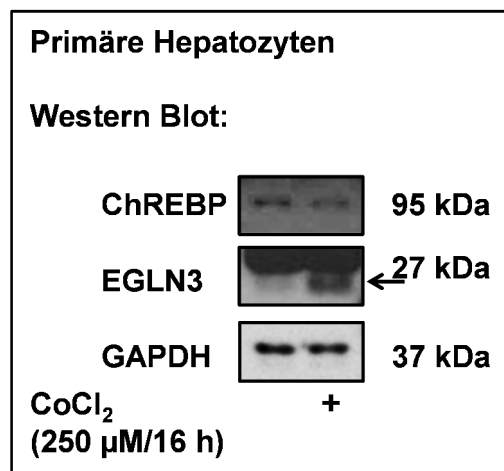
### 3.4.2 Einfluss einer EGLN3-Hemmung auf ChREBP

Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob eine Inaktivierung von EGLN3 ausreicht, um dieselben Effekte auf ChREBP zu erzielen. Dafür wurde EGLN3 in primären Hepatozyten durch  $\text{CoCl}_2$  gehemmt. Dabei war jedoch zu berücksichtigen, dass die Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$  unspezifisch alle EGLN-Isoformen inaktiviert. Die Ergebnisse in Abbildung 25 zeigen, dass durch  $\text{CoCl}_2$  eine Induktion von EGLN3 als HIF1 $\alpha$ -Zielgen ausgelöst wurde. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung war die Proteinmenge von EGLN3 stark erhöht. Dieses EGLN3 war jedoch durch die kompetitive Hemmung mittels  $\text{CoCl}_2$  enzymatisch nicht aktiv. Auch hier konnte eine Reduktion von ChREBP-Protein beobachtet werden, die vergleichbar ist mit dem gezeigten Effekt bei EGLN3-Depletion (siehe Kapitel 3.4.1).

Daraus lässt sich schließen, dass bereits eine Hemmung der enzymatischen Aktivität von EGLN3 ausreicht, um ChREBP zu reduzieren. Die vermutete Stabilisierung von ChREBP durch EGLN3 bedarf also eines funktionsfähigen Enzyms.

Diese Ergebnisse stimmen mit dem Resultat der Co-IP aus primären Hepatozyten überein (siehe Kapitel 3.2.3.1). Dort wurde gezeigt, dass bei Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$  endogenes

EGLN3 zwar an ChREBP binden kann, aber keine Stabilisierung des ChREBP-Proteins bewirkt.

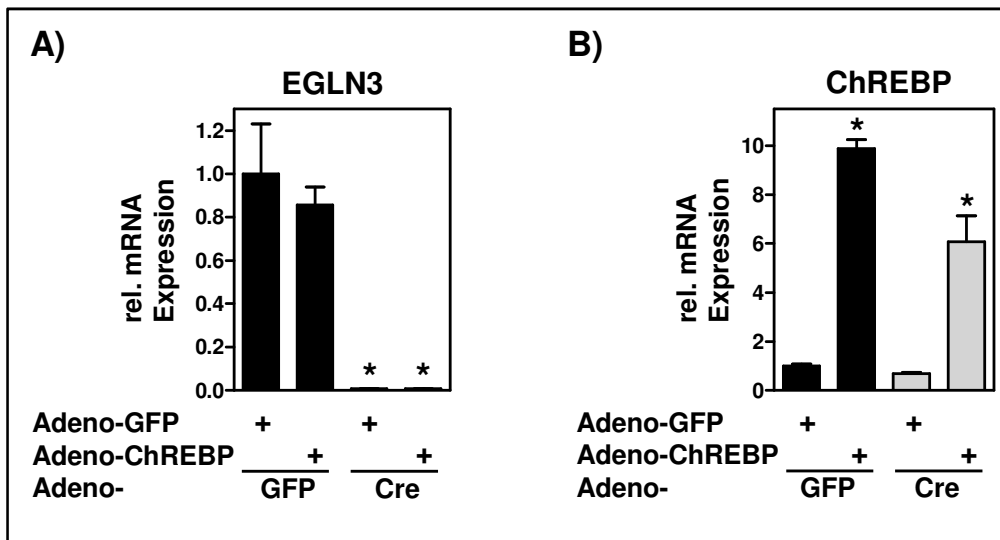


**Abbildung 25: Hemmung von EGLN3 in primären Hepatozyten führt zur Reduktion von ChREBP.** Western Blot des Proteins ChREBP in primären Hepatozyten mit und ohne CoCl<sub>2</sub>-Behandlung. GAPDH diente als Ladekontrolle.

### 3.5 Funktioneller Zusammenhang zwischen EGLN3 und ChREBP

Die bisherigen Daten zeigten, dass eine Depletion von EGLN3 oder eine Hemmung seiner enzymatischen Aktivität zu reduzierten ChREBP-Proteinmengen und reduzierter ChREBP-Zielgenexpression führten. Das nächste Experiment diente der Bestätigung eines funktionellen Zusammenhangs zwischen EGLN3 und ChREBP.

Dafür wurde in primären Hepatozyten aus Mäusen der Linie EGLN3 flox/flox durch Infektion mit Adeno-Cre EGLN3 deletiert. Die Kontrollzellen erhielten Adeno-GFP. Beide Gruppen wurden nochmals geteilt und zusätzlich mit Adeno-GFP bzw. Adeno-ChREBP infiziert. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR Analyse von EGLN3 und ChREBP. Mit der genutzten Methode konnte EGLN3 um >99% reduziert werden, siehe Abbildung 26A). Die Infektion mit Adeno-ChREBP führte zu einem etwa neunfachen Anstieg von ChREBP, siehe Abbildung 26B).

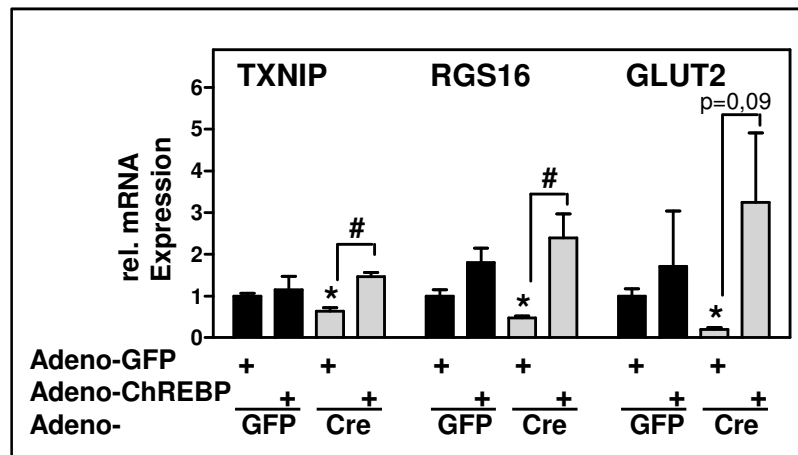


**Abbildung 26: Deletion von EGLN3 in primären Hepatozyten mit gleichzeitiger Überexpression von ChREBP.** qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von EGLN3 und ChREBP in primären Hepatozyten aus der Leber von EGLN3-gefloxten Mäusen. **A)** Deletion von EGLN3 durch Infektion mit Adeno-Cre bzw. Adeno-GFP als Kontrolle. **B)** Überexpression von ChREBP durch Infektion mit Adeno-ChREBP bzw. Adeno-GFP als Kontrolle. (\* $p < 0,05$  zur jeweiligen Adeno-GFP Kontrolle)

Aus denselben Ansätzen erfolgte die Messung ausgewählter ChREBP-Zielgene mittels qRT-PCR Analyse, die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Gezeigt ist die mRNA-Expression der bereits genannten Zielgene TXNIP, RGS16 und GLUT2. Wie erwartet führte die Deletion von EGLN3 durch Adeno-Cre (Gruppe Adeno-Cre mit Adeno-GFP) zu einer signifikanten Reduktion der untersuchten ChREBP-Zielgene im Vergleich zu den Kontrollzellen (Gruppe Adeno-GFP mit Adeno-GFP). In Zellen der GFP-Gruppe mit zusätzlicher ChREBP-Überexpression kam es zu einem Anstieg von ChREBP-Zielgenen, welcher jedoch nicht signifikant war. In Zellen der Cre-Gruppe wurde durch Zugabe von ektop-exprimiertem ChREBP der reduzierende Effekt der EGLN3-Deletion auf die ChREBP-Zielgene vollständig wieder aufgehoben.

Durch diese beobachtete „Wiederherstellung“ konnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen EGLN3 und ChREBP untermauert werden: die Herunterregulation von ChREBP-Zielgenen nach EGLN3-Depletion ist tatsächlich durch ChREBP vermittelt.





**Abbildung 27:** Der Effekt der Deletion von EGLN3, die reduzierte Expression von ChREBP-Zielgenen, wird durch ektope Zugabe von ChREBP vollständig aufgehoben. qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression ausgewählter ChREBP-Zielgene (TXNIP, RGS16, GLUT2) in primären Hepatozyten aus der Leber von EGLN3-gefloxten Mäusen. (\* $p < 0,05$  zur jeweiligen Adeno-GFP Kontrolle aus der Adeno-GFP Gruppe, # $p < 0,05$  zur jeweiligen Adeno-GFP Kontrolle aus der Adeno-Cre Gruppe)

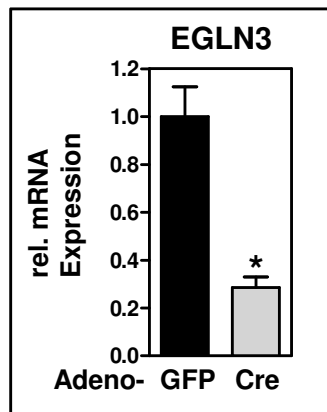
## 3.6 Untersuchung der ChREBP-Regulation in Mäusen

### 3.6.1 Deletion von EGLN3 in der Leber

Die in primären Hepatozyten durch eine reduzierte Expression von EGLN3 beobachtete Regulation von ChREBP-Protein und ChREBP-Zielgenen sollte nun auch in der Leber mit Hilfe eines Mausmodells untersucht werden. In Mäusen der Linie EGLN3 flox/flox wurde durch Schwanzveneninjektion von Adeno-Cre EGLN3 leberspezifisch deletiert.

In einem Vorversuch wurden dafür unterschiedliche Dosierungen von Adeno-Cre getestet und die Effizienz der EGLN3-Deletion anhand der mRNA-Expression überprüft. Die Kontrollgruppe erhielt in adäquater Dosierung Adeno-GFP. Die Expression von GFP-Protein in der Leber wurde nach der Organentnahme über Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Auch im Hauptversuch wurde die EGLN3-Deletion durch qRT-PCR Analyse der hepatischen mRNA-Expression validiert. Abbildung 28 zeigt eine Reduktion der EGLN3-Expression in der Leber um ca. 70% acht Tage nach der Virusinjektion. Im Vergleich zu den *in vitro* Experimenten war *in vivo* die Deletion von EGLN3 mittels Adeno-Cre weniger effizient. Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei Probengewinnung aus komplettem Lebergewebe nicht nur aus Hepatozyten, sondern auch aus Blut- und Stromazellen mRNA isoliert wird (siehe Kapitel 4.3.2).



**Abbildung 28: Deletion von EGLN3 in der Leber** durch Injektion von Adeno-Cre bzw. Adeno-GFP in EGLN3-gefloxte Mäuse. qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von EGLN3 in der Leber acht Tage nach der Virusinjektion. (n = 9 pro Gruppe, \*p<0,05 zur Adeno-GFP Kontrolle)

### 3.6.2 Metabolische Phänotypisierung nach EGLN3-Deletion

Im Verlauf des Hauptversuchs wurden verschiedene metabolische Kennwerte bestimmt, diese sind in Tabelle 22 dargestellt. Es erfolgte die Messung der Blutglukosewerte (*ad libitum* gefüttert und nüchtern), des Seruminsulinspiegels (nüchtern) sowie eine Dokumentation des Gewichtsverlustes (über den gesamten Versuchszeitraum) und der Futteraufnahme pro Maus pro 24 h. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede. Die im gefütterten Zustand der Tiere gemessenen Blutglukosewerte (*ad libitum* gefüttert) lassen bei Tieren mit reduzierter EGLN3-Expression (Gruppe Adeno-Cre) einen Abwärtstrend erkennen.

