

**Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie/Hämatologie
Otto-Heubner-Centrum für Kinder und Jugendmedizin
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**Charakterisierung der Histondemethylase JMJD1A
als neues Zielgen von HIF-1**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin**

**von
Maxi Bettkober
aus Berlin**

Datum der Promotion: 12.09.2014

Meiner Familie gewidmet

Wissen, was man weiß,
und wissen, was man nicht weiß,
das ist wahres Wissen.
(Konfuzius)

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaar
β_2M	Beta-2-Mikroglobulin (β_2 -Mikroglobulin)
β -Gal	β -Galaktosidase
BSA	bovine serum albumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl ₂	Kobaltchlorid
C _T	Threshold Cycle
<i>Dab2</i>	<i>Disabled homolog 2</i>
DFO	Desferrioxamin
DIP	2,2 α -Dipyridil
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
et al.	et alii (lat.: und andere)
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
Fe-(II)	Eisen-(II)-Atom
FKS	Fetales Kälberserum
<i>FoxQ1</i>	<i>Forkhead Faktor</i>
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HIF-1	hypoxia inducible factor 1
HIF-1 α	α -Untereinheit von HIF-1

HMEC-1	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HRE	Hypoxie-responsives Element
HUVEC	Humane umbilikale venöse Endothelzellen
<i>hν</i>	Lichtemission
JMJD1A	jumonji domain containing protein 1A
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kpn 1	Restriktionsendonuklease
LB-Medium	Luria Broth, Bakterienmedium
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molare Masse
Min.	Minuten
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
μM	Mikromolar
μg	Mikrogramm
n	Anzahl
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
Nhe 1	Restriktionsendonuklease
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
ODD	sauerstoff-abhängige Degradierungs-Domäne
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pdlim4</i>	<i>PDZ and LIM domain 4</i>
<i>POLR2F</i>	Untereinheit F der DNA-abhängige RNA-Polymerase II
<i>PPi</i>	Pyrophosphat
PHD	Prolylhydroxylase

qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<i>RPL13A</i>	<i>ribosomales Protein L13A</i>
RPM	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
siRNA	small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung	11
1.1.1. Sauerstoffabhängige Genregulation	12
1.1.2. Struktur und Regulation von HIF-1	12
1.1.3. Detektion HIF-1 abhängiger Gene – JMJD1A ein neues Zielgen ?	15
1.2.1. JMJD1A - Struktureller Aufbau	16
1.2.2. JmjC-Domäne	17
1.3.1. Der Histon-Code	17
1.3.2. Histon-Methylierung/Demethylierung	19
1.4. Fragestellung dieser Arbeit	20

2. Material und Methoden

2.1. Material	
2.1.1. Zelllinien	21
2.1.2. Bakterien	21
2.1.3. Plasmide	21
2.1.4. siRNA-Konstrukte	22
2.1.5. cDNA-Proben	23
2.1.6. Enzyme	24
2.1.7. Chemikalien	24
2.1.8. Synthetische Oligonukleotide	26
2.1.9. Geräte	27
2.1.10. Verwendete Websites	28
2.1.11. Statistische Auswertung	28
2.2. Methoden	
2.2.1. Zellkultur	28
2.2.2. RNA-Extraktion	29
2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	31
2.2.5. Aufreinigung & Aufkonzentrierung von PCR- und Restriktionsprodukten	31
2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese	32

2.2.7. Quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR) mit dem Light Cycler™	32
2.2.7.1. Quantifizierung der qRT-PCR	33
2.2.7.2. Schmelzkurvenanalyse	35
2.2.8. Promotoranalyse	35
2.2.8.1. Reporterassay	35
2.2.8.2. PCR, Restriktion und Ligation der Fragmente in den pGL2 Vektor	36
2.2.8.3. Transformation kompetenter Escherischia coli (E. coli)	37
2.2.8.4. Plasmidamplifikation- und Präparation	38
2.2.8.5. Sequenzierung	38
2.2.8.6. Transiente Transfektion der HEK293-Zellen	39
2.2.8.7. Luciferase-Assay	40
2.2.8.8. β -Galactosidase-Assay	41
2.2.9. Western Blot	41
3. Ergebnisse	
3.1. Untersuchung der sauerstoffabhängigen JMJD1A Expression <i>in vitro</i>	44
3.1.1. Hypoxie stimuliert JMJD1A mRNA-Expression <i>in vitro</i>	44
3.1.2. Hypoxie stimuliert JMJD1A mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien	45
3.1.3. Kinetik der sauerstoffabhängigen JMJD1A mRNA-Expression	46
3.1.4. Hypoxie stimuliert JMJD1A Protein Expression <i>in vitro</i>	48
3.1.5. Stimulation ist abhängig von HIF-1 α	49
3.1.6. Expression von JMJD1A in fetalem und adultem Gewebe	51
3.2. Untersuchung der sauerstoffabhängigen JMJD1A mRNA-Expression <i>in vivo</i>	53
3.3. Untersuchung der Promotorregion JMJD1A's nach funktionellen HIF Bindungsstellen (HREs)	54
4. Diskussion	
4.1. Expression von JMJD1A in verschiedenen Geweben	59
4.2. Sauerstoffabhängige Induktion von JMJD1A	60
4.3. Hypoxie – Trigger und limitierender Faktor	62
4.4. Funktionelle Bedeutung der Histondemethylase JMJD1A	63
4.5. Die Histondemethylase JMJD1A als epigenetischer Vermittler in der zellulären	66

Adaptation auf Hypoxie	
4.6. Die Rolle von JMJD1A in der Kanzerogenese	68
4.7. Schlussfolgerung und Ausblick	70
5. Abbildungsverzeichnis	71
6. Tabellenverzeichnis	72
7. Literaturverzeichnis	73
8. Eidesstaatliche Erklärung	80
9. Lebenslauf	81
10. Publikationen	82
11. Danksagung	83

Zusammenfassung

Hypoxie stellt eine Gefahr für die zelluläre Integrität der meisten Organismen dar und beeinflusst die zellulären Funktionen in vielfältigster Art und Weise, unter anderem durch Modifizierung der Chromatinstruktur und durch komplexe Veränderungen der Genexpression. Viele dieser Adaptationsprozesse, die letztendlich dem Überleben der Zelle dienen, werden direkt oder indirekt durch den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1) vermittelt. Die Histondemethylase *Jumonji domain containing protein 1A* (JMJD1A) aktiviert durch spezifische Demethylaseaktivität an Mono- und Dimethylgruppen von H3K9 (Histon 3 Lysin 9) die Genexpression verschiedener Zielgene und fungiert somit seinerseits als Transkriptionsmodulator.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss von Hypoxie im Allgemeinen und die Rolle von HIF-1 im Speziellen auf die Expression der Histondemethylase JMJD1A zu untersuchen. Mittels quantitativer RT-PCR konnte anhand unterschiedlicher humaner Zelllinien und verschiedener humaner und muriner Gewebe eine signifikante Zunahme der *JMJD1A* Transkription unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie nachgewiesen werden. Western-Blot-Untersuchungen ergaben, dass sich diese Induktion auch auf Proteinebene widerspiegelt. Die gezielte Blockade des HIF-1 Signalweges in humanen Endothelzellen mittels spezifischer gegen *HIF-1 α* mRNA gerichteter siRNA-Konstrukte zeigte, dass HIF-1 notwendig ist für die sauerstoffabhängige Induktion von *JMJD1A*. Durch Klonierung und gezielte Mutationsanalysen zahlreicher Promotorkonstrukte ließ sich in Reporterassay-Analysen zeigen, dass HIF-1 α durch direkte Interaktion mit nur einem *Hypoxie-responsiven Element* (HRE), 1208 bp vor dem *JMJD1A* Startkodon gelegen, die Expression von *JMJD1A* sowohl unter Hypoxie als auch unter dem Einfluss von Eisenchelatoren induziert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Histondemethylase JMJD1A einer sauerstoffabhängigen HIF-1-vermittelten Regulation unterliegt. Diese neu gewonnenen Erkenntnisse lassen ein direktes Zusammenwirken von HIF-1 und epigenetischen Regulationsmechanismen in der zellulären Adaptation auf Hypoxie vermuten, in der JMJD1A als direkter oder indirekter epigenetischer Vermittler von HIF-1 zu fungieren scheint. Erst die weitere Aufschlüsselung dieser komplexen Interaktionsmechanismen wird die Grundlage schaffen, neue therapeutische Strategien z.B. in der Onkologie und der regenerativen Medizin entwickeln zu können.

Abstract

Hypoxia threatens the cell integrity of most organisms and affects cellular functions sustainably. As a reaction to hypoxia, the hypoxia-induced transcription factor-1 (HIF -1) mediates directly and indirectly a plethora of adaptation processes with the ultimate goal of cell survival. This includes among others modifications of chromatin structure and complex changes in gene expression patterns. histone demethylase Jumonji domain containing 1A (JMJD1A) transactivates distinct target genes by demethylation of H3K9 residues and thereby serves as a transcription modulator itself.

The aim of this study was to examine the influence of hypoxia in general and the role of HIF-1 in particular on the expression of histone demethylase JMJD1A.

Using the technique of quantitative RT-PCR, a significant increase of *JMJD1A* transcription could be detected under hypoxic compared to normoxic conditions in a variety of human cell lines and various human and murine tissues. Western blot studies showed that hypoxic induction is also reflected at protein level. Blocking HIF-1 signaling by specific siRNAs directed against *HIF-1 α* mRNA in human endothelial cells revealed that HIF-1 is essential for the oxygen-dependent induction of *JMJD1A*. Via cloning numerous systematically shortened *JMJD1A* promoter constructs and specific mutations analysis, a single pivotal hypoxia responsive element (HRE) in the promoter of the human *JMJD1A* gene, located 1208bp upstream of the start codon, could be identified in reporter gene analysis that mediates *JMJD1A* upregulation by hypoxia.

In summary, this research demonstrated for the first time, that the histone demethylase JMJD1A is subject to an oxygen-dependent HIF-1 mediated regulation. These new findings lead to the assumption of a direct interaction of HIF-1 and epigenetic regulation mechanisms in the cellular adaptation to hypoxia in which JMJD1A appears to be acting as a direct or indirect epigenetic mediator of HIF-1 signaling. Thus, the basis is established to develop new therapeutic strategies e.g. in oncology and regenerative medicine by further breakdown of these complex interaction mechanisms.

1. Einleitung

Sauerstoff (O₂) ist für das Überleben der meisten zellulären Organismen von essenzieller Bedeutung. Erst durch die Nutzung der oxidativen Phosphorylierung wird höheren Organismen die ausreichende Produktion des lebensnotwendigen Energiesubstrats Adenosintri-phosphat (ATP) ermöglicht. Um die Atmungskette aufrecht zu erhalten, bedarf es einer hinreichenden Versorgung der Zelle mit Sauerstoff und Reduktionsäquivalenten. Der optimale Sauerstoffpartialdruck einer Zelle bewegt sich dabei in engen Bereichen, da nur wenige Zellen in der Lage sind eine nicht ausreichende Gewebe-Oxygenierung (Hypoxie) längere Zeit zu tolerieren. Ebenso kann eine zu hohe O₂-Konzentration eine toxische Wirkung entfalten und die Zelle nachhaltig schädigen. Deshalb ist es für Organismen zur Aufrechterhaltung der Homöostase lebenswichtig, dass sie über Adaptationsmöglichkeiten verfügen, um sich an unterschiedliche Bedingungen anzupassen.

Höhere Organismen bedienen sich zur schnellen Adaptation der reflektorischen Änderung von Atmung und Hämodynamik. Auf zellulärer Ebene sind es Proteinmodifikationen wie beispielsweise Änderung der Leitfähigkeit von Ionenkanälen. Mittel- und langfristige Anpassungsprozesse vollziehen sich mehrheitlich auf zellulärer Ebene durch eine veränderte Genexpression und Proteinsynthese¹.

Hypoxie spielt dabei nicht nur im Hinblick auf physiologische Anpassungsreaktionen der Organismen an ein verändertes Sauerstoffangebot eine entscheidende Rolle (z. B. Entwicklung einer Polyzythämie bei Aufenthalt im Hochgebirge), sondern auch im Rahmen der Entstehung bzw. im Verlauf zahlreicher Erkrankungen. Akute oder chronische Hypoxie sind Folge primär ischämischer Erkrankungen, wie z. B. koronarer Herzerkrankung, cerebraler oder peripher arterieller Verschlusskrankheit und führen nicht selten zum Zell- und Gewebsuntergang. Neoplastische Erkrankungen sind meist ebenfalls durch eine ausgeprägte lokale Hypoxie gekennzeichnet. Diese ist nicht nur mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie (z. B. auf Bestrahlung) assoziiert, sondern stellt auch einen ganz entscheidenden Stimulus für Angiogenese, Invasion und maligne Progression dar.

Erst das Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser zellulären Adaptationsprozesse auf Hypoxie wird es ermöglichen, in Zukunft gegebenenfalls neue spezifische Therapieansätze entwickeln zu können.

1.1.1. Sauerstoffabhängige Genregulation

Einen der wichtigsten zentralen Vermittler der zellulären Antwort auf Hypoxie stellt dabei der Transkriptionsfaktor *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) dar ². Der Transkriptionsfaktor HIF-1 wurde erstmals im Rahmen von Untersuchungen zur Expression von Erythropoetin (EPO) identifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass dieser eine Schlüsselrolle in der Regulation von EPO darstellt und für dessen vermehrte Expression unter Hypoxie verantwortlich ist ^{3/ 4}. Mittlerweile sind eine Vielzahl von weiteren Genen identifiziert worden, die durch HIF-1 reguliert werden und deren Proteine unter anderem im Rahmen der Erythropoese, Angiogenese, Glykolyse, Apoptose und Zellproliferation eine entscheidende Rolle spielen ⁵ (*siehe auch Abb. 1*). Neben der wichtigen physiologischen Bedeutung scheint HIF-1 auch eine relevante Stellung in der Pathophysiologie zahlreicher Krankheiten einzunehmen, wie z. B. bei Perfusionsstörungen oder dem Tumorwachstum ⁶.

Abb. 1 Übersicht einiger Zielgene von HIF-1

Erythropoese und Eisentransport

Ceruloplasmin | Erythropoetin | Transferrin | Transferrin Rezeptor

Angiogenese

Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) | VEGF-Rezeptor-1 (FLT-1) | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 | Transforming growth factor β (TGF β 3) | Endoglin

Kontrolle Vasotonus

Nitrit Oxid Synthase 2 | Endothelin-1 | Adrenomedullin | α_{1B} -Adrenoceptor

Glykolyse und Glukose Transport

Aldolase-A und C | Enolase-1 | Glukose Transporter-1, -3 (GLUT1, GLUT3) | Hexokinase-1 und 2 | Laktatdehydrogenase-A | Phosphofruktokinase-C |

Zellwachstum- und Überleben

CDK-Inhibitor 1 (p21) | NIP 3 | Insulin-like growth factor-binding protein 1-3 (IGFBP 1-3) | Nip3-like protein X (NIX) | Insulin-like growth factor 2 (IGF) | Nuclear factor- κ B (NF- κ B) |

1.1.2. Struktur und Regulation von HIF-1

HIF-1 ist ein heterodimerer Komplex, der sich aus einer adaptiven 1α -Untereinheit (HIF- 1α) und aus einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit, auch HIF- 1β oder ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) genannt, zusammensetzt. Beide Untereinheiten gehören zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) PAS-Proteine. Die Dimerisierung der β -Untereinheit kann dabei mit drei verschiedenen α -Untereinheiten (HIF- 1α , HIF- 2α und HIF- 3α) erfolgen und wird durch die PAS-Region am N-terminalen Ende vermittelt. Hier ist auch die bHLH-Region

lokalisiert, die für die DNA-Bindung der Zielgene verantwortlich ist. Im carboxyterminalen Teil von HIF-1 wurden zwei Transaktivierungsdomänen (TAD) identifiziert, die N-terminale TAD (N-TAD) und die C-terminale TAD (C-TAD)⁷. Durch deren Interaktion mit dem transkriptionellen Co-Aktivator p300/CBP (CREB-binding Protein) kann die Transkription von Zielgenen aktiviert werden, die mindestens ein Hypoxie-responsives Element (HRE) in ihrem Promoter aufweisen. Die HREs zeichnen sich durch die Konsensus-Sequenz 5'-R-CGTG-3' aus⁸. Der strukturelle Aufbau von HIF-2 α ist sehr ähnlich. Im Gegensatz zu HIF-1 α wird HIF-2 α nicht ubiquitär exprimiert, sondern beschränkt sich u. a. auf Endothelium, Niere, Lunge, Herz und Dünndarm⁹.

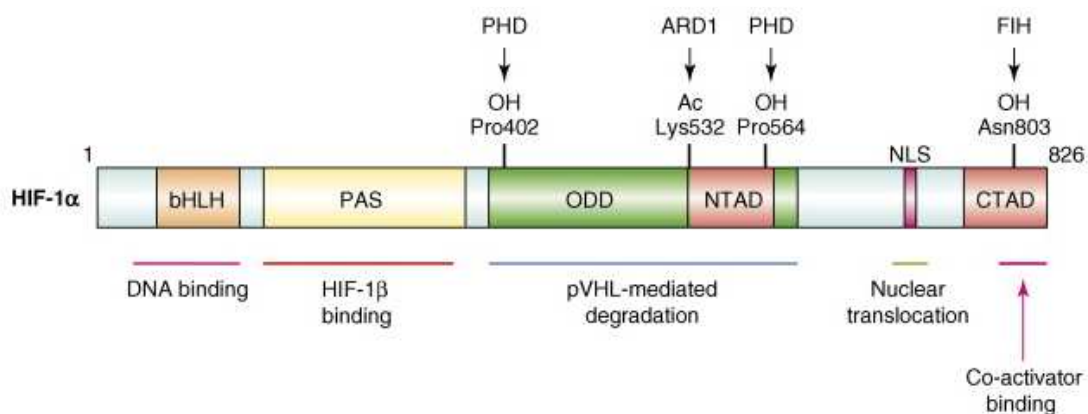


Abb. 2 Funktionelle HIF-1 α Domänen

Die verschiedenen Farben repräsentieren Domänen mit unterschiedlicher Funktion. Die Modifizierungen der spezifischen Aminosäurereste sowie die beteiligten Enzyme werden über dem jeweiligen Abschnitt beschrieben. Aussagen zur Funktion der einzelnen Domänen sind unter ihnen aufgelistet. Abkürzungen: bHLH – basische Helix-Loop-Helix; CTAD - C-terminale Transaktivierungsdomäne; NLS – nukleäre Lokalisationssequenz; NTAD - N-terminale Transaktivierungsdomäne; ODD – sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne ; PAS - PAS-Region (Per/ARNT/Sim-Domäne); PHD – Prolylhydroxylasen; FIH – inhibierender Faktor von HIF

(Quelle: Sonia Roche „Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription“, Trends in Biochemical Sciences, Vol. 32, Issue 8, August 2007, Pages 389-397)

Die Regulation von HIF-1 α erfolgt auf posttranslatiionaler Ebene durch Modifizierungen in der sauerstoffabhängigen Degradierungsdomäne ODDD (*oxygen dependent degradation domain*). Unter Normoxie besitzt HIF-1 α eine ausgesprochen kurze Halbwertszeit von nur wenigen Minuten, aber mit zunehmender Hypoxie wird es stabilisiert und akkumuliert im Zellkern. Die HIF-1 β Proteinmenge bleibt dagegen unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck (pO₂) konstant¹⁰. Unter normoxischen Bedingungen werden die α -Untereinheiten an zwei Prolinresten innerhalb der ODDD von Prolylhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert¹¹. Durch diese Hydroxylierung werden sie vom Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein (VHL) gebunden, polyubiquitiniert und anschließend im Proteasomkomplex degradiert¹². Da molekularer Sauerstoff für die

enzymatische Hydroxylierung essenziell ist, kann diese unter hypoxischen Bedingungen nicht mehr oder in nur geringerem Maße stattfinden^{11/13}. Aber nicht nur die Stabilität von HIF-1 α wird durch den Sauerstoffpartialdruck reguliert, sondern auch seine Aktivität. Dies geschieht durch Hydroxylierung eines Asparaginrestes in der Transaktivierungsdomäne von HIF-1 α ¹⁴. In Folge dessen kann der transkriptionelle Co-Aktivator CBP/p300 unter normoxischen Bedingungen nicht mehr binden und HIF-1 verliert seine transkriptionelle Aktivität. Verantwortlich für diese Modifikation ist der inhibierende Faktor von HIF (FIH), eine Asparaginyhydroxylase, die wie alle anderen HIF-Hydroxylasen Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängig sind^{14/15}. Molekulares Eisen stellt somit einen essenziellen Kofaktor in der Destabilisierung von HIF-1 α dar. Eisenchelatoren, wie beispielsweise Desferrioxamin (DFO), oder Metalle wie Kobaltchlorid (CoCl₂) bewirken daher wie Hypoxie eine Stabilisierung von HIF-1 α ¹⁶.

