

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Translokation der Proteinsynthese unter Hypoxie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Josefin Ujvári
aus Cottbus

Datum der Promotion: 09. September 2016

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
ZUSAMMENFASSUNG	7
ABSTRACT	8
1. EINLEITUNG	9
1.1. SAUERSTOFF, DER ENERGIELIEFERANT	9
1.2. HYPOXIE	9
1.3. EXKURS EMBRYOGENESE	12
1.4. EXKURS TUMOR.....	12
1.5. PROTEINBIOSYNTHESE UNTER HYPOXIE	12
1.6. ZIELSTELLUNG.....	16
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. ZELLKULTUR	18
2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	18
2.2.1. FRAKTIONIERTER RNA-PRÄPARATION	18
2.2.2. ER-GEBUNDENE RNA-ISOLIERUNG MITTELS SIGMA KIT	19
2.2.3. GESAMT-ZELL-RNA-ISOLIERUNG	21
2.2.4. REVERSE TRANSKRIPTION (CDNA-SYNTHESE)	21
2.2.5. MRNA-QUANTIFIZIERUNG MITTELS REALTIME PCR	21
2.2.6. PROTEINPRÄPARATION	22
2.2.7. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....	22
2.2.8. WESTERN BLOTTING UND PROTEINQUANTIFIZIERUNG.....	23

2.3. GENEXPRESSIONSANALYSE MITTELS AFFYMETRIX GENECHIP® HUMAN GENE 1.0 ST ARRAYS	24
2.4. FUNCTIONAL ENRICHMENT ANALYSIS.....	26
2.5. STATISTIK	27
3. ERGEBNISSE.....	28
3.1. UNTERSUCHUNGEN ZUR GENEXPRESSION UND MRNA LOKALISATION UNTER HYPOXIE MITTELS KURZZEIT-LYSE PROTOKOLL	28
3.2. FRAKTIONIERUNG MITTELS ENDOPLASMIC RETICULUM ISOLATION KIT VON SIGMA®	32
3.3. GLOBALE BESTIMMUNG DER MRNA LOKALISATION UNTER HYPOXISCHEN BEDINGUNGEN.....	33
3.3.1. <i>Gruppen und Kriterien für die Datenanalyse</i>	33
3.3.2. <i>Verifizierung der Microarray Ergebnisse</i>	34
3.3.3. <i>Allgemeine Betrachtung der globalen Veränderung in Genexpression / mRNA-Lokalisation unter Hypoxie.....</i>	38
3.3.4. <i>Functional Enrichment Analysis.....</i>	39
3.3.4.1. <i>Gruppe induzierter Gene.....</i>	40
3.3.4.2. <i>Gruppe reprimierter Gene</i>	41
3.3.5. <i>Veränderung der Genexpression/ Lokalisation von non-coding RNAs unter Hypoxie</i>	43
4. DISKUSSION	46
5. LITERATURVERZEICHNIS	55
EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG.....	60
LEBENS LAUF	62
DANKSAGUNG	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. 1: Vereinfachte Darstellung der zellulären Anpassungsreaktionen unter Hypoxie	14
Abbildung 1. 2: Polysomengradientenanalyse	16
Abbildung 2. 1: Aufarbeitungsschema zur fraktionellen RNA-Isolation	20
Abbildung 3. 1: Gesamt-Konzentrationsveränderung und Lokalisation von Markerproteinen und spezifischen mRNAs	29
Abbildung 3. 2: Vergleich der mRNA-Konzentrationsänderung vs. Proteinkonzentrationsänderung zweier Hypoxie-induzierter Transkripte	31
Abbildung 3. 3: Western Blots	33
Abbildung 3. 4: Vergleich der mRNA-Konzentrationsänderung spezifischer Transkripte unter Hypoxie	36
Abbildung 3. 5: Vergleich der mRNA-Konzentrationsänderung spezifischer Transkripte unter Hypoxie	37
Abbildung 3. 6: VENN Diagramm	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2. 1: Liste der für die Realtime PCR eingesetzten Primer	22
Tabelle 3. 1: Liste von HIF-1α Zielgenen	34
Tabelle 3. 2: Pathway Enrichment Analysis induzierter Gene	41
Tabelle 3. 3: Pathway Enrichment Analysis reprimierter Gene	42
Tabelle 3. 4: miRNAs	44
Tabelle 3. 5: Zusammenfassung der Anzahl regulierter Gene unter Einbezug der non-coding RNAs	45

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Base)	h	Stunde (Zeiteinheit)
Aldoc	Aldolase C	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- -1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
AMPK	Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase	HIF	Hypoxia inducible factor
APS	Ammoniumpersulfat	HK2	Hexokinase 2
ATP	Adenosintriphosphat	HPRD	Human Protein Reference Database
BioGRID	Biological General Repository for Interaction Datasets	HRE	Hypoxia response element
BLID	BH3-like motif containing cell death inducer	HRP	Meerrettich-Peroxidase
C	Cytosin (Base)	HumanCyc	Encyclopedia of Homo sapiens Genes and Metabolism
CaCl ₂	Kalziumchlorid	IRES	Internal ribosome entry site
cDNA	zu mRNA komplementäre einzelsträngige DNA	KCl	Kaliumchlorid
CO	Kohlenmonoxid	kDa	kiloDalton (Masseneinheit)
COHb	Methämoglobin	KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
CO ₂	Kohlendioxid	mA	miliAmpere (Stromstärke)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	min	Minute (Zeiteinheit)
DTT	Dithiothreitol	MINT	Molecular INTERaction database
EGLN	siehe PHD	miR	Micro Ribonukleinsäure
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor	mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Nicht-SI-Einheit des Druckes; 1mmHg ≈ 133.322Pa)
ER	Endoplasmatisches Retikulum	mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
FC	Foldchange	mTOR	mammalian Target of Rapamycin
Fe	Eisen	NaOH	Natriumhydroxid
g	Guanin (Base)	NCI	National Cancer Institute
g	Erdbeschleunigung = 9,81 m/s ²	nm	Nanometer
g	Gramm (Masseneinheit)	nt	Nukleotide
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	O ₂	Sauerstoff

P4H	Prolyl-4-Hydroxylase	vs	versus
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
PDI	Proteindisulfidisomerase		
PHD	Prolylhydroxylase		
PMF	Post-Mitochondriale Fraktion		
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Protein		
Q	Glutamin		
qPCR	Realtime PCR		
rER	Raues ER		
RNase	Ribonuklease		
RNP	Ribonukleoprotein		
rpm	Umdrehungen pro Minute		
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure		
RT	Reverse Transkription		
SBCNY	Systems Biology Center New York		
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat		
SDS-	SDS-Polyacrylamid-		
PAGE	Gelelektrophorese		
sek	Sekunde (Zeiteinheit)		
SRP	signal response particle		
T	Thymin (Base)		
TEMED	Tetramethylethylendiamin		
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		
UTR	untranslatierte Region der mRNA		
V	Volt		
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor		

Zusammenfassung

Die mRNA Translation, bzw. Proteinbiosynthese, gehört zu den intrazellulären Prozessen mit dem höchsten Energieverbrauch. Kommt es aufgrund eines anhaltenden Sauerstoffmangels (Hypoxie) zu einem Energiemangel, ist die Hemmung der Translation ein wichtiger Mechanismus um den Energiehaushalt anzupassen. Eine Sub-Gruppe von mRNAs kann sich jedoch der allgemeinen Suppression, die vor allem über die Regulation der Translationsinitiation kontrolliert wird, entziehen. Gene dieser Gruppe kodieren für Proteine, die das Überleben unter Hypoxie sicherstellen. Bisher wurde die Veränderung der mRNA Translationsrate unter Hypoxie hauptsächlich mittels Polysomengradientenanalyse untersucht. Dabei betrachtet man aber nur die zytoplasmatischen Polysomen. Andere Proteinsyntheseorte wie das raue endoplasmatische Retikulum (ER) werden dabei nicht berücksichtigt.

Diese Arbeit untersucht die Rolle des ER für die aktive Proteinbiosynthese unter Hypoxie. Dazu wurden HT1080 Fibrosarkomzellen 36 h unter Kontrollbedingungen bzw. Hypoxie inkubiert. In individuellen als auch globalen Untersuchungen wurden die qualitative und quantitative mRNA Menge in Bezug auf ihre allgemeine Veränderung (Expression, Gesamtzellextrakte) sowie der mRNA Lokalisation am ER (ER-Extrakte) verglichen. Unter Hypoxie effektiv synthetisierte Gene, wie HIF-1 α , HK2 und P4H α (I), zeigten unter Sauerstoffmangel eine Transkriptanreicherung am ER unabhängig von der mRNA Konzentration im gesamten Fibroblasten. Ein Gegenbeispiel ist der Apoptosefaktor BLID, der zwar transkriptionell aktiviert wird, jedoch keine Anreicherung am ER unter Hypoxie zeigt. Bei der globalen Genexpressionsbetrachtung mittels Microarray Analyse waren Transkripte überlebenswichtiger Gene bevorzugt am ER lokalisiert. Es konnte eine signifikante ER-Anreicherung von Faktoren, die bspw. in Signalwegen wie der Glykolyse involviert sind, gezeigt werden. Insgesamt waren nur etwa 40% aller Transkripte, die verstärkt am ER lokalisiert waren, in ihrer Gesamtmenge erhöht, was auf eine hohe Selektivität der mRNA Translation am ER unter Hypoxie hinweist. Außerdem wurde eine Vielzahl von non-coding RNAs identifiziert, die ohne Steigerung ihrer Genexpression ans ER rekrutiert wurden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Art NeufORMATIERUNG der mRNA Translation am ER unter Hypoxie hin.

Die These, dass es unter Hypoxie zu einer Translokation der Proteinsynthese ans ER kommt, kann in dieser Arbeit bestätigt werden. Das raue endoplasmatische Retikulum, als der effektivere Ort für die Proteinsynthese unter Hypoxie, könnte dabei als eine Art regulierender Filter der zelltypspezifischen Adaptation an Hypoxie fungieren.

Abstract

Protein biosynthesis is one of the most energy consuming processes in cells. During hypoxia, suppression of translation is an important mechanism of cellular adaptation. A subgroup of mRNAs elude this general suppression by regulating translation initiation. Genes of this group encode for hypoxia survival proteins. To date, changes in mRNA translation during hypoxia have been mainly explored by polysomal gradient analysis, which takes into account only the cytoplasmic polysomes. Other locations of protein biosynthesis, for example, the endoplasmic reticulum (ER) are excluded.

This thesis examines the role of the ER as a site for preferred protein biosynthesis during hypoxia. For this purpose, HT1080 fibrosarcoma cells were incubated for 36 hours under hypoxia and control conditions. The changes in global gene expression were compared and correlated with changes at the ER. Under hypoxia, highly induced genes like HIF-1 α , HK2 and P4H α (I) showed mRNA enrichment at the ER that was not dependent on their gene expression levels. On the other hand, the apoptosis factor BLID that was transcriptionally activated during hypoxia was not enriched at the ER. Microarray analysis revealed that transcripts of hypoxia survival genes, including factors that are involved in the glycolysis pathway, are favored for translation at the ER. The high selectivity of the mRNAs translated at the ER during hypoxia is further emphasized by the fact that only 40% of the transcripts that are enriched at the ER also showed induced gene expression. Furthermore, a high amount of non-coding RNAs were identified that were recruited to the ER without changes in gene expression levels. These results indicate a preference for mRNA translation at the ER during hypoxia.

This thesis confirms that the site of protein biosynthesis is shifted to the ER during hypoxia. The rough endoplasmic reticulum is the more effective locus for translation under hypoxia and could function as a regulative filter for cell type specific adaptation to hypoxia.

1. Einleitung

1.1. Sauerstoff, der Energielieferant

Die komplexen Stoffwechselprozesse vieler prokaryotischer und fast aller eukaryotischer Organismen werden durch Energieäquivalente (Adenosintriphosphat, ATP) sichergestellt, die hauptsächlich durch oxidative Phosphorylierung in der inneren Mitochondrienmembran generiert werden. Die Effektivität dieser Art der Energiegewinnung ist abhängig von Sauerstoff (O_2). Bei Säugern, wie dem Menschen, wird der über die Atmung aufgenommene O_2 zunächst an Hämoglobin gebunden und über die Blutbahn zu den Zellen transportiert. Intrazellulär wird ca. 90% des aufgenommenen Sauerstoffs zur ATP-Synthese in den Mitochondrien als Elektronenakzeptor im Komplex IV der Atmungskette benötigt. Die restlichen 10% des intrazellulären Sauerstoffs werden durch enzymatische Reaktionen (bspw. Oxidasen, Hydroxylasen) verbraucht ¹.

Der Sauerstoffbedarf kann je nach Entwicklungszustand, Stoffwechselrate und Zell- bzw. Gewebetyp sehr unterschiedlich ausfallen. So betreiben neuronale Zellen einen primär oxidativen-, Monozyten / Makrophagen dagegen einen eher glykolytischen Stoffwechsel. Entsprechend unterschiedlich ist der Energiebedarf differenzierter Gewebe im adulten Organismus: Muskeln und Hirn verbrauchen unter Standard-Ruhebedingungen jeweils etwa 20% des aufgenommenen Sauerstoffs, gefolgt von der Leber (17%), dem Herzen (11%), dem Gastrointestinaltrakt (10%) oder der Niere (6%) ¹. Intrazellulär werden im Durchschnitt 25-30% der gewonnenen Energie unter Standard-Ruhebedingungen für die Proteinbiosynthese benötigt. Des Weiteren werden beispielsweise 19-28% der Energie in Form von ATP von Na^+/K^+ -ATPasen, 4-8% von Ca^{2+} -ATPasen und 7-10% in der Glukoneogenese verbraucht ².

Störungen in der Sauerstoffaufnahme, dem Transport, der Abgabe im Gewebe oder der zellulären Verwertung führen daher zu teilweise massiven Einschränkungen des Energiestoffwechsels.

1.2. Hypoxie

Ein Sauerstoffmangel (Hypoxie) kann nicht allgemein durch einen konkreten pO_2 definiert werden, da das Sauerstoffniveau im gesunden Körper ungleichmäßig verteilt ist. So sind Lungenepithelzellen einem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von ~ 100 mmHg ausgesetzt,

während Zellen in der Retina mit ~5 mmHg versorgt werden³. Hypoxie entsteht vielmehr dann, wenn Zellen ihren eigentlichen Sauerstoffbedarf nicht decken können, d.h. der Verbrauch höher ist als die Versorgungsrate⁴. Hypoxie wird unterschieden nach Dauer, Stärke und Form. Zeitlich gesehen, gibt es einen akuten und einen anhaltenden Mangel. Akute Hypoxie kann durch ein Umschalten der Zellen auf Glykolyse kurzfristig überbrückt werden. Wird Gewebe bzw. werden Zellen längerfristig nicht mit einer adäquaten Menge an Sauerstoff versorgt, kommt es zu einem „hierarchischen“ Herunterfahren bzw. Abschalten von einzelnen Zellen, Gewebe und letztendlich auch ganzen Systemen⁴. Gleichzeitig werden Prozesse wie Erythropoese und Angiogenese, die die Sauerstoffversorgung verbessern, induziert⁵.

Außerdem unterscheidet man bei den Ursachen einer Hypoxie in intermittierend, hypoxämisch, anämisch, ischämisch oder toxisch. Die intermittierende oder unterbrochene Hypoxie findet sich bei Krankheiten wie Hypopnoe oder Schlafapnoe wieder. Bei vermindertem Atmosphärendruck (bspw. Höhenlage) oder nicht ausreichender Lungenventilation (Lungenfibrose, Asthma bronchiale oder chronisch obstruktive Lungenerkrankung) entsteht eine hypoxämische Hypoxie, die durch verminderten arteriellen pO_2 gekennzeichnet ist. Anämische Hypoxie hat als Ursache beispielsweise einen Mangel an Hämoglobin oder Hämoglobin-Fehlbildungen (Bsp.: Sichelzellenanämie). Besteht ein unzureichendes Angebot an Sauerstoff für eine bestimmte Region (Gewebe), beispielsweise ausgelöst durch einen Gefäßverschluss, definiert das einen ischämischen Sauerstoffmangel. Vergiftungen bspw. durch Kohlenmonoxid (CO), welches sich an das Hämoglobin anlagert und Carboxyhämoglobin (COHb) bildet, das keinen Sauerstoff transportiert, oder Cyaniden (bspw. Blausäure), die durch irreversible Bindung an das zentrale Eisen(III)-Ion des Häm a_3 Kofaktors in der Cytochrom *c* Oxidase der Atmungskette die Sauerstoffverwertung blockieren, werden als toxische Hypoxie bezeichnet.

Die verschiedenen Typen der Hypoxie erfordern verschiedenste Formen der Sauerstoffwahrnehmung und Aktivierung adäquater Adaptionsmechanismen⁶⁻⁸. Veränderungen des arteriellen pO_2 werden mit hoher Sensitivität registriert und über die Atmung reguliert. Die Wahrnehmung erfolgt dabei hauptsächlich in spezialisierten Zellen: den peripheren Chemorezeptoren (Glomus caroticum, Glomera aortica). In den Glomuszellen werden spezielle, sauerstoffabhängige Kaliumkanäle exprimiert, deren Offenwahrscheinlichkeit bei abnehmenden pO_2 sinkt^{9, 10}. Daraus resultiert die Generierung eines exzitatorischen Potentials (Aktionspotential), was wiederum zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle führt. Der Kalziumeinstrom ist die Voraussetzung für die Neurotransmitterfreisetzung (hauptsächlich Dopamin und Noradrenalin), und somit für die nervale Signalweiterleitung in das kardio-

/ respiratorische Zentrum der Medulla oblongata, wo die Anpassung der Atemfrequenz und des Atemzugvolumens erfolgt ¹¹.

Ein veränderter pO_2 wird jedoch nicht nur von exzitatorischen Zellen wahrgenommen, sondern von allen Zellen – was sich primär durch die Aktivitätsveränderung sauerstoffabhängiger Enzyme und, sekundär, durch den veränderten Energiehaushalt erklärt. Kaliumkanäle, Mitochondrien, NAD(P)H Oxidasen und die HIF-Prolyl-Hydroxylasen (PHD1, -2, -3; alias EGLN2, -1, -3) werden als molekularer Sauerstoffsensoren diskutiert ^{4, 12, 13}. Eine herausragende Rolle spielen dabei die Prolylhydroxylasen. Ihre Aktivität ist abhängig von Sauerstoff, 2-Oxoglutarat, Eisen (Fe) und (sekundär) Ascorbinsäure (Vitamin C) ¹⁴. Letztere ist notwendig, um das Eisen in seiner biologisch aktiven Fe^{2+} Form zu halten. Bei einem verminderten Sauerstoffangebot verringert sich dementsprechend die Aktivität der PHDs, was zur Stabilisierung des *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) führt. HIF ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor. Er besteht aus einer α und einer β Untereinheit und gehört als Basic Helix-loop-helix (Bühl) Protein zur Familie der PAS (PER/ARNT/SIM) DNA Bindungsproteine ^{15, 16}. Es werden 3 verschiedene α Untereinheiten beschrieben. Dabei spielt HIF-1 α die entscheidendste Rolle unter Hypoxie. Bei normaler Sauerstoffversorgung (Normoxie) wird es durch PHD hydroxyliert. Das führt dazu, dass HIF-1 α von dem Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein (pVHL) gebunden wird, was nach Ubiquitylierung in einer anschließenden Proteolyse durch das 26S Proteasom endet. Unter Hypoxie wird die Hydroxylierung von HIF-1 α gehemmt und es kommt durch verringerten Abbau zur Anreicherung des Proteins im Zytosol. Die β Untereinheit (HIF- β), auch Aryl-Hydrogencarbonat Rezeptor Nuklear Translokator (ARNT) genannt, ist nicht Hypoxie-sensitiv, jedoch Teil des funktionell aktiven HIF-Komplexes. Die Transkriptionsrate von ~70 verifizierten Genen wird durch HIF gesteuert ¹⁷. Darüber hinaus ergaben Untersuchungen, dass HIF und Faktoren in der HIF-aktivierten Kaskade etwa 245 Gene in ihrer Synthese aktivieren und etwa 325 Gene deaktivieren ¹⁸. Die Regulation dieser Gene kontrolliert Prozesse wie die Zellproliferationsrate, die Hemmung / Aktivierung der Apoptose, die pH-Wert Regulation, die Angiogenese, die Kontrolle des Eisen-Haushalts, oder verschiedene Remodeling Prozesse der extrazellulären Matrix ¹⁹ und ist sowohl unter physiologischen Bedingungen (z.B. Embryogenese) als auch pathologischen Veränderungen (z.B. Tumore) essentiell.