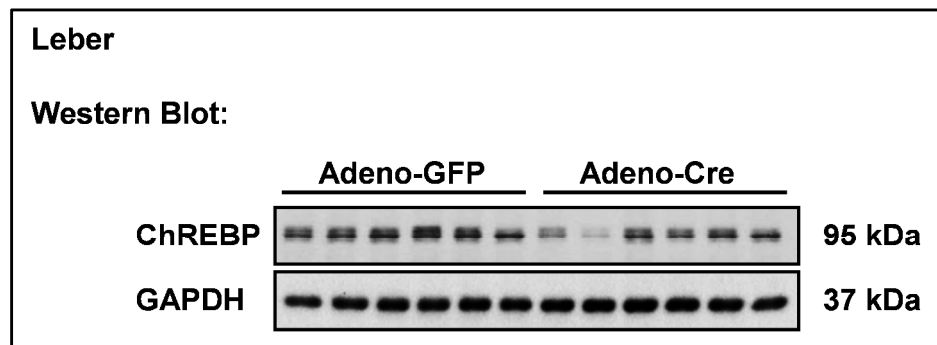
**Tabelle 22: Metabolische Kennwerte nach EGLN3-Deletion in der Leber.** Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. (Darstellung: MW ± SEM, n = 9 pro Gruppe)

Kennwert	Adeno-GFP	Adeno-Cre
Blutglukose, <i>ad libitum</i> gefüttert [mmol/l]	6,6 ± 0,4	5,7 ± 0,3
Blutglukose, nüchtern [mmol/l]	5,1 ± 0,2	4,7 ± 0,1
Seruminsulin, nüchtern [pmol/l]	106,6 ± 12,0	99,8 ± 5,2
Gewichtsverlust insgesamt [g]	1,62 ± 0,44	1,31 ± 0,29
Futteraufnahme pro Maus/24h [g]	3,00 ± 0,17	3,16 ± 0,23

### 3.6.3 Einfluss der EGLN3-Deletion auf ChREBP-Protein in der Leber

Um den Einfluss der EGLN3-Deletion auf die Proteinexpression von ChREBP zu untersuchen, wurde Gesamtproteinextrakt aus der Mausleber isoliert und im Western Blot analysiert. Es wurde die Expression von ChREBP acht Tage nach der Virusinjektion in den beiden

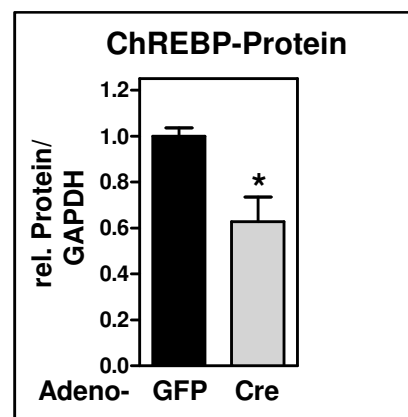
Versuchsgruppen verglichen. Diese ist auszugsweise in Abbildung 29 dargestellt. Pro Gruppe werden repräsentativ sechs Tiere gezeigt.



**Abbildung 29: Deletion von EGLN3 in der Leber führt zu reduzierter Expression von ChREBP-Protein.** Western Blot des Proteins ChREBP in der Leber acht Tage nach Injektion von Adeno-Cre bzw. Adeno-GFP in EGLN3-gefloxte Mäuse. Jede Bande repräsentiert Leberproteinextrakt aus einer Mausleber. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Für beide Bedingungen schwankte die Protein-Expression zwischen einzelnen Tieren stark. Deshalb wurde zusätzlich eine Quantifizierung der Banden mit Hilfe der Software „ImageJ“ durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 30 dargestellt. Für die im Western Blot gezeigten Tiere war die Expression von ChREBP durch EGLN3-Deletion signifikant reduziert.

Die *in vitro* durch reduzierte Expression von EGLN3 beobachtete Reduktion von ChREBP-Protein konnte somit auch *in vivo* in der Mausleber bestätigt werden.

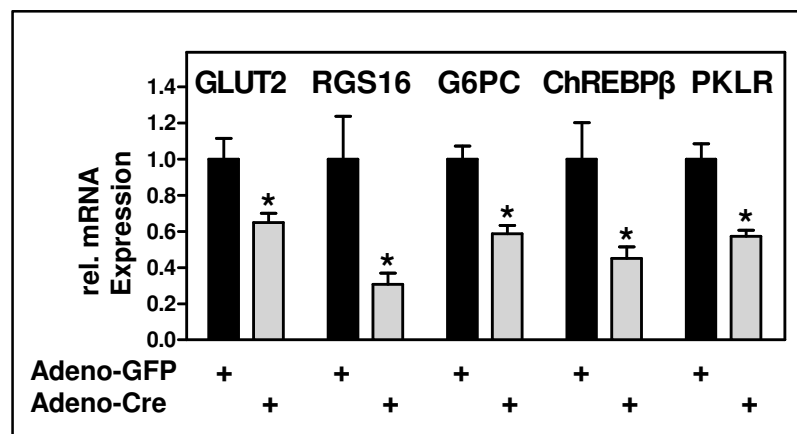


**Abbildung 30: Proteinquantifizierung von ChREBP.** Quantifizierung des Leberproteins aus dem Western Blot (Abbildung 29) und Normalisierung mittels GAPDH. (n = 6 pro Gruppe, \*p<0,05 zur Adeno-GFP Kontrolle)

### 3.6.4 Einfluss der EGLN3-Deletion auf ChREBP-Zielgene in der Leber

Basierend auf der Erkenntnis aus primären Hepatozyten wurde auch in der Mausleber der Einfluss von EGLN3 auf die Expression von ChREBP-Zielgenen untersucht. Die Messung ausgewählter ChREBP-Zielgene in der Leber acht Tage nach der Virusinjektion erfolgte mittels qRT-PCR Analyse. Neben den bereits mehrfach gemessenen Zielgenen GLUT2 und RGS16, wurde auch die Expression der Glucose-6-Phosphatase (G6PC), der ChREBP-Isoform beta (ChREBP $\beta$ ) und der Pyruvate kinase liver and red blood cell (PKLR) untersucht. Wie in Abbildung 31 dargestellt, konnte durch Reduktion von EGLN3 in der Leber eine signifikante Reduktion aller gemessenen ChREBP-Zielgene beobachtet werden.

Damit ließ sich *in vivo* die *in vitro* beobachtete Regulation von ChREBP-Zielgenen durch EGLN3 bestätigen. Auch in der Mausleber führte die reduzierte Expression von EGLN3 zu einer Herunterregulation von ChREBP-Zielgenen.



**Abbildung 31: Deletion von EGLN3 in der Leber führt zu reduzierter Expression von ChREBP-Zielgenen.** qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression ausgewählter ChREBP-Zielgene (GLUT2, RGS16, G6PC, ChREBP $\beta$ , PKLR) in der Leber acht Tage nach Injektion von Adeno-Cre bzw. Adeno-GFP in EGLN3-gefloxte Mäuse. (n = 9 pro Gruppe, \*p<0,05 zur jeweiligen Adeno-GFP Kontrolle)

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese geprüft werden, dass EGLN3 ein neuer Regulator der ChREBP-Aktivität ist. Als der Regulation zugrundeliegender Mechanismus wurde die Prolinhydroxylierung von ChREBP durch EGLN3 vermutet. Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten zeigen, dass eine physikalische Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3 besteht. Außerdem wurden im ChREBP-Protein hydroxylierte Prolinreste identifiziert und reduzierte EGLN3-Expression führte *in vitro* und *in vivo* zur Reduktion der Expression von ChREBP-Protein und ChREBP-Zielgenen.

### 4.1 Interaktion von ChREBP und EGLN3

#### 4.1.1 Interaktion von überexprimiertem Protein

Die ersten Experimente zur Identifikation einer physikalischen Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3 wurden mit überexprimiertem Protein in HEK-Zellen durchgeführt. Ein großer Vorteil der Überexpression beider potentieller Interaktionspartner ist die Erhöhung der Proteinmenge im Vergleich zu endogenem Protein. Zusätzlich kann ein besonders „markiertes“ Protein überexprimiert werden (Phizicky und Fields 1995, Berggard *et al.* 2007). In dieser Arbeit wurden Flag-markiertes ChREBP- bzw. EGLN3-Protein eingesetzt. Die Verwendung von Flag-Antikörpern zur Präzipitation des Flag-markierten Proteins ermöglichte eine sehr spezifische Bindung. Dabei kann eine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen weitgehend ausgeschlossen werden (Berggard *et al.* 2007).

Die Ergebnisse dieser Co-IPs zeigten eine robuste Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3. Mit Flag-markiertem ChREBP konnte EGLN3 als Co-Präzipitat angereichert werden (siehe Abbildung 13) und mit Flag-markiertem EGLN3 konnte ChREBP als Co-Präzipitat angereichert werden (siehe Abbildung 14). Für das letztgenannte Experiment bestätigte auch die Kontrolle mit dem empty-Vektor, dass ChREBP als Interaktionspartner nur in Anwesenheit von EGLN3 präzipitiert werden konnte. Damit war sichergestellt, dass der Antikörper nicht unspezifisch an den Interaktionspartner ChREBP bindet. Zudem diente die Detektion von sogenannten Referenzproteinen (housekeeping proteins), welche in Zellen konstitutiv exprimiert werden, als methodische Kontrolle, ob in der IP unspezifische nicht-gebundene Proteine vorhanden waren. In dieser Arbeit wurden hierfür die Referenzproteine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) und/oder beta-actin ( $\beta$ -ACTIN) untersucht. Die Detektion der Referenzproteine in den durchgeführten Co-IPs zeigte, dass kaum unspezifisches nicht-gebundenes Protein vorhanden war und bestätigte damit eine spezifische

Interaktion zwischen den jeweils untersuchten Interaktionspartnern. Eine weitere Möglichkeit, um auszuschließen, dass es sich bei einer Interaktion nur um eine unspezifische Bindung handelt bzw. um einen methodischen Fehler, wäre die Verwendung einer Negativ-Kontrolle. Dafür wird ein Protein eingesetzt, von dem bereits bekannt ist, dass es keine Bindung mit dem entsprechenden Interaktionspartner eingeht.

Nachteilig bei Co-IPs mit überexprimiertem Protein ist das Konzentrationsverhältnis der Interaktionspartner zueinander (Phizicky und Fields 1995). In den genannten Experimenten entsprach die Konzentration von ChREBP bzw. EGLN3 nicht dem relativen Verhältnis der Proteine in einer nicht-transfizierten Zelle. Es kann damit zu künstlichen Bindungseffekten kommen, außerdem kann auch der Zustand der posttranslationalen Modifikation der Proteine künstlich beeinflusst sein und eine Interaktion verhindern bzw. vortäuschen (Phizicky und Fields 1995). Dieser Aspekt ist für die Interaktion von ChREBP und EGLN3 von besonderer Bedeutung, da die Interaktion in engem Zusammenhang mit posttranslationaler Prolinhydroxylierung steht.