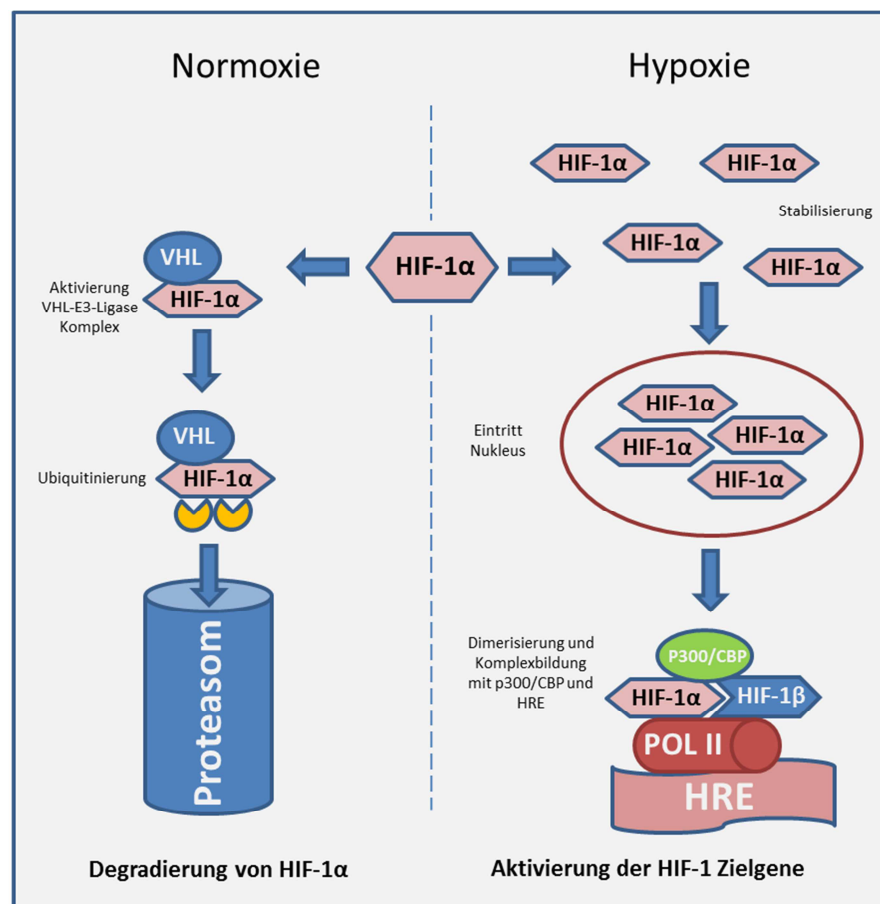


Abb. 3 Übersicht der HIF-1 Regulation in Normoxie und Hypoxie

In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (O₂) werden die HIF-1 α Untereinheiten ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut. In der Hypoxie sind die HIF-1 α Untereinheiten stabil und akkumulieren, translozieren in den Zellkern, dimerisieren mit HIF-1 β , rekrutieren den transkriptionellen Ko-Faktor p300/CBP und führen zur transkriptionellen Aktivierung zahlreicher Zielgene.

1.1.3. Detektion HIF-1 abhängiger Gene – JMJD1A ein neues Zielgen ?

Die Arbeitsgruppe von Dr. Sven Wellmann aus unserem Forschungslabor untersuchte im Jahr 2003 die lymphoblastischen B-Zelllinien REH und Z-33 mittels Microarrayanalyse auf sauerstoffabhängige Genexpression¹⁷. Beim Vergleich mehrerer Zelllinien von Leukämien hatte sich Z-33 als sauerstoffunempfindlich gezeigt. Ursächlich fand sich ein deletierter *HIF-1α* Locus. In den vergleichenden Microarrayanalysen ging es primär um die Frage, wie eine Zelle ohne den Masterregulator HIF-1 auf Hypoxie reagiert. Bei der Auswertung der Ergebnisse zwischen HIF-kompetenten (REH-Zellen) und HIF-inkompetenten Zellen (Z-33) fand sich neben den bereits bekannten HIF-1 Zielgenen auch das bis dahin wenig erforschte Gen *JMJD1A* (*Jumonji Domain-Containing Protein 1A*). Dieses wurde unter Hypoxie in HIF-1α-kompetenten REH-Zellen vermehrt exprimiert, nicht aber in HIF-1α-defizienten Z-33-Zellen (*siehe Abb. 4*).

	HIF1A +/+		Diff		HIF1A -/-		
	Hy	No			Hy	No	
	Expression				Expression		
CIRP	8170	3297	2,5	2,8	4947	1782	
HLA alpha-chain	7450	2480	3,0	2,8	5506	1967	
RTP801	6430	2191	2,9	0,8	1955	2460	- HIF-1 induzierbar
Hexokinase 2	6042	967	6,2	1,1	2551	2256	- HIF-1 induzierbar
RBM3	5494	2036	2,7	2,3	8485	3649	
JMJD1A (TSGA)	5242	2162	2,4	1,0	2057	2013	- HIF-1 induzierbar ?
BNIP3	4275	547	7,8	0,4	12	31	- HIF-1 induzierbar
P4HA1	3129	1217	2,6	0,5	1083	1979	- HIF-1 induzierbar
PFKFB3	2979	793	3,8	0,9	523	614	- HIF-1 induzierbar
Wilms tumor 1	2513	1058	2,4	1,7	79	46	
Glucose transp. 3	2057	634	3,2	0,9	163	184	- HIF-1 induzierbar
BHLHB2/DEC1	1919	414	4,6	0,5	186	360	- HIF-1 induzierbar
Galectin-8	1439	489	2,9	2,0	234	118	
Hypoth. protein	1308	496	2,6	2,8	2003	703	
VEGF	1261	505	2,5	0,5	628	1257	- HIF-1 induzierbar
Adrenomedullin	1006	214	4,7	1,3	395	310	- HIF-1 induzierbar
v-jun 17 oncogene	929	259	3,6	2,5	221	88	
Aldolase C	866	494	1,8	0,6	299	46	- HIF-1 induzierbar

Filter: Expressionslevel > 800; p<0,001

Abb. 4 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von REH und Z-33-Zellen

REH-Zellen (humane Prä-B-Zell-Leukämie) und Z-33-Zellen (humane HIF-1α defiziente akute lymphoblastische Prä-B-Zell-Leukämie) (1% O₂) ausgesetzt. Anschließend die RNA extrahiert und 13,5 µg von dieser in cDNA umgeschrieben und mittels Microarrayanalyse analysiert (Affymetrix, Human Genome U133A Chip). Die Auswertung erfolgte mit der Affymetrix GeneChip Software 5.0. Dargestellt sind die Gene, die ein Expressionslevel von mehr als 800 Units hatten und eine signifikante Differenz (Diff) von Normoxie (No) zu Hypoxie (Hy) mit einem p < 0,001 aufwiesen. Gene, die bereits als Zielgene von HIF-1 beschrieben wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die These der HIF-1-abhängigen-Genexpression von JMJD1A zu validieren und funktionell relevante HIF-1-Bindungsstellen in der Promotorsequenz des *JMJD1A*-Genes zu identifizieren.

1.2.1. JMJD1A – Struktureller Aufbau

Das für den Transkriptionsfaktor JMJD1A (*Jumonji Domain-Containing Protein 1A*) beschriebene Gen wurde 1991 erstmals aus Testis-Gewebeproben von Ratten isoliert und mit Hilfe einer Testis-cDNA-Bibliothek näher charakterisiert. Da es damals nur im Hodengewebe nachgewiesen werden konnte, wurde es von Höög et al. als *testis-specific gene A* (TSGA) bezeichnet¹⁸. Mittlerweile gibt es viele synonym verwendete Namen für das ursprüngliche TSGA-Gen, (*JMJD1A*, *KDM3A*, *JHDM2A*, *JHMD2A* und *KIAA0742*), wobei *JMJD1A* und *KDM3A* die gängigsten Bezeichnungen darstellen. Das humane Gen *JMJD1A* liegt auf Chromosom 2p11.2. und enthält 25 kodierende Exons. Das translatierte Protein besteht aus 1321 Aminosäuren und besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von rund 147,3 kDa. Immunfluoreszenzuntersuchungen haben gezeigt, dass JMJD1A vorwiegend im Zellkern, aber auch im Zytoplasma lokalisiert ist^{19/20}.

Das *JMJD1A*-Gen kodiert ein Enzym, welches neben dem C2HC4-Zinkfingermotiv auch eine JmjC-Domäne (Jumonji C Domäne) aufweist, nicht zuletzt deswegen wurde es folglich als *Jumonji Domain-Containing Protein 1A* bezeichnet (siehe Abb. 5).



Abb. 5 Domänenstruktur von JMJD1A

(Q9Y4C1, Uniprot), C2HC4 – Zinkfinger-Motiv (AS-Position 662-687), JmjC-Domäne (AS-Position 1058-1281)

Nachdem Yamane et al. 2006 erstmals dessen Funktion als Histondemethylase identifizierte, wurde das Protein von ihnen in *JmjC domain-containing histone demethylation protein 2A* umbenannt (*JHDM2A*)²¹. Zusammen mit JMJD1B (synonym: *5qNCA*, *C5orf7*, *JHDM2B*) und JMJD1C (synonym: *TRIP8*, *JHDM2C*) bildet JMJD1A eine der acht Untergruppen der Jumonji-domain-containing Proteine.

1.2.2. JmjC-Domäne

Domänen sind im Genom strukturell konservierte Einheiten. Sie bestehen meist aus 50 bis 150 Aminosäuren, die durch eine ganz bestimmte definierte Anordnung von α -Helices und/oder β -Faltblättern eine komplexe unabhängig gefaltete Struktur bilden. Die JmjC-Domäne stellt eine aus ca. 200 Aminosäuren bestehende Sequenz dar, die erstmals im carboxy-terminalen Teil des Jumonji-Proteins der Maus gefunden wurde und deshalb als carboxy-terminale Jmj-Domäne (JmjC) bezeichnet wird²². *Jumonji (jnj)* spielt bei der Maus eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung. So zeigen homozygote *jnj* Knock-out-Mäuse Fehlbildungen in der Entwicklung von ZNS, Leber, Thymus, Milz und Herz und versterben infolgedessen zwischen Tag 10 und 15 ihrer Embryonalentwicklung. Die morphologischen Veränderungen in der Entwicklung der Neuralrohre dieser Knock-out-Mäuse erinnerten an ein Kreuz, so kam es, dass das mutierte Gen den Namen *Jumonji* (japanisch für „Kreuz“) erhielt²².

Die konservierte JmjC-Domäne, bestehend aus acht β -Faltblättern, ist bis heute in einer Mehrzahl von Proteinen verschiedener Spezies nachgewiesen worden und gehört zur Cupin-Superfamilie²³. Fast all diese Mitglieder sind zudem Träger potenziell DNA- oder Chromatin-bindender Motive. Die bereits 2000 von Balciunas et al. postulierte Funktion als Demethylasen konnte bis dato bereits für eine Vielzahl der JmjC-Domäne tragenden Proteine nachgewiesen werden^{24/25}. Dem Reaktionsmechanismus liegt eine Hydroxylierung der Methylgruppe im Methyllysin mit anschließender spontaner Elimination von Formaldehyd zugrunde. Als Kofaktor für die enzymatische Funktion wird ein zweiwertiges Eisenatom (Fe(II)) und Alpha-Ketoglutarat (α KG) sowie die Anwesenheit von Sauerstoff benötigt²⁶.

1.3.1. Der Histon-Code

Histone sind Proteine, die als Bestandteil des Chromatins im Zellkern von Eukaryoten vorkommen und vornehmlich der Kondensation der DNA dienen. Insgesamt lassen sich die Histone in fünf verschiedene Klassen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) einteilen. Ihr hoher Gehalt an basischen und damit positiv geladenen Aminosäuren gewährleistet die elektrostatische Bindung an die negativ geladene DNA. In einer Länge von 146 bp windet sich die DNA dabei um den sogenannten Nukleosomenkern (*core particle*), welcher sich aus Dimeren der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzt²⁷. Dieser als „Nukleosom“ bezeichnete Komplex aus DNA und Histon-Oktamer bildet damit den Grundbaustein des Chromatins. Benachbarte Nukleosomen werden durch eine in der Länge variable, beim Menschen in der Regel 50-60 bp lange Verbindungs-DNA (*linker region*) miteinander verbunden. Das Histonprotein H1 ist an dieses Verbindungs-

stück assoziiert und wird zur Ausbildung der verdrehten 30 nm Faser benötigt, durch die ein noch höherer Komprimierungsgrad erzielt werden kann ²⁸.

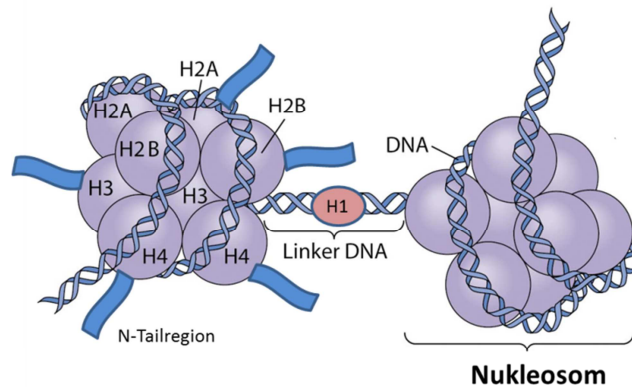


Abb. 6 Nukleosomen als Grundbaustein des Chromatin

Schematische Darstellung des Histonoktamers zweier Nukleosomen. Die herausstehenden Histon-Schwänze sind Gegenstand mannigfaltiger Modifikationen

(Bildquelle: <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-18/1820.jpg>, modifiziert)

Der Grad der Kondensierung ist dabei keineswegs als statisch anzusehen, sondern kann in unterschiedlichen Chromatinbereichen individuelle Ausmaße annehmen. So zeigen die klassischerweise als Euchromatin bezeichneten, transkriptionell aktiven Regionen einen vergleichsweise geringen Kondensierungsgrad auf, während in den Bereichen des Heterochromatins eine starke Verdichtung vorherrscht, aufgrund derer eine Transkription kaum mehr erfolgen kann. Die Chromatinstruktur wird unter anderem auch durch posttranslationale Histonmodifikationen vor allem an den N-terminalen Enden (*tail region*) der Histone z.B. in Form von Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung beeinflusst. Dadurch werden zum einen auf der Chromatinfaser Erkennungs- und Bindungsstellen für regulatorische Proteine geschaffen, zum anderen die Chromatinstruktur direkt verändert ^{29/30}. Die gesamte Vielfalt dieser Histonmodifizierungen wird auch unter dem Begriff „Histon-Code“ zusammengefasst, durch den das informative und regulatorische Potenzial des Genoms immens erweitert und eine spezifische dynamische Transkriptionsregulation ermöglicht wird ³¹. Als wichtiger epigenetischer Mechanismus dient der „Histon-Code“ somit der Weitergabe phänotypischer Merkmale ohne dabei den Genotyp einer Zelle zu verändern.

1.3.2. Histon-Methylierung/Demethylierung

Die Histon-Methylierung als eine Form der Histonmodifizierung wurde bereits vor mehr als vierzig Jahren von K. Murray beschrieben³². In den letzten Jahren konnte aber erst in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass die Methylierung sowohl indirekt als auch direkt mit der Transkriptionsaktivität verschiedener Gene assoziiert ist^{33/34}. Inwiefern die Veränderungen mit einer gesteigerten oder verminderten Genexpression einhergehen, hängt spezifisch von der genauen Lokalisation und dem Grad der Methylierung ab³⁵. Die Methylierung erfolgt durch die Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) an den Seitenketten von Arginin und durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) an den Lysin-Seitenketten meist der Histone 3 und 4. Lysine können dabei mit bis zu drei und Arginin mit bis zu zwei Methylgruppen (symmetrisch oder asymmetrisch) modifiziert werden³⁶. Lange Zeit ging man davon aus, dass die Histonmethylierung, basierend auf ihrer Stabilität, einen statischen Prozess darstellt und nicht reversibel ist. Erst 2004 gelang es Shi et al. mit Lysin-specific-demethylase-1 (LSD1) die erste Histondemethylase zu identifizieren³⁷. Bislang konnten insgesamt drei verschiedene Enzymklassen detektiert werden, die Histonmethylierungen revidieren können:

1. Histondemethyliminasen, wie z.B. PAD4, die Methyl-Arginin unter Freisetzung von Methylamin in Citrullin konvertieren³⁸
2. Aminoxidasen, wie LSD1, die durch eine FAD-abhängige oxidative Reaktion Methylgruppen der Lysinreste H3K4 oder H3K9 abspalten können³⁷
3. Dioxygenasen, die eine JmjC-Domäne aufweisen (JHDMs - JmjC-domain containing histone demethylases), wie z.B. JMJD1A, welche Methylgruppen an Lysin- und Argininresten entfernen können und Eisen (II) und α -Ketoglutarat als Kofaktoren benötigen^{21/36/39}.