1.3. Exkurs Embryogenese

In der Embryonalentwicklung nimmt die Komplexität der Gewebestrukturen immer mehr zu. Einfache Diffusion von Sauerstoff ist nicht mehr effizient genug. Anhaltende, ischämische Hypoxie ist die Folge²⁰. Der Sauerstoffpartialdruck im Embryo ist konstant hypoxämisch aufgrund des Diffusionsgradienten in der Plazenta zwischen maternalem und embryonalem Blut. Er beträgt rund 28 mmHg (3,6%) in den arteriellen, embryonalen Blutgefäßen, wohingegen der maternale arterielle pO₂ rund 80 mmHg (10-14%) beträgt. Außerdem bestehen graduelle, intraembryonale Unterschiede, was durch den Marker 2-Nitroimidazol (bindet intrazellulär an DNA und Proteine bei einer O₂-Konzentration unter 2%) gezeigt wurde²¹. Unter diesen Bedingungen sind Hypoxie-sensitive Signalwege aktiv. Die Bedeutung der HIF-aktivierten Signalwege wurde an HIF-1 α Knockout Mäusen demonstriert. Es verstarben alle Tiere intrauterin zwischen dem neunten und elften Schwangerschaftstag. Dabei kam es vor allem zu Defekten im Neuralrohr, in der Herzentwicklung und Angiogenese²². Das zeigt, welche entscheidende Rolle eine Aktivierung Hypoxie-sensitiver Kaskaden für die pränatale Entwicklung spielt.

1.4. Exkurs Tumor

Tumore sind aufgrund ihrer zumeist starken Proliferationsrate – und damit hohem Energieverbrauch - von einer guten Sauerstoffversorgung abhängig²³. Da die Gefäßeinsprossung in das Tumorgewebe jedoch auf der Basis der lokalen Hypoxie erfolgt und sich häufig auch nur undifferenzierte Gefäße entwickeln, sind viele Tumore durch eine permanente oder zyklische Hypoxie charakterisiert²⁴. Interessanterweise zeigen viele Tumore eine hohe Hypoxietoleranz, die mit einer verringerten Sensitivität gegenüber Radio- und Chemotherapie einhergeht²⁵. In einigen Nierenzellkarzinomen ist beispielsweise das von Hippel-Lindau Protein inaktiviert, was zu einer Stabilisierung von HIF auch unter normoxischen Bedingungen führt. Diese Nierenzellkarzinome weisen einen erhöhten Grad an Vaskularisation auf²⁶.

1.5. Proteinbiosynthese unter Hypoxie

Der Großteil zellulärer Prozesse wird durch Proteine katalysiert. Daher ist es für das Überleben der Zelle wichtig, unter Stress schnell die Syntheserate verschiedener Proteine zu regulieren. Die Menge an Protein kann auf mehreren Ebenen beeinflusst werden: Transkription

der prä-mRNA, Splicing, Export und Lokalisierung der mRNA, Translation, posttranslationale Modifikation und Proteindegradierung ²⁷. In einer hypoxischen Stresssituation werden verschiedenste Mechanismen aktiviert. Zum einen kommt es zur Synthese und Freisetzung von Signalmolekülen (z.B. Adenosin, VEGF [Vascular Endothelial Growth Factor], oder Endothelin-1; siehe Abbildung 1.1.). Hierdurch wird das umliegende Gewebe zur Aktivierung der Angiogenese, d.h. Gefäßeinsprossung in den hypoxischen Bereich und (Wieder-) Herstellung der Blut-/ Sauerstoffversorgung, angeregt. Dazu ist die Veränderung der Expressionsrate einer Vielzahl von Genen notwendig, wie es unter der bereits erwähnten HIF-Kaskade erfolgt.

Eine weitere Anpassungsstrategie ist die Inhibition energieverbrauchender Prozesse. Diese schnelle, einfache und effektive Form der Anpassung findet sich bereits in einfachen Lebensformen und wurde als „Unifying theory of hypoxia tolerance“ beschrieben ²⁸. Inhibiert wird vor allem der energetisch aufwendigste Prozess, die mRNA-Translation. Sie wird unter Hypoxie auf 5-40% gegenüber normoxischen Bedingungen herunterreguliert ²⁹. Diese Hemmung der mRNA Translation wird durch verschiedene Kinasen, die in engem Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel stehen (bspw. PERK [endoplasmatic reticulum-resident eIF2-alpha kinase], AMPK [AMP activated protein kinase] oder mTOR [mammalian target of rapamycin]), vermittelt, indem sie Translationsinitiations- und Elongationsfaktoren blockieren ³⁰ (siehe Abbildung 1.1.).

Durch die generelle Inhibition der mRNA Translation wird in der Zelle allerdings ein eher statischer Zustand erzeugt, der im Widerspruch zur aktiven und energieverbrauchenden Anpassung, d.h. der Neusynthese einer Vielzahl von Proteinen, steht. Untersuchungen unter Langzeit-Hypoxie (über 18 h) zeigen, dass die Proteinsyntheserate massiv eingeschränkt ist ^{2, 10}. Interessanterweise werden in dieser Phase der zellulären Anpassung hunderte Hypoxie-sensitiver Gene sehr effektiv exprimiert. Es muss demnach postuliert werden, dass Sub-Gruppen von mRNAs sich dieser allgemeinen Suppression der mRNA Translationsrate entziehen können. Solche posttranskriptionellen Regulationsmechanismen werden i.d.R. durch die Wechselwirkung von *cis*-Elementen mit *trans*-Faktoren (RNA-Bindungsproteine oder micro-RNAs) bestimmt. Die *cis*-regulativen Elemente sind dabei zumeist in den mRNA untranslatierten Regionen (UTRs) lokalisiert. Jede bekannte mRNA höherer Organismen besitzt eine 5'UTR (durchschnittliche Länge: 300 nt; Median: 240 nt) und eine 3'UTR (durchschnittliche Länge: 770 nt; Median: 400 nt) ³¹. Summarisch übertrifft die Länge der 5'- und 3'UTRs somit die der durchschnittlichen kodierenden Region. Die in den UTRs enthaltenden Informationen haben

dabei eine regulative Funktion bzgl. der mRNA Stabilität, mRNA Lokalisation und deren Translationsfähigkeit.

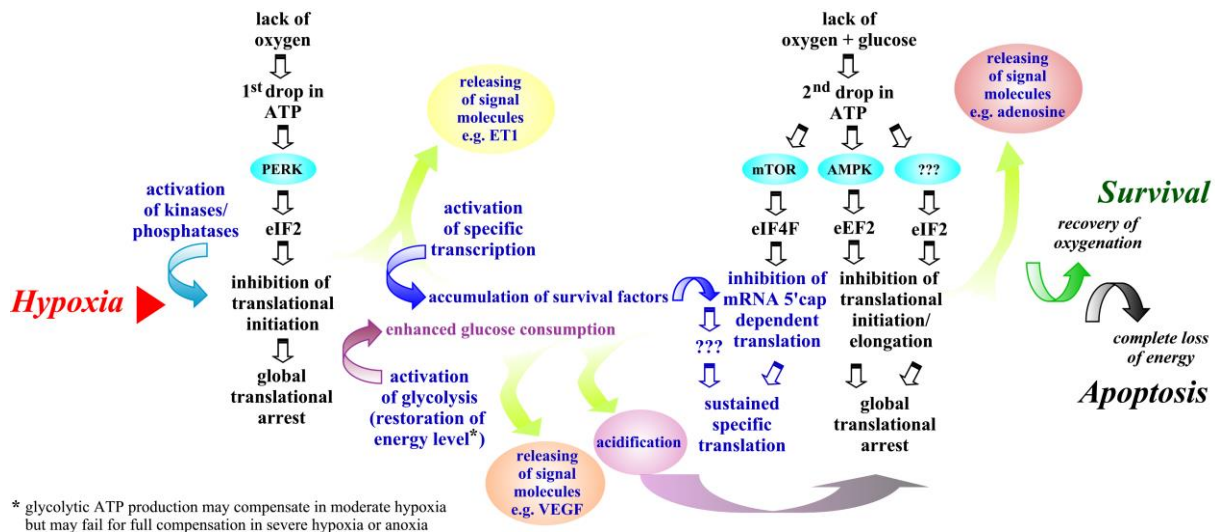


Abbildung 1. 1: Vereinfachte Darstellung der zellulären Anpassungsreaktionen unter Hypoxie

Unter akuten hypoxischen Bedingungen kommt es zu einer schnellen Hemmung der Proteinsyntheserate. Durch die Aktivierung der glykolytischen Energieproduktion kann diese Hemmung z.T. kompensiert werden (trifft für Zelltypen zu, die Glykolyse betreiben können und setzt die Versorgung mit Glukose voraus). Reicht die anaerobe ATP-Synthese nicht aus, wird die allgemeine (globale) Proteinsynthese erneut durch Kinasen wie mTOR oder AMPK, welche Translationsinitiations- und Elongationsfaktoren blockieren, gehemmt. Kann die Sauerstoffversorgung nicht wiederhergestellt werden, führt Hypoxie langfristig zur Apoptose. Die Frage, wie eine Vielzahl von Proteinen entgegen dem allgemeinen Trend effektiv translatiert werden können, kann z.Z. noch nicht beantwortet werden. (Abbildung übernommen aus: ²⁾)

Es wurde gezeigt, dass, insbesondere während der Embryogenese und unter Stressbedingungen, *cis*-Elemente in den mRNA UTRs eine Rolle in der Kontrolle der Genexpressionsrate und der zellulären Anpassungsfähigkeit spielen ³²⁻³⁵. Eine momentan diskutierte Hypothese in der Kontrolle der spezifischen Proteinsynthese unter Hypoxie ist die der alternativen Translationsinitiation, d.h., dass unter Bedingungen in denen die „normale“ mRNA-5'-cap-abhängige Rekrutierung der ribosomalen Untereinheiten inhibiert ist, mRNAs die eine interne Ribosomen-Bindungsstelle besitzen sich der allgemeinen Translationshemmung entziehen können. Tatsächlich wurden in den mRNAs einer Reihe wichtiger Hypoxie-induzierbarer Gene (bspw. HIF-1 α und VEGF; ^{36, 37}) solche sogenannten Internal Ribosome

Entry Sites (IRES) identifiziert. Man schätzt, dass ca. 10-15% aller mRNAs IRES Elemente enthalten³⁸. Sie könnten daher Subgruppen von mRNAs definieren, die nicht von der allgemeinen Hemmung der mRNA Translation unter Hypoxie betroffen sind. Andere Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch mRNAs die keine IRES Elemente besitzen, effektiv – und sogar verstärkt – unter Hypoxie translatiert werden können^{39, 40}. Andere Untersuchungen ergaben wiederum eine stress-induzierte Hemmung von mRNAs mit IRES Elementen⁴¹. Die Bedeutung der IRES Elemente für die Proteinbiosyntheserate unter Hypoxie ist demnach nicht vollständig geklärt.

Es muss weiterhin darauf hingewiesen werden, dass zur Bestimmung der mRNA Translationsrate üblicherweise die Polysomengradientenanalyse angewendet wird. Dabei wird der zytosolische (post-Nukleäre) Zellextrakt nach seinem Molekulargewicht in einer 10 bis 55%-igen Saccharose-Gradienten-Lösung separiert³⁸. Polysomen sedimentieren aufgrund ihres hohen Gewichts sehr schnell. Je mehr Ribosomen mit einem spezifischen Transkript assoziiert sind, desto höher ist die Sedimentationsgeschwindigkeit. Dabei wird davon ausgegangen, dass mehr Ribosomen pro Transkript eine verbesserte Translationsinitiation (mechanistisch der Hauptansatzpunkt in der Regulation der mRNA Translationsrate) voraussetzen. Ein höherer Besetzungsgrad mit Ribosomen führt demnach zu einer verstärkten Peptidsynthese pro Transkript / pro Zeiteinheit (siehe Abbildung 1.2.). Allerdings kann mittels der Polysomengradientenanalyse nur die mRNA Translationsrate an sogenannten freien Polysomen (mRNA-Ribosomen-Komplexe im freien Zytoplasma) bestimmt werden. Andere Orte der Proteinsynthese, wie die Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER), sind in dieser Betrachtung nicht eingeschlossen.

Es finden sich unter Normalbedingungen insgesamt ~30% der Transkripte am Endoplasmatischen Retikulum⁴². Ein nicht unerheblicher Teil dieser zu translatierenden mRNA kodiert für zytosolische und Kernproteine. Die Frage der zellulären Lokalisation der Proteinsynthese unter Hypoxie ist demnach noch völlig offen – die Hemmung der mRNA Translation kann nach gegenwärtigem Kenntnisstand nur für freie Polysomen (im Zytoplasma) angenommen werden.

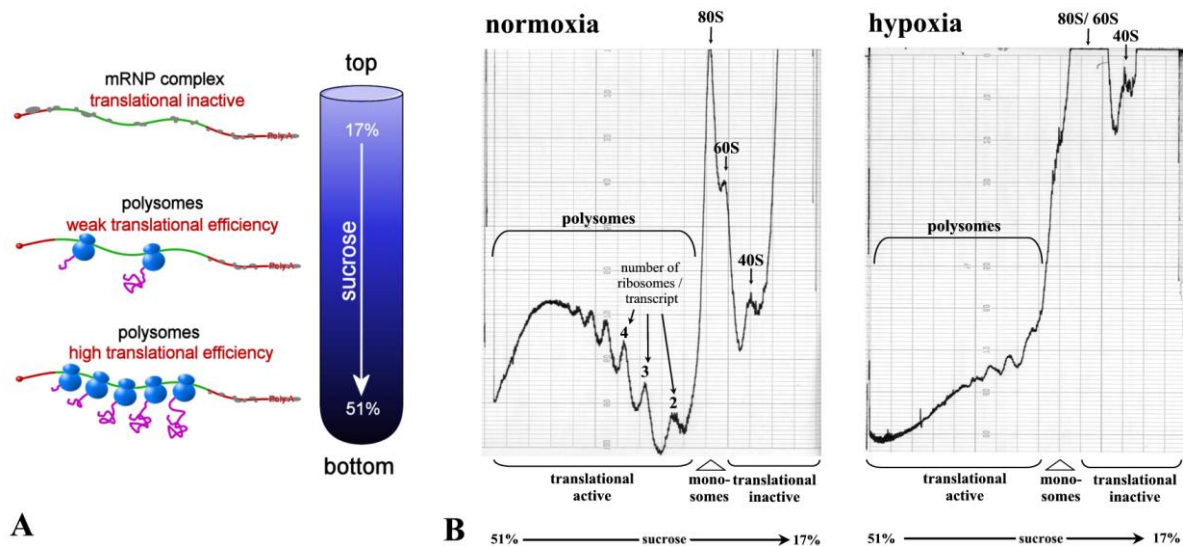


Abbildung 1.2: Polysomengradientenanalyse

Die Polysomengradienten-Zentrifugation wird zur Darstellung der Menge an translaterter mRNA und dem Besetzungsgrad der mRNA mit Ribosomen durchgeführt. Man unterscheidet dabei den Zustand einer spezifischen mRNA in translations-inaktiv (niedermolekulargewichtige RNP-Fractionen) und translations-aktiv (hochmolekulargewichtige Polysomenfractionen). Eine Differenzierung ist somit über die (von der Anzahl der Ribosomen abhängige) Masse der Komplexe, in denen die mRNA integriert ist, möglich. Darüber hinaus wird der Besetzungsgrad einer mRNA mit Ribosomen als Maß für die Proteinsynthese pro Zeiteinheit angesehen. A: Schematische Darstellung. B: Ribosomales Profil, photometrisch gemessen bei einer Absorption von 254 nm während des kontinuierlichen Abpumpens der Gradientenlösung. Unter Hypoxie (36 h) kann eine starke Verschiebung der RNA-Konzentration in niedermolekulargewichtige Fraktionen nachgewiesen werden. Dieser Befund kann als Disaggregation der Polysomenkomplexe und inhibierte Translationsinitiation gewertet werden. (Abbildung übernommen aus: ¹⁰⁾

1.6. Zielstellung

In den letzten Jahren wurde der Einfluss von Hypoxie (üblicherweise 0,5 – 1% Sauerstoff) auf die allgemeine Translationsfähigkeit einer Reihe von Zelltypen (HT1080 – humane Fibrosarkomzellen; HEK293 – immortalisierte humane embryonale Nierenzellen und Kelly-Zellen – humane Neuroblastomzellen) untersucht ^{10, 43}. Dabei wurde besonders auch der zeitliche Aspekt der Hypoxie berücksichtigt. Heraus kam, dass die globale Hemmung der Genexpressionsrate multi-phasisch und hauptsächlich energieabhängig erfolgt und sich die spezifische Aktivierung der Synthese Hypoxie-induzierbarer Faktoren nicht durch die Ergebnisse

der Polysomengradientenanalyse erklären lassen^{2, 10}. So zeigte sich bspw., dass die mRNAs der Matrix-Metalloproeinase-9 (MMP9) und die der Kollagen Prolyl-4-hydroxylase α (I) unter Hypoxie verstärkt in hochmolekulargewichtigen Fraktionen (die mit dem rER assoziiert waren) nachgewiesen wurden^{39, 40}. Beide mRNAs wurden verstärkt unter hypoxischen Bedingungen (bzw. Energiemangel) translatiert – und das im Kontext einer allgemeinen Translationshemmung.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die zelluläre Anpassung der Genregulation unter Hypoxie auf der Ebene der mRNA Translation zu untersuchen um damit unser Verständnis der molekularen Abläufe zu erweitern. Untersucht wird die Arbeitshypothese, dass sich unter Hypoxie die aktive Translation überlebenswichtiger Proteine ans raue Endoplasmatische Retikulum verlagert. Dazu werden Versuchsreihen unter Kontrollbedingungen und Hypoxie durchgeführt und unter diesen Bedingungen die Gesamt-mRNA, zur Bestimmung der Syntheserate, bzw. die rER-assoziierte mRNA, zur Bestimmung der mRNA Lokalisation, isoliert. Zur globalen Betrachtung der potentiellen Anreicherung von mRNAs mit der Gen Ontologie „Hypoxia Response“ in der rER Fraktion in Vergleich zu „Gesamt-RNA“ sollen Microarray Experimente durchgeführt werden. Die Ergebnisse sollen mit bioinformatischen Methoden analysiert werden. Auf diese Weise soll die Hypothese einer möglichen Translokation der mRNA Translation ans rER unter Hypoxie bestätigt oder abgelehnt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 wurde vom ATCC (American Type Culture Collection; Zelllinie CCL-121) bezogen. Die Kultur erfolgte aus der 6. Passage bei 37°C und 5% CO₂ mit einem Vollmedium aus DMEM (high glucose, PAA Laboratories GmbH), versetzt mit 10% hitze-inaktiviertem (45 min, 56°C) fötalen Kälberserum (FCS, Biochrom AG), 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES (Biochrom AG) und 2 mmol/l Glutamin. Die inkubierten Zellen wurden mit einer Konfluenz zwischen 80-90% je nach Verwendung unterschiedlich stark gesplittet. Die Kultivierung ging jedoch nicht über die 20. Passage hinaus. Für die Untersuchungen wurden die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit frischem Minimalmedium (Variation zum Vollmedium: 0,4% FCS) versetzt. Zu diesem Zeitpunkt wiesen sie eine Konfluenz von ca. 70% auf. Mit Versuchsbeginn wurden die Zellen für 36 Stunden in einem Hypoxie-Inkubator (JOUAN IG750) bei 0,5% O₂, 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Die Kontrollgruppe wurde unter sonst gleichen Bedingungen bei 21% O₂ inkubiert.