#### **4.1.2 Interaktion von endogenem Protein**

Für die Co-IPs mit endogenem Protein wurde in dieser Arbeit Protein aus primären Maushepatozyten sowie murinem Lebergewebe eingesetzt. In beiden Systemen wurde ChREBP als Antigen mit einem polyklonalen ChREBP-Antikörper präzipitiert. Der große Vorteil dieser Co-IPs mit endogenem Protein war, dass sowohl ChREBP als auch der vermutete Interaktionspartner EGLN3 im physiologischen Konzentrationsverhältnis der Zelle vorlagen und so typische posttranslationale Modifikationen aufwiesen. Damit lassen sich künstliche Effekte, wie bei der Überexpression, vermeiden (Berggard *et al.* 2007). Außerdem sind auch Interaktionen nachweisbar, die Teil umfangreicher Proteinkomplexe sind, die ansonsten *in vitro* nicht darstellbar wären. Darüber hinaus wird die Interaktion „im Umfeld aller konkurrierenden Proteine“ nachgewiesen und beinhaltet somit eine Art „interne Spezifitäts-Kontrolle“. Allerdings bedeuten in vielen Fällen Co-IPs mit endogenem Protein einen Verlust an Sensitivität durch die geringe Proteinmenge. Auch die Möglichkeit eine indirekte Interaktion nachzuweisen steigt an, da die Interaktionspartner Teil eines größeren Proteinkomplexes sein können (Phizicky und Fields 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion mit endogen-exprimiertem Protein in primären Hepatozyten (siehe Abbildung 19) und in Lebergewebe (siehe Abbildung 20) nachgewiesen. In der Co-IP aus primären Hepatozyten war die Anreicherung von ChREBP in der IP mittels ChREBP-Antikörper schwerer darstellbar als in den Co-IPs mit Flag-Antikörper. Wie bereits erwähnt ist die Präzipitation von Flag-markiertem Protein über den entsprechenden monoklonalen Antikörper spezifischer als die Bindung von endogenem ChREBP

über den verwendeten polyklonalen Antikörper. Zusätzlich erschwerten die geringen endogenen Proteinmengen und ein stärkerer Hintergrund die Detektion der Interaktion, was auch bei der Detektion von EGLN3 für die Co-IP aus Lebergewebe ersichtlich war. Durch eine Variation der verwendeten Antikörper, sowohl für die Präzipitation in der IP als auch für die Detektion im Western Blot, könnten eventuell noch eindeutigere Ergebnisse erzielt werden.

#### 4.1.3 Nachweis direkter Protein-Protein-Interaktion

Obwohl die Co-IP mit endogenem Protein inzwischen als Gold-Standard für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen gilt, muss das Ergebnis vorsichtig bewertet werden (Mackay *et al.* 2007). Zwar untermauerten die Ergebnisse mit endogenem Protein die Interaktion, die mit überexprimiertem Protein in beide Richtungen nachgewiesen wurde. Trotzdem weist eine Co-Immunopräzipitation immer sowohl direkte als auch indirekte Interaktionen nach (Mackay *et al.* 2007). Deshalb besteht die Möglichkeit, dass das positive Ergebnis durch einen weiteren Interaktionspartner zustande kam, der zwischen ChREBP und EGLN3 bindet und als Adapter fungiert. Die direkte Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3 sollte folglich über eine weitere Methode bestätigt werden.

Hierfür könnte in zukünftigen Experimenten die Glutathiontransferase Fusion Protein Pulldown Technik (GST-pulldown) eingesetzt werden. Über den GST-pulldown kann *in vitro* eine direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden. Dafür werden die Interaktionspartner in aufgereinigter, meist rekombinanter Form eingesetzt und einer der Interaktionspartner wird GST-markiert. Durch die hohe Affinität der GST für Glutathion kann dieses Protein über Glutathion-Beads immobilisiert werden. Findet eine direkte Bindung des Interaktionspartners statt, kann dieser ebenfalls angereichert werden (Sambrook und Russell 2006). Beispielsweise wurde die direkte Interaktion von EGLN3 mit Zielproteinen wie HCLK2 (Xie *et al.* 2012) oder PKM2 (Luo *et al.* 2011) mittels GST-pulldown nachgewiesen.

#### 4.1.4 Charakterisierung des Interaktionspartners EGLN3

Die Aminosäuren von EGLN3, die für die Bindung mit ChREBP benötigt werden, konnten in dieser Arbeit nicht eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 14). Eine Präzipitation von ChREBP durch die N-terminalen 116 Aminosäuren von EGLN3 war nicht möglich. Eine Präzipitation von ChREBP mit den C-terminalen 123 Aminosäuren von EGLN3 konnte gezeigt werden, war jedoch schwächer ausgeprägt als mit dem Protein in voller Länge. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass die beiden Fragmente wesentlich schwächer exprimiert waren als das vollständige EGLN3-Protein. Deshalb stand auch für die Co-IP weniger gebundenes Protein zur Verfügung. Das könnte erklären, warum mit dem

C-terminalen Fragment weniger ChREBP präzipitiert werden konnte. Da sich die katalytische Domäne von EGLN3 ebenfalls C-terminal befindet (McDonough *et al.* 2006, Villar *et al.* 2007), ist es schlüssig, dass dieses Fragment von EGLN3 mit ChREBP interagiert.

Auch für andere EGLN3-Zielproteine, zum Beispiel HCLK2, konnten Xie *et al.* (2012) nachweisen, dass die Interaktion nicht mit den Aminosäuren 1-116 von EGLN3 stattfindet. Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch Zielproteine von EGLN3 wie beispielsweise  $\beta$ 2-AR, die mit N-terminalen Aminosäuren von EGLN3 interagieren (Xie *et al.* 2009).

#### 4.1.5 Charakterisierung des Interaktionspartners ChREBP

Die Aminosäuren von ChREBP, die eine Interaktion mit EGLN3 erlauben, konnten in dieser Arbeit auf Aminosäure 239-864 eingegrenzt werden (siehe Abbildung 15). Die N-terminalen 238 Aminosäuren von ChREBP waren somit für die Interaktion nicht erforderlich. In diesem Bereich des ChREBP-Proteins liegt vor allem das funktionelle Element low-glucose inhibitory domain (LID), welches bei niedrigen Glukosekonzentrationen die Aktivität von ChREBP hemmt (Li *et al.* 2006). Es ist gut vorstellbar, dass dieses Element nicht an einer Interaktion mit EGLN3 beteiligt ist.

Bezüglich der Interaktion von EGLN3 und ChREBP stellt sich auch die Frage nach einem spezifischen Motiv im Zielprotein ChREBP. Für die Prolinhydroxylierung von HIF $\alpha$  durch EGLNs wurden zwei Prolinreste innerhalb eines spezifischen konservierten Motivs im HIF $\alpha$ -Protein identifiziert. Dieses Motiv beinhaltet die Sequenz LXXLAP. L steht hierbei für die Aminosäure Leucin, A für Alanin, X symbolisiert eine beliebige Aminosäure und P ist der von EGLNs hydroxylierte Prolinrest (Epstein *et al.* 2001). Inzwischen gibt es jedoch Studien, die zeigen, dass Mutationen im LXXLAP-Motiv die Prolinhydroxylierung von HIF $\alpha$  nicht verhindern. Damit scheint die einzig essentielle Aminosäure das zu hydroxylierende Prolin selbst zu sein (Huang *et al.* 2002). Für eine Reihe von Nicht-HIF-Zielgenen von EGLN3 konnten verschiedene Autoren ebenfalls nachweisen, dass für eine Prolinhydroxylierung durch EGLN3 das LXXLAP-Motiv nicht zwingend erforderlich ist (Xie *et al.* 2009, Luo *et al.* 2011, Xie *et al.* 2012). Auch im Protein ChREBP befindet sich kein LXXLAP-Motiv. Das schließt eine Prolinhydroxylierung jedoch keinesfalls aus, da aufgrund der oben genannten Erkenntnisse davon ausgegangen werden kann, dass die Sequenzabfolge LXXLAP keine Voraussetzung für die Prolinhydroxylierung durch EGLN3 ist.

#### 4.1.6 Interaktion von ChREBP und EGLN1

Die Untersuchung auf Interaktion von ChREBP mit den anderen EGLNs ergab, dass ChREBP ebenfalls mit EGLN1 interagieren kann (siehe Abbildung 18). Auffällig war jedoch, dass die



Interaktion schwächer ausgeprägt war als mit EGLN3, obwohl vergleichbare Proteinmengen der beiden EGLNs in der IP angereichert wurden. Mit der Isoform EGLN2 scheint ChREBP nicht zu interagieren. Interessanterweise zeigten Kikuchi *et al.* (2014) für das erst kürzlich identifizierte EGLN3-Zielprotein (PDH)-E1 $\beta$  ein übereinstimmendes Interaktionsmuster in Bezug auf die drei Isoformen.

Auch für das EGLN3-Zielprotein PKM2 konnte mittels Co-IP eine Interaktion mit EGLN1 und EGLN3, jedoch nicht mit EGLN2 nachgewiesen werden (Luo *et al.* 2011). Darüber hinaus zeigten die Autoren, dass weder der Knockdown noch die Überexpression von EGLN1 Einfluss auf die Prolinhydroxylierung von PKM2 hatten und bestätigten damit, dass die Regulation von PKM2 durch Prolinhydroxylierung spezifisch ist für EGLN3 (Luo *et al.* 2011).

In einem vergleichbaren Verfahren könnte so auch untersucht werden, ob EGLN3 und EGLN1 einen ähnlichen regulatorischen Einfluss auf die Prolinhydroxylierung von ChREBP haben oder ob sich eine Spezifität für EGLN3 darstellt.

## 4.2 Prolinhydroxylierung im ChREBP-Protein

### 4.2.1 Identifikation der Prolinhydroxylierung

Die Identifikation von EGLN3-Zielproteinen und der damit verbundene Nachweis der Prolinhydroxylierung bringen einige Schwierigkeiten mit sich. Vor allem die kleine Größe der Hydroxygruppe (ca. 16 Da) sowie deren ungeladener Zustand erschweren den Nachweis (Place und Domann 2013). Wiederum erleichtern andere Eigenschaften die Identifikation der Prolinhydroxylierung, zum Beispiel eine gewisse Stabilität der Modifikation, verbunden mit dem Fehlen bekannter Dehydroxylasen zu deren Reversion (Arsenault *et al.* 2014). Zur Identifikation von Prolinhydroxylierung sind verschiedene Methoden publiziert, wobei der Nachweis mittels Massenspektrometrie-Analyse am weitesten verbreitet ist (Place und Domann 2013). Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung von ChREBP auf Prolinhydroxylierung gewählt. Analysiert wurden Trypsin-verdaute Peptidfragmente von angereichertem, überexprimiertem bzw. endogenem ChREBP-Protein. Dabei konnten für überexprimiertes und endogenes ChREBP-Protein eine unterschiedliche Anzahl von Prolinresten als sicher bzw. potentiell prolinhydroxyliert nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3 und Abbildung 22). Bei sicher identifizierter Prolinhydroxylierung konnte die Art der Modifikation und teilweise auch die Position des hydroxylierten Prolins im Peptid sicher zugeordnet werden. Bei anderen Peptiden konnte aufgrund multipler Modifikationen keine genaue Abgrenzung der Prolinhydroxylierung und teilweise auch keine eindeutige Zuordnung der Position erreicht werden.

Die Schwierigkeit, die für manche Peptide bzw. Positionen keine sichere Aussage ermöglicht, liegt vor allem in der Ähnlichkeit der Prolinhydroxylierung mit anderen Modifikationen. Zum Beispiel die Oxidation der Aminosäure Methionin oder Modifikationen an Tryptophan und Cystein zeigen eine ähnliche Massenveränderung und lassen sich nur schwer von der Modifikation der Prolinhydroxylierung abgrenzen. Ein Lösungsansatz wäre die parallele Untersuchung einer Positivkontrolle. Als Positivkontrolle könnten radioaktiv-markierte synthetische Peptide dienen, welche Prolinhydroxylierung an den jeweils relevanten Positionen aufweisen. Die Ergebnisse aus der Massenspektrometrie würden dann als Vergleich für die experimentellen Daten dienen (Place und Domann 2013, Arsenault *et al.* 2014).