Für JMJD1A konnte 2006 von Yamane et al. eine spezifische Demethylaseaktivität für die Mono- und Dimethylierung von H3K9 (Histon 3 Lysin 9) gezeigt werden, wobei *in vivo* eine Präferenz für dimethyliertes-H3K9 (H3K9me2) vorherrscht. Als essenziell für die enzymatische Funktion von JMJD1A stellte sich sowohl die Zinkfinger- als auch die JmjC-Domäne heraus²¹. Basierend auf früheren Beobachtungen, bei denen die Methylierung von H3K9 mit einer transkriptionellen Repression und der Ausbildung heterochromatischer Strukturen einherging⁴⁰, war zu vermuten, dass JMJD1A durch seine Funktion als Demethylase diese Repression zu antagonisieren vermag. Tatsächlich konnte eine durch JMJD1A vermittelte Transkriptionssteigerung verschiedener Gene, wie z.B. *HOXA1* (*Homeobox A1*), *TNP1* (*transition nuclear protein 1*) und

PRM1 (*protamine 1*), infolge der Demethylierung von H3K9 gezeigt werden^{41/42}. Zudem wurde für *JMJD1A* eine Interaktion mit dem Androgenrezeptor (AR) und eine Funktion als Koaktivator beschrieben²¹.

1.4. Fragestellung dieser Arbeit

Die Adaptation an Hypoxie stellt eine Schlüsselfunktion im Kampf ums Überleben einer jeden Zelle dar. In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1) dabei eine ganz entscheidende Rolle als Vermittler einnimmt. Die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen sind jedoch komplex und trotz intensiver Forschung vielfach noch unklar. Mit der Identifizierung neuer Zielgene von HIF-1 versucht man diese Hypoxie-regulierten zellulären Prozesse besser verstehen zu lernen. Unter physiologisch oder pathophysiologisch hypoxischen Bedingungen aktiviert oder inhibiert HIF-1 durch Bindung an die „Hypoxie-responsiven Elemente“ (HREs) seine Zielgene.

Die Daten der Microarrayanalyse von PD Dr. Wellmann ließen vermuten, dass das bis dato wenig erforschte Gen *JMJD1A* einer sauerstoffabhängigen Genregulation unterliegt und diese durch HIF-1 vermittelt wird. Zur Validierung dieser These sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Stimuliert Hypoxie tatsächlich die *JMJD1A* mRNA Expression *in vitro* ?

Wenn ja, ist dieser Effekt in verschiedenen Zelllinien nachweisbar ?

Welcher Kinetik folgt die Stimulation der sauerstoffabhängigen Genexpression ? Wie sieht es auf Proteinebene aus ?

Ist die Genexpression von *JMJD1A* unter Hypoxie HIF-1 abhängig?

2. Inwiefern lassen sich die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse auf *in vivo* übertragen?

3. Lassen sich funktionell relevante HIF-1 Bindungsstellen (HREs) im

Promotorbereich von *JMJD1A* detektieren?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die verwendeten Materialien, Reagenzien, Plasmide und kommerziell erworbenen Kits entsprechen dem Reinheitsgrad pro analysi. Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Falcon Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D), Milian (Genf, CH), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, D), Eppendorf AG (Hamburg, D), VWR International GmbH (Darmstadt, D) und Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, D) bezogen.

2.1.1. Zelllinien

Für die quantitative Real-Time-PCR wurden RNA-Extrakte der Zelllinien Reh (prä-B-ALL-Zellen), HSMC (human smooth muscle cells), HeLa (Epithelzellen des Zervixkarzinoms), Hep3B (menschliche Hepatomzellen) sowie RNA-Extrakte von HEK-293 Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) verwendet. Die transiente Transfektion im Rahmen der Promotoranalyse erfolgte ebenfalls in der Zelllinie HEK-293. Die verwendeten Zelllinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen.

2.1.2. Bakterien

Bakterienstamm

Als kompetente Zellen wurden *Library Efficiency® DH5 α ™ Cells* mit dem Genotyp F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF), U169 *recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), phoA supE44 thi-1 gyr, A96 relA1 λ ⁻* der Firma Invitrogen AG, Karlsruhe, D und Basel, CH verwendet.

2.1.3. Plasmide

pGL2-Basic-Vektor

Der pGL2-Basic-Vektor ist ein eukaryontisches Promotor- und Enhancersequenz-freies Reporter-genplasmid für das Luciferasegen (*luc*) (Promega GmbH, Mannheim, D), welches für die Klonierung der *JMJDIA*-Promotorkonstrukte verwendet wurde. Als Resistenzmarker besitzt das Plasmid das β -Lactamase-Gen. Die Bindungsstelle des zur Sequenzierung verwendeten GLPrimer1 reicht von Basenpaar 5565 bis zu Basenpaar 5587 (*siehe Vektorkarte Abb. 7*).

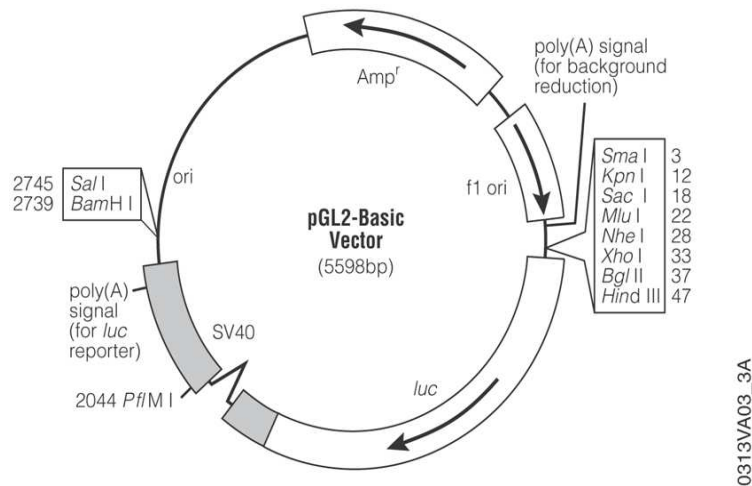


Abb. 7 Vektorkarte des pGL2-Basic Vektors (Promega)

Quelle: *pGL2 Luciferase Reporter Vectors – Handbook, 05/2003, Promega Corporation, Madison, WI, USA*

CMV- β -Gal-Plasmid

Das für die Co-Transfektion verwendete *CMV- β -Gal*-Plasmid, ein β -Galaktosidase Expressionsvektor, wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Holger Scholz, Johannes-Müller-Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt.

HIF-1 α -Plasmid

Auch diesen, zur Co-Transfektion verwendeten *HIF-1 α* Expressionsvektor (*HIF-1* cDNA in pcDNA3.1) erhielten wir von Prof. Dr. Holger Scholz, Johannes-Müller-Institut für Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin⁴³.

VEGF₁₆₅-Plasmid

Dieses Plasmid mit dem Gen für die splicing Variante *VEGF*₁₆₅ wurde als Standard für die Real-Time-PCR verwendet⁴⁴.

2.1.4 siRNA-Konstrukte

HIF-1 α siRNA

Zur stabilen Repression von *HIF-1 α* wurden HMEC-1 Zellen („Human Microvascular Endothelial Cell Line 1“) mit dem psiRNA-hH1neo G2 Vektor transfiziert. Dieser enthielt zudem eine kurze hairpin-siRNA, welche gegen *HIF-1 α* gerichtet ist. Die Positivkontrolle wurde hingegen nur mit dem leeren psiRNA-hH1 neoscr Plasmid transfiziert. Die Herstellung der siRNA-Konstrukte und die Durchführung der Hypoxieversuche mit den Zellen erfolgte durch die Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland⁴⁵.

2.1.5. cDNA-Proben

Gewebe-cDNA-Proben

Die für die *JMJD1A*-Expressionsmessung verwendeten Gewebe-cDNA-Proben wurden von der Firma Clontech (Clontech Laboratories Palo Alto, CA, USA) bezogen. Sie waren auf eine Konzentration von 0,5 ng/µl eingestellt und entstammten den folgenden Geweben:

cDNA von gesunden erwachsenen Geweben (Human MTC™ Panel I)

Gehirn	Gepoolt von 2 männlichen Kaukasiern, Alter 43 und 55
Herz	Gepoolt von 3 männlichen Kaukasiern, Alter 33, 55 und 55
Leber	Gepoolt von 3 männlichen Kaukasiern, Alter 42-50
Lunge	Gepoolt von 2 weiblichen Kaukasiern, Alter 24 und 32
Niere	Gepoolt von 5 männlichen und weiblichen Kaukasiern, Alter 20-61
Pankreas	Gepoolt von 15 männlichen und weiblichen Kaukasiern, Alter 22-69
Plazenta	Gepoolt von 7 weiblichen Kaukasiern, Alter 22-35
Skelettmuskel	Gepoolt von 8 männlichen und weiblichen Kaukasiern, Alter 29-60

cDNA von fetalem Gewebe (Human Fetal MTC™ Panel)

Gehirn	Gepoolt von 10 männlichen und weiblichen Spontanaborten, Alter 21.-30. Woche
Herz	Gepoolt von 13 männlichen und weiblichen Spontanaborten, Alter 23.-36. Woche
Leber	Gepoolt von 32 männlichen und weiblichen Spontanaborten, Alter 18.-24. Woche
Lunge	Gepoolt von 38 männlichen und weiblichen Spontanaborten, Alter 22.-27. Woche
Milz	Gepoolt von 17 männlichen und weiblichen Spontanaborten, Alter 16.-32. Woche
Niere	Gepoolt von 17 männlichen und weiblichen Spontanaborten, Alter 16.-32. Woche
Thymus	Gepoolt von 17 männlichen und weiblichen Spontanaborten, Alter 16.-32. Woche
Skelettmuskel	Gepoolt von 13 männlichen und weiblichen Spontanaborten, Alter 23.-36. Woche

Gewebeproben Ratten

Die von Dr. W. Bernhardt (Abteilung für Nephrologie und Hypertensiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Deutschland) freundlicherweise zur Verfügung gestellten Gewebeproben (Herz, Gehirn, Leber und Niere) stammen von männlichen Sprague-Dawleys Ratten (n= 2-3 zu jedem Messpunkt) mit einem Gewicht von 200-280g. Die Ratten waren dabei für jeweils 6 oder 12 Stunden einer normobaren Hypoxie (8% O₂ / 92% N₂) oder Normoxie ausgesetzt⁴⁶. Die Gewebeproben wurden bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.6. Enzyme

T4 DNA Ligase – LigaFast Rapid DNA Ligations System	Promega GmbH, Mannheim, D + Catalys AG, Wallisellen, CH
Kpn I	Promega GmbH, Mannheim, D + Catalys AG, Wallisellen, CH
Nhe I	Promega GmbH, Mannheim, D + Catalys AG, Wallisellen, CH
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen AG, Karlsruhe, D + Basel, CH
Superscript II	Invitrogen AG, Karlsruhe, D + Basel, CH
Expand Long Template PCR System	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
FuGENE-6™ Transfektionsreagenz	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH

2.1.7. Chemikalien

Medien und Lösungen für die Zellkultur:

CoCl ₂ (Kobaltchlorid) 100µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
DFO (Desferrioxamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
DIP (2'2α-Dipyridil) 100mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃ , Na-Pyruvat	Biochrom AG (Oxoid), Berlin, D
DMSO (Dimethylsulphoxide)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
FKS (Fetales Kälberserum)	Biochrom AG (Oxoid), Berlin, D
GlutaMAX1	Invitrogen, Karlsruhe, D und Basel, CH
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe, D und Basel, CH
PBS	Biochrom AG (Oxoid), Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG (Oxoid), Berlin, D
RPMI 1640	Biochrom AG (Oxoid), Berlin, D
Trypanblau	Biochrom AG (Oxoid), Berlin, D
Trypsin	Biochrom AG (Oxoid), Berlin, D

Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung:

Ampicillin (50mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Glycerin	Invitrogen, Karlsruhe, D und Basel, CH
Luria Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Luria Broth (LB-Medium)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D und Basel, CH

Chemikalien:

Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Ammonium Persulfate (APS 25%)	Promega GmbH, Mannheim, D+Catalys AG, Wallisellen, CH
Borsäure	Carl Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, D
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen, Karlsruhe, D und Basel, CH
ECL Plus Western Blotting Detection Reagenz	Amersham plc, Buckinghamshire, UK
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic-Acid)	Carl Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 100%	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Glycin	Carl Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Isopropanol	Carl Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	J.M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG, Allgäu
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, D
PVDF Transfermembran	Amersham plc, Buckinghamshire, UK
Röntgenfilm Hyperfilm MP	Amersham plc, Buckinghamshire, UK
Rotiphorese Gel 30	Carl Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
SDS 10 % (Sodium dodecyl sulfate)	Invitrogen, Karlsruhe, D und Basel, CH

TEMED (Tetramethyldiamin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tris Base (250 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tween 20	Promega GmbH, Mannheim, D+Catalys AG, Wallisellen, CH
Ultra Pure™ DNase und RNase	Invitrogen, Karlsruhe, D und Basel, CH
freies Wasser	

Kits und Assays:

Big Dye™ DNA Sequenzierkit	Perkin Elmer, Waltham, USA
ABI PRISM Big Dye Terminator V.1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen AG, Hombrechtikon, CH
Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer	Promega GmbH, Mannheim, D; Catalys AG, Wallisellen, CH
QIAprep Plasmid Mini Kit	Qiagen AG, Hombrechtikon, CH
QIAprep Plasmid Midi Kit	Qiagen AG, Hombrechtikon, CH
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen AG, Hombrechtikon, CH
RC DC Protein Assay	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen AG, Hombrechtikon, CH
TransFaktor Whole Cell Extraction Kit	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F
β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer	Promega GmbH, Mannheim, D; Catalys AG, Wallisellen, CH

Nukleinsäure-Isolierungs- und Analysensysteme:

100bp-DNA-Leiter	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Gelladepuffer	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Full-Range Rainbow Marker	Amersham plc, Buckinghamshire, UK
Microcon YM-50 Centrifugal Filter Unit	Millipore GmbH, Schwalbach, D und Zug, CH
QiaShredder 50	Qiagen AG, Hombrechtikon, CH

Zusammensetzung Puffer und Lösungen:

10 xTBE-Puffer für Gelelektrophorese:

pH=8
216g Tris Base
110g Borsäure
80ml 0,5M EDTA
ad 2l dest. H₂O

1 x TBE-Puffer (1l):

100 ml 10xTBE-Puffer
ad 1l H₂O

10 x TBS

100 mM Tris Base pH 7,6
1,5M NaCl

1x TBS (1l)

100ml 10x TBS
ad 1l H₂O

10 x Lauf- bzw. Transferpuffer

250mM Tris Base pH 8,5
2M Glycin

1x Laufpuffer (1l)

100 ml 10x Lauf- bzw. Transferpuffer
10 ml 10%-iges SDS
ad 1l H₂O

Ladepuffer

50 mM Tris-HCl pH 6,8
2% SDS
10% Glycerin
Bromphenolblau

Transferpuffer (1l)

100 ml 10 x Lauf- bzw. Transferpuffer
200 ml Methanol

1 x TBST (1l)

100 ml 10 x TBS
500 µl Tween 20

SDS Sample Buffer

62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)
2 % w/v SDS
10 % Glycerol
50 mM DTT

Blocklösung 100ml

5g Magermilchpulver in 1x TBS lösen

2.1.8. Synthetische Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, D, oder Microsynth AG, Balgach, CH, synthetisiert.

Primer qRT-PCR

Bezeichnung

JMJD1A-human-F (TSGA-S)
 JMJD1A-human-R (TSGA-A)
 JMJD1A-Ratte-F
 JMJD1A-Ratte-R
 POLR2F-human-F
 POLR2F-human-R
 VEGFA-human-F
 VEGFA-human-R
 VEGFA-Ratte-F
 VEGFA-Ratte-R
 β_2M -human-F
 β_2M -human-R
 RPL13A-human-F
 RPL13A-human-R
 RPL13A-Ratte-F
 RPL13A-Ratte-R

Sequenz 5'-3'

GAG CTG TTT CCC ACA CCG A
 TGC TCT CCT TAG AAG GCT GTA GAC
 GAG CTG TTT CTC ACA CTG A
 TGC TCT TCT TAG AAG GCT GTA GA
 CCC GAA AGA TCC CCA TCA T
 CAC CCC CCA GTC TTC ATA GC
 CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT
 CTT GTC TTG CTC TAT CTT TCT TTG GTC T
 TTA CTG CTG TAC CTC CAC C
 ACA GGA CGG CTT GAA GAT A
 GAT GAG TAT GCC TGC CGT GTG
 TCC AAT CCA AAT GCG GCA TCT
 GCG GAT GAA CAC CAA CCC
 GTA GGC TTC AGA CGC ACG AC
 GCG GAT GAA TAC CAA CCC
 GTA GGC TTC AGC CGC ACA AC

Primer Reportgenassay

Bezeichnung

JMJD1-F-923 (p1072)
 JMJD1-F-555 (p704)
 JMJD1-F-484 (p633)
 JMJD1-F- 444 (p593)
 JMJD1-F- 350 (p499)
 JMJD1-F-444 (p593mut)

Sequenz 5'-3'

*CGG GGT ACC TTC CAC GCT TGT AAA ATG GG
 *CGG GGT ACC TTT ATC CTT CAA AAT GGC GG
 *CGG GGT ACC ATT TCG CCC AGC AGC CTA AG
 *CGG GGT ACC CGA GCC TCC AGA GCA CTA TC
 *CGG GGT ACC CCT CAC CCT TTC CTG TGA GA
 *CGG GGT ACC CGA GCC TCC AGA GCA CTA TCG
 CTC CTC CCT CTA GCT GAG TAC GCC TGA AAC
 CG ATGC TTC TCT TCC CT
 *CTA GCT AGC CGC TGA CTT GGT TCA AGA GC

JMJD1-R+149

Zur Identifizierung der Primer wurde die Position des ersten 5'Nukleotids in Beziehung zum Beginn der 5'UTR angegeben, in Klammern dahinter ist mit ‚p‘ die Länge des resultierenden Promotorkonstruktes angegeben

*Die Sequenz CGG GGT ACC wurde den Forward-Primern als Schnittstelle für die Restriktion mit Kpn1 angehängen.

*Die Sequenz CTA GCT AGC wurde dem Reverse-Primer als Schnittstelle für das Restriktionsenzym NheI angehängen.