2.2. Molekularbiologische Methoden

Alle im Text nicht weiter bezeichneten Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich[®], Merck Millipore[®] und Carl Roth[®] bezogen.

2.2.1. Fraktionierte RNA-Präparation

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden mit 4°C kalten Lösungen sowie auf Eis durchgeführt. Die inkubierten Zellen wurden in der Zellkulturschale mit PBS (Biochrom AG) zweimal gewaschen, mit 700 µl PBS abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Zentrifuge bei 600 x g für 2 min sedimentiert. Nach einer weiteren Waschung mit PBS (erneute Zentrifugation bei 600 x g) wurde das Zellpellet mit 1-2 Volumen Lysispuffer (20 mM Tris, pH 7,4; 150 mM KCl, 25 mM MgCl₂; 20% Glycerin; 0,25% Nonident P40; 1 mM DTT; 200 U/ml RNaseOUT [Recombinant Ribonuclease Inhibitor; Invitrogen]; 1 x PIC [complete protease inhibitor mix; Roche Diagnostics Corporation]) versetzt. Nach 2 Minuten auf Eis wurden die lysierten Zellen bei 10.000 x g (4°C) für 10 Minuten zentrifugiert. Der resultierende Überstand entspricht einer mit Zytosol angereicherten Fraktion. Das Pellet wurde in 1 Volumen Lysispuffer gelöst und beinhaltet die Kernfraktion, Mitochondrien sowie Endoplasmatisches

Retikulum. Alle gewonnenen Fraktionsproben wurden mit RNA-Bee (AMS Biotechnology) versetzt und nach Herstellerangaben durch Chloroformzugabe in 3 Phasen geteilt. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde eins zu eins mit Isopropanol versetzt und die Nukleinsäuren über Nacht bei -20°C gefällt. Nach zweifacher Waschung mit 70% Ethanol wurde das RNA-Pellet in Nuklease-freiem Wasser (Gibco) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2. ER-gebundene RNA-Isolierung mittels Sigma Kit

Vor dem Ernten erfolgte die Zugabe von Cycloheximid ($100\ \mu\text{g/ml}$) ins Nährmedium und eine weitere Inkubation über 15 Minuten unter Kontrollbedingungen ($21\% \text{ O}_2$, $5\% \text{ CO}_2$, 37°C). Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden mit 4°C kalten Lösungen sowie auf Eis durchgeführt. Die Platten wurden mit PBS (Biochrom AG) gewaschen und die Zellen dann mit $700\ \mu\text{l}$ PBS geerntet. Nach einem weiteren PBS Waschschrift ($600 \times g$ Zentrifugation) wurden die Zellen mit dem Endoplasmic Reticulum Isolation Kit von Sigma[®] aufgearbeitet. Dabei wurden sie nach einer 20-minütigen Quellung mit einer hypotonischen Pufferlösung (4°C) bei 200 rpm mechanisch homogenisiert (Polytron PT 3000 von Kinematica[®]) und durch zweimalige Zentrifugation ($1.000 \times g$ und $12.000 \times g$) fraktioniert. Der Überstand besteht aus Zytosol, Mikrosomen sowie ER und wird als Post-Mitochondriale-Fraktion (PMF) bezeichnet. Nach titrierter Zugabe einer $8\ \text{mM}$ CaCl_2 -Lösung zur PMF und einer weiteren Zentrifugation bei $8.000 \times g$ wurde das gewonnene ER-Pellet in isotonischem Puffer gelöst. Im Überstand befanden sich stark verdünnt zytosolische Bestandteile. Die ER-Fraktion wurde mit RNA-Bee (AMS Biotechnology) versetzt und, wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben, weiter aufgearbeitet (siehe Abbildung 2.1.).

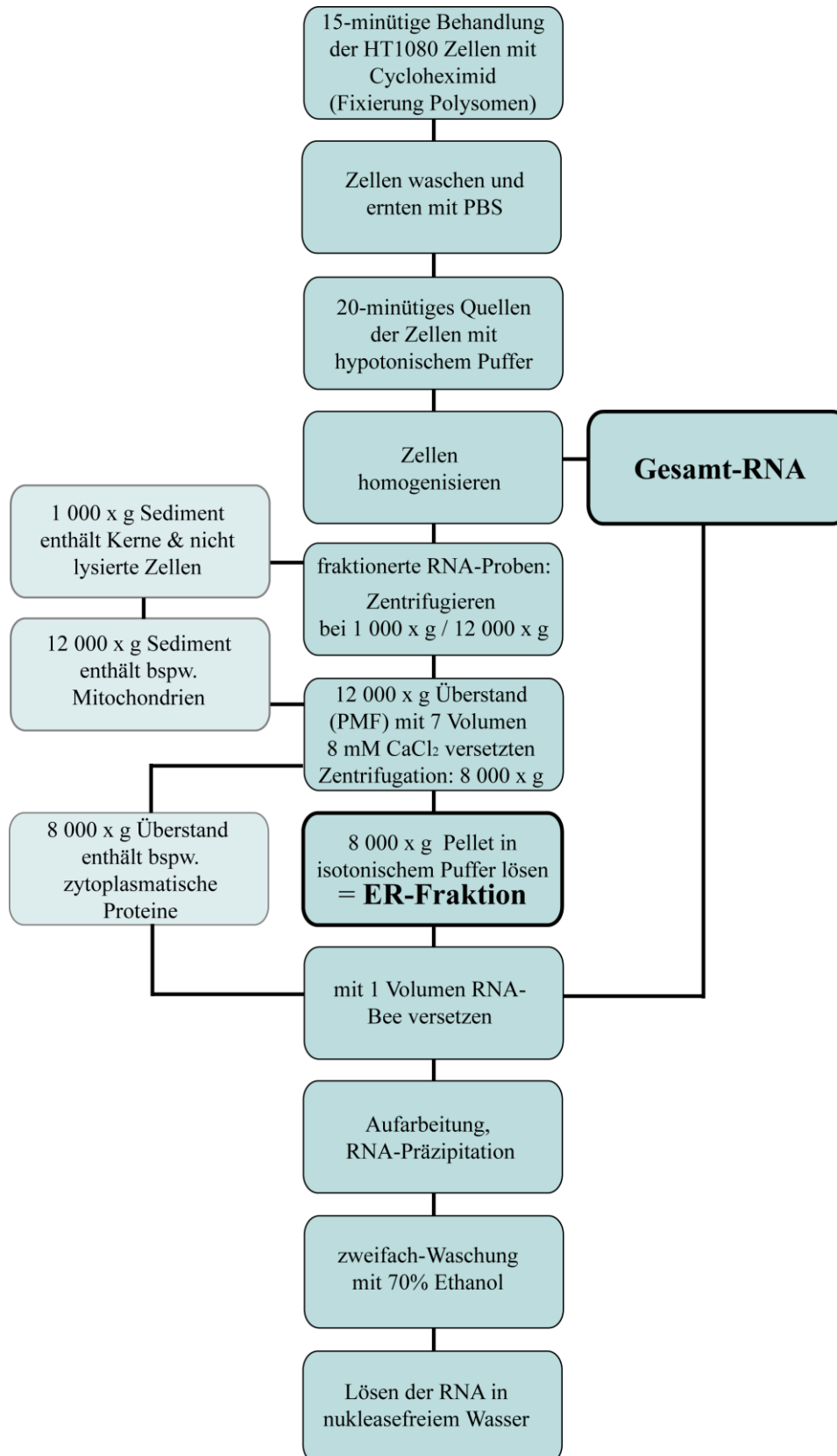


Abbildung 2. 1: Aufarbeitungsschema zur fraktionellen RNA-Isolation entsprechend der Herstellerangaben des „Endoplasmic Reticulum Isolation Kit“ (Sigma®).

2.2.3. Gesamt-Zell-RNA-Isolierung

Die Zellen wurden bis zur Fraktionierung durch Zentrifugation identisch behandelt wie Zellen, die nach dem Endoplasmic Reticulum Isolation Kit aufgearbeitet wurden. Nach der mechanischen Aufspaltung der Zellen wurde das gewonnene Zellhomogenisat mit RNA-Bee versetzt. Die weitere Aufarbeitung mit Chloroform, Isopropanol und Ethanolwaschung ist wiederum mit dem oben beschriebenen Protokoll identisch (siehe Abbildung 2.1.).

2.2.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Der Reversen Transkription liegt eine Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit anschließender Polymerasen Kettenreaktion (PCR) zugrunde. Für die Erststrangsynthese wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet. Es wurde 1 µg einer RNA-Probe mit Nuklease freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. Anschließend wurden 10 µl 2 x Mastermix (RT Puffer, dNTP Mix, RT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Nuklease freies Wasser) hinzugefügt und im Thermocycler (Biometra®) unter folgenden Bedingungen inkubiert: 10 min bei 25°C, 120 min bei 37°C und 5 sek bei 85°C.

2.2.5. mRNA-Quantifizierung mittels Realtime PCR

Mit der quantitativen Realtime PCR wird kontinuierlich die DNA-Menge am Ende jedes der insgesamt 40 Zyklen gemessen. Dabei wird ein in doppelsträngiger DNA interkalierender Farbstoff eingesetzt. Je mehr Matrize zu Beginn der Reaktion vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen sind nötig, um einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität zu erreichen. Der Punkt, an dem die Amplifikationskurve ins exponentielle Wachstum übergeht, wird als c_t -Wert definiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben (20 ng cDNA je Ansatz) in dreifachen Ansätzen mit dem GeneAMP 5700 System (Applied Biosystems) analysiert. Dabei wurde ein vorgefertigter Mastermix (Bioline®) aus DNA-Polymerase, dNTPs und Puffer eingesetzt. Für die quantitative Analyse wurde der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I (Invitrogen) 1:50 hinzugefügt. Die verwendeten Primer (siehe Tabelle 2.1.) wurden von TIB MOLBIOL GmbH hergestellt. Die Amplifikation erfolgte nach 10-minütiger Denaturierung bei folgenden Zyklen: 15 sek 95°C, 60 sek Annealing (60°C) und 30 sek Elongation (77°C). Alle Ergebnisse wurden auf 18S rRNA Menge nach der ΔCT Methode⁴⁴ normiert.

Tabelle 2. 1: Liste der für die Realtime PCR eingesetzten Primer

Primer	Sequenz
Aldoc Q FW	5'-TgC ggC TgC TAA CTg gCT gCg
Aldoc Q RE	5'-TTg CCC ggg gCT ACA ATC CgC
HK 2 Q FW	5'-CAC CCT CgC Cgg Tag CCT TCT TT
HK 2 Q RE	5'-ggg TgA gTg gTg gCT CCA AgC CC
EGLN3 Q FW	5'-Cgg gAg CCg gCT ggg CAA AT
EGLN3 Q RE	5'-TgC AgC gAC CAT CAC CgT Tgg gg
P4HB Q FW	5'-AgA CTC ACA TCC TgC TgT TC
P4HB Q RE	5'-TAC TTg gTC ATC TCC TCC TC
P4HA1 Q FW	5'-CCA CAg CAg Agg AAT TAC Ag
P4HA1 Q RE	5'-ACA CTA gCT CCA ACT TCA gg
BLID Q FW	5'-gCC ACT ggA ggC gCT CTT ggg T
BLID Q RE	5'-TTC CgC TTC Atg gCA gAg gAg CCA
18S rRNA Q FW	5'-gAT CAA AAC CAA CCC ggT CA
18S rRNA Q RE	5'-CCg TTT CTC Agg CTC CCT CT

2.2.6. Proteinpräparation

Die HT1080-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 700 µl PBS abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 600 x g für 2 min sedimentiert. Nach einer weiteren PBS Waschung wurden die Zellen in Laemmli-Puffer (25 mM TRIS, 250 mM Glycin, 0,1% SDS; pH 8,3-8,6) ⁴⁵ gelöst und anschließend für 15 Minuten bei 95°C im Thermoschüttler (750 rpm) inkubiert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 280 nm wurden die Proben für die SDS-PAGE in RotiLoad 1 (Carl Roth GmbH & Co. KG) verdünnt. Sie wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für den immunbiochemischen Nachweis der Proteine, wurden zuerst 30-60 µg der Proben mittels SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach ihrem Molekulargewicht (in den hier durchgeführten Versuchen 40 bis 120 kDa) getrennt. Dazu wurden die Gelplatten in die Gießvorrichtung der Gelapparatur (Bio-Rad Laboratories, München) eingesetzt und das 12 % Trenngel (15 ml Trenngelpuffer [Biometra[®]], 3 ml Nuklease-freies Wasser, 12 ml Bis-Acrylamid (30%), 250 ml APS [10%], 25 µl TEMED) gegossen. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um Unebenheiten zu vermeiden. Nach der Polymerisation wurde Isopropanol entfernt. Anschließend wurde das Trenngel mit einem 4% Sammelgel (5 ml Sammelgelpuffer [Biometra[®]], 3,45 ml Nuklease-freies Wasser, 1,3 ml Bis-

Acrylamid [30%], 100 ml APS [10%], 18 μ l TEMED) überschichtet und die Kämme gezogen. Nach einem Aufkochen der in RotiLoad1 gelösten Proben für 5 min bei 95 °C erfolgte die elektrophoretische Trennung bei 25 mA pro Gel für 1,5 Stunden. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde das Standardproteingemisch Cruz Marker (#2035, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) verwendet.

2.2.8. Western Blotting und Proteinquantifizierung

Die Übertragung der Protein-beladenen SDS-Trenngele erfolgte auf eine Roti[®]-PVDF Membran (Carl Roth GmbH & Co. KG). Die Membran wurde zunächst in 100 % Methanol aktiviert und anschließend, beginnend mit der Kathode, eine Watteschicht, eine Schicht Zellfaser, das Gel, die PVDF-Membran, Zellfaser, Watte und Anode aufeinandergelegt. Dann wurden die negativ geladenen Proteine bei einer Spannung von 100 V für eine Stunde aus dem Gel auf die Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde in einem Puffer aus 5% Milchpulver (Carl Roth GmbH & Co. KG) und TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) geblockt. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C (siehe Tabelle 2.2.). Nach mehrfachem Waschen der Membran mit TBS-T folgte die Inkubation mit dem an HRP (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.2.) für 1 Stunde. Danach wurde die Membran erneut mehrfach mit TBS-T gewaschen. Für die Proteinquantifizierung wurde der ChemiGlow West Chemiluminescence Substrate Kit (Cell Biosciences) genutzt. Zur Detektion der durch HRP erzeugten Lichtreaktion wurden fotosensitive Filme von Amersham Hyperfilm ECL verwendet. Anschließend wurden die Filme gescannt und deren Signale mittels Scion Image Software (Scion Corporation) analysiert.

Für eine interne Beladungskontrolle und Normierung der Ergebnisse auf β -Aktin bzw. GAPDH wurden die Blots aufgereinigt. Dazu erfolgte eine Waschung mit entionisiertem Wasser, eine 2-5 min Behandlung mit 0,2 M NaOH („Strippen“) und eine weitere Waschung mit entionisiertem Wasser. Die gereinigte Membran wurde, angefangen beim Blocken, wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Tabelle 2. 2: Liste der verwendeten Antikörper

	Name	Hersteller	Verdünnung
Primärantikörper	Anti-Aromatase	Acris, Katalognummer:	1 : 100
		AP00001PU-N	
	Anti-BLID	Abnova,	1 : 1000
		Katalognummer: H00414899-B01	
	Anti-PDI	Acris, Katalognummer:	1 : 100
		AP17615PU-N	
	Anti-P4H α (I)	Acris, Katalognummer:	1 : 1000
AF0210			
Anti- β -Aktin	Chemicon,	1 : 6000	
	Katalognummer: MAB1501R		
Anti-GAPDH	Acris, Katalognummer:	1 : 40 000	
	BM439		
Sekundärantikörper	goat anti-mouse	Santa Cruz,	1 : 50 000 bis 1 : 100 000
		Katalognummer: sc2031	
	donkey anti-rabbit	Santa Cruz,	1 : 100 000
		Katalognummer: sc2317	

2.3. Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix GeneChip[®] Human Gene 1.0 ST Arrays

Das GeneChip Human Gene 1.0 ST Format von Affymetrix bildet mehr als 28.000 Gene ab, die jeweils über durchschnittlich 26 Oligonukleotid-Sonden (25-mer) repräsentiert werden. Die Probe Sets des Chips bestehen aus Perfect Match Sonden, wobei die generelle Bestimmung unspezifischer Hintergrundsignale über etwa 20.000 sogenannter „Background“-Sonden erfolgt. Die Sonden selbst decken den gesamten Genbereich ab, so dass ein realistischeres Bild der Expression wiedergegeben werden kann.

Für die Microarray Analyse wurden Kontroll- und Hypoxie-Proben aus Gesamtzell-RNA und ER-gebundene RNA verwendet. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Für einen GeneChip wurde ein RNA-Pool aus drei unabhängigen RNA-Proben verwendet.

Die weitere Aufarbeitung und Array Hybridisierung erfolgte im Rahmen einer Core Facility im Labor für funktionelle Genomforschung Charité (LGFC) der Charité –

Universitätsmedizin Berlin. Unsere Ansprechpartner waren Prof. Christian Hagemeyer, Prof. Reinhold Schäfer und Dr. Ute Ungethüm.

Ausgehend von 2µg RNA (100 ng/µl) erfolgte gemäß der Herstelleranleitung (1µg Total RNA Labeling Protocol, Affymetrix) die Synthese von biotinylierter cDNA (sense-Orientierung). Die nachfolgende Hybridisierung auf ST-Arrays und die weitere Verarbeitung (Waschen, Färben mit Streptavidin-Phycoerythrin, Scannen, Aufzeichnen der Daten) war ebenfalls Bestandteil der Dienstleistung des LGFC.

Die als CEL-Datei gespeicherten Intensitätswerte der Arrays wurden von Bertram Klinger (Institut für Theoretische Biologie, Humboldt Universität Berlin) mittels der R Pakete `affy` (www.bioconductor.org) unter Verwendung des robust multiarray average (RMA) Algorithmus⁴⁶ normalisiert. Die normalisierten Expressionswerte wurden zusammen mit einer aktuellen ProbeSet Annotation von Herrn Klinger in Form einer Excel-Tabelle bereitgestellt. Für die Darstellung der Daten wurde die x-fache Veränderung gegenüber den Kontrollwerten (Fold-Change, FC) für die Gruppen „Gesamt“ und „ER“ ermittelt. Als signifikant verändert gelten Datenpunkte, die einen $FC > 1,4$ oder $< -1,4$ aufweisen. Die Streuung für niedrigere Datenpunkte ist jedoch größer als bei höheren Werten, was auf den Einfluss von Streulicht aus anderen Wells sowie den Anteil an Hintergrundsignalen zurückzuführen ist. Zur Berücksichtigung dieser lokalen Variabilität braucht es neben dem statischen Foldchange eine zusätzliche dynamische Schwelle, den z-score⁴⁷. Er berechnet sich aus dem Foldchange durch die lokal errechnete Standardabweichung. Bei einem z-score von 3, was einem Schwellwert von 3 Standardabweichungen entspricht, wird von einer Regulation ausgegangen. Datenpunkte bzw. Gene gelten somit als signifikant verändert, wenn das statische ($\pm 1,4$ FC) und das dynamische ($z \text{ score} \geq 3$) Kriterium erfüllt ist.