#### 4.2.2 Positionen der Prolinhydroxylierung

Von den 30 für ChREBP-Protein aus HEK-Zellen sicher oder potentiell nachgewiesenen Prolinhydroxylierungen liegen etwa zwei Drittel der Prolinpositionen in der proline-rich region des ChREBP-Proteins (siehe Abbildung 23). Diesem Element wird bereits eine Funktion für Protein-Protein-Interaktionen zugeschrieben (Yamashita *et al.* 2001). Für N- oder C-terminal gelegene Prolinreste im ChREBP-Protein wurde kaum Prolinhydroxylierung nachgewiesen. Diese Beobachtung stimmt auch mit den Ergebnissen aus der Co-IP von verkürztem ChREBP und EGLN3 überein (siehe Abbildung 15). Dort hatte sich gezeigt, dass die N-terminalen 238 Aminosäuren für die Interaktion von ChREBP und EGLN3 nicht notwendig sind.

Auch die Betrachtung der Konservierung der identifizierten Prolinreste erhöht die Wahrscheinlichkeit ihrer funktionellen Bedeutung. 25 der 30 nachgewiesenen, sicher oder potentiell hydroxylierten Prolinreste sind für Maus, Mensch und Ratte konserviert (siehe Abbildung 23).

Andere EGLN3-Zielproteine weisen ebenfalls eine hohe Konservierung der Prolinpositionen auf, die von EGLN3 hydroxyliert werden. Das gilt sowohl für das klassische Zielprotein HIF $\alpha$  (Epstein *et al.* 2001) als auch für neu identifizierte Nicht-HIF-Zielproteine wie zum Beispiel HCLK2 (Xie *et al.* 2012).

Mutationen an den entsprechenden Prolinpositionen im ChREBP-Protein könnten die Bedeutung der einzelnen Prolinreste für die EGLN3-vermittelte Hydroxylierung näher charakterisieren. Andere Autoren zeigten für EGLN3-Zielproteine, dass eine Mutation an den zu hydroxylierenden Prolinresten des Zielproteins die Interaktion mit EGLN3 reduziert oder aufhebt (Luo *et al.* 2014). Durch systematische Modifikation dieser Prolinreste und Überprüfen auf Interaktion könnten die Zielpositionen der EGLN3-vermittelten Hydroxylierung im ChREBP-Protein näher bestimmt werden.

### 4.2.3 Quantitativer Nachweis der Prolinhydroxylierung

Nach der durchgeführten Identifikation von Prolinhydroxylierung im ChREBP-Protein wäre der quantitative Nachweis der Prolinhydroxylierung ein nächster Untersuchungsschritt. Die EGLN3-vermittelte Prolinhydroxylierung von ChREBP müsste durch reduzierte bzw. erhöhte EGLN3-Aktivität dynamisch reguliert sein. In Folge von EGLN3-Überexpression wird eine Zunahme, in Folge von EGLN3-Knockdown wird eine Reduktion der Prolinhydroxylierung an ChREBP erwartet.

Für das EGLN3-Zielprotein  $\beta$ 2-AR wurden diese Untersuchungen ebenfalls mittels Massenspektrometrie durchgeführt und durch die Behandlung mit EGLN3 siRNA war die Prolinhydroxylierung an  $\beta$ 2-AR nahezu eliminiert (Xie *et al.* 2009). Für die Untersuchung von ChREBP ist jedoch zu berücksichtigen, dass die möglichen multiplen Modifikationen der Peptide eine quantitative massenspektrometrische Untersuchung vermutlich erschweren.

Eine weitere Nachweismethode für die Prolinhydroxylierung ist die Verwendung eines Hydroxyprolin-Antikörpers im Western Blot. Auch diese Methode wäre für die quantitative Untersuchung der Prolinhydroxylierung denkbar. Beispielsweise wurde die Prolinhydroxylierung von PKM2 mittels Detektion im Western Blot untersucht, allerdings nach Anreicherung des Proteins durch Immunopräzipitation (Luo *et al.* 2011).

## 4.3 Regulation von ChREBP durch EGLN3

Aus Vordaten zu dieser Arbeit war bereits bekannt, dass eine Depletion von EGLN3 in primären Hepatozyten zu einer Herunterregulation von ChREBP-Zielgenen führt. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine reduzierte EGLN3-Expression eine Verminderung der ChREBP-Proteinmenge zur Folge hat. Diese reduzierte Expression von ChREBP-Protein erklärt die Herunterregulation der ChREBP-Zielgene. Außerdem konnte die Reduktion von ChREBP-Protein und -Zielgenen infolge reduzierter EGLN3-Expression *in vivo* in der Mausleber bestätigt werden.

### 4.3.1 Einfluss auf ChREBP-Proteinexpression *in vitro* und *in vivo*

Die Untersuchung von ChREBP-Protein erfolgte durch Analyse von Gesamtzelllysat im Western Blot. Es wurden die Effekte von reduzierter EGLN3-Expression auf ChREBP-Protein *in vitro* und *in vivo* überprüft.

In den Experimenten mit primären Hepatozyten wurde EGLN3 durch Einsatz von siRNA depletiert. *In vivo* wurde EGLN3 in EGLN3-gefloxten Mäusen leberspezifisch durch Infektion

mit Adeno-Cre deletiert. Die Detektion von EGLN3 in primären Hepatozyten bestätigte die Depletion des Proteins in mit siRNA behandelten Zellen (siehe Abbildung 24). Diese Verifikation war mit dem genutzten Antikörper in der Mausleber nicht möglich. Es konnte, vermutlich aufgrund der geringen Proteinexpression oder durch eine Überlagerung mit unspezifischen Banden, EGLN3 in beiden Versuchsgruppen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Untersuchungen von ChREBP auf Proteinebene zeigten übereinstimmend eine Reduktion der ChREBP-Proteinmenge, jeweils im Vergleich zu Kontrollzellen bzw. -tieren (siehe Abbildung 24, 29 und 30).

Unter der Annahme, dass ChREBP durch EGLN3 prolinhydroxyliert wird, bedeutet eine Reduktion von EGLN3 weniger Prolinhydroxylierung an ChREBP. Die Untersuchungen von ChREBP auf Proteinebene zeigten, dass damit die Menge des exprimierten Proteins abnimmt. Ursache hierfür könnte ein Verlust der Proteinestabilität beispielsweise durch gesteigerte Degradation von nicht-hydroxyliertem ChREBP-Protein sein.

Experimente in primären Hepatozyten mit EGLN3-Hemmung durch  $\text{CoCl}_2$  bestätigten diesen Mechanismus. Auch bei vorhandenem EGLN3-Protein, welches jedoch in inaktiver Form vorlag, nahm die Menge des exprimierten ChREBP-Proteins ab (siehe Abbildung 25). Der Verlust der enzymatischen Aktivität und infolgedessen die reduzierte Prolinhydroxylierung an ChREBP bewirkten also eine Dezimierung der ChREBP-Proteinmenge.

Interessanterweise war die physikalische Interaktion von ChREBP und EGLN3 durch eine Hemmung von EGLN3 nicht beeinflusst (siehe Abbildung 19). Diese Interaktion von inaktivem EGLN3 mit seinem Zielprotein, welches eigentlich durch EGLN3 hydroxyliert wird, war unerwartet, wurde jedoch auch für andere Zielproteine von EGLN3 bereits beobachtet (Xie *et al.* 2012).

In der Konsequenz der gezeigten Regulation müsste eine gesteigerte Prolinhydroxylierung an ChREBP, zum Beispiel durch EGLN3-Überexpression, eine Stabilisierung des ChREBP-Proteins bedeuten. Zur Überprüfung dessen wären Experimente mit EGLN3-Überexpression *in vitro* und *in vivo* und darauffolgende Untersuchungen der ChREBP-Proteinexpression geeignet. Einen Hinweis für eine solche Regulation lieferte bereits die Co-IP mit Überexpression von ChREBP und EGLN3 in HEK-Zellen (siehe Abbildung 13). Bei Überexpression beider Interaktionspartner war mehr ChREBP-Protein zu detektieren als bei Zellen mit ChREBP-Überexpression und nur endogen-exprimiertem EGLN3.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Betrachtung von ChREBP-Protein ist die mit der Aktivierung und Regulation verbundene Translokation in den Zellkern. Es wurde bereits nachgewiesen, dass posttranslationale Modifikationen in Form von Phosphorylierung/Dephosphorylierung einen großen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von ChREBP

haben (Kawaguchi *et al.* 2001). Daher ist gut vorstellbar, dass auch die Modifikation der Prolinhydroxylierung die Lokalisation von ChREBP beeinflusst. Da EGLN3 sowohl zytoplasmisch als auch nukleär exprimiert wird (Metzen *et al.* 2003), kann die Prolinhydroxylierung in beiden Kompartimenten eine Rolle spielen. Eine Steigerung der Zielgenexpression von ChREBP durch Prolinhydroxylierung könnte entweder durch eine erhöhte nukleäre Lokalisation oder eine erhöhte transkriptionelle Aktivität vermittelt sein. Für die Reduktion der Zielgenexpression durch vermutlich verminderte Prolinhydroxylierung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Gesamtproteinmenge für ChREBP reduziert ist. Es ist anzunehmen, dass vor allem die nukleäre Proteinfraction von ChREBP in diesem Fall vermindert ist. Ursachen könnten beispielsweise gesteigerte Degradation und/oder erhöhte Translokation ins Zytosol sein. Eine alleinige Sequestrierung des nicht-hydroxylierten ChREBP-Proteins im Zytosol scheint nicht die Ursache zu sein, da die Gesamtproteinmenge dabei gleich bleiben würde. Eine wichtige Untersuchungsmethode zur Aufklärung dieser Fragestellungen wäre die Analyse subzellulärer Proteinfractionen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

#### **4.3.2 Einfluss auf ChREBP-Zielgenexpression *in vitro* und *in vivo***

Die Analyse der ChREBP-Zielgenexpression erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR und umfasste die Zielgene GLUT2, PKLR, FASN, SCD1, ChREBP $\beta$ , TXNIP, RGS16, G6PC oder eine Auswahl daraus.

Die Beobachtung, dass reduzierte EGLN3-Expression in primären Hepatozyten die Herunterregulation von ChREBP-Zielgenen bewirkt, war dieser Arbeit bereits vorangestellt (siehe Kapitel 1.5.1). Die genannte Regulation konnte auch in primären Hepatozyten mit gefloxtem EGLN3 gezeigt werden, in denen EGLN3 durch die Infektion mit Adeno-Cre deletiert war. Gleichzeitig konnte in diesem Experiment der Effekt durch ektope Zugabe von ChREBP, ebenfalls mittels Adenovirusinfektion, vollständig aufgehoben werden (siehe Abbildung 26 und 27). Dieses Ergebnis unterstützte den funktionellen Zusammenhang zwischen ChREBP und EGLN3 und bestätigte, dass die Herunterregulation von ChREBP-Zielgenen nach EGLN3-Depletion tatsächlich durch ChREBP vermittelt ist.

Außerdem erfolgte die Analyse der ChREBP-Zielgenexpression *in vivo* in der Leber. Das untersuchte Lebergewebe stammte von EGLN3-gefloxtten Mäusen, in denen durch Adenovirusinjektion leberspezifisch Cre exprimiert war und zu einer Deletion von EGLN3 führte. Die Messung erfolgte acht Tage nach Virusinjektion. Die mRNA-Expression von EGLN3 war im Vergleich zur Kontrollgruppe um ca. 70% reduziert (siehe Abbildung 28). Die Deletion war somit weniger effektiv als in isolierten primären Hepatozyten. Eine Erklärung dafür ist, dass die Adenoviren möglicherweise nicht alle Hepatozyten infizierten und infolgedessen Zellen existierten, die kein Cre und dementsprechend weiterhin EGLN3 exprimierten.