Primer Sequenzierung

Bezeichnung

GLprimer1

Sequenz 5'-3'

TGT ATC TTA TGG TAC TGT AAC TG

2.1.9. Geräte

Brutschrank	Heraeus Instruments, Berlin, D
Bunsenbrenner	Usbeck Carl Friedrich KG, Radevormwald, D
CO ₂ Inkubatoren	
Binder CO ₂ Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Mini Galaxy A/E CO ₂ Inkubator	Sysmex Digitana AG, Horgen, CH
Dispergiergerät	
Ultra Turrax T 25	IKA Labortechnik, Staufen, D
Elektrophoresekammer	
Agarosegele	Biometra, Göttingen, D
Kamera	
Polaroid CU-5 Nahaufnahme Kamera	Polaroid, Offenbach/Main, D
ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
Kühlschrank	
RV 3.11 Profiline	Liebherr Hausgeräte, Ochsenhausen, D
Laser-Imager	
Scopix™ LR 5200	Agfa Graphics GmbH & Co.KG, Düsseldorf, D
Luminometer	Mitras LB 940, Berthold Technologies, D
Mikroskope	
Telaval 31 (invers)	Carl Zeiss AG, Jena, D
Mikrowelle	
Mikrowelle HMT8621	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, Stuttgart, D
Mikrozentrifugen	
Qualitron DW-41	Qualitron Inc., Sylvania, Ohio, USA
MIKRO 22	A. Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, D
Galaxy Mini Microcentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, D
Biofuge Pico	Heraeus Instruments, Berlin, D
Mini-Protean Tetra Electrophoresis System	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Mini-Trans-Blot Cell	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
PCR Cycler	
Mastercycler egradient S	Eppendorf AG, Hamburg, D
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PCR Werkbank	
Captair bio	Erlab DFS SAS, Köln, D
pH-Meter	
pH 330 Set 1	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Photometer	
Multiskan Ascent	Thermo Labsystems, Finnland
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg, D
Power Supply	
Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D
Power Pac 3000	Bio-RAD Laboratories, Göttingen, D
Schüttelinkubator	
Certomat R	B. Braun Biotech International, Melsungen, D
Schüttler	
IKA Vibrax VXR	IKA Labortechnik, Staufen, D
Sequenziergerät	
ABI Prism377 Automatic Sequencer	PerkinElmer™, Life Sciences, Foster City, CA, USA
Sterilwerkbank	
Holten Safe 2010	Thermo Electron Corporation, Fernwald, D
Stickstofftank	Tec-Lab, Königsstein, D
Thermo-Cycler	
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH & Co. KG, Mannheim, D
Rotor-Gene 6000	Corbett Life Science, Sydney, AUS
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D

Thermozentrifuge Rotanta / R	A. Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, D
Ultratiefkühlgerät Ultra-Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, D
UV-Transluminator TFX-20M	Fröbel-Labortechnik GmbH, Berlin, D
Vortexer Vibrofix VF1	IKA Labortechnik, Staufen, D
Heidolph Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, D
Waage Scaltec, SBC 42	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, D
Wasserbad	GFL – Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, D

2.1.10. Verwendete Webseiten

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
<http://www.tib-molbiol.de>
<http://www.ensembl.org>
<http://www.uniprot.org/>

2.1.11. Statistische Auswertung

Die angegebenen Daten sowie auch die dazugehörigen Symbole stellen die Mittelwerte da. Die Standardabweichung (SD) oder der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) spiegelt sich in den Fehlerbalken wieder. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede wurde ein zweiseitiger t-Test nach Student mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0.05$) verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die adhärenenten HEK293, HeLa, HSMC und Hep3B-Zellen wurden in DMEM unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 1% GlutaMAX1 bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und wassergesättigter Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Für ein optimales Wachstum der adhärenenten Zellen wird das Zellkulturmedium DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt. Für die Suspensionszellen REH wurde RPMI 1640 als Medium verwendet, welches ebenfalls mit 10%-igem FKS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Die Zellen werden alle 2-3 Tage gesplittet. Dafür wird das Medium von den adhärenenten Zellen abgesaugt, mit PBS gespült und mit Trypsin für 5 Min. im Brutschrank inkubiert. Danach werden die abgelösten Zellen mit PBS aufgenommen und bei 1000 RPM für 2 Min. zentrifugiert, um sie daraufhin wieder in Zellkultur-schalen auszusäen. Für die Suspensionszellen erübrigte sich die Ablösung mit Trypsin, so dass diese direkt bei 1000 RPM für 2 Min. zentrifugiert wurden. Im Anschluss wurde ihnen frisches Medium hinzugefügt. Für die Hypoxieexperimente wurden die Zellen nach Anfärbung mit Trypanblau in einer Schilling-Zählkammer gezählt und 2×10^5 Zellen in 2 ml Nährmedium je

Well einer 6 Well Platte ausgesät. Je Versuch wurden mindestens zwei Wells einer Zelllinie ausgesät, eine für die Hypoxiekammer und die andere für die Normoxiekammer. Normoxie wurde dabei in allen Experimenten als 20% O₂ und 5% CO₂ definiert und Hypoxie als 0,5 - 1% O₂.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren der Zellen wird dem Kultivierungsmedium zusätzlich 10% FKS und 10% DMSO zugesetzt. Auf die vom Medium befreiten Zellen wird dann das Einfriermedium gegeben und auf die Kryoröhrchen mit jeweils 2×10^6 Zellen verteilt. Um gewährleisten zu können, dass die Zellen langsam - etwa 1°C/Min. – abkühlen, werden die Kryoröhrchen für 24 h in einem Behälter mit Isopropanol in einem -80°C-Gefrierschrank gelagert und danach in einem Stickstofftank. Das Auftauen der Zellen beginnt mit der einminütigen Inkubation der Kryoröhrchen im 37°C-warmen Wasserbad. Durch das tropfenweise Zugeben des ebenfalls 37°C-warmen Kulturmediums tauen die Zellen behutsam auf. Das DMSO aus dem Einfriermedium wird durch Zentrifugation von den Zellen getrennt und sie können innerhalb der nächsten 12 – 24 h in einer geeigneten Zellkulturschale adhären.

2.2.2. RNA-Extraktion

Zur Isolierung der RNA aus den Zelllysaten wurde das Qiagen Rneasy® Mini Kit verwendet und gemäß dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die Konzentration der so gewonnenen RNA-Extrakte wird anschließend photometrisch bestimmt. Um Zelllysate aus den Gewebeproben der Ratten zu erhalten, wurden den gekühlten Proben zunächst 600µl RLT-Puffer (Qiagen Rneasy® Mini Kit) zugesetzt und diese dann mit dem Dispergiergerät homogenisiert.

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein DNA-Abschnitt kann durch die PCR (polymerase chain reaction) aus einem komplexen Gemisch von DNA, die das zu vervielfältigende DNA-Teilstück enthält, selektiv amplifiziert werden. Die exponentielle Amplifikation der DNA wird durch multiple Zyklen von thermischer Strangtrennung der DNA (*Denaturierung*), Bindung der spezifischen Oligodesoxynukleotide (Primer) an die Einzelstrang-DNA (*Annealing*) und DNA-Synthese durch die thermostabile Platinum® Taq-DNA-Polymerase (*Elongation*) erreicht. Die PCR-Reaktion wird in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem *PCR-Cycler* durchgeführt. Die entstandenen PCR-Fragmente lassen sich durch gelektrophoretische Auftrennung als Banden darstellen. Durch den Zusatz von Ethidium-

bromid zum Gel, einem Farbstoff, der mit der DNA interkaliert und bei einer Wellenlänge von 256 nm fluoresziert, können die Banden im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Tabelle 1: PCR-Ansatz für die Herstellung von DNS-Fragmenten (20µl)

1x Ansatz	Reagenzien	Firma
8,8 µl	H ₂ O	
2 µl	MgCl ₂ (50 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
2 µl	10 x PCR Buffer (ohne MgCl ₂)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
2 µl	dNTP-Mix (je 2mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
0,2 µl	Platinum® <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
1/1 µl	Forward /Reverse Primer	
3 µl	DNA	

Reaktionsbedingungen im Cycler:

Initialisierung:	95°C	5 Min.	
Denaturierung:	95°C	15s	} 34 Zyklen
Annealing:	62°C	30s	
Elongation:	72°C	2 Min. 30s	
	72°C	5 Min.	
	4°C	Ende	

Um optimale Annealing-Temperaturen für das jeweilige Primerpaar zu erhalten, wird immer zuvor eine Test-PCR am Gradientencycler mit verschiedenen Annealing-Temperaturen zwischen 55°C und 65°C durchgeführt. Bei größeren DNS-Fragmenten (>600 bp) wird das Expand Long Template PCR System benutzt.

Tabelle 2: PCR-Ansatz mit dem Expand Long Template PCR System (30µl)

1x Ansatz	Reagenzien	Firma
19,5 µl	H ₂ O	
3 µl	10 x PCR Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
1 µl	dNTP-Mix (je 10mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
0,5 µl	Enzyme (Expand Long Template PCR)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
1/1 µl	Forward /Reverse Primer	
4 µl	DNA	

Reaktionsbedingungen im Cycler:

Initialisierung:	95°C 2 Min.	}	34 Zyklen
Denaturierung:	95°C 15s		
Annealing:	62°C 30s		
Elongation:	68°C 2 Min. 30s		
	68°C 7 Min.		
	4°C Ende		

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion kann ebenfalls angewendet werden, um die Plasmidtransformation in Bakterien auf ihr Gelingen zu testen. Dafür werden einfach 5µl LB-Medium entnommen, das ca. 1-2 h zuvor mit einer einzelnen Kolonie von der Transformationsplatte beimpft wurde, und statt der DNS zu dem PCR-Ansatz hinzu pipettiert.

2.2.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Mit Hilfe der Reversen Transkription (RT) kann die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dadurch besteht die Möglichkeit indirekt auch RNA-Abschnitte nachzuweisen. Die RT zur Generierung von cDNA wurde bei 37°C für 45 Min. und anschließender Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 96°C für 5 Min. durchgeführt.

Tabelle 3: Allgemeiner Ansatz der Reversen Transkription von RNA (20 µl)

1x Ansatz	Reagenzien	Firma
1 µg	RNA	
4 µl	5 x First Strand Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
2 µl	dNTP-Mix (je 10mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
1 µl	DTT (0,1 M)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
2 µl	Hexanukleotide (50mM)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
1 µl	SuperScript II Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
ad 20 µl	H ₂ O	

2.2.5. Aufreinigung & Aufkonzentrierung von PCR- und Restriktionsprodukten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Zur Aufkonzentrierung der PCR Produkte wurde der Microcon® Filter von Millipore gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wird die entsprechende Konzentration des Agarosegels gewählt. Zur Herstellung von 100 ml eines 2%-igen Gels werden 2g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Unter leichtem Rühren wird das Ganze auf ca. 60°C abgekühlt, mit 8 µl Ethidiumbromid (500 µg/ml) versetzt und luftblasenfrei auf einen horizontalen Gelträger gegossen. Durch das Einhängen eines Kamms in die obere Schicht des Gels entstehen nach Erstarren des Gels die Taschen zum Auftragen der Proben (10 µl Aliquot des PCR-Produkts + 2 µl Gelladepuffer). Die Elektrophoresekammer wird dann mit 0,5x TBE-Puffer ausreichend befüllt, mit den jeweiligen Proben geladen und eine Spannungsquelle mit 120V angelegt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung können die Fragmente mittels UV-Transluminator sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

2.2.7. Quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) mit dem Light Cycler™

Die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, zeichnet sich zudem aber durch die Möglichkeit der Quantifizierung der gewonnenen DNA zu jedem Zeitpunkt des PCR-Zyklus aus (*real-time*). Die Quantifizierung wird durch Fluoreszenzmessungen ermöglicht, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren entweder direkt mit der doppelsträngigen DNA (Ethidiumbromid, SYBRGreen) oder sind an Oligonukleotide gebunden, die erst nach spezifischer Bindung an das PCR-Produkt fluoreszieren.

In dieser Arbeit wurde der asymmetrische Cyanin-Farbstoff SYBRGreen (SG) zur Markierung verwendet. Der resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521$ nm. Die Messung findet am Ende der Elongationsphase eines jeden Zyklus statt und kann am angeschlossenen Computer während des gesamten Laufs (bestehend aus mehreren Zyklen) direkt verfolgt werden. Der zur qRT-PCR verwendete LightCycler™ setzt sich im Wesentlichen aus zwei funktionellen Hauptkomponenten zusammen, der Thermocyclereinheit und der Fluoreszenzmesseinheit. Die zylindrisch aufgebaute Reaktionskammer, die durch Luft geheizt bzw. gekühlt werden kann, und genau wie das Probenkarussell aus Materialien mit geringer Wärmekapazität besteht, ermöglicht eine Aufheiz- und Abkühlungsrate von bis zu 20°C pro Sekunde. Als Reaktionsgefäße dienen dünne Quarzglaskapillaren (*LightCycler-Glaskapillaren*) mit einem Fassungsvermögen von 25 µl, die durch ihre große Oberfläche im Verhältnis zum Volumen sehr schnell die Umgebungs-

temperatur annehmen können und damit besonders gut für diesen extrem schnellen Thermocycler geeignet sind ⁴⁷.

Für die qRT-PCR werden zunächst 17 µl des Master-Mix inklusive den entsprechenden Primern in die gekühlten Glaskapillaren vorgelegt. Anschließend werden noch jeweils 3 µl der cDNA-Probe hinzu pipettiert und die Kapillaren fest verschlossen, um eine Kontamination zu vermeiden. Die befüllten Glaskapillaren werden kurz anzentrifugiert und können dann in den LightCycler™ eingesetzt werden. In allen Versuchen wurde mindestens eine Doppelbestimmung vorgenommen.

Tabelle 4: Allgemeiner Ansatz für die qRT-PCR (20µl)

1x Ansatz	Reagenzien	Firma
7,2 µl	H ₂ O	
3 µl	MgCl ₂ (50 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
2 µl	10 x PCR Buffer ohne MgCl ₂	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
2 µl	dNTP-Mix (2mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
0,3 µl	BSA (10 µg/µl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
1 µl	SYBRGreen (10 µM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
0,2 µl	Platinum (Taq DNA-Polymerase 500U)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D und Basel, CH
0,7/0,7 µl	Forward / Reverse Primer	
3 µl	cDNA	

Reaktionsbedingungen im LightCycler™:

Initialisierung:	95°C 120s	} 40 Zyklen
Denaturierung:	95°C 8s	
Annealing:	66°C 12s	
Elongation:	72°C 20s	
	38°C 30s	

2.2.7.1. Quantifizierung der qRT-PCR

Zur Quantifizierung wurde der sogenannte *crossing-point* (cp-Wert) oder auch Threshold-Cycle (C_T-Wert) jeder Probe bestimmt. Dieser von der LightCycler™-Software (Roche Diagnostics GmbH) über den „second derivate maximum“ (SDM) Analysemodus ermittelte und in der Anzahl der PCR-Zyklen ausgegebene Wert ist definiert als der Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenzzunahme vom linearen in den exponentiellen Bereich wechselt. Der zur C_T-Wert-Bestimmung

verwendete mathematische Algorithmus bedient sich dabei dem ersten Maximum der zweiten Ableitung der Kurve, welche die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zykluszahl beschreibt.

Standard- und Standardkurve

Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge an DNA-Template (Kopien) und dem C_T -Wert⁴⁸.

Durch diesen Zusammenhang kann anhand einer Standardkurve mit der Gleichung

$$C_T\text{-Wert} = - \left[\frac{1}{\log E} \right] \times \log T_0 + \left[\frac{\log T}{\log E} \right]$$

Abb. 8 Gleichung der Standardkurve

T_0 = Ausgangskonzentration der Probe; T = Konzentration des PCR-Produkts am C_T -Wert; E = Effizienz der Reaktion

auch die Ausgangskonzentration T_0 von unbekanntenen Proben berechnet werden. Dazu fertigt man eine logarithmische Verdünnungsreihe einer Kontrollprobe mit bekannter

Ausgangskonzentration an. Durch die Auftragung der gemessenen C_T -Werte gegen die logarithmisch verdünnten DNA-Äquivalente lässt sich eine Standardgerade ziehen. Aus der Steigung m dieser Geraden mit der allgemeinen Geradengleichung $y = m * x + n$ wird die Effizienz berechnet: $E = 10^{(-1/m)}$. Eine Steigung m von $-3,32$ würde somit eine Effizienz von 100 % bedeuten, d. h. eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus. -3.58 eine Effizienz von 90 %. Die LightCycler™-Software berechnet aus den ermittelten C_T -Werten der Proben unter Verwendung der Standardgeraden die Ausgangskonzentrationen automatisch.

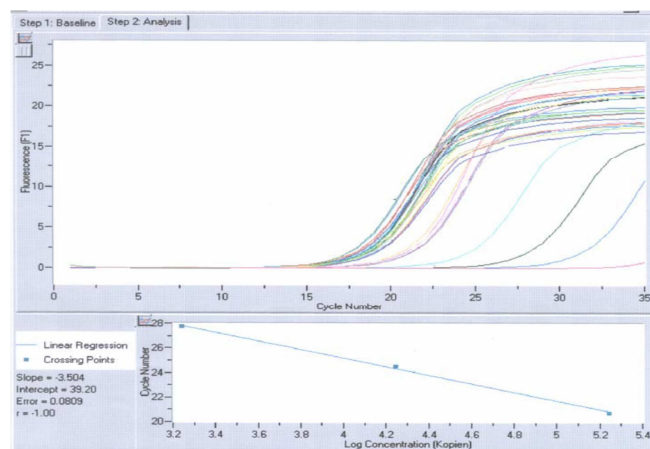


Abb. 9 Beispiel einer qRT-PCR mittels LightCycler™ und dazugehöriger Standardgeraden

In dieser Arbeit wurde als Standard das VEGF₁₆₅-Plasmid verwendet (*siehe 2.1.3.*). Dieses ist durch seine Stabilität besonders geeignet um Messschwankungen zwischen den einzelnen PCR-Läufen zu detektieren. Zur Erstellung einer Standardgeraden wurde das Plasmid in Zehnerstufen verdünnt.

Normalisierung

Bei der Normalisierung, die einer relativen Quantifizierung entspricht, werden die Expressionsergebnisse des Zielgens ins Verhältnis zu einem sogenannten Referenz- oder auch *housekeeping*-Gen gesetzt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass Variationen z.B. in der Menge des Ausgangsmaterials ausgeglichen werden können. Das ideale Referenzgen lässt sich leicht detektieren, zeichnet sich durch eine ubiquitäre und homogene Expression aus, die während des Zellzyklus zwischen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung nicht variiert. Die Wahl solcher Referenzgene ist mitunter schwierig und wird daher in der Diskussion noch weiter erörtert werden. Für die Bestimmung der *JMJD1A*-Expression in den cDNA-Gewebe-Panels wurde das Referenzgen *POLR2F* ausgewählt. Ansonsten erfolgte die Normalisierung zum Referenzgen *β₂-Mikroglobulin (β₂M)* und *RPL13A*.

2.2.7.2. Schmelzkurvenanalyse

Da die Bindung an doppelsträngige DNA von SYBRGreen unspezifisch ist und eine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt, Artefakt und Primerdimeren somit nicht möglich, bedarf es einer Schmelzkurvenanalyse nach abgeschlossener qRT-PCR mit dem LightCycler™ oder einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte.

Bei der Schmelzkurvenanalyse kommt es durch die schrittweise Temperaturerhöhung von 0,2°C/s (von 50°C auf 95°C) bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur zum Aufbrechen des Doppelstranges. Dieser Aufbruch kann durch die Fluoreszenzabnahme detektiert werden. Da der Schmelzpunkt von spezifischen PCR-Produkten höher liegt als bei unspezifisch entstehenden Primerdimeren oder Artefakten, können Produkte voneinander abgegrenzt werden, die sich in ihrer Schmelztemperatur um weniger als 2°C unterscheiden ⁴⁹.