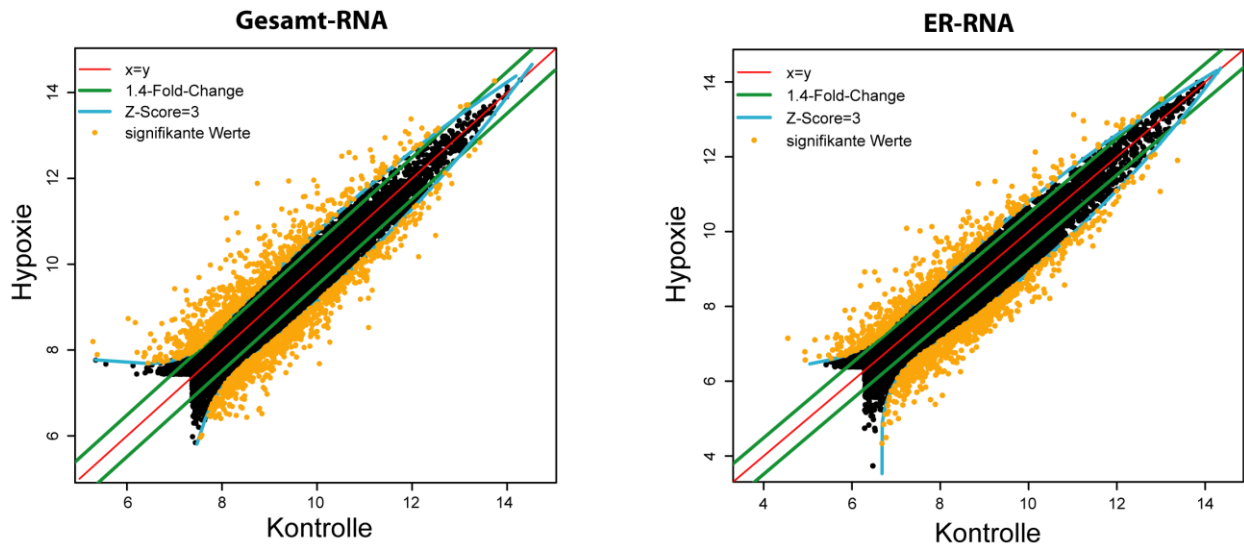


Abbildung 2. 2: Diagramme zur grafischen Darstellung der Microarray Selektionskriterien

für Hypoxie-regulierte Gene in HT1080 Zellen nach 36 h, 0,5% O₂. Gezeigt werden die logarithmierten Signalstärken aus den Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Arrays von Kontrollen (x-Achse) gegenüber Hypoxie (y-Achse) in den Gesamt-RNA Proben (links), bzw. ER-RNA Proben (rechts). Wenn die Datenpunkte das statische ($\pm 1,4$ FC) und dynamische ($Z\text{-Score} \geq 3$) Kriterium erfüllen, werden die entsprechenden Gene / ProbeSet IDs als signifikant verändert (gelb) angesehen.

2.4. Functional Enrichment Analysis

Für die Functional Enrichment Analyse fand der Web-based Gene Set Enrichment Analysis Toolkit (WebGestalt2 [<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>], ^{48, 49}) Anwendung. Bei WebGestalt2 handelt es sich um ein internet-basiertes Datengewinnungssystem, welches Genlisten im biologischen Kontext erfasst. Unter anderem bedient sich die Plattform der Gene Ontology, KEGG pathways, Pathway Commons, Wikipathways und microRNA Zielgenen. Dabei wird beim Functional Enrichment Verfahren nach Anreicherung einer funktionellen Gengruppe mit interessanten, z.B. induzierten, Genen analysiert. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Pathway Commons und Wikipathways gelegt.

Bei der Pathway Commons Datenbank handelt es sich um eine Kollektion öffentlich zugänglicher Signalwege (Pathways) verschiedenster Organismen. Darunter finden sich Pathways wie biochemische Reaktionen, Transport- und Katalysevents und physikalische Interaktionen zwischen Proteinen, DNA, RNA und kleineren Molekülen. Aktuell sind aus 9 Datenbanken (BioGRID, Cancer Cell Map, HPRD, HumanCyc, IntAct, MINT, NCI und Reactome, SBCNY) über 1600 Pathways und 442 000 Interaktionen vertreten (<http://www.pathwaycommons.org/pc/>).

Wikipathways ist eine offene, gemeinschaftliche Datenbank für biologische Systeme. Es bedient sich der gleichen MediaWiki Software wie Wikipedia und besteht aus einem frei zugänglichen Grafik-Bearbeitungsprogramm und einer integrierten Datenbank für Gene, Proteine und ganzer biologischer Systeme. Aktuell umfasst sie 1766 Pathways (Stand: 08.01.2014), wovon 460 dem Homo sapiens zugeordnet sind (<http://wikipathways.org/index.php/WikiPathways>).

2.5. Statistik

Die folgenden Ergebnisse basieren auf mindestens 2 verschiedenen Serien von je 3 unabhängigen Versuchsansätzen. Die Darstellung erfolgte durch Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde durch einen 2-seitigen Studentischen t-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur Genexpression und mRNA Lokalisation unter Hypoxie mittels Kurzzeit-Lyse Protokoll

In dieser Arbeit soll die Bedeutung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in Bezug auf die Proteinsynthese unter Hypoxie und eine eventuelle Rekrutierung der aktiven mRNA Translation ans ER untersucht werden. Prinzipiell können zwei zelluläre Kompartimente der Proteinsynthese unterschieden werden: das ER, welches membranständige Ribosomen trägt und das Zytoplasma, das freie Polysomen (RNA-Ribosomen-Komplexe) enthält.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass spezifische Transkripte unter Hypoxie verstärkt am ER präsent sind - andere jedoch nicht, sollte in einer groben, jedoch leicht durchzuführenden Zellkompartiment-Fraktionierung (vgl. Kapitel 2.2.1. fraktionierte RNA-Präparation), exemplarisch einige mRNAs nachgewiesen werden. Dazu wurden humane Fibroblasten (HT1080-Zelllinie) für 36 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (0,5% O₂) inkubiert und anschließend die RNA isoliert. Zur Untersuchung der Genexpression und mRNA Lokalisation unter Kontrollbedingungen vs. Hypoxie, wurde die Gesamtveränderung der mRNA Konzentration mittels Realtime PCR bestimmt (Gesamt-RNA), als auch die lokale Präsenz der Transkripte in zwei Fraktionen (Sediment/ER-haltig vs. Zytosol) nachgewiesen (Abbildung 3.1.). Zur Differenzierung translationsaktiver Kompartimente wurde durch eine 2-minütige Behandlung der Zellen mit einem lysierenden Puffer (siehe Kapitel 2.2.1.) die Zellmembran aufgebrochen. Durch anschließende Zentrifugation entstanden zwei Fraktionen: die schwere Sedimentfraktion und die leichtere Zytosolfraktion. Das Sediment enthielt ER sowie Zellkerne und Mitochondrien. Im Überstand (Zytosol) befanden sich vor allem freie (zytoplasmatische) Polysomen sowie translations-inaktive Ribonukleoprotein (RNP-) Komplexe. Da die Sedimentfraktion auch Zellkerne mit prä-RNAs enthielt, wurden zur Abgrenzung Intron überspannende Primer eingesetzt. Eine Überprüfung der Fraktionen mit Markerproteinen für das ER bzw. Zytoplasma ist in der Abbildung 3.1.A gezeigt. Für die mRNA Quantifizierung wurden u.a. Kandidaten ausgewählt, von denen eine Aktivierung unter Hypoxie angenommen werden kann. Gezeigt ist die Quantifizierung der Hexokinase-2 (HK2) mRNA, β -Aktin mRNA, Hypoxia Inducible Factor-1 α mRNA (HIF1A) mRNA (**Abbildung 3.1.**) sowie die Prolyl 4-hydroxylase α (I) (P4HA1) mRNA und die BH3-like motif containing, cell death inducer (BLID) mRNA (**Abbildung 3.2.A&C**).

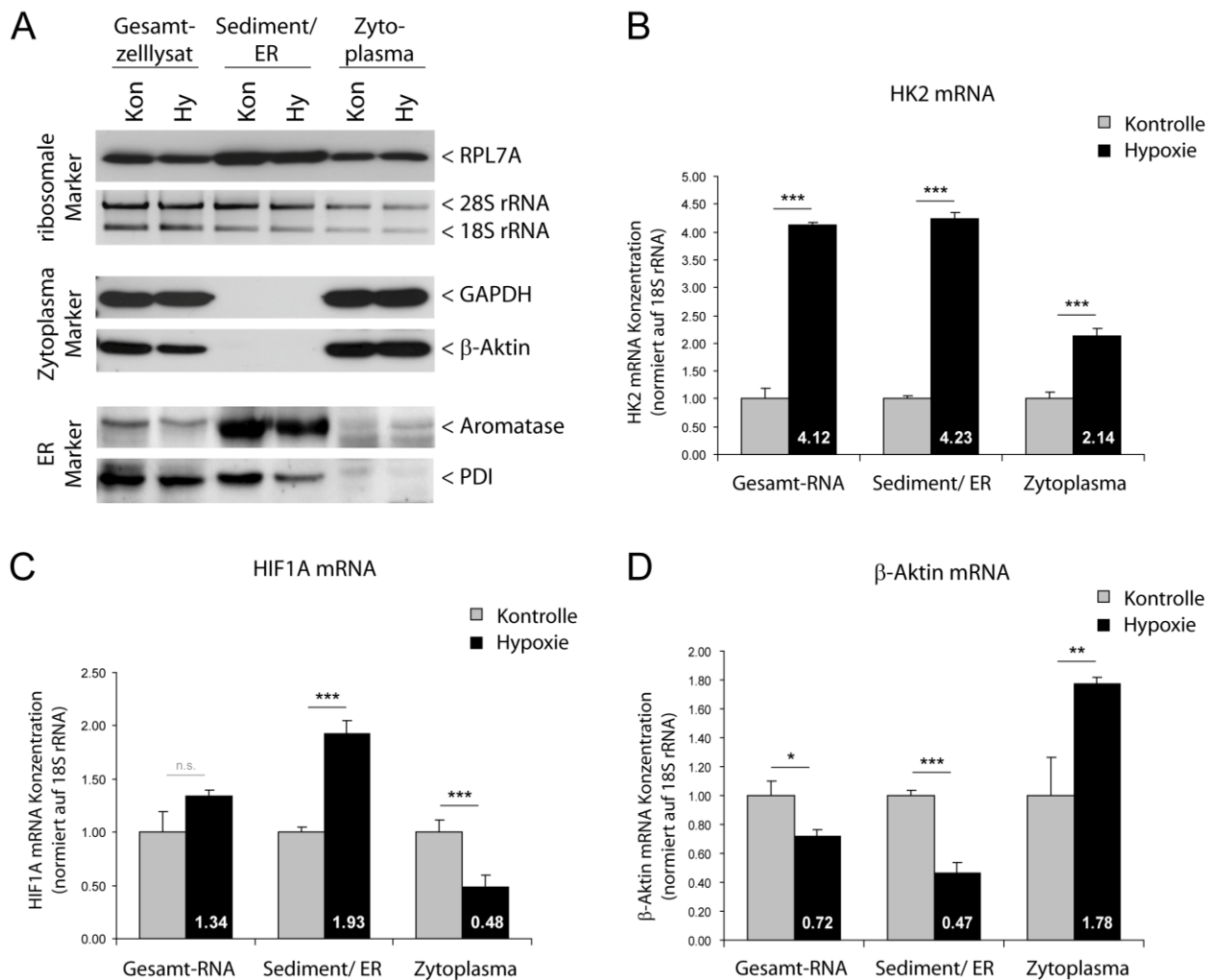


Abbildung 3. 1: Gesamt-Konzentrationsveränderung und Lokalisation von Markerproteinen und spezifischen mRNAs

HT1080-Zellen wurden für 36 Stunden unter 0,5% O₂ (Hypoxie; Hy), bzw. 21% O₂ (Kontrolle; Kon) inkubiert. Die Aufarbeitung von Gesamt-Zell-Lysaten bzw. Gesamt-RNA dienen zur Bestimmung der veränderten Expression. Zur Lokalisation wurde ein Teil der Zellen lysiert und in eine ER-haltige Sedimentfraktion und eine Überstandsfraktion (Zytoplasma) aufgetrennt. **A**) Nachweis verschiedener Marker (ribosomal, ER, Zytosol) zur Fraktionsdefinierung. **B-D**) qPCR zur Konzentrationsbestimmung verschiedener mRNAs. N=6. n.s. = nicht signifikant. * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001.

In beiden Fraktionen (ER-haltig bzw. Zytoplasma) konnten ribosomale Marker nachgewiesen werden (**Abbildung 3.1.A**), was zeigt, dass zwei Ribosomen-haltige Kompartimente getrennt wurden. Die ER-Markerproteine Aromatase und PDI wurden in der Sedimentfraktion stark angereichert, was auf eine deutliche Abtrennung des ER gegenüber freien

Polysomen hinweist. Der Anstieg der HK2 mRNA Konzentration in den Gesamt-RNA Proben kann als Positiv-Kontrolle des Hypoxie-Einflusses in diesem Experiment gewertet werden, da HK2 zu den verifizierten Hypoxie-aktivierbaren Genen gehört¹⁷. Es konnte ein starker Anstieg sowohl in der ER-haltigen Fraktion, als auch in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden. Da bekannt ist, dass die HK2 mRNA unter Hypoxie effektiv translatiert wird, ist eine erhöhte Präsenz dieses Transkriptes in der ER-haltigen Fraktion konform mit der Annahme, dass die aktive Proteinsynthese am ER stattfindet.

Diese Schlussfolgerung wird unterstützt durch die Ergebnisse zum β -Aktin und HIF-1 α . Obwohl die β -Aktin mRNA insgesamt abnimmt, zeigt sie zusätzlich noch eine verstärkte Präsenz im Zytoplasma. Diese Ergebnisse bestätigen kürzlich publizierte Befunde in MCF-7 nach Hypoxie⁵⁰. Demgegenüber zeigt die HIF-1 α mRNA keine Veränderung auf der Gesamtkonzentrationsebene, ist jedoch verstärkt in der ER-haltigen Sedimentfraktion und verringert in der Zytosolfraktion nachweisbar. An diesem Beispiel zeigt sich ein klarer Shift zugunsten der ER-haltigen Fraktion, ohne dass sich die Gesamt-RNA Menge veränderte. HIF-1 α gehört zu den Kandidaten, von denen eine effektive Translation unter Hypoxie angenommen werden kann.

Diese Beispiele zeigen, dass nicht alle mRNAs, die in ihrer Menge unter Hypoxie erhöht sind, auch eine verstärkte Präsenz am ER aufweisen. Es deutet sich an, dass die mRNA Lokalisation unabhängig von der mRNA-Konzentration reguliert werden kann.

Um eine weitere Bestätigung der Hypothese, dass die mRNA Translation am ER unter Hypoxie bevorzugt stattfindet, zu erhalten, wurden exemplarisch zwei Transkripte mit vergleichbarer Erhöhung der Gesamt-RNA Menge unter Hypoxie, jedoch einer unterschiedlichen Präsenz am ER, ausgewählt (**Abbildung 3.2.**). Die Kollagen Prolyl 4-hydroxylase α (I) Untereinheit (P4HA1, P4H- α (I)) wurde in früheren Arbeiten bereits als Hypoxie-induziert und aktiv translatiert beschrieben⁴⁰. Der Apoptosefaktor BLID (BH3-like motif containing, cell death inducer) zeigte eine mit der P4HA1 mRNA vergleichbare Erhöhung der mRNA Konzentration unter Hypoxie, ist im Gegensatz jedoch nicht verstärkt am ER lokalisiert. Mittels Western Blot wurden beide Proteinmengen quantifiziert. Es zeigte sich nur im Falle der P4H- α (I) eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge (**Abbildung 3.2.B**). Die BLID Proteinmenge blieb unverändert (**Abbildung 3.2.D**), so dass die Erhöhung der mRNA Menge als Kompensation der globalen Hemmung der Proteinsynthese angesehen werden kann.

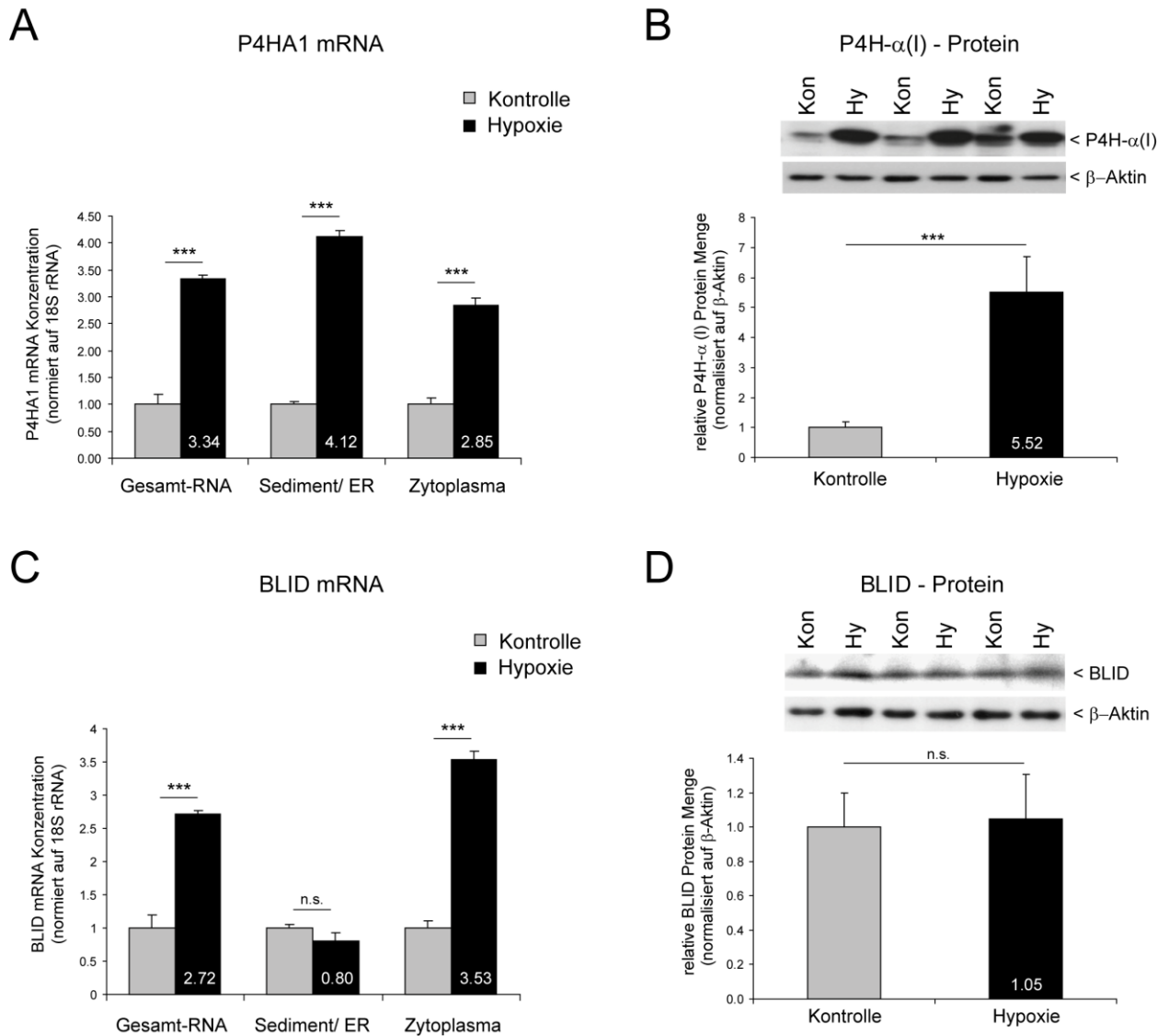


Abbildung 3. 2: Vergleich der mRNA-Konzentrationsänderung vs. Proteinkonzentrationsänderung zweier Hypoxie-induzierter Transkripte

Zwei Transkripte mit ähnlicher Erhöhung auf der Gesamt-mRNA Ebene, jedoch unterschiedlicher Präsenz am ER (P4HA1 - ja; BLID - nein) wurden auf ihre Erhöhung auf der Proteinebene mittels Western Blot überprüft. A, C: qPCR zur Quantifizierung der veränderten P4HA1 (A) bzw. BLID mRNA Konzentration (C). N = 6. *** = $p < 0,001$. n.s. = nicht signifikant. B, D: Western Blot zum Nachweis des P4H- α (I) (B) bzw. des BLID Proteinniveaus. Gezeigt werden repräsentative Bilder mit jeweils drei unabhängigen Einzelproben für Kontrolle (Kon) und Hypoxie (Hy) sowie die statistische Auswertung. N = 3. *** = $p < 0,001$. n.s. = nicht signifikant.