Außerdem wurde die mRNA aus vollständigem Lebergewebe, inklusive aller Stromazellen und auch Blutzellen, isoliert. Es ist anzunehmen, dass diese Zelltypen von der Adenovirusinfektion und EGLN3-Deletion weniger stark betroffen sind.

Der Effekt der reduzierten EGLN3-Expression auf ChREBP-Zielgene war eindeutig. Die ChREBP-Zielgenexpression der Cre-Tiere war signifikant geringer als die der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 31).

### 4.3.3 Einfluss auf Glukose- und Fettstoffwechsel *in vivo*

Die im Tierexperiment beobachteten Effekte einer reduzierten EGLN3-Expression waren reduzierte ChREBP-Protein- und -Zielgenexpression.

Um zu ermitteln ob diese Reduktion der ChREBP-Aktivität Auswirkungen auf die hepatische und/oder systemische Stoffwechsellaage hat, wurden auch einige metabolische Kennwerte im Tierversuch erfasst (siehe Tabelle 22). Für die gemessenen Kennwerte wie beispielsweise Blutglukose- und Seruminsulinwerte ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Für Tiere mit reduzierter EGLN3-Expression ließ sich bei der im gefütterten Zustand gemessenen Blutglukose (*ad libitum* gefüttert) ein leichter Abwärtstrend erkennen.

Bei der Interpretation der Daten sind zwei verschiedene Einflüsse auf den Stoffwechsel zu berücksichtigen. Zum einen gibt es Publikationen von leberspezifischem EGLN3-Knockout, die Auswirkungen auf metabolische Kennwerte beschreiben. Zum anderen liefern die zu erwartenden Auswirkungen reduzierter ChREBP-Funktion ebenfalls Anhaltspunkte für Veränderungen bezüglich der Stoffwechsellaage.

Für leberspezifischen EGLN3-Knockout in Mäusen beschreibt eine 2013 veröffentlichte Studie folgende metabolische Veränderungen im Vergleich zu Kontrolltieren: reduzierte Nüchternblutglukose- und Insulinwerte, reduzierte mRNA-Expression von Enzymen der Glukoneogenese wie Glucose-6-phosphatase (G6PC) und der Lipidsynthese wie Fatty acid synthase (FASN). Für den Triglyzeridgehalt der Leber ergab sich kein Unterschied zu den Kontrolltieren. Als Mechanismus dieser Regulation zeigten die Autoren eine Stabilisierung von HIF2 $\alpha$ -Protein, die über einen Anstieg von Insulin-Rezeptor-Substrat 2 und der Aktivierung der Proteinkinase B zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität führte (Taniguchi *et al.* 2013).

Die reduzierte ChREBP-Aktivität konnte im durchgeführten Tierexperiment anhand der reduzierten Proteinexpression von ChREBP und einer Herunterregulation der ChREBP-Zielgene gezeigt werden. Zu erwarten war, dass die verminderte Expression von G6PC zu einer Reduktion der Blutglukosewerte und zu einem erhöhten Glykogengehalt in der Leber führt. Die gemessenen Blutglukosewerte zeigten jedoch keine signifikante Reduktion und der

Glykogengehalt der Leber wurde nicht bestimmt. Auch Daten zu weiteren Kennwerten des (hepatischen) Fettstoffwechsels fehlen, die zusätzliche Einblicke in die ChREBP-Regulation durch EGLN3 geben könnten. In Frage kommen dafür Fettsäuresyntheserate der Leber, Triglyzeridgehalt in Leber und Plasma sowie freie Fettsäuren im Blut. Die verminderte ChREBP-Aktivität durch EGLN3-Deletion ließe eine Reduktion der genannten Kennwerte erwarten. Diese Erwartungen decken sich zum Großteil mit den beobachteten Effekten des oben genannten EGLN3-Knockouts in der Leber. Somit ist denkbar, dass die Effekte (auch) durch einen ChREBP-vermittelten Mechanismus ausgelöst werden.

Daten zu leberspezifischem ChREBP-Knockout in metabolisch gesunden Mäusen, als Vergleichswerte für die Auswirkungen reduzierter ChREBP-Aktivität in der Leber, sind bisher nicht veröffentlicht.

#### **4.4 Andere Effektoren von EGLN3**

Die Hydroxylierung von HIF $\alpha$ -Protein gilt bisher als die bedeutendste Funktion der Prolylhydroxylasen EGLN1-3 (Bruick und McKnight 2001, Epstein *et al.* 2001). Zu Beginn dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von EGLN3 jedoch nicht zu einer Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ -Protein und nicht zur Induktion von HIF1 $\alpha$ -Zielgenen führte (siehe Abbildung 11 und 12). Damit scheint der Effekt, dass in primären Hepatozyten eine Reduktion von EGLN3 zur Reduktion von ChREBP-Protein und -Zielgenexpression führt, nicht über HIF1 $\alpha$  vermittelt zu sein. Beweis für einen HIF1 $\alpha$ -unabhängigen Mechanismus wäre allerdings erst die Bestätigung der beobachteten Effekte in Zellen ohne HIF1 $\alpha$ .

Allerdings ist für EGLN3 bekannt, dass es vor allem für die Regulation von HIF2 $\alpha$  in Hypoxie verantwortlich ist (Appelhoff *et al.* 2004). Damit stellt sich die Frage nach einer möglichen Vermittlung durch HIF2 $\alpha$ . Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine HIF2 $\alpha$ -Aktivierung vorwiegend mit langanhaltender Hypoxie (48-72 h) in Verbindung gebracht wird (Koh und Powis 2012). Auch vor dem Hintergrund des von Taniguchi *et al.* (2013) veröffentlichten Mechanismus (siehe Kapitel 4.3.3) wären die hier gezeigten Effekte von EGLN3 auf ChREBP in weiterführenden Experimenten hinsichtlich einer Vermittlung durch HIF2 $\alpha$  zu prüfen.

## 4.5 Andere Regulatoren von ChREBP

### 4.5.1 Insulin, LXR und SREBP-1c

Die Umwandlung von Kohlenhydraten in Fettsäuren in der Leber über die De-Novo-Lipidsynthese wird durch nutritive Signale gesteuert. Als Antwort auf kohlenhydratreiche Nahrung regulieren zwei Stoffwechselwege synergistisch die Induktion glykolytischer und lipogener Gene. Dabei existiert ein „glukosevermittelter“ und ein „insulinvermittelter“ Signalweg (Denechaud *et al.* 2008).

Für die glukoseabhängige Komponente spielt ChREBP eine Hauptrolle. Glukose aktiviert ChREBP, was zur Induktion lipogener Zielgene wie zum Beispiel FASN und ACC1 führt (Denechaud *et al.* 2008).

Andererseits stimulieren hohe Glukosekonzentrationen im Blut die Sekretion von Insulin. Als wichtigste Mediatoren der insulinvermittelten Aktivierung lipogener Gene gelten Liver X receptor (LXR) und Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c). Insulin kann indirekt, über LXR und SREBP-1c, auch Einflüsse auf ChREBP ausüben (Denechaud *et al.* 2008, Filhoulaud *et al.* 2013).

LXR aktiviert sowohl direkt als auch indirekt, über SREBP-1c, insulinabhängig ebenfalls die Transkription von FASN und ACC1 (Tobin *et al.* 2002, Chen *et al.* 2004). ChREBP ist ein direktes Zielgen von LXR (Cha und Repa 2007) und wird zudem indirekt über SREBP-1c aktiviert, nämlich durch die über SREBP-1c vermittelte Induktion der Glukokinase (Foretz *et al.* 1999, Dentin *et al.* 2004). Interessanterweise konnte inzwischen gezeigt werden, dass LXR ebenfalls durch Glukose aktiviert wird und somit auch zur Induktion von ChREBP als LXR-Zielgen führen kann (Mitro *et al.* 2007). Diese Mechanismen und Zusammenhänge sind bei der Untersuchung der ChREBP-Regulation bzw. bei der Beeinflussung der ChREBP-Aktivität als therapeutische Interventionsmöglichkeit (siehe Kapitel 4.6) zu berücksichtigen.

### 4.5.2 Retinol Saturase

Das Enzym Retinol saturase (RETSAT) reduziert, unter anderem in der Leber, Retinol zu 13,14-Dihydroretinol (Moise *et al.* 2004). Bisher unveröffentlichte Daten aus der Dissertation von Nicole Witte zeigen, dass RETSAT außerdem an der Regulation des Glukose- und Fettstoffwechsels in der Leber beteiligt ist (Witte 2015).

Interessanterweise führte die Depletion von RETSAT in Mäusen zu einer reduzierten, die Überexpression von RETSAT in HEK-Zellen zu einer erhöhten ChREBP-Expression. Diese Beobachtung ergab einen ersten Hinweis auf einen regulatorischen Zusammenhang zwischen RETSAT und ChREBP. Außerdem konnte nach RETSAT-Depletion eine



Reduktion der EGLN3-Expression beobachtet werden, sodass auch EGLN3 als Regulator mit einbezogen wurde. Zudem hatte die Depletion von EGLN3 in primären Hepatozyten eine Reduktion von ChREBP-Zielgenen zur Folge. Diese Daten waren Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit und sind in Kapitel 1.5.1 dargestellt. Insgesamt lässt sich aus diesen Beobachtungen ein möglicher regulatorischer RETSAT-EGLN3-ChREBP-Zusammenhang ableiten.

## **4.6 Beeinflussung der ChREBP-Aktivität als therapeutischer Ansatz**

Störungen im hepatischen Fettstoffwechsel stehen in engem Zusammenhang mit Erkrankungen wie hepatischer Steatose, Insulinresistenz, Diabetes Typ 2, Adipositas und metabolischem Syndrom (Cheung und Sanyal 2008, Denechaud *et al.* 2008, Ameer *et al.* 2014).

Die zentrale Rolle von ChREBP in der Regulation des hepatischen Glukose- und Fettstoffwechsels bietet einen Ansatzpunkt für therapeutische Interventionsmöglichkeiten. Dies setzt jedoch ein umfangreiches Verständnis für die Expression, Regulation und Funktion dieses Transkriptionsfaktors voraus. Die Identifikation von EGLN3 als möglichem Regulator von ChREBP bietet neue Perspektiven die ChREBP-Aktivität zu beeinflussen.

Die leberspezifische Hemmung von ChREBP in ob/ob-Mäusen zeigte bereits vielversprechende positive Auswirkungen auf metabolische Kennwerte (Dentin *et al.* 2006).

Damit könnte eine Reduzierung der ChREBP-Aktivität in der Leber, zum Beispiel durch pharmakologische EGLN3-Inhibierung, eine Behandlungsmöglichkeit für hepatische Steatose und damit assoziierten Erkrankungen darstellen.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### Untersuchung neuer Regulatoren der Glukose-stimulierten Genexpression

Das Protein Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) ist ein Glukose-stimulierter Transkriptionsfaktor und ein wichtiger Regulator des Glukose- und Fettstoffwechsels. Die höchste Expression von ChREBP findet sich in der Leber. Durch hohe Glukosekonzentrationen in der Zelle wird ChREBP, über die Translokation in den Zellkern, aktiviert und induziert die Expression glykolytischer und lipogener Zielgene. Dieser Arbeit vorausgehende Experimente in primären Maushepatozyten haben gezeigt, dass die Depletion der Prolyhydroxylase Egl-nine hypoxia-inducible factor 3 (EGLN3) zu einer reduzierten Expression von ChREBP-Zielgenen führt. EGLN3 ist eine von drei Isoformen einer Enzymfamilie, deren enzymatische Funktion darin besteht, Prolinreste bestimmter Zielproteine zu hydroxylieren. Daraus leitete sich die Hypothese ab, dass EGLN3 ein neuer Regulator der ChREBP-Aktivität ist und diese Regulation über Prolinhydroxylierung vermittelt wird.