2.2.8. Promotoranalyse

2.2.8.1. Reporterassay

Mit Hilfe eines Reporterassays ist es möglich, den Einfluss potenzieller Promotoren und Enhancer auf die Transkription eines Reportergens in geeigneten Zellen zu testen. Reportergene

codieren für Proteine, die durch enzymatische Aktivität oder eine andere Eigenschaft leicht nachweisbar sind. Idealerweise werden sie nicht oder nur in geringem Umfang in eukaryotischen Zellen endogen exprimiert. In dieser Arbeit wurden als Reporter gen verwendet das β -Galactosidase-Gen (*lacZ*) aus *E. coli* und das Luciferase-Gen (*luc*) aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*⁵⁰. Das potenzielle Promotorfragment wird vor das Reporter gen kloniert und der Vektor in geeignete Zellen transfiziert. Die Aktivität des Reporter genprodukts ist im Allgemeinen direkt proportional zu der Transkriptionsaktivität. Durch Nachweis des vom Reporter gen codierten Proteins lässt sich deshalb indirekt eine Aussage über den Einfluss des Promotorfragments auf die Transkription des nachgeschalteten Gens machen⁵⁰.

2.2.8.2. PCR, Restriktion und Ligation der Fragmente in den pGL2 Vektor

PCR

Die zu untersuchenden Promoter-Fragmente werden durch Einsatz des Expand Long Template PCR Systems hergestellt (siehe 2.2.3). Die verwendete Annealing Temperatur beträgt 64°C. Zur Kontrolle wird ein kleiner Anteil der gewonnenen PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Der Rest der durch die PCR gewonnenen Fragmente wird aufgereinigt und aufkonzentriert. Anschließend wird die DNA-Konzentration der jeweiligen Fragmente am Photometer gemessen, um für die folgende Restriktion die einzusetzende Menge der Inserts (DNA) bestimmen zu können.

Restriktion

Zur Restriktion der DNA-Fragmente wurden die Restriktionsenzyme Kpn1 und Nhe1 der Firma Promega nach Anleitung des Herstellers verwendet und die DNA nach Zusatz der Enzyme für 90-120 Min. bei 37°C inkubiert. Die DNA des verwendeten pGL2 Vektors wurde konform verdaut. Im Anschluss an die entsprechend den Angaben erfolgte Inaktivierung der Enzyme erfolgte die Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Restriktionsprodukte.

Tabelle 5: Allgemeiner Restriktionsansatz (20µl)

1x Ansatz	Reagenzien	Firma
2 µg	Insert (DNA)	
1 µl	Multicore 10 x Buffer	Promega GmbH, Mannheim, D
0,2 µl	BSA (Bovine Serum Albumin Acetylated)	Promega GmbH, Mannheim, D
1 µl	Kpn1	Promega GmbH, Mannheim, D
1 µl	Nhe1	Promega GmbH, Mannheim, D
ad 20 µl	H ₂ O	

Ligation

Die Ligation der einzelnen Promotorfragmente in den pGL2-Vektor erfolgte unter Verwendung des LigaFast Rapid DNA Ligation Systems. Die Bestimmung der einzusetzenden Menge an Insert und Vektor erfolgte nach folgender Formel:

$\frac{\text{Vektor in ng} \times \text{Größe des Inserts in kb}}{\text{Größe des Vektors in kb}} \times \text{Molares Verhältnis von Vektor zu Insert} = \text{Insert in ng}$

Das hier verwendete Molare Verhältnis entsprach 3:1. Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur für 15 Min. inkubiert. Anschließend wurden kompetente E. coli Zellen mit dem nun die Promotorfragmente enthaltenen pGL2 Vektor transformiert.

Tabelle 6: Allgemeiner Ligationsansatz (10µl)

1x Ansatz	Reagenzien	Firma
....ng	Insert (DNA)	
ca. 100 ng	pGL2-Basic-Vektor	Promega GmbH, Mannheim, D
5 µl	2 x Ligase Buffer	Promega GmbH, Mannheim, D
1 µl	T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Mannheim, D
ad 10 µl	H ₂ O	

2.2.8.3. Transformation kompetenter Escherichia coli (E. coli)

Die kompetenten E. coli Zellen (*Library Efficiency® DH5α™ Cells*) wurden auf Eis aufgetaut und 100 µl von ihnen mit 2 µl des Ligationsansatzes vermischt. Nach einer Inkubationszeit des Gemisches von 30 Min. auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock von 42°C für 45 sek. ausgesetzt. Nach der kurzen (ca. 2-5 Min.) Abkühlung auf Eis werden die Zellen mit 900 µl SOC-Medium bei 37°C und 225 RPM auf einem Rotationsschüttler für 60 Min. geschüttelt. Anschließend werden 100 µl des jeweiligen Ansatzes auf Luria-Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch den Einbau einer Ampicillinresistenz-vermittelten Sequenz in das Plasmid, können sich nur diejenigen Wirtszellen vermehren, die das Plasmid auch tatsächlich enthalten und es kommt damit zur Selektion.

2.2.8.4. Plasmidamplifikation- und Präparation

Zur Amplifikation der Plasmid-DNA wurde je eine gepickte Kolonie aus der Übernachtskultur mit 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium versetzt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 225 RPM inkubiert. Im Anschluss daran wird die Kultur für 5-6 Min. bei ca. 2000 RPM abzentrifugiert. Die Isolierung der Plasmide wurde mit dem QIAprep Plasmid Midi Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers vorgenommen. Hierbei erfolgt die Aufreinigung der Bakterien mittels alkalischer Lyse und über Säulen mit einer DNA-bindenden Silica-Matrix.

2.2.8.5. Sequenzierung

Um die Sequenzintegrität der verschiedenen Promotorkonstrukte sicherzustellen, wurden die Plasmide mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator V. 1.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems, Weiterstadt, D nach der Aufreinigung sequenziert. Die Methode des Cycle Sequencing ist ähnlich einer PCR aufgebaut und unterscheidet sich von dieser durch den Einsatz nur eines Primers. Die verwendete hitzestabile DNA-Polymerase ermöglicht den Ablauf mehrerer Zyklen der Hitzedenaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation, so dass am Ende eine größere Menge an Produkt für die Analyse zur Verfügung steht. Durch den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP's) in den DNA-Strang und daraus resultierendem Kettenabbruch wird eine weitere Polymerisierung ab dieser Stelle verhindert. Die vier verschiedenen ddNTP's sind jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung können die Farben von einem geeigneten Detektor erkannt werden und jedem Fragment kann ein bestimmtes Nukleotid zugeordnet werden. Die Gelelektrophorese, Detektion und Analyse der Sequenzierungen wurden mit dem automatischen Sequenzierer ABI PrismTM 377 durchgeführt. Die Sequenzier-PCR wurde im Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700 durchgeführt.

Tabelle 7: Sequenzier-PCR Ansatz (10µl) und Reaktionsbedingungen

1x Ansatz	Reagenzien
100 ng	aufgereinigtes Plasmid
0,5 µl	GL1 Primer
1 µl	Big Dye
ad 10 µl	H ₂ O

Initiale Denaturierung 96°C	1 Min.	} 25 Zyklen
Denaturierung 96°C	30 s	
Annealing 55°C	15 s	
Elongation 60°C	4 Min.	
4°C		

Anschließend wurden die Produkte unter Verwendung des DyeEx 2.0 Spin Kit von Qiagen gemäß Protokoll des Herstellers von überschüssigen Primer- und Nukleotidresten befreit.

In die 0,5 ml großen Reaktionsgefäße wurden zu den bereits vorgelegten 16µl H₂O noch 4µl der aufgereinigten DNA gegeben, das Ganze mit einem Deckel dicht verschlossen und anschließend in den Sequenzierer zur Analyse gestellt.

2.2.8.6. Transiente Transfektion der HEK293-Zellen

Am Abend vor der Transfektion werden die HEK293-Zellen dünn (1×10^5 Zellen/ml und 600µl/Well) in 12-Well-Platten ausgesät. Für jedes zu überprüfende Promotorkonstrukt wird ein 3-fach-Ansatz angesetzt. Für alle Untersuchungen werden immer der Leervektor als Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Um den β -Galaktosidase-Assay durchführen zu können, wird zusätzlich ein CMV- β -Gal-Vektor in die HEK-293-Zellen co-transfiziert. Zur Vorbereitung der Transfektion wird am Morgen das entsprechende Volumen an serumfreiem Medium in ein Reaktionsgefäß gegeben und das Transfektionsmittel Fugene® direkt ins Medium pipettiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation kann nun das passende Volumen an Plasmid-DNA und CMV- β -Gal-Vektor zugeführt werden. Nach weiteren 15 Min. Inkubation kann die gesamte Mischung vorsichtig tropfenweise auf die Zellen gegeben werden. Je nach Versuchsaufbau wird nun eine 12-Well-Platte in die Hypoxiekammer gestellt, eine 12-Well-Platte mit 100µM DIP versetzt und anschließend mit einer DIP freien 12-Well-Platte unter normoxischen Bedingungen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach ca. 18 h werden dann die Zellen für den Luciferase-Assay geerntet.

Transfektionsansatz je Well einer 12-Well-Platte:

Medium OptiMEM 25 µl

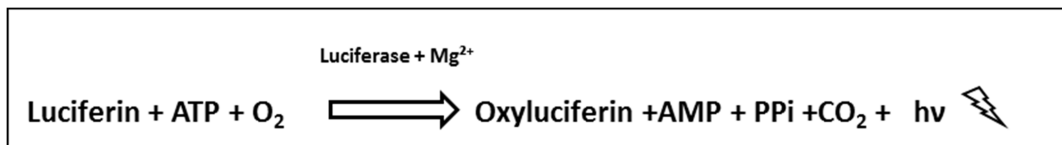
Transfektionsreagenz (Fugene®): 1µl

Reporter gen / CMV- β -Gal (im Verhältnis 9:1): 0,3 µg / 0,033 µg

2.2.8.7. Luciferase-Assay

Das Luciferase-Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (firefly luciferase) ist ein monomeres Protein (62 kDa), das keiner posttranslationalen Prozessierung unterliegt. Das Luciferase-Gen (*luc*) wurde von de Wet *et al.*⁵¹ sequenziert und kloniert.

Luciferase katalysiert die Umsetzung des Substrates Luciferin in Gegenwart von ATP und Magnesium (Mg^{2+}) zu Luciferyl-AMP, das in einem zweiten Schritt unter Freisetzung von Licht (560 nm) zu Oxyluciferin reagiert:



Wenn ein Substratüberschuss vorliegt, ist die Stärke des emittierten Lichtblitzes proportional der Luciferase-Aktivität. Die Detektion des Lichtes erfolgte mittels Luminometer.

In dieser Arbeit wurde das von Promega entwickelte Luciferase- und β -Galaktosidase-Assay-System verwendet. Nach dem 18 Stunden-Versuch werden die einzelnen Wells der 12-Well-Platte mehrmals mit PBS gespült und die transient transfizierten HEK293-Zellen inklusive des gesamten Mediums in Reaktionsgefäße überführt. Anschließend werden die Zellen bei 6000 RPM zentrifugiert. Um die Zellen nun vollständig vom Medium zu befreien, wäscht man sie noch zweimal mit PBS. Dem Pellet werden nun 140 μl von dem 1x Reporter Lysis Buffer von Promega zugegeben. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen, müssen die Reaktionsgefäße für ca. 30 Min. in den -20°C -Gefrierschrank. Nach dem Auftauen werden die Reaktionsgefäße für 15 s gevortext und bei 12000 RPM für weitere 15 s zentrifugiert. Der Überstand kann nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für den Luciferase- und β -Galactosidase Enzym Assay eingesetzt werden. Da ein sehr starkes Signal beim Luciferase Assay zu erwarten ist, werden nur je 10 μl des Lysats in die LumiNunc-96-Lochplatte vorgelegt und dann im Luminometer mit automatischer Zugabe von je 100 μl Luciferase Assay Reagenz vermessen.

2.2.8.8. β -Galactosidase-Assay

Um die Transfektionseffizienz zu überprüfen wird parallel zum Luciferase-Assay ein β -Galactosidase-Enzym-Assay mit dem gleichen Zelllysate durchgeführt. Hierfür werden 10 μ l Lysat mit 10 μ l 1x Reporter Lysis Buffer in eine 96-Lochplatte vorgelegt und 20 μ l 2x Assay Buffer zugegeben. Sobald ein Farbumschlag festzustellen ist, werden 50 μ l Natriumcarbonat dazu pipettiert, um die Reaktion zu stoppen. Bei 420 nm kann nun die Platte am ELISA-Reader vermessen werden.

2.2.9. Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots können spezifische Proteine eines Proteingemisches identifiziert und quantitativ bestimmt werden. Das Prinzip dieser Technik beruht im Wesentlichen darauf, die elektrophoretisch gemäß ihres Molekulargewichtes aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Trägermembran zu übertragen, um sie anschließend durch spezifische Antikörper zu detektieren und sichtbar zu machen.

Proteinextraktion

Die HEK-293-Zellen wurden auf zwölf 10-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde die eine Hälfte der Platten mit 100 μ M DIP versetzt und alle Platten für weitere 18 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe des TransFactor Extraction Kit von Clontech die Kern- und Zytoplasmaextrakte nach Anweisungen des Herstellers gewonnen. Die Zytoplasmaextrakte wurden vor dem Auftragen auf die SDS-Page mit Aceton ausgefällt. Dabei wurde -20°C kaltes 100%-iges Aceton im Verhältnis 1:1 dem Zytoplasmaüberstand hinzugefügt und für 10 Min. bei -20°C stengelassen. Das Gemisch wurde anschließend für 10 Min. bei 14000 RPM zentrifugiert. Das Pellet wurde nun zweimal mit gekühltem 80%-igen Aceton gewaschen und im Anschluss daran 1x SDS Sample Buffer hinzugefügt. Die Proteinbestimmung der Kern- und Zytoplasmaextrakte erfolgte unter Verwendung des RC DC Protein Assay von BIO-RAD nach den Anweisungen des Herstellers. Die Proteinkonzentration wurde mittels ELISA Reader bei 750 nm bestimmt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Nach Aufbau der Elektrophoresevorrichtung werden die Gele angefertigt. Dabei wird auf das Trenngel im Anschluss an dessen Polymerisation das Sammelgel gegossen. Die Proteine aus dem Kern- und Zytoplasma werden vor der SDS-Page für 5 Min. auf 95°C erhitzt und anschließend für 2 Min. auf Eis abgekühlt. Die Proben werden auf eine Proteinkonzentration von 60 µg eingestellt, mit 8 µl Ladepuffer versehen und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer mit den vertikalen Gelen wird dann noch ausreichend mit dem 1x Laufpuffer befüllt. Das Einlaufen der Proben erfolgt für ca. 15 Min. bei 60V und deren Auftrennung bei 150 V bis das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hat.

Komponente	Trenngel (7,5 %)	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:0,8 (Rotiphorese Gel 30)	3,75 ml	2 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,75 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	2,5 ml
10 % SDS	150 µl	100 µl
H ₂ O	7,35 ml	5,4 ml
25% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	40 µl	30 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	15 µL	12 µl

Tabelle 8: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels

Westernblot und Immunfärbung

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page werden die Proteine nun elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer erfolgt über Nacht im Transferpuffer bei 4°C und 30V im Mini Transblot von BIO-RAD. Nach dem Blotting wird die Membran mit der Blocklösung auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membran über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit 1x TBST (3 x 10 Min.) wird die Membran nun 1 h mit dem sekundären Antikörper, an dem eine Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1x TBST (3 x 15 Min.) wird die Membran für 90 s mit ECL-Lösung bedeckt und anschließend entwickelt. Die Belichtungszeit des Röntgenfilms beträgt dabei gut 30 Min.

<u>Primäre Antikörper</u>	Verhältnis (AK/Blocklösung)	Hersteller
Anti-Jmjd1a-AK (ab 32440) Rabbit	1 : 500	Abcam plc., Cambridge, UK
Anti-HIF-1 α -AK (mouse)	1 : 500	Transduction Laboratories, Lexington, KY
Anti- β -Actin-AK Rabbit	1 : 1000	Cell Signaling Technology Inc., Boston, USA
<u>Sekundärer Antikörper</u>		
Anti-Rabbit-IgG	1 : 4000	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Anti-Mouse-IgG	1 : 2000	Cell Signaling Technology Inc., Boston, USA

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für den Western Blot

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der sauerstoffabhängigen JMJD1A Expression *in vitro*

3.1.1. Hypoxie stimuliert JMJD1A mRNA-Expression *in vitro*

Um zu überprüfen, ob *JMJD1A* tatsächlich sauerstoffabhängigen Regulationsmechanismen in seiner Genexpression unterliegt, wurde die mRNA-Expression von *JMJD1A* nach Hypoxieeinwirkung mittels quantitativer RT-PCR an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293-Zellen) im Vergleich mit normoxischen Kontrollen untersucht. Die Normalisierung erfolgte dabei zur mRNA-Expression vom Referenzgen β_2 -Mikroglobulin (β_2M). Inkubiert man HEK293-Zellen sechs Stunden unter hypoxischen Bedingungen (0,5% O₂), sieht man einen Anstieg der *JMJD1A* mRNA-Expression um das ca. 2,5-Fache im Vergleich zu den Zellen, die im gleichen Zeitraum bei 20% O₂ inkubiert wurden. *VEGF-A*, ein bekanntes HIF-1 Zielgen, wurde als Kontrolle mitgeführt und zeigte eine ähnliche Induktion wie *JMJD1A*: einen Anstieg um das 1,6-Fache. Wie in der Einleitung beschrieben, ist für die Hydroxylierung von HIF-1 α und dem dadurch ausgelösten Abbau von HIF-1 α elementares Eisen ein notwendiger Kofaktor. Wird Eisen gebunden, kommt es umgekehrt zur Stabilisierung von HIF-1 α . Erwartungsgemäß zeigte sich nach Zugabe von je 100 μ M der Eisenchelatoren 2,2 α -Dipyridil (DIP), Desferrioxamin (DFO) und Kobaltchlorid (CoCl₂) zu den kultivierten HEK293-Zellen ebenfalls ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von *JMJD1A* und *VEGF-A*.

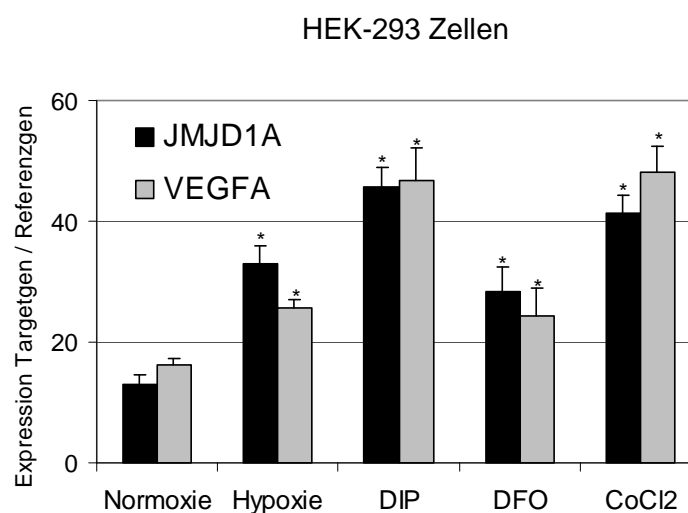


Abb. 10 Graphische Darstellung der mRNA-Expression von *JMJD1A* und *VEGF-A* in HEK293-Zellen unter Einwirkung von Hypoxie bzw. Eisenchelatoren

HEK293-Zellen waren dabei entweder 6h Normoxie (20% O₂), Hypoxie (0,5% O₂) ausgesetzt oder ihnen wurde 100 μ M DIP, DFO und CoCl₂ zugesetzt. Angabe der mRNA-Expression vom Zielgen (*JMJD1A*, *VEGF-A*) im relativen Verhältnis zur mRNA-Expression von Referenzgen β_2M ; Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von jeweils drei Proben; * = signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wert unter Normoxie mit $p < 0,05$.