Auch wenn es sich beim Vergleich von P4H- α (I) und BLID um Einzelbeispiele handelt, so deuten die Ergebnisse doch an, dass eine erhöhte mRNA Konzentration nicht mit einer erhöhten Proteinmenge korrelieren muss. Um die Rolle der mRNA Lokalisation am ER für die

Proteinsynthese unter Hypoxie auf der globalen Ebene aufzuzeigen, sollte daher zunächst eine reine ER Fraktion isoliert werden. Wenn das ER eine wichtige Funktion in diesem Kontext übernimmt, so sollten in Microarray Analysen mRNAs am ER angereichert sein, die für eine spezifische Hypoxie-vermittelte Antwort stehen. Beispiele wären Faktoren, die an der Glykolyse beteiligt sind. Von diesen Genen ist eine effektive mRNA Translation unter Hypoxie bekannt.

3.2. Fraktionierung mittels Endoplasmic Reticulum Isolation Kit von Sigma®

Um eine klar definierte Aussage über ER-gebundene mRNAs treffen zu können, wurde im Weiteren der SIGMA ER-Isolation Kit (siehe Kapitel 2.2.2.) verwendet. Der Vorteil liegt in der Isolation einer reinen ER-Fraktion, die weder Kerne noch Mitochondrien enthält. Die humanen Fibrosarkomzellen wurden 36 Stunden unter 0,5% O₂ (Hypoxie) bzw. 21% O₂ (Kontrolle) inkubiert. Während der ER Isolation mittels SIGMA ER-Isolation Kit wurden verschiedene Fraktionen verworfen (siehe auch Präparationsschema, Abbildung 2.1.). Zur Überprüfung der Fraktionierung wurden in allen Fraktionen typische Markerproteine mittels Western Blot dargestellt (**Abbildung 3.3.**). Eine Anreicherung des ER konnte durch den Nachweis der ER Markerproteine Aromatase und PDI bestätigt werden. Zytoplasma Marker, wie GAPDH und β -Aktin, wurden ausschließlich im prä-ER Sediment und im post-ER Überstand nachgewiesen.

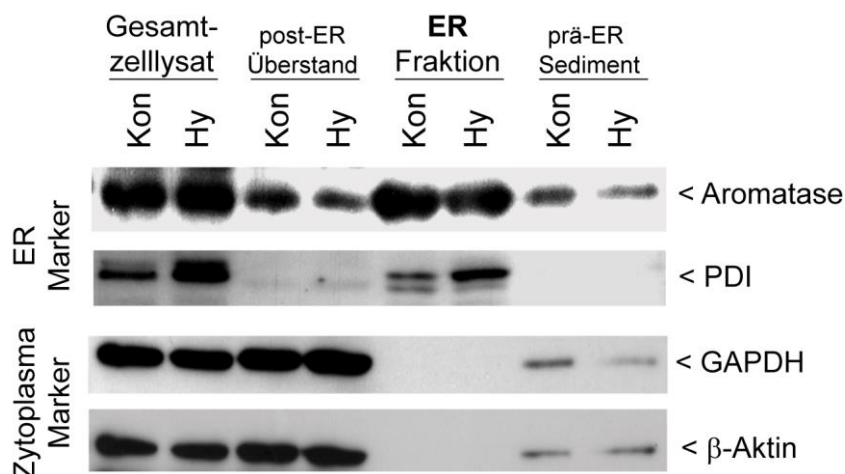


Abbildung 3. 3: Western Blots

von HT1080 Zellextrakten, nach 36-stündiger Inkubation bei 21% O₂ (Kontrolle), bzw. 0,5% O₂ (Hypoxie). Die Extraktion der Zellfraktionen erfolgte mittels Endoplasmic Reticulum Isolation Kit von SIGMA. Der Blot zeigt eine klare Anreicherung der ER Markerproteine Aromatase und PDI in der ER Fraktion. Die Zytoplasma Marker GAPDH und beta-Aktin konnten nur im prä-ER Sediment (enthält u.a. Mitochondrien) und im post-ER Überstand (enthält bspw. zytosolische Proteine) nachgewiesen werden. (Zum Aufarbeitungsschema vergleiche Abbildung 2.1.)

3.3. Globale Bestimmung der mRNA Lokalisation unter hypoxischen Bedingungen

3.3.1. Gruppen und Kriterien für die Datenanalyse

Gesamtzell-RNA sowie die gewonnenen ER Proben aus dem ER Isolation Kit (SIGMA) wurden mittels Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array analysiert. Für die vier Gruppen (1: Gesamt-RNA-Kontrolle; 2: Gesamt-RNA-Hypoxie; 3: ER-RNA-Kontrolle; 4: ER-RNA-Hypoxie) wurden jeweils drei unabhängige RNA-Proben gepoolt. Die Durchführung der Microarrays erfolgte an der Charité – Universitätsmedizin Berlin im Labor für funktionelle Genomforschung Charité (LGFC). Die Auswertung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Theoretische Biologie, Humboldt Universität zu Berlin.

Dabei wurden für die Selektion regulierter Gene zwei Ausschlusskriterien angewendet. Das statische Kriterium, der Fold-Change, bildet sich aus der x-fachen Veränderung der Hypoxie Arrays gegenüber den Kontrollen. Bei einem FC größer 1,4 gelten die Datenpunkte bzw. deren Gene als signifikant erhöht. Liegt der FC unter -1,4 werden deren Gene als reprimiert angesehen. Zusätzlich müssen signifikante Datenpunkte das dynamische Kriterium erfüllen. Sie müssen über

dem Schwellwert von 3 Standardabweichungen liegen ($z\text{-score} \geq 3$). Sind beide Kriterien erfüllt, ist das dazugehörige Gen als signifikant verändert anzusehen.

3.3.2. Verifizierung der Microarray Ergebnisse

Für eine qualitative Kontrolle der Hypoxiereaktion wurde die Liste exprimierter Gene nach HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) Zielgenen durchsucht. HIF-1 ist ein α/β -Dimer und fungiert als Transkriptionsfaktor, der spezifisch unter Sauerstoffmangel aktiviert wird. Typische HIF-1 Zielgene wurden unter anderem in einem *Nature Reviews Cancer* Artikel von Gregg L. Semenza zusammengefasst¹⁷ und für diese Überprüfung verwendet. In den Microarray Daten wurden 60 der 69 verifizierten HIF-1 Zielgene als „präsent“ nachgewiesen. 19 dieser 60 HIF-1 Zielgene (32%) waren unter Hypoxie (bei Berücksichtigung des Fold-Change & z-score) in den verwendeten HT1080 Fibrosarkomzellen und unter den gewählten Bedingungen reguliert (**Tabelle 3.1.**).

Tabelle 3. 1: Liste von HIF-1 α Zielgenen

und ihre x-fache Veränderung in Gesamt-RNA und am ER. Die HIF-1 α Zielgene wurden folgender Referenz entnommen:¹⁷. Werte, die als signifikant verändert anzusehen sind, wurden farbig unterlegt.

Gen Symbol, Name	x-fache Veränderung	
	Gesamt-RNA	ER-RNA
ALDOC, Aldolase C	3.99	3.93
BNIP3L, BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like	1.78	1.82
BNIP3, BCL2/Adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	3.81	3.29
CA9, carbonic anhydrase IX	8.82	5.00
CITED2, Cbp/p300-interacting transactivator, 2	1.86	2.11
CCNG2, cyclin G2	2.28	2.05
ETS1, v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	1.77	1.34
ENO2, enolase 2	5.80	3.28
GPI (AMF), glucose phosphate isomerase	2.08	1.83
GLUT1, glucose transporter 1	1.53	1.64
HK2, hexokinase 2	3.63	1.86
LRP1, low density lipoprotein-related protein 1	2.30	1.56
MMP9, matrix metalloproteinase 9	1.80	1.52
PFKL, phosphofruktokinase L	1.92	1.90
PGK 1, phosphoglycerate kinase 1	1.95	1.67
P4HA1, prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	3.56	2.29
TGF-alpha, transforming growth factor-alpha	1.56	1.37
VEGFC, vascular endothelial growth factor C	2.06	1.53
VIM, vimentin.	1.53	1.49

Diese transkriptionell aktivierten Gene kodieren für Proteine, die vor allem wichtig für den Glukosestoffwechsel, den Extrazellulär-Matrix Metabolismus, die Apoptose, pH Regulation und Angiogenese sind, d.h. die für das Überleben und die Funktion von Zellen essentiell sind. Eine Aktivierung von HIF-1 α , und somit Hypoxie, konnte im durchgeführten Experiment durch die erhöhte mRNA Menge von bekannten HIF-1 α Zielgenen bestätigt werden.

Darüber hinaus wurden die Microarray Ergebnisse stichprobenartig mittels Realtime PCR (qPCR) verifiziert. Insgesamt wurden acht Transkripte ausgewählt und nachgewiesen (**Abbildungen 3.4. & 3.5.**). Dabei sollte überprüft werden, ob die Kriterien zur Bestimmung „signifikant“ regulierter Gene im Microarray ($\pm 1,4$ -FC & z -score ≥ 3) in einer guten Näherung via qPCR nachgewiesen werden können. Für 6 der 8 Kandidaten konnte diese Annahme bestätigt werden. Im Fall von EGLN3 (egl nine homolog 3, alias HIF-prolyl hydroxylase 3 [PHD3]) zeigten sich zwar deutliche Unterschiede in der x-fachen Veränderung, die Signifikanzeinstufung sowie das Verhältnis zwischen Gesamt-RNA und ER-RNA war jedoch vergleichbar (**Abbildung 3.4.A**). Bei der Prolyl 4-hydroxylase β (P4HB) wurde bspw. mit beiden Methoden am ER unter Hypoxie eine signifikante Erhöhung der Transkriptmenge nachgewiesen – auf der Gesamt-RNA Ebene mit beiden Methoden nicht (**Abbildung 3.5.B**). Die beiden Ausnahmen stellten die Quantifizierungen der GAPDH mRNA, einem glykolytischem Enzym, und der BLID mRNA dar. GAPDH ist via Microarray unverändert, zeigte in der qPCR jedoch eine schwache, aber signifikante, Erhöhung (**Abbildung 3.4.D**). Die BLID mRNA ist entsprechend der qPCR am ER unter Hypoxie signifikant vermindert präsent, zeigte im Microarray jedoch nur einen verminderten Trend (**Abbildung 3.5.D**).

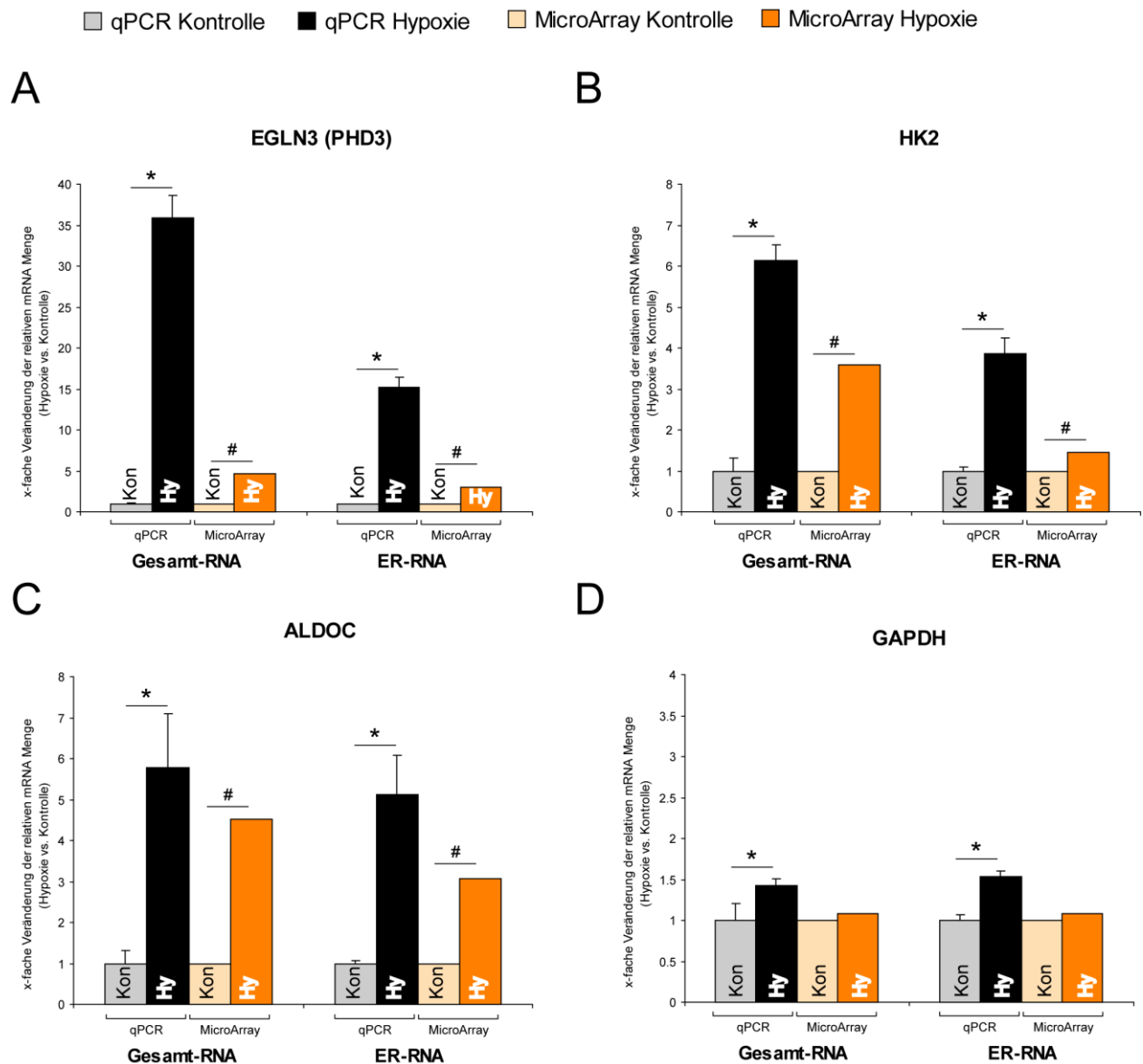


Abbildung 3. 4: Vergleich der mRNA-Konzentrationsänderung spezifischer Transkripte unter Hypoxie

mittels Microarray und Realtime PCR (qPCR). A-D: Gezeigt ist die auf Kontrolle (21% O₂ bezogene Veränderung der mRNA Konzentration unter Hypoxie (36 h, 0,5% O₂) von Gesamt-RNA und ER-RNA mittels qPCR und Microarray. * - signifikante Änderung, p<0,05 (t-Test). # - signifikant nach Ausschlusskriterien +/-1,4-FC & z-score ≥ 3 (vgl. 3.3.1.).

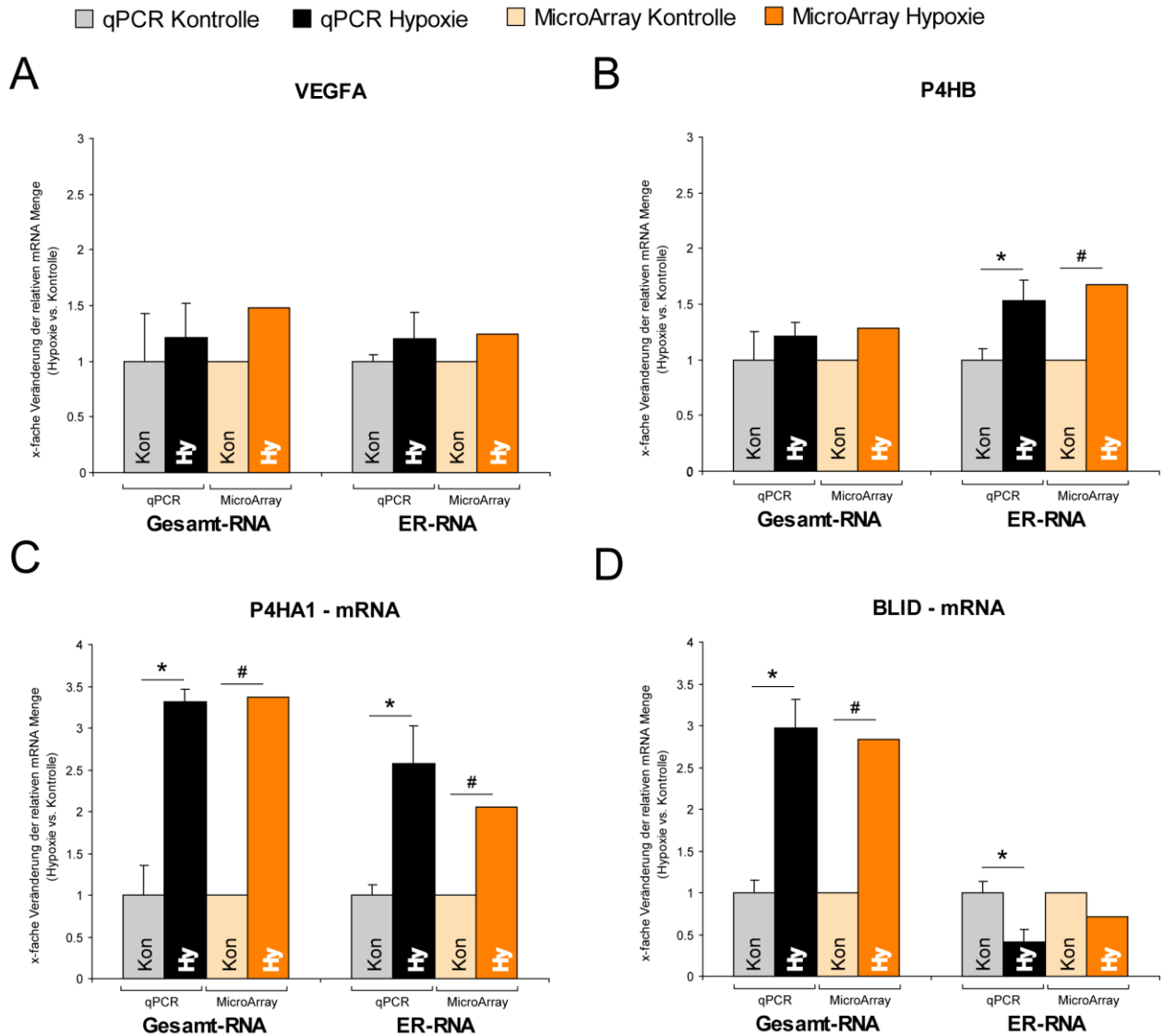


Abbildung 3. 5: Vergleich der mRNA-Konzentrationsänderung spezifischer Transkripte unter Hypoxie

mittels Microarray und Realtime PCR (qPCR). Die Darstellung ist analog zu Abbildung 3.4.