Zunächst identifizierte die vorliegende Arbeit mittels Co-Immunopräzipitation eine physikalische Protein-Protein-Interaktion zwischen ChREBP und EGLN3. Diese Interaktion konnte gleichermaßen für überexprimiertes ChREBP und EGLN3 in HEK-Zellen, als auch für die endogenen Proteine in primären Hepatozyten und murinem Lebergewebe nachgewiesen werden. Anschließend zeigte eine massenspektrometrische Analyse verschiedene hydroxylierte Prolinreste in überexprimiertem und endogenem ChREBP-Protein. *In vitro* in primären Hepatozyten und *in vivo* in der Mausleber war die funktionelle Konsequenz einer verminderten EGLN3-Expression die reduzierte Expression von ChREBP-Protein und dessen Zielgenen. In primären Hepatozyten konnte der Effekt der EGLN3-Depletion, die reduzierte Expression von ChREBP-Zielgenen, durch Zugabe von ektop-exprimiertem ChREBP wieder aufgehoben werden. Diese Beobachtung bestätigte, dass die Herunterregulation von ChREBP-Zielgenen nach Depletion von EGLN3 tatsächlich durch ChREBP vermittelt ist.

Zusammenfassend hat die vorliegende Arbeit eine physikalische Interaktion zwischen den beiden Proteinen ChREBP und EGLN3 nachgewiesen und lässt eine Proteinmodifikation in Form von Prolinhydroxylierung von ChREBP durch EGLN3 vermuten. Die gewonnenen Erkenntnisse zur funktionellen Konsequenz dieser Beeinflussung deuten auf eine Stabilisierung und Aktivierung von ChREBP durch Prolinhydroxylierung hin. Es ist bekannt, dass eine gesteigerte Lipidsynthese in der Leber zu Erkrankungen wie hepatischer Steatose und Insulinresistenz führen kann. Eine Verminderung der ChREBP-induzierten hepatischen Lipidsynthese durch pharmakologische EGLN3-Inhibierung könnte eine neue therapeutische Interventionsmöglichkeit für diese Erkrankungen darstellen.



## 6 SUMMARY

### **Investigation of new regulators of glucose-induced gene expression**

The carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) is a glucose-stimulated transcription factor that regulates carbohydrate and lipid metabolism. The highest expression of ChREBP can be found in the liver. High cellular glucose concentrations initiate translocation of ChREBP into the nucleus, where it binds to DNA and induces the expression of glycolytic and lipogenic target genes. Previous experiments using primary murine hepatocytes showed that depletion of the prolyl hydroxylase egl-nine hypoxia-inducible factor 3 (EGLN3) leads to a reduced expression of ChREBP target genes. EGLN3 is one isoform of an enzyme family that hydroxylates proline residues of certain target proteins. Hence it is hypothesized that EGLN3 is a novel regulator of ChREBP activity and that this regulatory function is mediated through proline hydroxylation.

The present study identified a physical protein-protein interaction between ChREBP and EGLN3 by using co-immunoprecipitation. This interaction was verified for both over-expressed ChREBP and EGLN3 in HEK cells as well as endogenous protein levels in primary hepatocytes and murine liver tissue. A subsequent mass spectrometric analysis revealed different hydroxylated proline residues in overexpressed and endogenous ChREBP protein. Experiments using primary hepatocytes *in vitro* and analysis of the mouse liver *in vivo* demonstrated that diminished EGLN3 expression led to a reduced expression of ChREBP protein and ChREBP target genes. The effect of EGLN3 depletion on the ChREBP target gene expression in primary hepatocytes was rescued by ectopic expression of ChREBP. This observation indicates that EGLN3 depletion-induced downregulation of ChREBP target genes is in fact mediated by ChREBP.

In summary, this study detected a physical interaction between ChREBP and EGLN3. Furthermore, these results suggest an EGLN3-mediated proline hydroxylation of ChREBP. These novel findings of ChREBP regulation indicate a stabilization and activation of ChREBP caused by proline hydroxylation. It is known that increased lipid synthesis in the liver can lead to diseases like hepatic steatosis and insulin resistance. Pharmacological EGLN3-inhibition could be used as a new therapeutic intervention in order to reduce ChREBP-induced hepatic lipid synthesis and treat these diseases.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Alemany, R. und D. T. Curiel (2001). "CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors." Gene Ther **8**(17): 1347-1353.

Alemany, R., K. Suzuki und D. T. Curiel (2000). "Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice." J Gen Virol **81**(Pt 11): 2605-2609.

Ameer, F., L. Scandiuzzi, S. Hasnain, H. Kalbacher und N. Zaidi (2014). "De novo lipogenesis in health and disease." Metabolism **63**(7): 895-902.

Appelhoff, R. J., Y. M. Tian, R. R. Raval, H. Turley, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe und J. M. Gleadle (2004). "Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor." J Biol Chem **279**(37): 38458-38465.

Arden, C., S. J. Tudhope, J. L. Petrie, Z. H. Al-Oanzi, K. S. Cullen, A. J. Lange, H. C. Towle und L. Agius (2012). "Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes." Biochem J **443**(1): 111-123.

Arsenault, P. R., K. J. Heaton-Johnson, L. S. Li, D. Song, V. S. Ferreira, N. Patel, S. R. Master und F. S. Lee (2014). "Identification of prolyl hydroxylation modifications in mammalian cell proteins." Proteomics: Epub ahead of print. PMID: 25421965. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/25421910.25421002/pmic.201400398/pdf>.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko und L. Stryer (2013). Biochemie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 7. Auflage, 1196, 9783827429889.

Berggard, T., S. Linse und P. James (2007). "Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions." Proteomics **7**(16): 2833-2842.

Bricambert, J., J. Miranda, F. Benhamed, J. Girard, C. Postic und R. Dentin (2010). "Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice." J Clin Invest **120**(12): 4316-4331.

Brown, T. A. (2007). Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage, 432, 9783827418302.

Bruick, R. K. und S. L. McKnight (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF." Science **294**(5545): 1337-1340.

Cairo, S., G. Merla, F. Urbinati, A. Ballabio und A. Reymond (2001). "WBSCR14, a gene mapping to the Williams-Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network." Hum Mol Genet **10**(6): 617-627.

- Cardinale, G. J., R. E. Rhoads und S. Udenfriend (1971). "Simultaneous incorporation of <sup>18</sup>O into succinate and hydroxyproline catalyzed by collagen proline hydroxylase." Biochem Biophys Res Commun **43**(3): 537-543.
- Cervera, A. M., N. Apostolova, F. Luna-Crespo, A. Sanjuan-Pla, R. Garcia-Bou und K. J. McCreath (2006). "An alternatively spliced transcript of the PHD3 gene retains prolyl hydroxylase activity." Cancer Lett **233**(1): 131-138.
- Cha-Molstad, H., G. Saxena, J. Chen und A. Shalev (2009). "Glucose-stimulated expression of Txnip is mediated by carbohydrate response element-binding protein, p300, and histone H4 acetylation in pancreatic beta cells." J Biol Chem **284**(25): 16898-16905.
- Cha, J. Y. und J. J. Repa (2007). "The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR." J Biol Chem **282**(1): 743-751.
- Chen, G., G. Liang, J. Ou, J. L. Goldstein und M. S. Brown (2004). "Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11245-11250.
- Chen, N., O. Rinner, D. Czernik, K. J. Nytko, D. Zheng, D. P. Stiehl, N. Zamboni, M. Gstaiger und C. Frei (2011). "The oxygen sensor PHD3 limits glycolysis under hypoxia via direct binding to pyruvate kinase." Cell Res **21**(6): 983-986.
- Cheung, O. und A. J. Sanyal (2008). "Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease." Semin Liver Dis **28**(4): 351-359.
- Davies, M. N., B. L. O'Callaghan und H. C. Towle (2008). "Glucose activates ChREBP by increasing its rate of nuclear entry and relieving repression of its transcriptional activity." J Biol Chem **283**(35): 24029-24038.
- de Luis, O., M. C. Valero und L. A. Jurado (2000). "WBSCR14, a putative transcription factor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterisation of the human gene and the mouse ortholog." Eur J Hum Genet **8**(3): 215-222.
- Demidenko, Z. N., A. Rapisarda, M. Garayoa, P. Giannakakou, G. Melillo und M. V. Blagosklonny (2005). "Accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha is limited by transcription-dependent depletion." Oncogene **24**(30): 4829-4838.
- Denechaud, P. D., R. Dentin, J. Girard und C. Postic (2008). "Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance." FEBS Lett **582**(1): 68-73.
- Dentin, R., F. Benhamed, I. Hainault, V. Fauveau, F. Foufelle, J. R. Dyck, J. Girard und C. Postic (2006). "Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice." Diabetes **55**(8): 2159-2170.



- Dentin, R., F. Benhamed, J. P. Pegorier, F. Foufelle, B. Viollet, S. Vaulont, J. Girard und C. Postic (2005). "Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation." J Clin Invest **115**(10): 2843-2854.
- Dentin, R., J. P. Pegorier, F. Benhamed, F. Foufelle, P. Ferre, V. Fauveau, M. A. Magnuson, J. Girard und C. Postic (2004). "Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression." J Biol Chem **279**(19): 20314-20326.
- Dentin, R., L. Tomas-Cobos, F. Foufelle, J. Leopold, J. Girard, C. Postic und P. Ferre (2012). "Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver." J Hepatol **56**(1): 199-209.
- Dunwoodie, S. L. (2009). "The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo." Dev Cell **17**(6): 755-773.
- Ebert, B. L., J. D. Firth und P. J. Ratcliffe (1995). "Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences." J Biol Chem **270**(49): 29083-29089.
- Eggert, C. und U. Fischer (2003). "RNA-Interferenz: Ein neues Werkzeug zur Analyse der Genfunktion." BIOSpektrum **9**(4): 372-374.
- Epstein, A. C., J. M. Gleadle, L. A. McNeill, K. S. Hewitson, J. O'Rourke, D. R. Mole, M. Mukherji, E. Metzen, M. I. Wilson, A. Dhanda, Y. M. Tian, N. Masson, D. L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, C. J. Schofield und P. J. Ratcliffe (2001). "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." Cell **107**(1): 43-54.
- Fechner, H., A. Haack, H. Wang, X. Wang, K. Eizema, M. Pauschinger, R. Schoemaker, R. Veghel, A. Houtsmuller, H. P. Schultheiss, J. Lamers und W. Poller (1999). "Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers." Gene Ther **6**(9): 1520-1535.
- Filhoulaud, G., S. Guilmeau, R. Dentin, J. Girard und C. Postic (2013). "Novel insights into ChREBP regulation and function." Trends Endocrinol Metab **24**(5): 257-268.
- Foretz, M., C. Guichard, P. Ferre und F. Foufelle (1999). "Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12737-12742.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos und G. L. Semenza (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." Mol Cell Biol **16**(9): 4604-4613.