3.1.2. Hypoxie stimuliert *JMJD1A* mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien

Nachdem die Induktion der Genexpression in HEK293-Zellen unter Hypoxie validiert werden konnte, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt in ähnlicher Form auch in anderen humanen Zelllinien zu beobachten ist.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die vier verschiedenen humanen Zelllinien HSMC, Reh, HeLa und Hep3B für 24 Stunden entweder in Hypoxie (0,5% O₂) inkubiert oder ihnen wurde der Eisenchelator DFO zugesetzt. Im Anschluss wurde mittels quantitativer RT-PCR die *JMJD1A* mRNA-Expression gemessen und mit der jeweiligen *JMJD1A* mRNA-Expression unter Normoxie verglichen. Als Referenzgen wurde in den Versuchen *ribosomales Protein L13A* (*RPL13A*) verwendet. Die Bestimmung der mRNA-Expression von *VEGF-A* diente zur Kontrolle. Abbildung 11 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse.

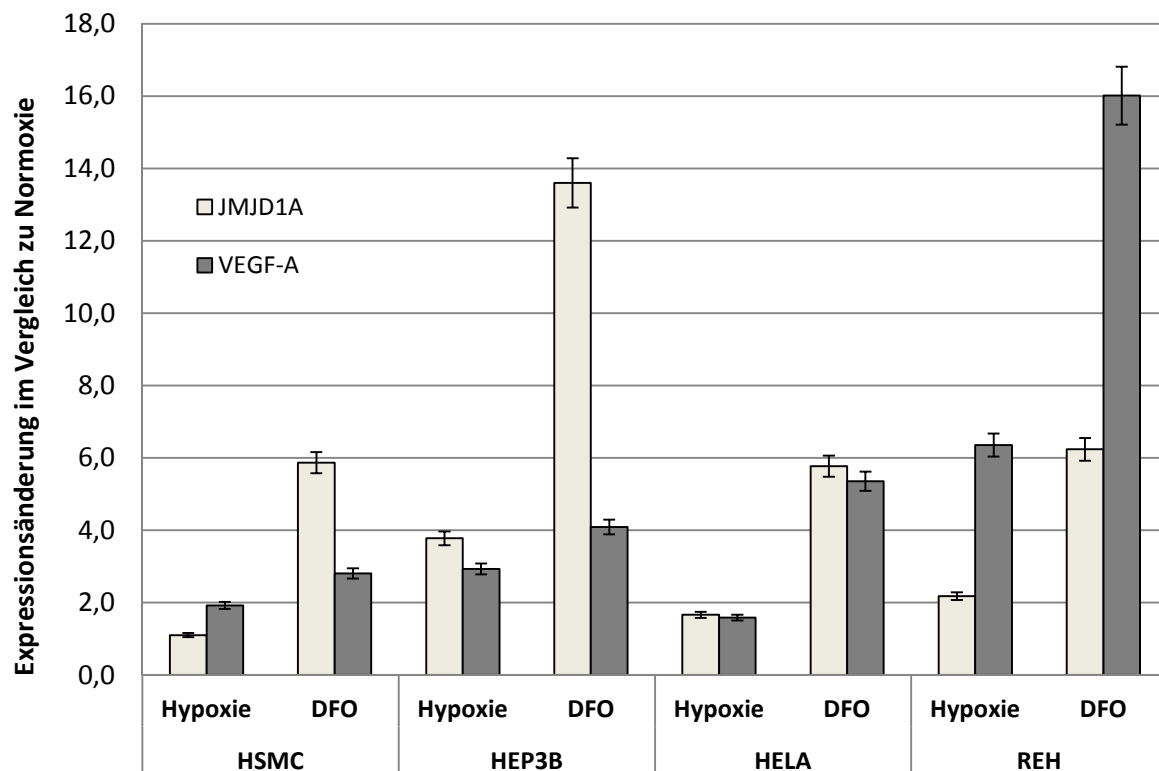


Abb. 11 *JMJD1A* und *VEGF-A* mRNA-Expression von *JMJD1A* und *VEGF-A* in verschiedenen Zelllinien unter Einwirkung von Hypoxie und DFO

HSMC, Hep3B, Hela und Reh-Zellen waren dabei entweder 24 h Normoxie (20% O₂), Hypoxie (0,5% O₂) ausgesetzt oder Ihnen wurde 100 µM DFO zugesetzt. Angabe der Expressionsänderung vom Zielgen (*JMJD1A*, *VEGF-A*) im Vergleich zum Ausgangswert in Normoxie (0 h-Wert). Normalisierung der mRNA-Expression von *JMJD1A* und *VEGF-A* zum Referenzgen *RPL13A*.

In allen untersuchten Zelllinien konnte die Stimulation der *JMJDIA* mRNA-Expression unter Hypoxie nachgewiesen werden. Der größte Anstieg war dabei mit einer 3,8-fachen Expressionssteigerung in Hep3B-Zellen zu beobachten. Unter der Einwirkung von DFO konnte die Stimulation von *JMJDIA* auf mRNA Ebene in den Hep3B-Zellen sogar auf das fast Vierzehnfache der Ausgangsexpression gesteigert werden. Eine nur sehr geringe Steigerung der Transkriptionsrate sowohl von *JMJDIA* als auch von *VEGF-A* zeigte sich unter 24 Stunden Hypoxieeinwirkung in den HSMC und HELA-Zellen. Unter Zusatz von DFO für 24 Stunden konnte jedoch auch in diesen beiden Zelllinien ein Anstieg der *JMJDIA* mRNA-Expression um das fast 6-Fache gemessen werden. Generell erwies sich das „Hypoxie-Mimetikum“ DFO hinsichtlich der Transkriptionssteigerung von *JMJDIA* bzw. *VEGF-A* in allen Zelllinien als deutlich potenter als eine Sauerstofferniedrigung auf 0,5% O₂ für 24 Stunden.

Der Trend der Expressionsinduktion von *JMJDIA* unter hypoxischen Bedingungen ließ sich somit auf Zellen unterschiedlichster Herkunft übertragen.

3.1.3 Kinetik der sauerstoffabhängigen *JMJDIA* mRNA-Expression

Nachdem in den vorangegangenen Untersuchungen die Transkriptionsinduktion von *JMJDIA* als Reaktion der Zellen auf Hypoxieeinwirkung zu beobachten war, stellte sich konsequent die Frage nach dem zeitlichen Ablauf dieser adaptiven Antwort auf Ebene der Genexpression.

Um Aussagen über die Expressionskinetik von *JMJDIA* treffen zu können, wurde die leukämische B-Zelllinie ‚REH‘ für 0, 3, 6, 12, 24 oder 48 Stunden einer Hypoxie (0,5% O₂) ausgesetzt. Nach den jeweiligen Zeitintervallen wurde die *JMJDIA* mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR gemessen und ins Verhältnis zum Nullstundenwert gesetzt (siehe Abbildung 12). Zur Normalisierung wurde auch in diesem Versuch das Referenzgen *RPL13A* verwendet.

Bereits nach drei Stunden Hypoxie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der *JMJDIA* mRNA-Expression auf ungefähr 200%. Dieser Trend setzte sich fort bis nach sechs Stunden in hypoxischer Umgebung mit einer Vervierfachung der Transkription von *JMJDIA* das Maximum erreicht wurde. Eine weitestgehend konstante Transkriptionsrate von *JMJDIA* mit ca. 400% konnte zwischen sechs und zwölf Stunden Hypoxie beobachtet werden. Nach weiteren 12 Stunden, insgesamt 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen, zeigte sich ein deutlicher Abfall der

JMJDIA Expression auf mRNA-Ebene auf nur noch 200% der Ausgangsexpression. Auf ungefähr diesem Niveau verblieb die *JMJDIA* mRNA-Expression auch nach 48 Stunden Hypoxie. Betrachtet man die graphische Darstellung der Ergebnisse, so ähnelt die Expressionskinetik von *JMJDIA* in Reh-Zellen unter Hypoxie fast einer Glockenkurve. Unter Hypoxieeinwirkung scheint die Transkriptionsrate von *JMJDIA* stetig anzusteigen bis deren Peak nach 6 bis 12 Stunden erreicht wird. Danach scheint sich die Transkriptionsrate auf einem Niveau einzupendeln, das im Wesentlichen dem 3-Stundenwert entspricht. Vergleichbare Expressionskinetiken lassen sich in der Literatur auch für die sauerstoffabhängige Expression von *VEGF* finden⁵².

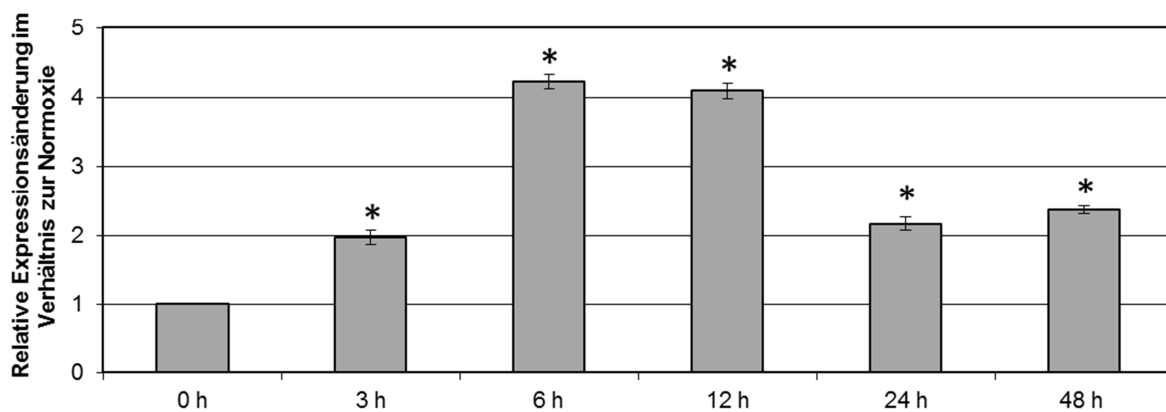


Abb. 12 Kinetik der *JMJDIA* mRNA Expression unter Hypoxieeinwirkung

Reh-Zellen wurden 0, 3, 6, 12, 24, 48 h unter hypoxischen Bedingungen (0,5% O₂) inkubiert. Angabe der mRNA Expressionsänderung von *JMJDIA* im Vergleich zum Ausgangswert in Normoxie (0 h-Wert). Normalisierung der mRNA-Expression von *JMJDIA* zum Referenzgen *RPL13A*. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, * = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert in Normoxie (0h-Wert) mit $p < 0,05$.

3.1.4. Hypoxie stimuliert JMJD1A Protein Expression *in vitro*

Nachdem auf mRNA-Ebene die Induzierbarkeit von JMJD1A durch Hypoxie gezeigt wurde, wurde im nächsten Schritt die Expression auf Proteinebene untersucht.

Hierfür wurde der auf mRNA-Ebene stärkste JMJD1A Induktor, DIP, eingesetzt. HEK293-Zellen wurden 18 Stunden entweder in normoxischer Atmosphäre allein oder mit Zusatz von 100 μ M DIP kultiviert. Anschließend wurde ein Western Blot zum Nachweis von JMJD1A und HIF-1 α durchgeführt. Als Ladekontrolle diente das β -Actin-Protein. Während HIF-1 α in den Zellen ohne Zusatz von DIP nicht nachweisbar war und auf Höhe der erwarteten Bande für JMJD1A nur ein schwaches und wiederholt unscharfes Signal erschien, fand sich in den mit DIP behandelten Proben ein klares und deutliches Signal (siehe Abb. 13).

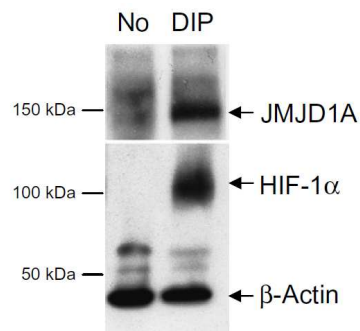


Abb. 13 JMJD1A und HIF-1 α Proteinexpression in HEK 293-Zellen mittels Western Blot
HEK 293-Zellen waren zuvor entweder 18 h Normoxie oder DIP ausgesetzt. No = Normoxie (20% O₂), DIP = 2,2 α -Dipyridil. Zur Kontrolle wurde ein polyklonaler β -Actin-Antikörper eingesetzt (β -Actin). Größenangabe der sichtbaren Banden jeweils in Kilodalton (kDa).

3.1.5. Stimulation ist abhängig von HIF-1 α

Anhand der Beobachtungen, dass Hypoxie die Expression von *JMJDIA* stimuliert, dieser Effekt aber in Z33-Zellen, die eine HIF-1 α Defizienz aufweisen, jedoch nicht reproduziert werden konnte (siehe Microarrayanalysen) und *JMJDIA* zudem ein ähnliches Expressionsprofil zeigte wie das bekannte HIF-1 α Zielgen *VEGF-A*, ließ die Vermutung naheliegen, dass die gesteigerte Genexpression in Hypoxie direkt durch HIF-1 α vermittelt wird.

Zur Validierung dieser These wurden uns freundlicherweise von der AG Prof. Eltzhig cDNA-Proben zur Verfügung gestellt, die nach folgendem Versuchsaufbau gewonnen wurden: HMEC-1-Zellen waren für 6, 12 oder 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (O₂ 0,5%) inkubiert worden. Die HMEC-1-Zellen waren zuvor stabil mit einem Plasmid transfiziert, das entweder eine siRNA gegen *HIF-1 α* exprimiert, „HIF-1 α siRNA“ oder aber nur eine Kontroll-siRNA ohne Funktion, „Kontroll si-RNA“. In diesen Proben wurde die mRNA-Expression von *JMJDIA* sowie von *VEGF-A* mittels quantitativer RT-PCR gemessen. Abbildung 14 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse. Dargestellt sind die relativen Expressionsänderungen von *JMJDIA*- und *VEGF-A*-mRNA im Vergleich zum „normoxischen“ Ausgangswert (0h-Wert). In den HMEC-1-Zellen, die mit dem Kontroll-siRNA-Vektor transfiziert wurden, also HIF-1 α uneingeschränkt funktionsfähig waren, zeigte sich im Verlauf erwartungsgemäß ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression von *JMJDIA*. Während nach 6 Stunden Hypoxieeinwirkung ein Anstieg der Transkriptionsrate von *JMJDIA* um das Dreifache zu verzeichnen war, wurde das Maximum mit einer fast 5-fachen Steigerung der *JMJDIA* mRNA-Expression im Vergleich zum Ausgangswert nach 12 Stunden Hypoxie erreicht. Setzte man die Zellen noch länger einer hypoxischen Umgebung aus, insgesamt 24 Stunden, so konnte kein weiterer Anstieg der mRNA-Expression festgestellt werden. Auch hier konnte das Maximum der Transkriptionsrate von *VEGF-A* mit einer Steigerung auf das Sechsfache nach 12 Stunden erreicht werden.

In den HMEC-1-Zellen, die mit einer siRNA gegen *HIF-1 α* transfiziert waren, sprich eine Akkumulierung von HIF-1 unter Hypoxie im Zellkern anhaltend unterdrückt war, zeigten zwar einen leichten, aber **keinen signifikanten** Anstieg der *JMJDIA* und *VEGF-A* mRNA-Expression unter Hypoxie im Vergleich zum 0h-Ausgangswert. Nach 24 Stunden Hypoxieeinwirkung war ein maximaler Anstieg auf das 2,7-Fache (*JMJDIA*) bzw. 3,1-Fache (*VEGF-A*) zu beobachten.

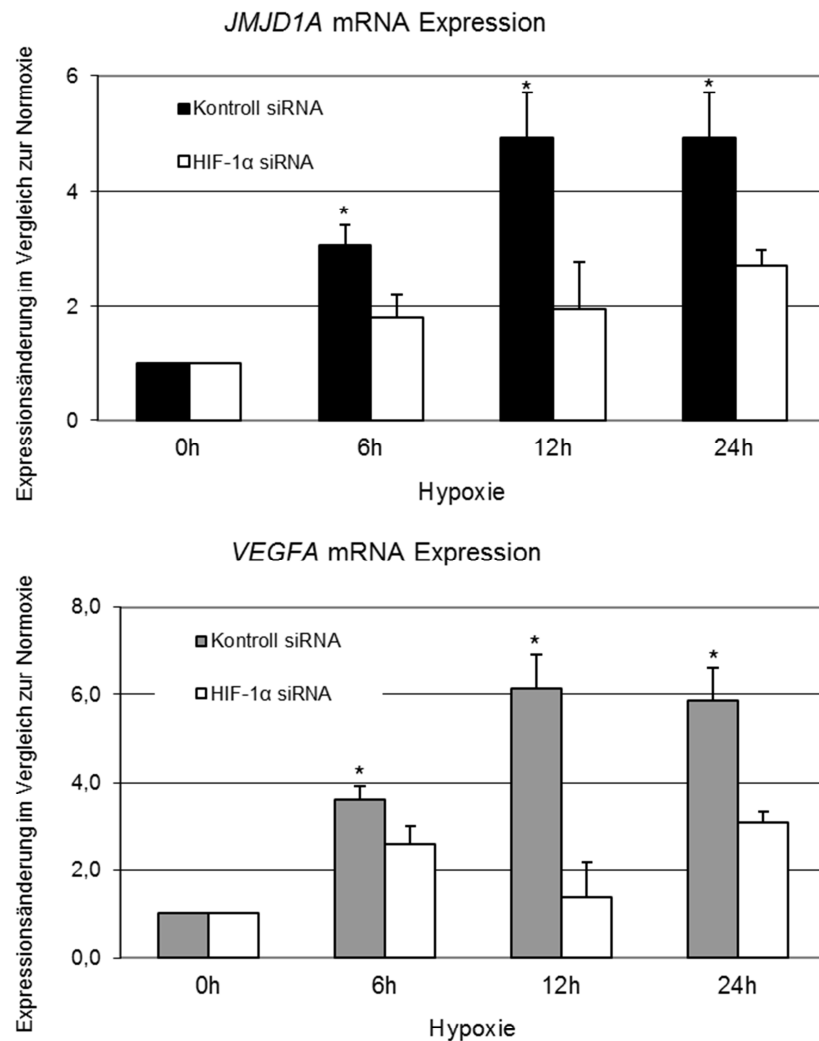


Abb. 14 JMJD1A und VEGF-A mRNA-Expression in stabil transfizierten HMEC-1-Zellen unter Hypoxie

Die HMEC-1 Zellen waren entweder mit einem *HIF-1α* siRNA-Konstrukt (HIF-1α siRNA) oder einem leeren Kontrollvektor (Kontroll siRNA) stabil transfiziert und wurden 0, 6, 12 oder 24h unter hypoxischen Bedingungen (0,5% O₂) inkubiert. Angabe der Expressionsänderung vom Zielgen (*JMJD1A*, *VEGF-A*) im Vergleich zum Ausgangswert in Normoxie (0h-Wert). Normalisierung der mRNA-Expression von *JMJD1A* und *VEGFA* zum Referenzgen *RPL13A*. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von jeweils drei Experimenten; * = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert in Normoxie (0h-Wert) mit $p < 0,05$.