Die Ergebnisse deuten an, dass die mRNA Quantifizierung mittels Realtime PCR (zumindest in Einzelfällen) deutlich sensitiver ist. Insgesamt konnte jedoch eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden gezeigt werden, so dass die gewählten Selektionskriterien für „signifikant“ regulierte Gene im Microarray als geeignet angesehen wurden.

3.3.3. Allgemeine Betrachtung der globalen Veränderung in Genexpression / mRNA-Lokalisation unter Hypoxie

Bei der Gegenüberstellung von Hypoxie vs. Normoxie konnten signifikante Veränderungen in der Genexpression (Gesamtzellextrakte) sowie der mRNA Lokalisation am ER festgestellt werden.

In allen vier Gruppen (1: Gesamt-RNA-Kontrolle; 2: Gesamt-RNA-Hypoxie; 3: ER-RNA-Kontrolle; 4: ER-RNA-Hypoxie) wurden jeweils um die 14.800 Gene als präsent (exprimiert) abgebildet. Signifikant verändert unter Hypoxie waren (Ausschlusskriterien: +/-1,4 FC und z score ≥ 3 ; siehe Kapitel 2.3.) in „Gesamt“ 1.352 Gene und im „ER“ 1.174 Gene. Dementsprechend blieb die Genexpression in rund 90,8% der nachgewiesenen Kandidaten unverändert (präsent in „Gesamt“ 14.758 Gene). Am ER zeigten etwa 92,1% keine veränderte Lokalisation (präsent in „ER“ 14.851 Gene).

Von den 1.352 verändert exprimierten Genen aus „Gesamt-RNA“ wurden 615 (45,5%) hoch reguliert, bzw. 737 (54,5%) herab reguliert. Am ER waren 486 Gene (41,4%) verstärkt und 688 (58,6%) vermindert nachzuweisen (**Abbildung 3.6.**). Es konnte also eine ähnliche Anzahl an Genen ermittelt werden, die unter Hypoxie reguliert wurden und die am ER verändert lokalisiert waren.

Um zu überprüfen, ob bspw. hoch regulierte Gene auch verstärkt am ER wiedergefunden werden, wurde die Schnittmenge der Kandidaten aus Gesamt-RNA und denen, die am ER nachgewiesenen werden konnten, gebildet. Interessanter Weise erwies sich diese Schnittmenge als nicht sehr groß (**Abbildung 3.6.**). Bei den hoch regulierten Kandidaten betrug die Schnittmenge 190 (31%). D.h. 425 Gene (69%) wurden in den HT1080 Zellen unter Hypoxie hoch reguliert, blieben jedoch am ER unverändert. D.h. nur etwa 1/3 der Kandidaten wurde unter Hypoxie verstärkt exprimiert und war auch verstärkt am ER nachweisbar. Demgegenüber fanden sich 296 RNAs, die verstärkt am ER präsent waren, ohne dass sich ihre Menge insgesamt erhöhte.

Ähnliche Befunde wurden bei den herab regulierten Genen gefunden: Während 737 Gene in ihrer Expression gehemmt wurden, waren 50%, d.h. 370 RNAs, auch am ER erniedrigt. 318 Transkripte zeigten eine verminderte Präsenz am ER, obwohl sich ihre Gesamtmenge nicht veränderte (**Abbildung 3.6.**).

Diese Ergebnisse zeigen sehr klar, dass es eine selektive ER Lokalisation der Transkripte unter Hypoxie gibt.

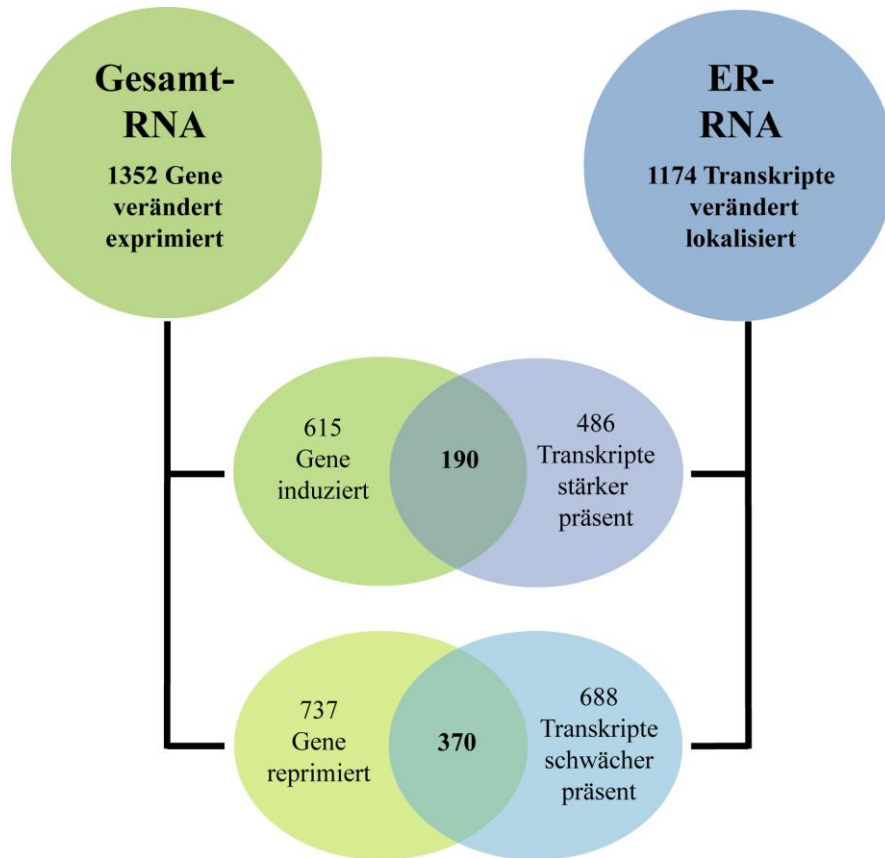


Abbildung 3. 6: VENN Diagramm

zur Darstellung der Anzahl unter Hypoxie veränderter Transkript-Mengen, bzw. der Transkript-Lokalisation. Die Ergebnisse für „Gesamt-RNA“ (veränderte Expression) und „ER-RNA“ (veränderte Lokalisation am ER) resultieren aus den Affymetrix Microarray Daten.

3.3.4. Functional Enrichment Analysis

Um herauszufinden, ob unter Hypoxie eine Anreicherung von Transkripten am ER stattfindet, die zu den gleichen Signalwegen gehören, wurde das „Web-based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt2)“ (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) mit der Funktion *Functional Enrichment Analysis* verwendet. In dieser Analyse werden die gruppenspezifischen ProbeSet IDs aus den Microarray Daten nach bekannten Kandidaten gefiltert, die in bestimmten Signalwegen relevant sind, d.h. in gleiche Signalwege der Zell-Expression bzw. -Funktion involviert sind. Findet sich eine Anreicherung von solchen Genen bzw. Faktoren, so wird davon ausgegangen, dass dieser Signalweg im Experiment aktiviert bzw. gehemmt ist.

WebGestalt2 nutzt unter anderem die öffentlichen Datenbanken von Pathway Commons und Wikipathways, um signifikante Kandidaten und Signalwege aus den Microarray Daten zu

ermitteln. Für die *Functional Enrichment Analysis* wurden die signifikant veränderten Gene bzw. deren ProbeSet IDs in sechs Gruppen unterteilt:

1. Nur Gesamt-RNA erhöht,
2. Gesamt-RNA und ER-RNA erhöht,
3. Nur ER-RNA erhöht,
4. Nur Gesamt-RNA vermindert,
5. Gesamt-RNA und ER-RNA vermindert,
6. Nur ER-RNA vermindert.

3.3.4.1. Gruppe induzierter Gene

Insgesamt findet man 911 Gene in den Microarrays, die auf mRNA Ebene unter Langzeithypoxie hoch reguliert werden. In der Gruppe „Nur Gesamt-RNA erhöht“ befinden sich 425 Gene, die überwiegend Einfluss auf die Adipogenese, Cholesterol Biosynthese und den Interleukin-3 Signalweg nehmen (**Tabelle 3.2.**). Interleukin-3 wird vor allem im Zusammenhang mit Inflammation und Immunreaktion diskutiert. „Nur ER-RNA erhöht“ (296 Gene) sind vor allem Signalwege, die Einfluss auf Translationsfaktoren haben. Diese Signifikanz weist auf eine erhöhte Translationsaktivität hin. In der geringen Schnittmenge zwischen „Gesamt-RNA“ und „ER-RNA“ sind 190 Gene induziert. Es finden sich in „Gesamt-RNA und ER-RNA erhöht“ typische Hypoxie-Signalwege, wie HIF-1 α Kaskade, Glykogen Metabolismus und Glykolyse (**Tabelle 3.2.**). Diese Prozesse sind essenziell für das Überleben des Fibroblasten unter Sauerstoffmangel.

Tabelle 3. 2: Pathway Enrichment Analysis induzierter Gene

(C) Anzahl der Referenzgene dieser Kategorie; (O) Anzahl der Gene in der übermitteltem Gruppe die auch in dieser Kategorie enthalten sind; (E) erwartete Anzahl in dieser Kategorie entsprechend der übermittelten Gruppengröße; (R) Ratio der Anreicherung; (rawP) p Wert Hypergeometrischer Test; (adjP) bereinigter p-Wert nach *Multiple-test adjustment*.

Pathway Enrichment Analysis		
Nur Gesamt-RNA erhöht	Cholesterol biosynthesis	C=26;O=4;E=0.30;R=13.41; rawP=0.0002;adjP=0.0242
	IL-3 Signaling Pathway	C=97;O=6;E=1.11;R=5.39; rawP=0.0009;adjP=0.0135
	Adipogenesis	C=128;O=6;E=1.47;R=4.09; rawP=0.0036;adjP=0.0360
Gesamt-RNA & ER-RNA erhöht	HIF-1-alpha transcription factor network	C=64;O=10;E=0.33;R=30.13; rawP=1.06e-12;adjP=5.94e-11
	Hypoxic and oxygen homeostasis regulation of HIF-1-alpha	C=77;O=10;E=0.40;R=25.04; rawP=7.28e-12;adjP=2.04e-10
	Glycolysis and Gluconeogenesis	C=41;O=4;E=0.21;R=18.81; rawP=5.95e-05;adjP=0.0002
	Glycogen Metabolism	C=35;O=2;E=0.18;R=11.02; rawP=0.0142;adjP=0.0284
	T Cell Receptor Signaling Pathway	C=130;O=3;E=0.67;R=4.45; rawP=0.0302;adjP=0.0403
Nur ER-RNA erhöht	Translation Factors	C=50;O=2;E=0.15;R=13.16; rawP=0.0101;adjP=0.0101

3.3.4.2. Gruppe reprimierter Gene

Unter den insgesamt 1055 herab regulierten Genen im Fibroblasten findet sich eine Anreicherung von Genen mit Beteiligung an 28 verifizierten Pathway Commons Signalwegen. Tabelle 3.3. zeigt die am stärksten gehemmten Signalwege. In „Gesamt-RNA und ER-RNA vermindert“ (370 Gene) sind Signalwege reprimiert, die den Zellzyklus, das RNA-Prozessieren, die oxidative Phosphorylierung und die Atmungskette betreffen. Auch „Nur ER-RNA vermindert“ weist Gene auf, die Einfluss auf den Zellzyklus haben. Außerdem werden Transkriptionsfaktoren, das mRNA-Prozessieren sowie Translationsfaktoren beeinflusst. Nicht am ER, aber im ganzen Fibroblasten („Nur Gesamt-RNA vermindert“) ist vor allem die Proteasomdegradation und der Aminosäure-Umsatz betroffen. Alles in allem sieht man eine klare Deprivation Energie- und Sauerstoff-verbrauchender Prozesse.

Tabelle 3. 3: Pathway Enrichment Analysis reprimierter Gene

Beschreibung siehe Legende Tabelle 3.2.

Pathway Enrichment Analysis		
Nur Gesamt-RNA vermindert	Metabolism of amino acids	C=346;O=21;E=7.70;R=2.73; rawP=3.53e-05;adjP=0.0102
	Proteasome Degradation	C=58;O=7;E=1.29;R=5.42; rawP=0.0003;adjP=0.0192
Gesamt-RNA & ER-RNA vermindert	Cell Cycle, Mitotic	C=286;O=50;E=7.72;R=6.48; rawP=2.36e-26;adjP=9.79e-24
	Metabolism of amino acids	C=346;O=49;E=9.33;R=5.25; rawP=1.13e-21;adjP=2.34e-19
	M Phase	C=144;O=32;E=3.88;R=8.24; rawP=1.56e-20;adjP=2.16e-18
	DNA Replication	C=108;O=27;E=2.91;R=9.27; rawP=6.12e-19;adjP=4.23e-17
	Assembly of the pre-replicative complex	C=102;O=26;E=2.75;R=9.45; rawP=1.63e-18;adjP=9.66e-17
	G1/S Transition	C=124;O=28;E=3.35;R=8.37; rawP=2.56e-18;adjP=1.33e-16
	mRNA processing	C=121;O=14;E=3.26;R=4.29; rawP=4.89e-06;adjP=8.97e-05
	Oxidative phosphorylation	C=51;O=9;E=1.38;R=6.54; rawP=7.83e-06;adjP=0.0001
	Electron Transport Chain	C=89;O=9;E=2.40;R=3.75; rawP=0.0007;adjP=0.0055
	TCA Cycle	C=31;O=5;E=0.84;R=5.98; rawP=0.0013;adjP=0.0089
Nur ER-RNA vermindert	Cell Cycle, Mitotic	C=286;O=39;E=6.97;R=5.60; rawP=2.08e-18;adjP=7.32e-16
	M Phase	C=144;O=26;E=3.51;R=7.41; rawP=1.17e-15;adjP=2.06e-13
	Transcription	C=319;O=27;E=7.77;R=3.47; rawP=2.18e-08;adjP=1.28e-06
	G2/M Checkpoints	C=113;O=15;E=2.75;R=5.45; rawP=1.03e-07;adjP=3.63e-06
	mRNA processing	C=121;O=11;E=2.95;R=3.73; rawP=0.0002;adjP=0.0070
	Translation Factors	C=50;O=6;E=1.22;R=4.93; rawP=0.0013;adjP=0.0152
	Proteasome Degradation	C=58;O=6;E=1.41;R=4.25; rawP=0.0028;adjP=0.0196

3.3.5. Veränderung der Genexpression/ Lokalisation von non-coding RNAs unter Hypoxie

MicroRNAs sind non-coding RNAs, die aus 20-24 Nukleotiden bestehen. Sie binden an die 3'UTR ihrer Ziel-RNA und destabilisieren sie oder blockieren deren Translation. In allen vier Gruppen (1: Gesamt-RNA-Kontrolle; 2: Gesamt-RNA-Hypoxie; 3: ER-RNA-Kontrolle; 4: ER-RNA-Hypoxie) sind insgesamt 44 microRNAs (MIR) präsent (**Tabelle 3.4.**). Induziert sind im gesamten Fibroblasten nur 6,8% (MIR21, MIR196a-1, MIR221). Nur am ER erhöht ist MIR519a-2. Außerdem weisen 4 weitere miRNAs eine deutliche Präsenz am ER unter Kontrollbedingungen auf. Das sind rund 9,1% aller als präsent nachgewiesenen miRNAs. Funktionell spielen MicroRNAs eine entscheidende Rolle bei der Entartung diverser Tumore.

Tabelle 3. 4: miRNAs und ihre x-fache Veränderung in Gesamt-RNA und am ER. Werte, die als signifikant verändert anzusehen (+/-1,4 FC & z-score ≥ 3) sind, wurden farbig unterlegt. miRNAs in roter Schrift zeigen eine deutliche ER Lokalisation unter Kontrollbedingungen.

Gen Symbol	x-fache Veränderung	
	Gesamt-RNA	ER-RNA
MI0000342 Homo sapiens miR-200b stem-loop	1.05	1.06
MI0000239 Homo sapiens miR-197 stem-loop	1.32	1.26
ncrna:miRNA chromosome:ENSG00000221146	1.25	1.64
MIR34A	1.17	1.38
MI0000290 Homo sapiens miR-214 stem-loop	1.28	1.00
MI0000281 Homo sapiens miR-199a-2 stem-loop	1.04	1.27
MI0000114 Homo sapiens miR-107 stem-loop	-1.01	-
MI0000286 Homo sapiens miR-210 stem-loop	1.31	1.28
MI0000732 Homo sapiens miR-194-2 stem-loop	1.31	1.13
MI0000261 Homo sapiens miR-139 stem-loop	1.08	1.16
MI0000808 Homo sapiens miR-326 stem-loop	1.26	1.25
MI0003636 Homo sapiens miR-622 stem-loop	1.19	1.20
MI0000474 Homo sapiens miR-134 stem-loop	1.13	1.13
MI0000287 Homo sapiens miR-211 stem-loop	1.28	-1.04
MI0001445 Homo sapiens miR-423 stem-loop	1.33	1.21
MI0000487 Homo sapiens miR-193a stem-loop	1.17	1.60
MIR21	2.14	-1.22
MI0000449 Homo sapiens miR-132 stem-loop	1.11	-
MI0000288 Homo sapiens miR-212 stem-loop	1.26	1.34
MI0000238 Homo sapiens miR-196a-1 stem-loop	1.71	-1.19
MI0000274 Homo sapiens miR-187 stem-loop	1.30	1.39
MI0005529 Homo sapiens miR-220b stem-loop	1.04	1.45
MI0000271 Homo sapiens miR-181c stem-loop	1.18	1.12
MI0000746 Homo sapiens miR-99b stem-loop	1.20	1.23
MI0003182 Homo sapiens miR-519a-2 stem-loop	-1.04	3.86
MI0000085 Homo sapiens miR-27a stem-loop	1.44	-
MI0000079 Homo sapiens miR-23a stem-loop	1.57	1.29
MI0000803 Homo sapiens miR-330 stem-loop	1.19	-
MI0000479 Homo sapiens miR-150 stem-loop	1.27	1.12
MI0000478 Homo sapiens miR-149 stem-loop	1.28	1.24
MI0000783 Homo sapiens miR-375 stem-loop	1.07	1.06
MI0000482 Homo sapiens miR-185 stem-loop	1.09	1.40
MI0000476 Homo sapiens miR-138-1 stem-loop	1.28	1.46
MI0000465 Homo sapiens miR-191 stem-loop	1.01	-
ncrna:miRNA chromosome:ENSG00000221243	1.19	1.58
MI0000815 Homo sapiens miR-339 stem-loop	1.25	1.20
MI0000082 Homo sapiens miR-25 stem-loop	1.28	1.11
MI0000542 Homo sapiens miR-320a stem-loop	1.22	1.46
ncrna:miRNA chromosome:ENSG00000211510	1.29	1.06
MI0000262 Homo sapiens miR-147 stem-loop	1.21	-
ncrna:miRNA chromosome:ENSG00000221651	-1.41	-1.09
MI0000298 Homo sapiens miR-221 stem-loop	2.59	1.34
MI0000297 Homo sapiens miR-220a stem-loop	-1.19	1.34
MI0003188 Homo sapiens miR-503 stem-loop	-1.08	1.25

Darüber hinaus sind 70 der 625 im Fibroblasten induzierten Gene weitere non-coding RNAs (**Tabelle 3.5.**). Unter den 737 reprimierten („Gesamt-RNA“) befinden sich nur 4 ncRNAs. Interessant ist, dass eine signifikant erhöhte Menge an ncRNAs ans ER rekrutiert wird („Nur ER-RNA erhöht“ = 113) ohne in „Gesamt“ induziert zu werden. Sie bilden 38,2% aller ans ER rekrutierten mRNAs und scheinen damit einen entscheidenden Einfluss auf die unter Hypoxie ablaufenden Prozesse am Endoplasmatischen Retikulum zu haben.