- Fu, J., K. Menzies, R. S. Freeman und M. B. Taubman (2007). "EGLN3 prolyl hydroxylase regulates skeletal muscle differentiation and myogenin protein stability." J Biol Chem **282**(17): 12410-12418.
- Fukasawa, M., Q. Ge, R. M. Wynn, S. Ishii und K. Uyeda (2010). "Coordinate regulation/localization of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP) by two nuclear export signal sites: discovery of a new leucine-rich nuclear export signal site." Biochem Biophys Res Commun **391**(2): 1166-1169.
- Gauthier, K., C. Billon, M. Bissler, M. Beylot, J. M. Lobaccaro, J. M. Vanacker und J. Samarut (2010). "Thyroid hormone receptor beta (TRbeta) and liver X receptor (LXR) regulate carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) expression in a tissue-selective manner." J Biol Chem **285**(36): 28156-28163.
- Girard, J., P. Ferre und F. Foufelle (1997). "Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes." Annu Rev Nutr **17**: 325-352.
- Gorr, T. A. und J. Vogel (2015). "Western blotting re-visited: critical perusal of under-appreciated technical issues." Proteomics Clin Appl: Epub ahead of print. PMID: 25597284. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/25597210.25591002/prca.201400118/pdf>.
- Guinez, C., G. Filhoulaud, F. Rayah-Benhamed, S. Marmier, C. Dubuquoy, R. Dentin, M. Moldes, A. F. Burnol, X. Yang, T. Lefebvre, J. Girard und C. Postic (2011). "O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver." Diabetes **60**(5): 1399-1413.
- Havula, E. und V. Hietakangas (2012). "Glucose sensing by ChREBP/MondoA-Mlx transcription factors." Semin Cell Dev Biol **23**(6): 640-647.
- Herman, M. A., O. D. Peroni, J. Villoria, M. R. Schon, N. A. Abumrad, M. Bluher, S. Klein und B. B. Kahn (2012). "A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism." Nature **484**(7394): 333-338.
- Ho, V. T. und H. F. Bunn (1996). "Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein." Biochem Biophys Res Commun **223**(1): 175-180.
- Högel, H., K. Rantanen, T. Jokilehto, R. Grenman und P. M. Jaakkola (2011). "Prolyl hydroxylase PHD3 enhances the hypoxic survival and G1 to S transition of carcinoma cells." PLoS One **6**(11): e27112.
- Horn, F. (2012). Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium, Georg Thieme Verlag, 5. Auflage, 644, 9783131308856.

- Huang, J., Q. Zhao, S. M. Mooney und F. S. Lee (2002). "Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3." J Biol Chem **277**(42): 39792-39800.
- Iizuka, K. (2013). "Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism." Endocr J **60**(5): 543-555.
- Iizuka, K., R. K. Bruick, G. Liang, J. D. Horton und K. Uyeda (2004). "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7281-7286.
- Iizuka, K., B. Miller und K. Uyeda (2006). "Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(2): E358-364.
- Ishii, S., K. Iizuka, B. C. Miller und K. Uyeda (2004). "Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15597-15602.
- Ivan, M., K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane und W. G. Kaelin, Jr. (2001). "HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing." Science **292**(5516): 464-468.
- Jaakkola, P., D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh und P. J. Ratcliffe (2001). "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation." Science **292**(5516): 468-472.
- Jaakkola, P. M. und K. Rantanen (2013). "The regulation, localization, and functions of oxygen-sensing prolyl hydroxylase PHD3." Biol Chem **394**(4): 449-457.
- Kabashima, T., T. Kawaguchi, B. E. Wadzinski und K. Uyeda (2003). "Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5107-5112.
- Kallio, P. J., K. Okamoto, S. O'Brien, P. Carrero, Y. Makino, H. Tanaka und L. Poellinger (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**(22): 6573-6586.
- Kawaguchi, T., K. Osatomi, H. Yamashita, T. Kabashima und K. Uyeda (2002). "Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **277**(6): 3829-3835.

- Kawaguchi, T., M. Takenoshita, T. Kabashima und K. Uyeda (2001). "Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13710-13715.
- Kikuchi, D., Y. A. Minamishima und K. Nakayama (2014). "Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1beta and regulates the cellular PDH activity." Biochem Biophys Res Commun **451**(2): 288-294.
- Kiss, J., M. Mollenhauer, S. R. Walmsley, J. Kirchberg, P. Radhakrishnan, T. Niemietz, J. Dudda, G. Steinert, M. K. Whyte, P. Carmeliet, M. Mazzone, J. Weitz und M. Schneider (2012). "Loss of the oxygen sensor PHD3 enhances the innate immune response to abdominal sepsis." J Immunol **189**(4): 1955-1965.
- Knowles, H. J., R. R. Raval, A. L. Harris und P. J. Ratcliffe (2003). "Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells." Cancer Res **63**(8): 1764-1768.
- Koh, M. Y. und G. Powis (2012). "Passing the baton: the HIF switch." Trends Biochem Sci **37**(9): 364-372.
- Koivunen, P., P. Tiainen, J. Hyvarinen, K. E. Williams, R. Sormunen, S. J. Klaus, K. I. Kivirikko und J. Myllyharju (2007). "An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor alpha." J Biol Chem **282**(42): 30544-30552.
- Landazuri, M. O., A. Vara-Vega, M. Viton, Y. Cuevas und L. del Peso (2006). "Analysis of HIF-prolyl hydroxylases binding to substrates." Biochem Biophys Res Commun **351**(2): 313-320.
- Li, M. V., B. Chang, M. Imamura, N. Pongvarin und L. Chan (2006). "Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module." Diabetes **55**(5): 1179-1189.
- Li, M. V., W. Chen, N. Pongvarin, M. Imamura und L. Chan (2008). "Glucose-mediated transactivation of carbohydrate response element-binding protein requires cooperative actions from Mondo conserved regions and essential trans-acting factor 14-3-3." Mol Endocrinol **22**(7): 1658-1672.
- Lieb, M. E., K. Menzies, M. C. Moschella, R. Ni und M. B. Taubman (2002). "Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation." Biochem Cell Biol **80**(4): 421-426.
- Lipscomb, E. A., P. D. Sarmiere, R. J. Crowder und R. S. Freeman (1999). "Expression of the SM-20 gene promotes death in nerve growth factor-dependent sympathetic neurons." J Neurochem **73**(1): 429-432.

- Lipscomb, E. A., P. D. Sarmiere und R. S. Freeman (2001). "SM-20 is a novel mitochondrial protein that causes caspase-dependent cell death in nerve growth factor-dependent neurons." J Biol Chem **276**(7): 5085-5092.
- Luo, W., H. Hu, R. Chang, J. Zhong, M. Knabel, R. O'Meally, R. N. Cole, A. Pandey und G. L. Semenza (2011). "Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1." Cell **145**(5): 732-744.
- Luo, W., B. Lin, Y. Wang, J. Zhong, R. O'Meally, R. N. Cole, A. Pandey, A. Levchenko und G. L. Semenza (2014). "PHD3-mediated prolyl hydroxylation of nonmuscle actin impairs polymerization and cell motility." Mol Biol Cell **25**(18): 2788-2796.
- Ma, L., L. N. Robinson und H. C. Towle (2006). "ChREBP\*MLx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver." J Biol Chem **281**(39): 28721-28730.
- Ma, L., Y. Y. Sham, K. J. Walters und H. C. Towle (2007). "A critical role for the loop region of the basic helix-loop-helix/leucine zipper protein MLx in DNA binding and glucose-regulated transcription." Nucleic Acids Res **35**(1): 35-44.
- Ma, L., N. G. Tsatsos und H. C. Towle (2005). "Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes." J Biol Chem **280**(12): 12019-12027.
- Mackay, J. P., M. Sunde, J. A. Lowry, M. Crossley und J. M. Matthews (2007). "Protein interactions: is seeing believing?" Trends Biochem Sci **32**(12): 530-531.
- Maxwell, P. H. (2005). "A common pathway for genetic events leading to pheochromocytoma." Cancer Cell **8**(2): 91-93.
- McDonough, M. A., V. Li, E. Flashman, R. Chowdhury, C. Mohr, B. M. Lienard, J. Zondlo, N. J. Oldham, I. J. Clifton, J. Lewis, L. A. McNeill, R. J. Kurzeja, K. S. Hewitson, E. Yang, S. Jordan, R. S. Syed und C. J. Schofield (2006). "Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2)." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9814-9819.
- Merla, G., C. Howald, S. E. Antonarakis und A. Reymond (2004). "The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3." Hum Mol Genet **13**(14): 1505-1514.
- Metzen, E., U. Berchner-Pfannschmidt, P. Stengel, J. H. Marxsen, I. Stolze, M. Klinger, W. Q. Huang, C. Wotzlaw, T. Hellwig-Burgel, W. Jelkmann, H. Acker und J. Fandrey (2003). "Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing." J Cell Sci **116**(Pt 7): 1319-1326.
- Metzen, E., D. P. Stiehl, K. Doege, J. H. Marxsen, T. Hellwig-Burgel und W. Jelkmann (2005). "Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element." Biochem J **387**(Pt 3): 711-717.

- Minamishima, Y. A., J. Moslehi, R. F. Padera, R. T. Bronson, R. Liao und W. G. Kaelin, Jr. (2009). "A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo." Mol Cell Biol **29**(21): 5729-5741.
- Mitro, N., P. A. Mak, L. Vargas, C. Godio, E. Hampton, V. Molteni, A. Kreuzsch und E. Saez (2007). "The nuclear receptor LXR is a glucose sensor." Nature **445**(7124): 219-223.
- Moise, A. R., V. Kuksa, Y. Imanishi und K. Palczewski (2004). "Identification of all-trans-retinol:all-trans-13,14-dihydroretinol saturase." J Biol Chem **279**(48): 50230-50242.
- Mülhardt, C. (2013). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 7. Auflage, 298, 9783642346354.
- Myllyharju, J. (2003). "Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis." Matrix Biol **22**(1): 15-24.
- Myllylä, R., E. R. Kuutti-Savolainen und K. I. Kivirikko (1978). "The role of ascorbate in the prolyl hydroxylase reaction." Biochem Biophys Res Commun **83**(2): 441-448.
- Nakagawa, T., Q. Ge, R. Pawlosky, R. M. Wynn, R. L. Veech und K. Uyeda (2013). "Metabolite regulation of nucleo-cytosolic trafficking of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): role of ketone bodies." J Biol Chem **288**(39): 28358-28367.
- Nakayama, K., S. Gazdoui, R. Abraham, Z. Q. Pan und Z. Ronai (2007). "Hypoxia-induced assembly of prolyl hydroxylase PHD3 into complexes: implications for its activity and susceptibility for degradation by the E3 ligase Siah2." Biochem J **401**(1): 217-226.
- NCBI(1) (2015). National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bezeichnung und Synonyme für humanes ChREBP (Homo sapiens). Retrieved 13.01.2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51085>.
- NCBI(2) (2015). National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bezeichnung und Synonyme für PHD1-3 bzw. EGLN1-3 (Mus musculus). Retrieved 13.01.2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/112405>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/112406>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/112407>.
- Orban, P. C., D. Chui und J. D. Marth (1992). "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6861-6865.
- Page, E. L., D. A. Chan, A. J. Giaccia, M. Levine und D. E. Richard (2008). "Hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion." Mol Biol Cell **19**(1): 86-94.