3.1.6. Expression von *JMJD1A* in fetalem und adultem Gewebe

Um ein Expressionsprofil von *JMJD1A* in verschiedenen humanen Geweben zu erhalten, wurde in einem Gewebepanel mittels quantitativer RT-PCR die Transkriptionsrate von *JMJD1A* im relativen Verhältnis zum Referenzgen *POLR2F* (DNA-abhängige RNA-Polymerase II Polypeptid F) bestimmt. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über die relative mRNA-Expression von *JMJD1A* in verschiedenen adulten und fetalen humanen Geweben.

Gewebe	JMJD1A	
	Relative Kopienzahl	%-Anteil an Leukozyten
Gehirn adult	3,1	10,3
Gehirn fetal	4,8	16,3
Herz adult	6,7	22,4
Herz fetal	5,3	17,9
Niere adult	4,4	14,6
Niere fetal	7,0	23,6
Leber adult	1,0	3,5
Leber fetal	4,4	14,7
Lunge adult	7,3	24,6
Lunge fetal	4,0	13,4
Skelettmuskel adult	1,5	5,2
Skelettmuskel fetal	9,3	31,3
Milz adult	5,0	16,7
Milz fetal	3,8	12,9
Thymus adult	6,6	22,3
Thymus fetal	15,4	52,0
Colon adult	4,7	15,9
Intestinum adult	1,2	4,2
Leukozyten adult	29,7	100,0
Ovar adult	6,9	23,3
Pankreas adult	7,1	24,0
Plazenta adult	4,0	13,6
Prostata adult	2,5	8,3
Testis adult	17,1	57,5

Tabelle 10: Relative Expression der mRNA von *JMJD1A* in humanen Geweben

Relative Kopienzahl, Kopienzahl relativ zu der des Referenzgens *POLR2F* nach der Formel: Zielgen/Referenzgen x 100; %-Anteil von Leukozyten, für jedes Gen wurde die relative Kopienzahl in Leukozyten als 100 % definiert

JMJD1A konnte in allen 16 untersuchten humanen Geweben nachgewiesen werden. Die höchste Expression von *JMJD1A*-mRNA wurde in Leukozyten gefunden, gefolgt von einer Transkriptionsrate von 58 % im Vergleich zu Leukozyten in Hodengewebe (Testis). Eine relativ hohe Ex-

pression zeigte sich zudem noch in fetalem Thymus (52 %) und fetaler Skelettmuskulatur (31 %). Am niedrigsten war die Transkription von *JMJD1A* mit 3,5 % in Lebergewebe, wobei hier eine vierfach höhere Transkriptionsrate in fetalem Lebergewebe gesehen wurde. Ein signifikanter Unterschied der Expression von *JMJD1A*-mRNA konnte im direkten Vergleich von fetal vs. adult auch noch in vier weiteren Geweben (Gehirn, Niere, Skelettmuskel und Thymus) beobachtet werden. Es zeigte sich dabei ein Anstieg der *JMJD1A* mRNA-Expression bis auf das Sechsfache (Skelettmuskel) in fetalem Gewebe. Gleiche Expression zeigte sich in fetalem und adultem Herz, in fetaler Lunge und Milz war sie signifikant niedriger im Vergleich zum adultem Gewebe.

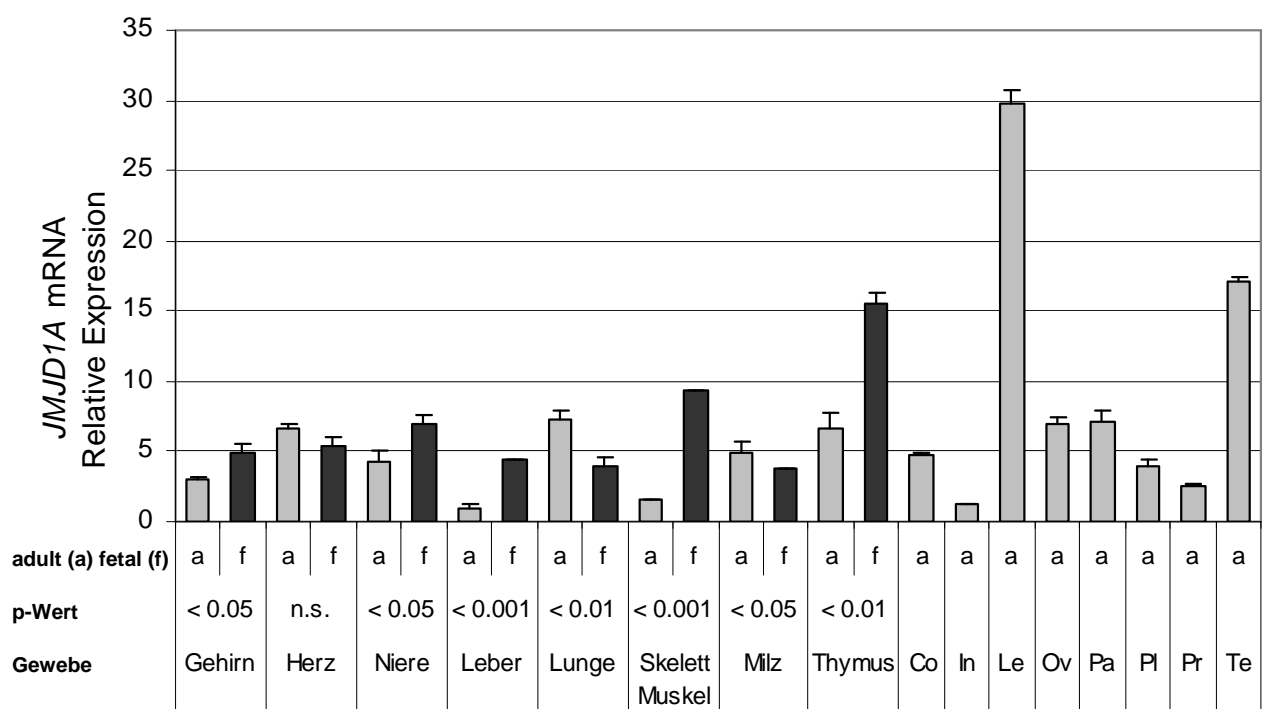


Abb. 15 Graphische Darstellung der *JMJD1A* mRNA Expression in verschiedenen adulten und fetalen Gewebeprouen

Gewebebezeichnung: Co - Colon, In - Intestinum, Le - Leukozyten, Ov - Ovar, Pa - Pankreas, Pl - Plazenta, Pr - Prostata, Te - Testis. *JMJD1A* mRNA-Expression normalisiert zur *POLR2F* mRNA-Expression, Angabe von *JMJD1A* als prozentualer Anteil zur *POLR2F* mRNA-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von jeweils vier Proben. Angabe vom p-Wert für korrespondierende adulte und fetale Gewebe. n.s. - nicht signifikant.

3.2. Untersuchung der sauerstoffabhängigen *JMJD1A* mRNA-Expression *in vivo*

Die bis hier zusammengefassten Untersuchungen basieren auf Versuchen mit Zelllinien hinsichtlich der sauerstoffabhängigen Regulation von *JMJD1A*. Anhand der Gewebepanels konnte zwar gezeigt werden, dass *JMJD1A in vivo* exprimiert wird, jedoch keine Aussagen über die sauerstoffabhängigen Regulationsmechanismen getroffen werden.

Zur Analyse der Expressionsänderung von *JMJD1A* unter Hypoxie *in vivo* wurden uns von Dr. W. Bernhardt Gewebeproben (Herz, Gehirn, Leber und Niere) von Ratten zur Verfügung gestellt, die zuvor für jeweils 6 oder 12 Stunden einer normobaren Hypoxie (8 % O₂/92 % N₂) oder Normoxie ausgesetzt waren. Mittels quantitativer RT-PCR wurde die *JMJD1A* parallel zur *VEGF-A* mRNA-Expression bestimmt. Tab. 11 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse.

JMJD1A und *VEGF-A* mRNA-Expression *in vivo*
nach Hypoxie-Einwirkung auf Ratten

		Relative mRNA-Expression von Zielgen zu Referenzgen						
	Hypoxie [Stunden]	<i>JMJD1A</i>			<i>VEGF-A</i>			
		Ø	Δ	P	Ø	Δ	p	
Gehirn	0	16.5	-	-	4.3	-	-	
	6	38.3	2.3	0.00006	31.0	7.3	0.0007	
	12	17.8	1.1	0.7	15.3	3.6	0.005	
Herz	0	7.2	-	-	15.6	-	-	
	6	23.6	3.3	0.01	56.5	3.6	0.04	
	12	25.4	3.5	0.08	22.8	1.5	0.1	
Niere	0	11.0	-	-	11.7	-	-	
	6	19.5	1.8	0.11	24.4	2.1	0.02	
	12	9.6	0.9	0.5	7.0	0.6	0.1	
Leber	0	6.3	-	-	3.5	-	-	
	6	49.0	7.7	0.03	43.7	12.4	0.006	
	12	26.5	4.2	0.02	19.9	5.7	0.004	

Tabelle 11: *JMJD1A* und *VEGF-A* mRNA-Expression *in vivo* nach Hypoxieeinwirkung auf Ratten

Darstellung der mRNA-Expression von *JMJD1A* und *VEGF-A* in homogenisierten Gewebeproben (Gehirn, Herz, Niere und Leber) von Ratten, die entweder für 6 oder 12 Stunden hypoxischen Bedingungen (8 % O₂/92 % N₂) ausgesetzt waren. Im Vergleich dazu spiegelt der Nullstundenwert die Expression zu Versuchsbeginn in Normoxie wieder. n = 2-3 zu jedem Versuchszeitpunkt und jedem Experiment. Ø = mRNA-Expression vom Zielgen (*JMJD1A*, *VEGF-A*) im Verhältnis zur mRNA-Expression vom Referenzgen (*RPL13A*). Δ = Expressionsänderung im Vergleich zum Nullstundenwert. p = p-Wert, ermittelt mittels unpaired Student's t-test.

Vergleicht man die relative mRNA-Expression von *JMJD1A* zu Beginn der Versuche (Nullstundenwert), so lässt sich die höchste Grundexpression im Gehirn der Ratten finden, gefolgt von Niere und Herz. Wie auch schon in den Versuchen mit den humanen Gewebeproben zeigt sich die geringste Expressionsrate von *JMJD1A* unter Normoxie im Lebergewebe der Ratten: diese entsprach etwa einem Drittel der *JMJD1A* mRNA-Expression im Gehirn. In allen Gewebeproben konnte nach sechsständiger Hypoxieeinwirkung ein Anstieg sowohl der *JMJD1A* als auch

der *VEGF-A* mRNA-Expression beobachtet werden. Mit einem Anstieg um das 7,7-fache (*JMJDIA*) bzw. 12,4-fache (*VEGF-A*) im Vergleich zum Ausgangswert (Normoxie) stellte sich die Induktion der mRNA-Expression nach sechs Stunden im Lebergewebe am eindrucklichsten dar. Lediglich im Nierengewebe war weder nach sechs, noch nach zwölf Stunden Hypoxie ein signifikanter Anstieg der *JMJDIA* mRNA-Expression nachweisbar. Auffallend war zudem, dass die durch Hypoxie ausgelösten Induktionseffekte der mRNA-Expression nach 12 Stunden Hypoxieeinwirkung deutlich schwächer ausgeprägt (Leber, Gehirn) waren bzw. sogar gänzlich verschwanden (Herz, Niere). Diese Kinetik ließ sich sowohl bei *JMJDIA* als auch bei *VEGF-A* beobachten.

Abschließend lässt sich somit feststellen, dass Hypoxie auch *in vivo* die mRNA-Expression von *JMJDIA* stimuliert und dass *JMJDIA* einen annähernd gleichen Expressionscharakter wie *VEGF-A* aufweist.

3.3. Untersuchung der Promotorregion *JMJDIA*'s nach funktionellen HIF-Bindungsstellen (HREs)

Detektion potenzieller HIF-Bindungsstellen im *JMJDIA*-Gen

Die minimale konservierte Bindungssequenz von HIF -1 ist 5'-RCGTG-3'. Diese Konsensussequenz, auch als „Hypoxie responsives Element (HRE)“ beschrieben, wurde in der untranslierten 3' Sequenz des humanen *JMJDIA*-Gens gesucht. Innerhalb von 2 Kilobasen fanden sich in der Promotorregion des humanen *JMJDIA*-Gens insgesamt acht potenzielle Bindungsstellen für HIF-1. Sie wurden nach ihrer Lage im *JMJDIA*-Gen „HRE-1“, „HRE-2“, „HRE-3“, „HRE-4“, „HRE-5“, „HRE-6“, „HRE-7“ und „HRE-8“ genannt. Das HRE-1 liegt 1737 bp stromaufwärts des Translationsbeginns von *JMJDIA*.

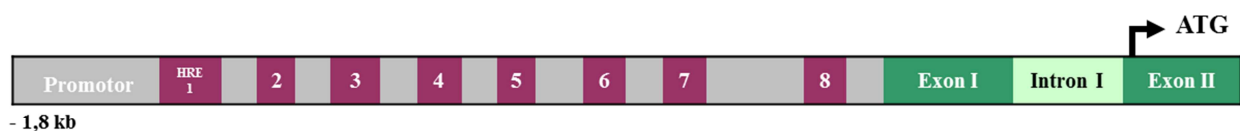


Abb. 16 Lage der potenziellen HIF-Bindungsstellen (HRE) im *JMJDIA*-Promotorbereich
 Schematische Darstellung der potenziellen „Hypoxia-responsive elements 1-8“ (HRE 1-8) im *JMJDIA*-Gen.
 ATG: Startcodon, Beginn der Translation von *JMJDIA*.

In Reporteragenassay-Analysen wurde nun untersucht, welche dieser potenziellen HREs (hypoxic responsive elements) tatsächlich in der Lage sind HIF-1 zu binden und konsekutiv als Enhancer

für die *JMJDIA* Expression zu fungieren. Um systematisch die funktionellen HREs zu detektieren, wurden zunächst fünf unterschiedlich lange Promotorfragmente vor das Luciferase-Reportgen (Luc) in den PGL2-Vektor kloniert. Die einzelnen Fragmente wurden gemäß ihrer Basenlänge als „p1072“, „p704“, „p633“, „p593“ und „p499“ bezeichnet. Als Negativkontrolle „pG12“ diente der PGL2 Vektor (siehe Abb. 17).

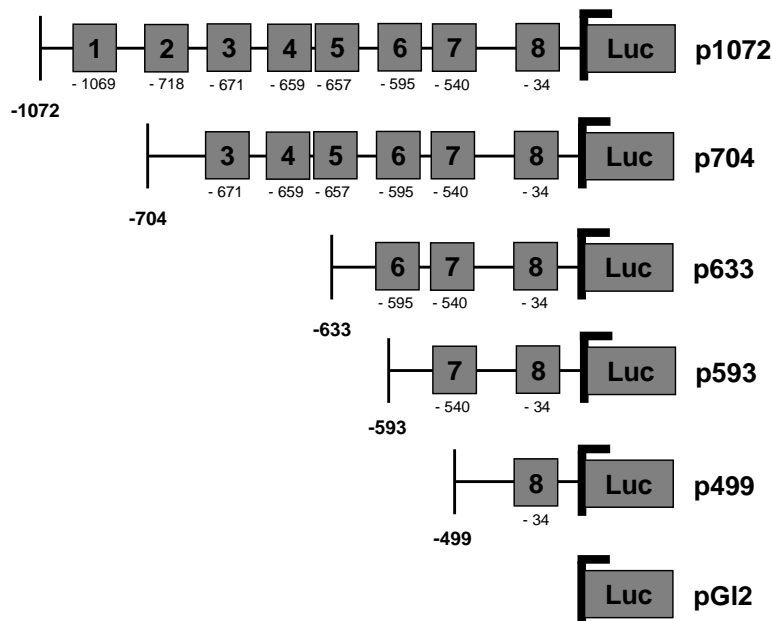


Abb. 17 Schematische Darstellung der verschiedenen Promotorkonstrukte

Exemplarische Darstellung der unterschiedlich langen *JMJDIA*-Promotorfragmente, die vor das Luciferase-Gen (Luc) in den pGL2-Vektor kloniert wurden. Nummerierte Darstellung (1-8) der jeweils ihnen beinhalteten potenziellen HRE's mit Angabe der Lage in Bezug zu Exon I von *JMJDIA*. Bezeichnung der Konstrukte (p1072 etc.) nach ihrer jeweiligen bp-Länge. pG12 entspricht dem Leervektor pGL2.

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden anschließend mit den sechs verschiedenen Promotorkonstrukten transformiert. Die gewonnenen Plasmide wurden mittels Qiagen Midiprep® aufgereinigt. Die dsDNA-Konzentration der einzelnen Plasmidkonstrukte wurde photometrisch bestimmt. Für das Luciferase-Assay wurden jeweils 600 µl HEK293-Zellen/well ausplattiert und mit 1,8 µg der Reportergen-DNA sowie 0,2 µg des Standardisierungsplasmids pCMV-Gal transient transfiziert. Der Sinn dieser Kotransfektion ist eine Standardisierung zwischen den Proben, um auffällige Schwankungen in der Transfektionseffizienz zu kontrollieren. Einem Teil der mit den Promotorkonstrukten transient transfizierten HEK293-Zellen wurde der Eisenchelator DIP zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen 18 Stunden bei 20 % O₂ (Normoxie) inkubiert. Die im Luciferase-Reportergen-Assay gemessene Luciferase-Aktivität diente als Maß für die Stärke des Promotors und somit als Marker für die Funktionalität der detektierten potenziellen HREs. Die relative Lu-

ciferase-Aktivität wurde durch Normalisierung zur β -Galaktosidase-Aktivität (pCMV-Gal-Plasmid) bestimmt. Interessanterweise zeigte sich, dass die Konstrukte p1072, p704, p633 und p593 ähnliche Luciferase-Aktivitäten unter „hypoxischen“ Bedingungen besaßen. Sie steigerten die relative Luciferase-Aktivität um das 30- bis 45-fache im Vergleich zum Leervektor pGL2. Während das längste Konstrukt p1072 alle acht potenziellen HREs beinhaltet, wies das Konstrukt p593 nur noch zwei der potenziellen HREs auf. Daraus wurde gefolgert, dass die HREs 1-6 keine maßgebliche Rolle in der HIF-1 α vermittelten Transkriptionssteigerung von *JMJD1A* spielen. Vergleicht man hingegen die relative Luciferase-Aktivität von dem Konstrukt p499 zu p593, so zeigt sich ein dramatischer Abfall der Luciferase-Aktivität auf 2,2 %. Die Luciferase-Aktivität von p499 entspricht dabei in etwa der des Leervektors pGL2 mit 1,6 %. Damit war augenscheinlich, dass HRE-7 eine Schlüsselrolle in der sauerstoffabhängigen HIF-1 vermittelten Regulation der *JMJD1A* Expression einnimmt.