Tabelle 3. 5: Zusammenfassung der Anzahl regulierter Gene unter Einbezug der non-coding RNAs

Beschreibung siehe Legende Tabelle 3.4.

Gruppe	Anzahl				Protein-kodierend
	Gene	miRNAs	ncRNAs	[%]	
Nur Gesamt-RNA erhöht	425	3	64	[15.1]	358
Gesamt-RNA & ER-RNA erhöht	190	0	6	[3.2]	184
Nur ER-RNA erhöht	296	1	113	[38.2]	182
Nur Gesamt-RNA vermindert	367	0	4	[1.1]	363
Gesamt-RNA & ER-RNA vermindert	370	0	0	[0]	370
Nur ER-RNA vermindert	318	0	1	[0.3]	317

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des rauen Endoplasmatischen Retikulums für die aktive Proteinbiosynthese unter Hypoxie untersucht werden.

Hypoxie spielt eine wichtige Rolle in der pränatalen Entwicklung sowie der postnatalen Physiologie und Pathologie. In der Embryogenese sind alle Zellen permanent einem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) zwischen 0,5 und 30 mmHg (entspricht ~1-5% O_2) ausgesetzt⁵¹, was zur dauerhaften Aktivierung Hypoxie-sensitiver Signalwege führt. Dabei nehmen sie Einfluss beispielsweise auf die Bildung von Knochen, Knorpel, Gefäßen, Blut sowie auf das angeborene Immunsystem⁵².

In der Literatur werden Hypoxie-induzierte Kaskaden vorwiegend im Zusammenhang mit der Tumorgenese beschrieben^{17, 53}. Aufgrund der hohen Proliferationsrate der Tumorzellen können sich hypoxische Areale bilden, welche Angio- und Vaskulogenese aktivierende Signalstoffe aussenden. Dabei kommt es oft zu fehlerhafter oder unvollständiger Gefäßbildung, wodurch u.a. wiederum die Hypoxie begünstigt wird. Am Beispiel von Brustkrebs zeigt sich die prognostische Aussagekraft der Hypoxie und ihrer aktivierten Faktoren. Normalerweise beträgt der pO_2 in der Mamma (Brust) mehr als 60 mmHg. Im Mammakarzinom finden sich meist Werte um die 10 mmHg. Sinkt der Wert unter 10 mmHg, steigt das Risiko für Metastasierung und Letalität⁵⁴.

Die Sauerstoffwahrnehmung und Aktivierung Hypoxie-sensitiver Kaskaden erfolgt dabei auf Zellebene. Zum einen werden Sauerstoff-abhängige Enzyme in ihrer Aktivität verändert, zum anderen wird auf das hypoxische Umfeld mit einer veränderten Genexpression reagiert. Zur Anpassung der Zellen an die veränderten, hypoxischen, Bedingungen, muss jedoch die Neusynthese überlebenswichtiger Proteine, bspw. glykolytischer Faktoren, initiiert werden. Bisher wurde die aktive mRNA Translation durch die Polysomengradientenanalyse untersucht. Auf diese Weise kann die Anzahl der Ribosomen pro Transkript bestimmt werden, welche als Maß für die Translationsrate angesehen wird. Wie viele Ribosomen zeitgleich eine mRNA translatieren, wird hauptsächlich über den Prozess der Translationsinitiation reguliert⁵⁵. In der Polysomengradientenanalyse zeigt sich unter Hypoxie eine deutliche Abnahme der allgemeinen mRNA Menge in Polysomenkomplexen (Transkripte, die mit Ribosomen besetzt sind und daher aktiv translatiert werden), was als globale Hemmung der Proteinsynthese gedeutet wird. Demgegenüber zeigt sich eine deutliche Zunahme bei 80S Monosomen sowie den 60S und 40S

Ribosomenuntereinheiten, was allgemein als Disaggregation der Polysomenkomplexe gewertet wird. Ein großer Teil der Transkripte liegt unter anhaltender Hypoxie als Ribonukleoprotein (RNP) Komplex vor¹⁰ und ist demnach translationsinaktiv. In Untersuchungen an PC-3 Zellen konnten unter Hypoxie jedoch auch Transkripte nachgewiesen werden, die entgegen der allgemeinen Disaggregation der Polysomenkomplexe weiterhin stabil mit Ribosomen besetzt sind⁵⁶. 71 mRNAs, darunter unter anderem Ribonuclease, Laktatdehydrogenase A und Procollagen-Prolin, zeigten eine Anreicherung an Polysomen, jedoch keine Erhöhung des Proteinniveaus. Thomas & Johannes deuteten dieses Phänomen als eine Kompensation der ineffektiven Translationsrate der freien Polysomen im Zytosol.

Bei den zahlreichen Polysomengradientenanalysen, die zur Untersuchung der aktiven Proteinbiosynthese unter Hypoxie durchgeführt wurden, betrachtete man jedoch ausschließlich die freien – zytoplasmatischen - Polysomen. Das Endoplasmatische Retikulum, als Proteinsyntheseort, wurde dabei nicht berücksichtigt. Die Bedeutung des Endoplasmatischen Retikulums für die globale Proteinbiosynthese wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Etabliert ist die Annahme, dass die Translationsinitiation aller mRNAs im Zytosol startet und dass dieser Komplex, der mRNAs sekretorischer sowie membranständiger Proteine enthält, mittels eines als signal recognition particle (SRP) bezeichneten Signalweges an das rER rekrutiert wird um dort weiter translatiert zu werden⁵⁷⁻⁵⁹. Es konnte kürzlich jedoch gezeigt werden, dass unter Normalbedingungen etwa 30% aller mRNAs am ER translatiert werden⁴². Dabei kodieren viele dieser mRNAs auch für zytosolische und Kernproteine⁶⁰. Der andere, SRP-unabhängige, Weg ist die Ribosomen-unabhängige Direktrekrutierung. Dieses könnte beispielsweise über eine ER ständige mRNA oder über einen RNA Bindungsrezeptor erfolgen⁶¹. Interessanterweise konnte eine 2,5 bis 4-fach höhere Proteinsyntheserate am ER gegenüber der Translation im Zytosol an sogenannten freien Polysomen (RNA-Ribosomen-Komplexe) nachgewiesen werden⁶². Diese Befunde deuten an, dass die Rolle des Endoplasmatischen Retikulums in der Proteinsynthese mehr umfasst als die reine Translation sekretorischer und Membranproteine.

Um einen ersten Eindruck über die Verteilung der mRNA in einer hypoxischen Zelle zu erhalten, wurde in dieser Arbeit das Zelllysate aus humanen Fibrosarkomzellen (HT1080) nach einer zwei-minütigen Kurzzeit-Lyse (siehe Kapitel 2.2.1.) in zwei Kompartimente fraktioniert. Das Sediment setzte sich unter anderem aus Zellkernen, Mitochondrien und Endoplasmatischen

Retikulum zusammen. Der Überstand, welcher in ähnlicher Form auch für die Polysomengradientenanalyse verwendet wird, bestand aus zytosolischen Proteinen und freien Polysomen. In beiden Zellfraktionen, Zytosol und ER-haltig, sowie in Ganzzelllysaten wurden die Hypoxiemarker HIF-1 α und Hexokinase2 sowie das Referenzgen β -Aktin nachgewiesen.

Die gesamt- β -Aktin mRNA Konzentration sinkt in HT1080 Zellen unter Hypoxie. Darüber hinaus kommt es zu einer Verlagerung der Transkriptkonzentration ins Zytosol. Dieses Ergebnis konnte auch in MCF-7 Zellen gezeigt werden⁵⁰.

Die mRNAs der Hypoxie-sensitiven Gene HK2 und HIF-1 α zeigten beide eine verstärkte Präsenz am ER unter Hypoxie. Während die Hexokinase2 mRNA Konzentration proportional auch im gesamten Fibroblasten ansteigt, bleibt die HIF-1 α mRNA Menge insgesamt unverändert. Die Zunahme der in der Zelle vorhandenen HIF-1 α mRNA am ER lässt sich durch eine Abnahme der Konzentration im Zytosol erklären. Bisher wurde die erhöhte Konzentration an HIF-1 α Protein ausschließlich auf die Unterbrechung der Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Degradation zurückgeführt. Einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinmenge könnte nach diesen Ergebnissen aber auch eine gesteigerte Translationsrate aufgrund der Translokation der HIF-1 α mRNA zum Endoplasmatischen Retikulum haben.

Ein weiterer Hypoxie-induzierter Faktor ist die Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase α (I). Ihre mRNA Konzentration war unter Hypoxie stark gestiegen. Diese Erhöhung konnte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Fähling beschrieb 2006, dass die Proteinmenge an P4H α (I) im zeitlichen Verlauf stärker anstieg als deren mRNA Menge⁴⁰. D.h. die Translation unter Hypoxie ist effektiver. In den hier dargestellten Versuchen konnte vor allem eine stärkere Präsenz am ER gegenüber dem Zytosol gezeigt werden, was die aktive und erhöhte Translation am ER andeutet.

Ein weiterer getesteter Kandidat ist der Apoptosefaktor BLID (BH3-like motif-containing cell death inducer), dessen mRNA Menge in HT1080 Zellen unter Hypoxie induziert ist. Am ER zeigte sich jedoch keine signifikante Konzentrationsänderung im Vergleich zu Normoxie. Auch auf Proteinebene konnte keine Zunahme von BLID nachgewiesen werden. Die globale Erhöhung der mRNA kann als Kompensation für die ineffektive Translationsrate im Zytosol hypoxischer Zellen angenommen werden, was auch schon von Thomas & Johannes in ihren Versuchen an PC-3 Zellen postuliert wurde⁵⁶. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Anreicherung von BLID mRNA im Zytosol, eine Vorbereitung auf eine mögliche Apoptose darstellt. Da der größere Anteil der BLID mRNA als translations-inaktiver RNP-Komplex vorliegt, ist eine schnelle Aktivierung der Translation, unabhängig von der Initiierung der Transkription, möglich und

kann eine sehr schnelle Erhöhung der BLID Proteinmenge bewirken. Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass eine erhöhte mRNA Konzentration nicht mit einem Anstieg an Protein korrelieren muss.

Die These einer Verlagerung der aktiven Translation ans Endoplasmatische Retikulum wurde in Kooperation auch durch Untersuchungen der Experimental Research Unit der RHTW Aachen Universität gestützt. Durch Immunfluoreszenzfärbung und In-situ-Hybridisierung (IS-FISH) konnte eine ER-Bindung (ER-Marker: Calnexin) der Hypoxie-induzierten mRNAs von VEGF-A, HIF-1 α und C-P4Ha(I) nachgewiesen werden. Die Bindung an Ribosomen des ER konnte durch die Co-Lokalisation zu rpL19, einem ribosomalen Protein der 60S Untereinheit, bestätigt werden (unpublizierte Daten Staudacher et al.). Es wurden weiterhin β -Aktin und BLID mRNAs getestet. Diese zeigten, wie auch schon in den hier präsentierten Versuchen, eine verminderte Co-Lokalisation zu Calnexin und rpL19, was eine Abnahme der mRNA Konzentration am ER zeigt. Diese Resultate bestätigen unabhängig von den hier präsentierten Ergebnissen, dass eine erhöhte Genexpression Hypoxie-induzierter Gene mit einer selektiver Translation am ER assoziiert sind.

Bis hierhin kann bestätigt werden, dass ausgewählte Kandidaten (HIF-1 α , P4HA1, HK2), die als Hypoxie-induzierbare Gene verifiziert sind, unter Hypoxie eine erhöhte Präsenz am ER aufweisen. Andere Kandidaten (β -Aktin, BLID) zeigen diese verstärkte Anreicherung am ER nicht, so dass eine regulierte mRNA Lokalisation am ER unter Hypoxie angenommen werden kann.

Um die Rolle des Endoplasmatischen Retikulums für die hypoxische Proteinbiosynthese und eine eventuelle Translokation der mRNA Translation ans ER nachweisen zu können, wurde der globale Zusammenhang zwischen Genexpression (Gesamt-RNA) und der mRNA/ ER-Lokalisation mittels Microarray Analyse betrachtet.

Zunächst wurde anhand typischer HIF-1 Zielgene die Hypoxieantwort der Genexpression in den verwendeten HT1080 Zellen qualitativ kontrolliert. HIF-1 aktiviert die Genexpression durch Bindung an hypoxia response elements (HREs) in der Zielgen-Promoterregion. Insgesamt sind bisher ca. 4000 Promoterregionen die HREs enthalten bekannt⁶³. Diese potenziellen Bindungsstellen können aufgrund von Acetylierung und Demethylierung der Histonenkonfiguration frei oder versperrt sein. Unter Hypoxie wirkt auch die Stärke und Dauer des Sauerstoffmangels auf diese Konfiguration. Die unterschiedliche Aktivierung der HIF-1

Zielgene ist somit zelltypspezifisch. Semenza fasste in einem Übersichtsartikel 69 verifizierte HIF-1 Zielgene zusammen¹⁷. 60 dieser Gene wurden in den HT1080 Zellen exprimiert. 32% (19 von 60) wurden im hier durchgeführten Versuch signifikant unter Hypoxie induziert und stellen vor allem Gene des Glukosestoffwechsels, der Extrazellulär-Matrix, der Apoptose, der pH Regulation und der Angiogenese dar. Eine Aktivierung typischer HIF-1 Zielgene und die stattgefunden Hypoxiereaktion konnte damit als bestätigt angesehen werden. Nachfolgend wurde die Gesamt RNA aus Kontroll- und hypoxischen Zellen extrahiert um das allgemeine Expressionsverhalten darzustellen. Zur Darstellung der ER-Lokalisation wurde zunächst das ER der Zellen isoliert und anschließend die RNA extrahiert.

Als signifikant verändert wurden Datenpunkte angesehen, die das statische (Fold-Change, FC +/-1,4) und das dynamische (Z-score ≥ 3) Kriterium erfüllen. Zur Überprüfung dieser Signifikanzkriterien wurden mittels Realtime PCR (qPCR) acht ausgewählte Einzelkandidaten untersucht. Insgesamt wurde eine gute Übereinstimmung gefunden, wobei die qPCR sensitiver erscheint. Die für die Microarray Analyse getroffenen Signifikanzkriterien konnten als geeignet angenommen werden.

In der Microarray Analyse waren über 90% der exprimierten Gene unter Hypoxie nicht verändert, bzw. deren mRNA Konzentration blieb konstant. Signifikant verändert waren näherungsweise gleich viele Kandidaten (hochreguliert Gesamt-RNA 45,5%, bzw. ER-RNA 41,4%; herunterreguliert Gesamt-RNA 54,5%, bzw. ER-RNA 58,6%). Der überwiegende Teil der regulierten Gene wurde demnach in der Expression vermindert.

Besonders interessant ist, dass die Schnittmenge aus verstärkt exprimierten Genen (Gesamt-RNA) und RNAs, die unter Hypoxie verstärkt am ER lokalisiert waren, mit nur 31% sehr gering ausfällt. 69% der Hypoxie-aktivierten Gene blieben am ER unverändert. Demgegenüber waren 61% (296 mRNAs) stärker am ER lokalisiert, obwohl sich ihre Gesamtmenge nicht änderte. Ähnliche Verteilung konnte auch bei den reprimierten Genen (Schnittmenge 50%) gezeigt werden. Aufgrund der geringen Schnittmenge induzierter (bzw. reprimierter) Gene, die sowohl auf der Expressionsebene als auch in ihrer ER-Lokalisation erhöht (bzw. vermindert) waren, kann man eine selektive Transkriptlokalisierung am ER unter Hypoxie annehmen.

Um eine Einschätzung der Bedeutung dieser selektiven mRNA-Verteilung nachzugehen, wurde mittels Functional Enrichment Analysis nach Gemeinsamkeiten der Kandidaten in ihrer Funktion sortiert. Dabei wurde nach einer Anreicherung von signifikanten Genen in einer

Gruppe gesucht, die denselben Signalwegen zugeordnet werden. Es wurden Gene nach ihrer Expression sowie ihrer Lokalisation am Endoplasmatischen Retikulum unterschieden.

Eine Anreicherung von Kandidaten, die bekanntermaßen unter Hypoxie effektiv translatiert werden, konnte in der Gruppe gefunden werden, die sowohl verstärkt exprimiert als auch verstärkt am ER unter Hypoxie lokalisiert war. Kennzeichnend waren Gene Ontologies wie „Hypoxia response“, „Glycolysis“ oder „HIF-1 transcription factor network“. Die Genexpression genau dieser Kandidaten wurde in einer Vielzahl von Publikationen als verstärkt beschrieben und kann daher als „aktiv translatiert“ angenommen werden ^{40, 64}.

Für den Fibroblasten überlebenswichtig und deshalb auch in der Gesamtkonzentration an mRNA und speziell am ER induziert, waren vor allem Gene des HIF-1 α Signalweges, der Glykolyse, der Glukoneogenese und des Glykogen Metabolismus. Auch induziert unter Hypoxie, aber nicht am ER lokalisiert, waren Gene, die an der Fettumsetzung sowie am Cholesterolumsatz und am Interleukin 3 Signalweg beteiligt sind. Lokale Hypoxie kann zu Entzündung des umliegenden Gewebes führen ⁶⁵. Der Interleukin 3 Signalweg ist unter anderem an dieser Inflammationsreaktion sowie der T-Zell-gesteuerten Immunantwort beteiligt ⁶⁶. Interessant ist, dass für Zellen wie den HT1080 Fibroblasten, die nicht an solchen Reaktionen mitwirken, der Hypoxie-induzierte Signalweg Interleukin 3 aktiviert wird. Die transkribierte mRNA aber nicht an den translationseffektiven Locus ER transportiert wird. Es ist bekannt, dass Hypoxie eine ganze Kaskade an Genen aktiviert. Die Translokation ans ER kann bei dieser Aktivierung einen möglichen Filter für die zelltypspezifische Adaptation der Genexpression an Sauerstoffmangel darstellen. Aktivierte Gene, die nicht der zelltypspezifischen Funktionen dienen, werden ins translations-ineffektive Zytosol abgeschoben.

Herunterreguliert wurden vor allem Signalwege der Zellteilung, der oxidativen Phosphorylierung und der Atmungskette, was die typische Reaktion einer Zelle unter Sauerstoffmangel zeigt. MRNAs, die für Translationsfaktoren codieren, finden sich sowohl in der Gruppe „Nur ER-RNA vermindert“ sowie in „Nur ER-RNA erhöht“, was als NeufORMATIERUNG aufgrund der globalen Hemmung interpretiert werden kann. Eine Erklärung wäre das Umschalten am ER auf alternative Translationsinitiationsmechanismen aufgrund der hypoxischen Unterdrückung der regulären 5'-cap-abhängigen Initiation. Ein viel beschriebener Alternativweg ist die Translationsinitiation via Internal Ribosome Entry Sites (IRES) ⁶⁷. Die ribosomale 40S Untereinheit bindet dabei an die IRES Struktur durch Vermittlung von

sogenannten IRES transacting Faktoren (ITAFs). Bekannte Hypoxie-sensitive Gene, die IRES Elemente in ihrer 5'UTR aufweisen, sind VEGF A und HIF-1 α ^{36, 68}. IRES allein erklärt jedoch nicht die translatorische Kapazität hypoxischer Zellen. Eine weitere Möglichkeit die Translation einzuleiten beschrieb Uniacke. Ein Initiationskomplex aus dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E2 (eIF4E2), HIF-2 α und RNA Bindungsprotein (RBM4) lagert sich an die „hypoxia response element“ (HRE) Region der zu translatierenden mRNA an und assembliert mit deren 5'cap-Ende. Die Translation beginnt ⁶⁹. Dieser Mechanismus selektiert während eines Sauerstoffmangels durch Anlagerung an die HRE Region die Hypoxie-sensitiven mRNAs.