- Park, M. J., D. I. Kim, S. K. Lim, J. H. Choi, H. J. Han, K. C. Yoon und S. H. Park (2014). "High glucose-induced O-GlcNAcylated carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) mediates mesangial cell lipogenesis and fibrosis: the possible role in the development of diabetic nephropathy." J Biol Chem **289**(19): 13519-13530.
- Pashkov, V., J. Huang, V. K. Parameswara, W. Kedzierski, D. M. Kurrasch, G. G. Tall, V. Esser, R. D. Gerard, K. Uyeda, H. C. Towle und T. M. Wilkie (2011). "Regulator of G protein signaling (RGS16) inhibits hepatic fatty acid oxidation in a carbohydrate response element-binding protein (ChREBP)-dependent manner." J Biol Chem **286**(17): 15116-15125.
- Pedersen, K. B., P. Zhang, C. Doumen, M. Charbonnet, D. Lu, C. B. Newgard, J. W. Haycock, A. J. Lange und D. K. Scott (2007). "The promoter for the gene encoding the catalytic subunit of rat glucose-6-phosphatase contains two distinct glucose-responsive regions." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(3): E788-801.
- Pescador, N., Y. Cuevas, S. Naranjo, M. Alcaide, D. Villar, M. O. Landazuri und L. Del Peso (2005). "Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene." Biochem J **390**(Pt 1): 189-197.
- Phizicky, E. M. und S. Fields (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." Microbiol Rev **59**(1): 94-123.
- Place, T. L. und F. E. Domann (2013). "Prolyl-hydroxylase 3: Evolving Roles for an Ancient Signaling Protein." Hypoxia (Auckl) **2013**(1): 13-17.
- Pober, B. R. (2010). "Williams-Beuren syndrome." N Engl J Med **362**(3): 239-252.
- Pollard, P. J., J. J. Briere, N. A. Alam, J. Barwell, E. Barclay, N. C. Wortham, T. Hunt, M. Mitchell, S. Olpin, S. J. Moat, I. P. Hargreaves, S. J. Heales, Y. L. Chung, J. R. Griffiths, A. Dalglish, J. A. McGrath, M. J. Gleeson, S. V. Hodgson, R. Poulson, P. Rustin und I. P. Tomlinson (2005). "Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations." Hum Mol Genet **14**(15): 2231-2239.
- Postic, C., R. Dentin und J. Girard (2004). "Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis." Diabetes Metab **30**(5): 398-408.
- Poupeau, A. und C. Postic (2011). "Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors." Biochim Biophys Acta **1812**(8): 995-1006.
- Prip-Buus, C., D. Perdureau, F. Foufelle, J. Maury, P. Ferre und J. Girard (1995). "Induction of fatty-acid-synthase gene expression by glucose in primary culture of rat hepatocytes. Dependency upon glucokinase activity." Eur J Biochem **230**(1): 309-315.
- Rehm, H. und T. Letzel (2010). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 6. Auflage, 390, 9783827423122.

- Rehner, G. und H. Daniel (2010). Biochemie der Ernährung, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 3. Auflage, 605, 9783827420411.
- Ren, G., C. K. Okerberg und S. T. Mathews (2012). "Ultrasensitive protein detection and imaging: comparison of Lumitein, ProteoSilver, SYPRO((R)) Ruby, and Coomassie ((R)) Brilliant Blue gel stains." Methods Mol Biol **869**: 621-632.
- Rolfs, A., I. Kvietikova, M. Gassmann und R. H. Wenger (1997). "Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1." J Biol Chem **272**(32): 20055-20062.
- Rui, L. (2014). "Energy metabolism in the liver." Compr Physiol **4**(1): 177-197.
- Sakiyama, H., N. Fujiwara, T. Noguchi, H. Eguchi, D. Yoshihara, K. Uyeda und K. Suzuki (2010). "The role of O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP." Biochem Biophys Res Commun **402**(4): 784-789.
- Sakiyama, H., R. M. Wynn, W. R. Lee, M. Fukasawa, H. Mizuguchi, K. H. Gardner, J. J. Repa und K. Uyeda (2008). "Regulation of nuclear import/export of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): interaction of an alpha-helix of ChREBP with the 14-3-3 proteins and regulation by phosphorylation." J Biol Chem **283**(36): 24899-24908.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2006). "Detection of Protein-Protein Interactions Using the GST Fusion Protein Pulldown Technique." CSH Protoc **2006**(1).
- Schofield, C. J. und P. J. Ratcliffe (2005). "Signalling hypoxia by HIF hydroxylases." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 617-626.
- Sechi, S. und B. T. Chait (1998). "Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification." Anal Chem **70**(24): 5150-5158.
- Semenza, G. L. (2009). "Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." Physiology (Bethesda) **24**: 97-106.
- Shayakhmetov, D. M., Z. Y. Li, S. Ni und A. Lieber (2004). "Analysis of adenovirus sequestration in the liver, transduction of hepatic cells, and innate toxicity after injection of fiber-modified vectors." J Virol **78**(10): 5368-5381.
- Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen und M. Mann (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." Nat Protoc **1**(6): 2856-2860.
- Shih, H. M., Z. Liu und H. C. Towle (1995). "Two CACGTG motifs with proper spacing dictate the carbohydrate regulation of hepatic gene transcription." J Biol Chem **270**(37): 21991-21997.



Sirek, A. S., L. Liu, M. Naples, K. Adeli, D. S. Ng und T. Jin (2009). "Insulin stimulates the expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) by attenuating the repressive effect of Pit-1, Oct-1/Oct-2, and Unc-86 homeodomain protein octamer transcription factor-1." Endocrinology **150**(8): 3483-3492.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson und D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.

Stoeckman, A. K., L. Ma und H. C. Towle (2004). "Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes." J Biol Chem **279**(15): 15662-15669.

Takeda, K., V. C. Ho, H. Takeda, L. J. Duan, A. Nagy und G. H. Fong (2006). "Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2." Mol Cell Biol **26**(22): 8336-8346.

Taniguchi, C. M., E. C. Finger, A. J. Krieg, C. Wu, A. N. Diep, E. L. LaGory, K. Wei, L. M. McGinnis, J. Yuan, C. J. Kuo und A. J. Giaccia (2013). "Cross-talk between hypoxia and insulin signaling through Phd3 regulates hepatic glucose and lipid metabolism and ameliorates diabetes." Nat Med **19**(10): 1325-1330.

Thompson, K. S. und H. C. Towle (1991). "Localization of the carbohydrate response element of the rat L-type pyruvate kinase gene." J Biol Chem **266**(14): 8679-8682.

Tobin, K. A., S. M. Ulven, G. U. Schuster, H. H. Steineger, S. M. Andresen, J. A. Gustafsson und H. I. Nebb (2002). "Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis." J Biol Chem **277**(12): 10691-10697.

Tsatsos, N. G., M. N. Davies, B. L. O'Callaghan und H. C. Towle (2008). "Identification and function of phosphorylation in the glucose-regulated transcription factor ChREBP." Biochem J **411**(2): 261-270.

Tuderman, L., R. Myllyla und K. I. Kivirikko (1977). "Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 1. Role of co-substrates." Eur J Biochem **80**(2): 341-348.

Uyeda, K. und J. J. Repa (2006). "Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis." Cell Metab **4**(2): 107-110.

Villar, D., A. Vara-Vega, M. O. Landazuri und L. Del Peso (2007). "Identification of a region on hypoxia-inducible-factor prolyl 4-hydroxylases that determines their specificity for the oxygen degradation domains." Biochem J **408**(2): 231-240.

Volpers, C. und S. Kochanek (2004). "Adenoviral vectors for gene transfer and therapy." J Gene Med **6 Suppl 1**: S164-171.

- Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue und G. L. Semenza (1995). "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**(12): 5510-5514.
- Wang, G. L. und G. L. Semenza (1993). "Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia." J Biol Chem **268**(29): 21513-21518.
- Wang, H. und C. B. Wollheim (2002). "ChREBP rather than USF2 regulates glucose stimulation of endogenous L-pyruvate kinase expression in insulin-secreting cells." J Biol Chem **277**(36): 32746-32752.
- Wiedemann, C., H. L. Schulz und B. H. F. Weber (2004). "Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung." BIOspektrum **10**(1): 99-102.
- Witte, N. (2015). Rolle der Retinol Saturase im hepatischen Glucose- und Fettstoffwechsel. Unveröffentlichte Dissertation. Institut für Pharmakologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin und Institut für Pharmazie des Fachbereichs Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin.
- Xie, L., X. Pi, A. Mishra, G. Fong, J. Peng und C. Patterson (2012). "PHD3-dependent hydroxylation of HCLK2 promotes the DNA damage response." J Clin Invest **122**(8): 2827-2836.
- Xie, L., K. Xiao, E. J. Whalen, M. T. Forrester, R. S. Freeman, G. Fong, S. P. Gygi, R. J. Lefkowitz und J. S. Stamler (2009). "Oxygen-regulated beta(2)-adrenergic receptor hydroxylation by EGLN3 and ubiquitylation by pVHL." Sci Signal **2**(78): ra33.
- Yamashita, H., M. Takenoshita, M. Sakurai, R. K. Bruick, W. J. Henzel, W. Shillinglaw, D. Arnot und K. Uyeda (2001). "A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9116-9121.
- Yu, F. X., T. F. Chai, H. He, T. Hagen und Y. Luo (2010). "Thioredoxin-interacting protein (Txnip) gene expression: sensing oxidative phosphorylation status and glycolytic rate." J Biol Chem **285**(33): 25822-25830.

## Ein herzliches Dankeschön ...

... an **Herrn Professor Jörg R. Aschenbach**, der durch seine Betreuung am Fachbereich meine externe Doktorarbeit ermöglicht hat. Danke für Ihre Zeit und Ihr Engagement, alle Anregungen, Ratschläge und hilfreichen Hinweise zur Organisation dieser Arbeit. Sie waren immer für meine Fragen erreichbar und das war eine tolle Unterstützung.

... an **Herrn Professor Michael Schupp** vom Institut für Pharmakologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin für die Möglichkeit, mit der Bearbeitung meines Projektes in seinem Labor wissenschaftliches Arbeiten kennen zu lernen. Danke, Michael, für deine großartige Betreuung: deine Zeit und Geduld, deine konstruktive Kritik sowie die zahlreichen Anregungen und Ideen. Danke für alle Unterstützung und Hilfe bei großen und kleinen Sorgen und Danke für deinen Optimismus. Du hast es mir leicht gemacht, mit Freude und Begeisterung an meiner Dissertation zu arbeiten.

... an meine Kollegin **Nicole Witte** für die Bereitstellung der in Abbildung vier gezeigten Daten. Danke für deine Kooperation und die Zustimmung zur Darstellung in dieser Arbeit.

... an **Dr. Ben Wielockx** und seine Arbeitsgruppe von der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden. Vielen Dank für die Bereitstellung und Genotypisierung der geflochtenen Mäuse, die Erfahrungsberichte, Hilfestellungen und eure freundliche Unterstützung.

... an **Heike Stephanowitz und Dr. Eberhard Krause** vom FMP Berlin für die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse. Danke für euer Mitdenken und Mitarbeiten, für eure Erfahrung und die vielen persönlichen Erklärungen am Telefon und per E-Mail.

... an **die Tierschutzbeauftragten und Tierpfleger** der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Danke für die fundierte Ausbildung zum Thema Versuchstierkunde, die ich sehr zu schätzen weiß. Die für mich „unbekannte“ Tierart Maus hat mich schnell fasziniert, ich konnte viel Neues dazulernen und hatte in euch immer kompetente Ansprechpartner für meine Fragen. Vielen Dank!

... an **alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Schupp**. Danke für die Offenheit, mit der ihr mich in euer Team aufgenommen habt und für eure Freundschaft. Danke für die ausgezeichnete Einarbeitung, alle Erklärungen und euren unermüdlichen Einsatz. Danke für alle Momente, in denen wir zusammen gearbeitet, gelacht, uns gefreut, gestaunt, diskutiert oder auch gerätselt haben :). Ich bin sehr dankbar für die wertvolle Zeit mit euch, ihr seid etwas ganz Besonderes!

... an alle **Mitarbeiter des CCR**, die mich unterstützt und begleitet haben. Es war schön euch kennen zu lernen und es hat viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten. Danke für eure unzähligen Ratschläge und eure große Hilfsbereitschaft.

... an die **Mitarbeiter der Veterinärmedizinischen Bibliothek**. Ihr habt mich bei vielen Fragen zur Literaturrecherche, Formatierung und praktischen Fertigstellung dieser Arbeit mit ganz viel Geduld und Energie betreut und unterstützt. Dankeschön!

... an meine **Familie und Freunde**. Es ist ein Geschenk euch zu haben. Danke für euer Dasein und Verständnis, euer Zuhören und Nachfragen. Danke für alle Gebete, E-Mails und Anrufe. Ihr alle habt mich während meines Studiums und der Promotion begleitet und ermutigt. Vielen Dank für eure moralische, tatkräftige und auch finanzielle Unterstützung, mit der ihr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen habt.

DANKKE

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, Miriam Knauer, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Untersuchung neuer Regulatoren der Glukose-stimulierten Genexpression“ selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 30.01.2015

Miriam Knauer