Die Hemmung der unter Normalbedingungen stattfindenden 5'cap-abhängigen Initiation mit Coxsackie B Viren (CBV) Infektion zeigte die zu erwartende Hemmung der Proteinbiosynthese im Zytosol, jedoch eine stabile Translationsrate am ER ⁷⁰. CBV spaltet den Translationsinitiationsfaktor eIF4G sowie das polyA-Bindungsprotein. Es konnte die Disassemblierung der zytosolischen Polysomen post contagionem gezeigt werden. ER-gebundene Ribosomen blieben währenddessen weiter mit der zu translatierenden mRNA assoziiert. Außerdem standen einige Ribosomen nach Termination der Neusynthese weiterer Proteine zur Verfügung unabhängig von der Anwesenheit einer *signal recognition particle* (SRP) vermittelten mRNA Signalsequenz.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Genexpression überlebenswichtiger, z.T. HIF-1 abhängiger Prozesse, wie bspw. die Glykolyse, in hypoxischen Zellen gesteigert ist und dass diese Induktion mit einer gesteigerten mRNA Präsenz am ER korreliert ist. Es liegt demnach nahe, dass die Proteinsynthese unter Hypoxie vorrangig am ER stattfindet. Ob Mechanismen wie die IRES- oder 4E2:HIF-2 α :RBM4 Komplex abhängige Translationsinitiation bevorzugt am ER oder im Zytoplasma wirksam sind, muss in weiteren Studien geklärt werden. Dazu könnte bspw. eine Quantifizierung der HIF-2 α oder RBM4 Proteinmenge in der ER Fraktion nach Hypoxie dienen.

Ein weiterer post-transkriptioneller Regulationsfaktor, dem unter Hypoxie immer mehr Bedeutung zukommt, ist die microRNA (miRNA). Hierbei handelt es sich um kurze, nicht kodierende RNAs, die an bestimmten Stellen der 3'UTR der Ziel-mRNA binden und dessen Degradation oder Translationshemmung bewirken ⁷¹. Zur Zeit wird geschätzt, dass etwa 30% des humanen Genoms von miRNAs reguliert wird ⁷². Es sind bisher ~1000 miRNAs bekannt, wovon jede ~10 mRNAs beeinflusst ⁷³. Veränderte miRNA Expression findet sich vielfach beschrieben

in der Tumorgenese⁷⁴⁻⁷⁶. Ihre Regulation ist jedoch sehr zelltypspezifisch. Auf Translationsebene hemmen miRNAs die 5'cap-abhängige Initiation⁷⁷.

In den hier analysierten Microarrays konnten insgesamt 44 exprimierte miRNAs detektiert werden. Signifikant induziert waren jedoch nur miR21, miR196a-1 und miR221. miR21 ist ein vielfach beschriebener Zellregulator. Er hemmt unter Hypoxie die Zellproliferation⁷⁸, hat Einfluss auf die Zelltransformation⁷⁵ und inhibiert Apoptose⁷⁹.

Interessant ist, dass eine einzelne miRNA ans ER rekrutiert wurde und allgemein nicht im Fibroblasten erhöht war: miR519a-2. Die Funktion von miR519 ist bisher noch relativ unbekannt. 2008 wurde eine direkte Hemmung der Biosynthese von humanem Antigen R (HuR oder ELAVL1) durch miR519 nachgewiesen⁸⁰. HuR fördert die Translation von Cyclinen, Wachstumsfaktoren und mitogenen Transkriptionsfaktoren. Indirekt könnte miR519 so die Proliferation der Zelle hemmen. Außerdem fördert miR519 durch Hemmung von HuR die IRES vermittelte Translationsinitiation⁸¹.

Neben den miRNAs fand sich auch ein großer Anteil weiterer, nicht kodierender RNAs (ncRNAs), die unter Hypoxie signifikant verändert waren. Von den 625 Genen, die unter Hypoxie auf mRNA Ebene induziert waren, kodieren 70 nicht für Proteine. Unter den reprimierten Genen fanden sich nur vier sogenannte ncRNAs von insgesamt 737. Sehr interessant ist der Anteil an nicht regulierten ncRNAs, die unter Hypoxie vermehrt am ER nachweisbar waren. Er stellt mit 113 ncRNAs insgesamt 38,2% aller ans ER rekrutierten Transkripte. Am ER vermindert war nur eine ncRNA. In der Literatur finden sich wenige Publikationen, die sich mit unter Hypoxie regulierten ncRNA befassen⁸². Die Veränderungen der Lokalisation von ncRNAs ist bislang unbeschrieben. Non-coding RNAs scheinen eine unbekannte aber wichtige Rolle in der Regulation der Translation unter Hypoxie zu spielen. Dieses Phänomen sollte in zukünftigen Arbeiten weiter beleuchtet werden.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse lassen alle auf eine wichtige Rolle der Translation am ER unter Hypoxie schließen, die das Überleben der Zellen sicherstellt. Für Hypoxie-sensitive Gene, die insbesondere mit dem Energiestoffwechsel der Zelle assoziiert sind, konnte eine klare Favorisierung der Proteinsynthese am ER dargestellt werden - unabhängig von der mRNA Konzentration. Das ER könnte dabei als eine Art Filter für die zelltypspezifische Adaptation unter Hypoxie agieren. Aufgrund der unmittelbaren Nähe des ER zum Kern würde eine solche Selektion wesentlich kürzere mRNA Transportwege bedeuten. Außerdem wird ein kinetischer Vorteil aufgrund der zweidimensionalen Translation am ER gegenüber dem

dreidimensionalen Translatieren an freien Ribosomen diskutiert⁶². Gene bzw. deren mRNAs, die nicht unmittelbar für das Überleben benötigt werden, werden ins Zytosol verlagert. Es scheint als sei das Zytosol eine Art „Reservebecken“ für überproduzierte bzw. später benötigte mRNAs, wie im Falle von BLID. Bei der globalen Betrachtung waren Transkripte, die mit der allgemeinen Hypoxieantwort der Zelle im Zusammenhang stehen (GO: „Hypoxia response“, „Glycolysis“), am ER lokalisiert. Gene, die unter Hypoxie hochreguliert werden, für den HT1080 Fibroblasten aber keine überlebenswichtige Rolle spielen, werden nicht ans ER rekrutiert (beispielsweise der Interleukin 3 Signalweg). Nicht induziert, aber unter Hypoxie vermehrt am ER lokalisiert, sind vor allem Transkripte die für Translationsinitiationsfaktoren kodieren und ncRNAs. Es scheint eine Art Neuformatierung bzw. Umschalten aufgrund der Hemmung der regulären 5'cap-abhängigen Translationsinitiation zu geben. Der genauere Mechanismus der Translokation und Selektion zwischen den beiden Kompartimenten ER und Zytosol ist das Ziel zukünftiger Arbeiten. Auch ist interessant, welche Rolle dabei die nicht kodierenden RNAs spielen.

Das Verständnis rund um die genaue Adaptation an ein hypoxisches Umfeld ist wichtig für die protektive und kurative Therapie in der Prenatalentwicklung sowie der postnatalen Physiologie. In der Tumorthherapie gelten die hypoxischen Bereiche durch Chemo- und Radiotherapie als uneffektiv behandelbar. Es ist wichtig neue Angriffspunkte zu finden und das Tumorstadium und dessen Metastasierung durch gezielt lokale und selektive Therapie zu unterdrücken und Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten. Die Kenntnis über die zelltypspezifische Anpassung der Genexpression bzw. Ursachen der Hypoxie-Resistenz verschiedener Tumore bieten neue Therapieoptionen. Dabei wird die Kontrolle bzw. Regulation der mRNA Translation unter Hypoxie eine entscheidende Rolle spielen.

5. Literaturverzeichnis

1. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological reviews* 1997;77(3):731-58.
2. Fähring M. Surviving hypoxia by modulation of mRNA translation rate. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009;13(9A):2770-9.
3. Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *The Biochemical journal* 2008;409(1):19-26.
4. Fähring M, Persson PB. Oxygen sensing, uptake, delivery, consumption and related disorders. *Acta physiologica* 2012;205(2):191-3.
5. Mole DR, Ratcliffe PJ. Cellular oxygen sensing in health and disease. *Pediatric nephrology* 2008;23(5):681-94.
6. Coulon C, Georgiadou M, Roncal C, De Bock K, Langenberg T, Carmeliet P. From vessel sprouting to normalization: role of the prolyl hydroxylase domain protein/hypoxia-inducible factor oxygen-sensing machinery. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;30(12):2331-6.
7. Evans AM, Hardie DG, Peers C, Mahmoud A. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms of oxygen-sensing. *Current opinion in anaesthesiology* 2011;24(1):13-20.
8. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *The New England journal of medicine* 2011;365(6):537-47.
9. Weir EK, Lopez-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *The New England journal of medicine* 2005;353(19):2042-55.
10. Fähring M. Cellular oxygen sensing, signalling and how to survive translational arrest in hypoxia. *Acta physiologica* 2009;195(2):205-30.
11. Kumar P. Sensing hypoxia in the carotid body: from stimulus to response. *Essays in biochemistry* 2007;43:43-60.
12. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & development* 2004;18(18):2183-94.
13. Wottawa M, Koditz J, Katschinski DM. Normoxic destabilization of ATF-4 depends on proteasomal degradation. *Acta physiologica* 2010;198(4):457-63.
14. Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 2001;107(1):1-3.
15. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 1992;12(12):5447-54.
16. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2002;16(10):1151-62.
17. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2003;3(10):721-32.
18. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105(2):659-69.
19. Hickey MM, Simon MC. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Current topics in developmental biology* 2006;76:217-57.
20. Lee HS, Han J, Bai HJ, Kim KW. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: regulation, molecular and cellular communication at the neurovascular interface. *The FEBS journal* 2009;276(17):4622-35.

21. Dunwoodie SL. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Developmental cell* 2009;17(6):755-73.
22. Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* 2008;11(2):121-40.
23. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bulletin du cancer* 2006;93(8):E73-80.
24. Dewhirst MW. Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiation research* 2009;172(6):653-65.
25. Shinohara ET, Maity A. Increasing sensitivity to radiotherapy and chemotherapy by using novel biological agents that alter the tumor microenvironment. *Current molecular medicine* 2009;9(9):1034-45.
26. Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, van Engeland M, de Bruine AP. VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *The Journal of pathology* 2010;221(2):125-38.
27. Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Molecular cell* 2010;40(2):228-37.
28. Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(18):9493-8.
29. Guppy M, Withers P. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 1999;74(1):1-40.
30. Koritzinsky M, Magagnin MG, van den Beucken T, Seigneuric R, Savelkoul K, Dostie J, et al. Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *The EMBO journal* 2006;25(5):1114-25.
31. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860-921.
32. Pesole G, Liuni S, Grillo G, Saccone C. Structural and compositional features of untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Gene* 1997;205(1-2):95-102.
33. Spicher A, Guicherit OM, Duret L, Aslanian A, Sanjines EM, Denko NC, et al. Highly conserved RNA sequences that are sensors of environmental stress. *Molecular and cellular biology* 1998;18(12):7371-82.
34. Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews Molecular cell biology* 2002;3(3):195-205.
35. Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nature reviews Genetics* 2003;4(8):626-37.
36. Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ. Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Molecular biology of the cell* 2002;13(5):1792-801.
37. Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O, Levi BZ. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 1998;17(2):227-36.
38. Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M, Willis AE. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2008;100(1):27-38.
39. Fähring M, Steege A, Perlewitz A, Nafz B, Mrowka R, Persson PB, et al. Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression. *Biochimica et biophysica acta* 2005;1731(1):32-40.

40. Föhling M, Mrowka R, Steege A, Nebrich G, Perlewitz A, Persson PB, et al. Translational control of collagen prolyl 4-hydroxylase- α (I) gene expression under hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(36):26089-101.
41. Kozak M. A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic acids research* 2005;33(20):6593-602.
42. Jagannathan S, Nwosu C, Nicchitta CV. Analyzing mRNA localization to the endoplasmic reticulum via cell fractionation. *Methods in molecular biology* 2011;714:301-21.
43. Perlewitz A, Nafz B, Skalweit A, Fahling M, Persson PB, Thiele BJ. Aldosterone and vasopressin affect α - and γ -ENaC mRNA translation. *Nucleic acids research* 2010;38(17):5746-60.
44. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
45. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
46. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4(2):249-64.
47. Parikh JR, Klinger B, Xia Y, Marto JA, Bluthgen N. Discovering causal signaling pathways through gene-expression patterns. *Nucleic acids research* 2010;38(Web Server issue):W109-17.
48. Duncan D, Prodduturi N, Zhang B. WebGestalt2: an updated and expanded version of the Web-based Gene Set Analysis Toolkit. *BMC Bioinformatics* 2010;11:(Suppl 4):P10.
49. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic acids research* 2005;33(Web Server issue):W741-8.
50. de Vries S, Naarmann-de Vries IS, Urlaub H, Lue H, Bernhagen J, Ostareck DH, et al. Identification of DEAD-box RNA helicase 6 (DDX6) as a cellular modulator of vascular endothelial growth factor expression under hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 2013;288(8):5815-27.
51. Okazaki K, Maltepe E. Oxygen, epigenetics and stem cell fate. *Regenerative medicine* 2006;1(1):71-83.
52. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012;148(3):399-408.
53. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441(7092):437-43.
54. Vaupel P, Mayer A, Hockel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods in enzymology* 2004;381:335-54.
55. Valasek LS. 'Ribozomin'--translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). *Current protein & peptide science* 2012;13(4):305-30.
56. Thomas JD, Johannes GJ. Identification of mRNAs that continue to associate with polysomes during hypoxia. *Rna* 2007;13(7):1116-31.
57. Walter P, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *The Journal of cell biology* 1981;91(2 Pt 1):557-61.
58. Walter P, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *The Journal of cell biology* 1981;91(2 Pt 1):551-6.

59. Walter P, Ibrahimi I, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *The Journal of cell biology* 1981;91(2 Pt 1):545-50.
60. Reid DW, Nicchitta CV. Primary role for endoplasmic reticulum-bound ribosomes in cellular translation identified by ribosome profiling. *The Journal of biological chemistry* 2012;287(8):5518-27.
61. Chen Q, Jagannathan S, Reid DW, Zheng T, Nicchitta CV. Hierarchical regulation of mRNA partitioning between the cytoplasm and the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *Molecular biology of the cell* 2011;22(14):2646-58.
62. Stephens SB, Nicchitta CV. Divergent regulation of protein synthesis in the cytosol and endoplasmic reticulum compartments of mammalian cells. *Molecular biology of the cell* 2008;19(2):623-32.
63. Ortiz-Barahona A, Villar D, Pescador N, Amigo J, del Peso L. Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic acids research* 2010;38(7):2332-45.
64. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *The Journal of biological chemistry* 2004;279(37):38458-65.
65. Goggins BJ, Chaney C, Radford-Smith GL, Horvat JC, Keely S. Hypoxia and Integrin-Mediated Epithelial Restitution during Mucosal Inflammation. *Frontiers in immunology* 2013;4:272.
66. Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, Nero TL, Grimbaldeston MA, Bonder CS, et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunological reviews* 2012;250(1):277-302.
67. Le Quesne JP, Spriggs KA, Bushell M, Willis AE. Dysregulation of protein synthesis and disease. *The Journal of pathology* 2010;220(2):140-51.
68. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Molecular and cellular biology* 1998;18(6):3112-9.
69. Uniacke J, Holterman CE, Lachance G, Franovic A, Jacob MD, Fabian MR, et al. An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature* 2012;486(7401):126-9.
70. Lerner RS, Nicchitta CV. mRNA translation is compartmentalized to the endoplasmic reticulum following physiological inhibition of cap-dependent translation. *Rna* 2006;12(5):775-89.
71. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry* 2010;79:351-79.
72. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120(1):15-20.
73. Sonenberg N, Hinnebusch AG. New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Molecular cell* 2007;28(5):721-9.
74. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research* 2005;65(16):7065-70.
75. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834-8.
76. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(7):2257-61.

77. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 2007;317(5845):1764-7.
78. de Oliveira PE, Zhang L, Wang Z, Lazo JS. Hypoxia-mediated regulation of Cdc25A phosphatase by p21 and miR-21. *Cell cycle* 2009;8(19):3157-64.
79. Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, et al. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovascular research* 2010;87(3):431-9.
80. Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, Gorospe M. miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105(51):20297-302.
81. Kullmann M, Gopfert U, Siewe B, Hengst L. ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes & development* 2002;16(23):3087-99.
82. Liu ZH, Yang G, Zhao T, Cao GJ, Xiong L, Xia W, et al. Small ncRNA expression and regulation under hypoxia in neural progenitor cells. *Cellular and molecular neurobiology* 2011;31(1):1-5.

Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, Stefanie Josefin Ujvári, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Translokation der Proteinsynthese unter Hypoxie**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (siehe oben) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (siehe oben) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 30.01.2014

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Stefanie Josefin Ujvári hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Staudacher JJ, Naarmann-de Vries IS, **Ujvári SJ**, Klinger B, Kasim M, Benko E, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Bondke Persson A, Lorenzen S, Meier JC, Blüthgen N, Persson PB, Henrion-Caude A, Mrowka R, Fähling M.

“Hypoxia-induced gene expression results from selective mRNA partitioning to the endoplasmic reticulum.”

Nucleic Acids Research. (2015) Mar 31;43(6):3219-36. doi: 10.1093/nar/gkv167.

Mündliche Präsentation:

Staudacher JJ, **Ujvári SJ**, Kasim M, Klinger B, Mrowka R, Persson PB, Fähling M.

“Adaptation of gene expression in hypoxia by shifting the site of mRNA translation”

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft. Dresden, Germany. (2012)

Poster Präsentation:

Fähling M, Staudacher JJ, **Gardow SJ**, Kasim M.

“Sustained mRNA translation in hypoxia: A matter of localized protein synthesis?”

EMBO Conference Series: Protein Synthesis and Translational Control. EMBL Heidelberg, Germany. (2011)

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Stefanie Josefin Ujvári

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Fähling für die kompetente und verständnisvolle Betreuung. Die Zusammenarbeit war äußerst lehrreich und hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Ein besonderer Dank geht auch an meine Arbeitsgruppe „Molekularbiologie“ (I. für vegetative Physiologie, Charité Universitätsmedizin Berlin). Herr J. Staudacher, Herr E. Benko und Frau M. Kasim danke ich für Ihre tatkräftige Unterstützung, die inspirierenden Diskussionen und motivierenden Worte. Meine labortechnischen Fähigkeiten verdanke ich der guten Einarbeitung durch meinen Doktorvater sowie Herrn E. Benko und Frau A. Perlewitz. Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Microarray Daten bedanke ich mich bei Herrn B. Klinger. Die medizintechnischen Assistenten Frau R. Stöbe und Frau J. Werner unterstützten mich durch Ihre sehr gute Zuarbeit.

Außerdem richte ich meinen Dank auch an meine Eltern, Geschwistern sowie meinen Mann. Sie hielten mir stets den Rücken frei, sodass ich mich voll und ganz auf die Fertigstellung meiner Arbeit konzentrieren konnte.

Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit auf diesem steinigen Weg!