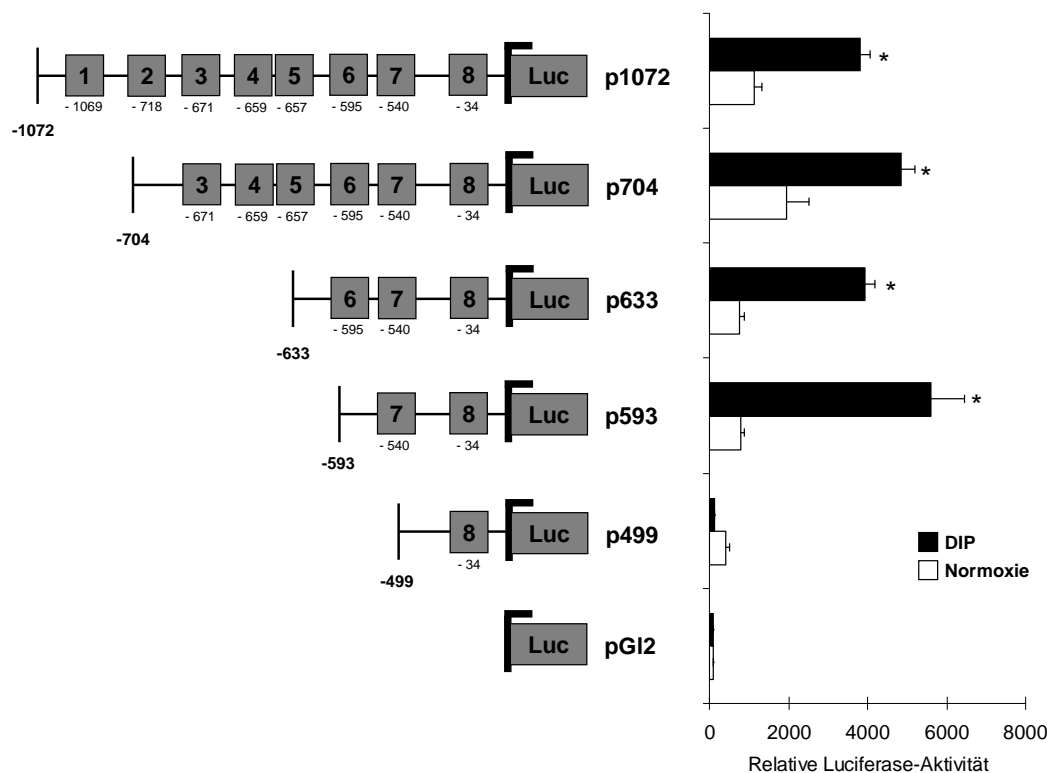


Abb. 18 Induktion der Luciferase-Aktivität unter Hypoxie durch *JMJD1A* Promotorsequenzen

Auf der linken Seite der Abbildung sind die *JMJD1A*-Promotorfragmente inklusive ihrer inkludierten HREs dargestellt sowie der ‚leere‘ Kontrollvektor pGL2. Korrespondierend dazu rechts die gemessene Luciferase-Aktivität der mit den Promotorfragmenten transfizierten HEK293-Zellen im Reportgen-Assay. Die Messung der Luciferase-Aktivität der transfizierten HEK293-Zellen erfolgte 18h nach Zusatz von 2,2-Dipyridil (DIP) oder ohne jegliche Zusätze (Normoxie). Angabe der Luciferase-Aktivität relativ zur β -Galaktosidaseaktivität der jeweiligen Konstrukte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von jeweils drei Proben; * = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert in Normoxie mit $p < 0,01$.

Um die Annahme, dass es sich bei HRE-7 um eine funktionelle Bindungsstelle für HIF-1 handelt, zu verifizieren, wurde ein „mutiertes“ Konstrukt mit dem Namen p593mut vor das Luciferase-Reportergen in den PGL2 Vektor kloniert. Der einzige Unterschied von p593mut zu p593 lag im Konsensbereich von HRE-7: hier wurden die Nukleinbasen 5'-CACG-3' (p593) durch 5'-ATGC-3' (p593mut) ausgetauscht, somit sollte es HIF-1 nicht mehr möglich sein an dieser Stelle zu binden und eine Aktivierung der Genexpression von *JMJDIA* unter Hypoxie zu bewirken. Als Negativkontrollen wurden parallel die Luciferase-Aktivität von p499 und dem Leervektor pGL2 gemessen. Die mit den unterschiedlichen Promotorkonstrukten transient transfizierten Zellen wurden 18h entweder in Normoxie (20 % O₂) oder Hypoxie (0,5 % O₂) inkubiert bzw. ihnen wurde der Eisenchelator DIP zugesetzt. Im Anschluss daran wurde die Luciferase-Aktivität der unterschiedlichen Konstrukte mittels Luciferase-Reportergen-Assay bestimmt.

Das Promotorkonstrukt p593 zeigte unter Hypoxie einen Anstieg seiner Luciferase-Aktivität um das 14-fache im Vergleich zur Normoxie, unter der Einwirkung von DIP sogar einen Anstieg um das 16,6-fache. Das mutierte *JMJDIA* Promotorkonstrukt p593mut verlor, wie zu erwarten war, seine Enhancer-Funktion gegenüber Hypoxie und DIP. Dementsprechend ließen sich genau wie beim Promotorkonstrukt p499 und pGL2 keine signifikanten Unterschiede in der Luciferase-Aktivität unter den verschiedenen Versuchsbedingungen (Normoxie, Hypoxie, DIP) beobachten (siehe Abb. 19).

Um zu beweisen, dass die Promotoraktivierung von *JMJDIA* direkt HIF-1 vermittelt ist, wurde eine Charge der mit den unterschiedlichen Promotorkonstrukten transient transfizierten Zellen (p593, p593mut, p499 und PGL2) zusätzlich mit einem *HIF-1α* Expressionskonstrukt cotransfiziert und im Anschluss für 18 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Die endogene Überexpression von *HIF-1α* zeigte eine signifikante Induktion der *JMJDIA*-Promotor-Aktivität im p593-Konstrukt mit einer Steigerung der Luciferase-Aktivität um das 7-fache im Vergleich zu den nicht *HIF-1α* cotransfizierten Zellen. Dieser Effekt war aufgehoben in den Zellen, in denen HRE-7 zerstört wurde (p593mut) oder gar nicht vorhanden war (p499, pGL2) (siehe Abb. 19).

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich somit feststellen, dass HIF-1 durch direkte Interaktion mit nur einem HRE, 1208 bp vor dem *JMJDIA* Startkodon gelegen, die Expression von *JMJDIA* aktiviert.

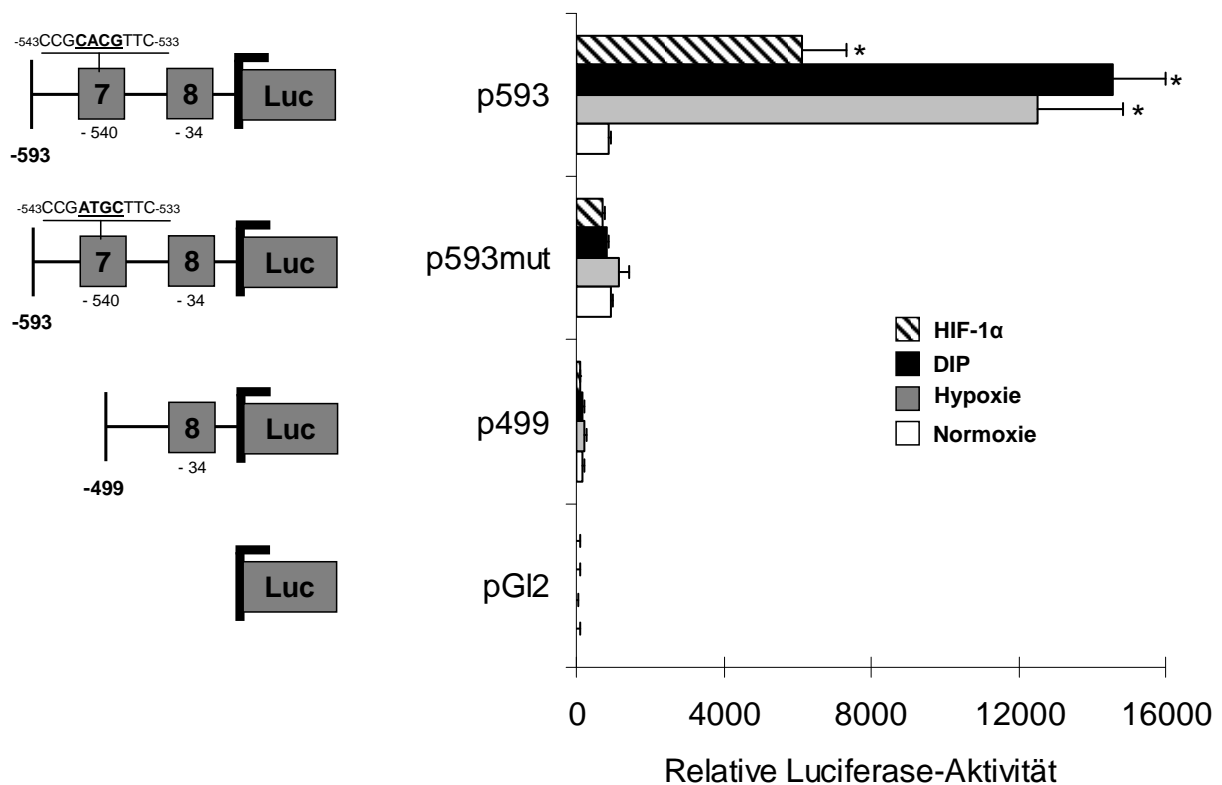


Abb. 19 Einfluss von ortsgerichteter Mutagenese des HRE-7 in *JMJD1A* Promotorkonstrukt p593 auf die Luciferase-Aktivität unter Hypoxie.

Links schematische Darstellung der untersuchten *JMJD1A* Promotorkonstrukte p593, p593mut sowie der als Kontrolle dienenden Konstrukte p499 und pGL2. Detaillierte Angabe der ortsgerichteten Mutagenese der Konsensussequenz von HRE-7 über dem Promotorkonstrukt p593mut im Vergleich zu p593. **Rechts** korrespondierende relative Luciferase-Aktivität der verwendeten Promotorkonstrukte unter Einfluss von DIP, Hypoxie (0,5 % O₂), *HIF-1α*-Überexpression und Normoxie (20 % O₂) über 18h. Angabe der Luciferase-Aktivität relativ zur β -Galaktosidaseaktivität der jeweiligen Konstrukte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von jeweils drei Proben; * = signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert in Normoxie mit $p < 0,01$.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Histondemethylase JMJD1A, in der jüngsten Literatur überwiegend KDM3A genannt, einer sauerstoffabhängigen Genregulation unterliegt. Sowohl *in vitro* anhand unterschiedlicher Zelllinien, als auch *in vivo* in verschiedenen Geweben konnte nachgewiesen werden, dass Hypoxie die *JMJD1A* Promotoraktivität steigert und zu einer vermehrten Expression von *JMJD1A* RNA und Protein führt. Als zentraler Vermittler dieser sauerstoffabhängigen Induktion wurde der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1) identifiziert.

4.1. Expression von JMJD1A in verschiedenen Geweben

JMJD1A wurde 1991 erstmals und ausschließlich in männlichen Keimzellen von Mäusen und Ratten nachgewiesen¹⁸. 2006 konnten Knebel et al. in Northern-Blot-Analysen zeigen, dass die Expression von *JMJD1A* nicht auf den Hoden (Testis) limitiert ist, sondern auch in zahlreichen anderen murinen Geweben, insbesondere in Thymus und Herz, nachgewiesen werden kann⁵³.

Um diese widersprüchlichen Aussagen hinsichtlich der Gewebeexpression von *JMJD1A* RNA zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die *JMJD1A*-Expression mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) in gepoolten adulten und fetalen humanen Gewebeproben gemessen. Um Inhomogenitäten im Ausgangsmaterial (z.B. cDNA-Qualität) und Konzentrationsschwankungen zu korrigieren, wurde die Methode der relativen Quantifizierung angewendet. Dabei wird die Expression des Zielgens (hier *JMJD1A*) ins Verhältnis zur Expression eines Referenzgens (beispielsweise *POLR2F*) der gleichen cDNA-Probe gesetzt. Das ideale Referenzgen wird konstant in allen Geweben und Zelltypen exprimiert, ohne internen oder externen regulatorischen Einflüssen zu unterliegen. Dieser idealen Expression genügt kein Gen, insofern hat jedes Referenzgen Limitationen und eine unkritische Wahl birgt Fehlerquellen für Fehlinterpretation der relativen Quantifizierungsergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzgen *POLR2F* ausgewählt. *POLR2* ist eine DNA-abhängige RNA-Polymerase II. *POLR2* besteht aus insgesamt 10-14 Untereinheiten. Eine von diesen ist die Untereinheit F (*POLR2F*)⁵⁴. *POLR2F* wird in allen Zellen ubiquitär exprimiert und Hoerndli et al. zeigten 2004 in ihren Analysen, dass es sich bei *POLR2F* um ein stabil endogen exprimiertes Gen handelt, welches sich im Vergleich mit einer Vielzahl häufig verwendeter Referenzgene als geeignetes Referenzgen in adulten und fetalen Geweben erwies⁵⁵.

Das Ergebnis der Gewebepanelanalyse bestätigte erwartungsgemäß eine hohe Expression von *JMJD1A*s im Hodengewebe. Überraschenderweise war jedoch eine noch wesentlich höhere Expressionsrate in Leukozyten zu verzeichnen. Ähnlich zu den Northern-Blot-Analysen von Knebel et al. an murinen Geweben⁵³, zeigte sich auch in humanem Herz und Thymus eine hohe Expression an *JMJD1A*-mRNA. Versuche mit *JMJD1A*-Knock-out-Mäusen haben belegt, dass *JMJD1A* eine essenzielle Rolle in der Spermatogenese spielt. Homozygote *JMJD1A* defiziente Mäuse waren infertil und wiesen ein deutlich geringeres Hodenvolumen als ihre Wildtyp-Artgenossen auf. Ursächlich zeigte sich eine gestörte Chromatinkondensation, aufgrund derer die Elongation der Spermatiden ausblieb. Durch den Funktionsverlust von *JMJD1A* war in den Promotorregionen von *Transition protein 1 (Tnp1)* und *Protamine 1 (Prm1)* ein höherer Methylierungsgrad an H3K9 nachweisbar, welcher mit einer deutlich geringeren Transkription dieser für die Spermatogenese essenziellen Gene, assoziiert war^{56/42}. Aufgrund der auffällig hohen Expression von *JMJD1A* in Leukozyten und fetalem Thymus stellt sich die Frage, ob *JMJD1A* auch eine wichtige Rolle in der Ontogenese der weißen Blutzellen zu spielen vermag.

Als weiteres bedeutendes Ergebnis der *JMJD1A* Gewebepanelanalyse zeigte sich, dass die Expression von *JMJD1A* in der Mehrzahl der fetalen Gewebe (Gehirn, Leber, Niere, Skelettmuskel und Thymus) signifikant höher lag als in dem adulten Pendant. Eine Erklärung hierfür könnte die „physiologisch“ bestehende Hypoxie im fetalen Gewebe mit einem vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck (pO₂) von ca. 30 mmHg im Vergleich zum Erwachsenen mit einem durchschnittlichen pO₂ von ca. 85-110 mmHg sein. Warum in fetaler Milz und Lunge die Expression von *JMJD1A* hingegen signifikant niedriger im Vergleich zum adultem Gewebe war, bleibt unklar.

4.2. Sauerstoffabhängige Induktion von *JMJD1A*

Wenn Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt werden, kommt es zu komplexen Veränderungen ihrer Genexpression, die der zellulären Adaptation und damit dem Überleben der Zelle dienen. Viele dieser Adaptationsprozesse werden direkt oder indirekt durch die Transkriptionsfaktoren HIF-1 und HIF-2 vermittelt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, konnte die Induktion der Genexpression von *JMJD1A* durch Hypoxie in zahlreichen Arbeiten der letzten Jahre belegt werden. Die Stimulation der Expression aufgrund reduzierter Sauerstoffverfügbarkeit war dabei nicht auf einzelne Zelltypen beschränkt, sondern konnte in einer Vielzahl von Zelllinien und Geweben nachgewiesen werden^{57/58/59/20}. Einen ersten Hinweis, dass dieser Stimulationseffekt in Zusammenhang mit HIF-1 steht, ergaben die Microarrayanalysen von Dr.

Wellmann. In seinen Versuchen mit der *HIF-1 α* defizienten Zelllinie Z-33 war die hypoxische Induktion *JMJD1A*s aufgehoben. Passend zu diesem Befund konnte in den hier verwendeten HMEC-1-Zellen, nach Blockierung der HIF-1 Signalkaskade durch spezifische gegen *HIF-1 α* mRNA gerichtete siRNA-Konstrukte, kein signifikanter Anstieg der mRNA Expression von *JMJD1A* unter Hypoxie verzeichnet werden.

Die minimale Steigerung der Transkriptionsrate von *JMJD1A* unter Hypoxie auch bei den *HIF-1 α* -blockierten HMEC-1-Zellen steht dabei in keinem Widerspruch. Bekanntermaßen liegt die Effizienz von siRNA-Konstrukten nicht bei 100 Prozent, folglich kann bei anhaltender Hypoxie absolut gesehen mehr HIF-1 α im Zellkern akkumulieren und somit eine Expressionssteigerung der HIF-1-Zielgene bewirken. Ein weiterer Diskussionspunkt ist die mögliche Rolle von HIF-2. Obwohl HIF-2 die gleichen Bindungssequenzen wie HIF-1 hat, unterscheiden sich die beiden Isoformen in Teilaspekten ihrer Fähigkeit der Genregulation^{60/61}. Während einige Zielgene, wie z. B. *VEGF*, von beiden Isoformen gemeinsam reguliert werden, werden andere Gene, wie z. B. *Oct4*, spezifisch durch HIF-2 aktiviert⁶². Die hier erhobenen Befunde mit fast vollständiger Hemmung der *JMJD1A* Induktion unter Hypoxie in HMEC-1-Zellen nach Blockierung von *HIF-1 α* sprechen gegen eine Rolle von HIF-2 in diesem Versuchsaufbau. Pollard et al. konnten in ihrer später veröffentlichten Arbeit durch direkten Vergleich siRNA-vermittelter Suppression von *HIF-1 α* und *HIF-2 α* in MCF7-Zellen (*Humane Östrogenrezeptor positive Adenokarzinomzellen der Brust*) bestätigen, dass die Ausschaltung von *HIF-2 α* im Gegensatz zu *HIF-1 α* keinen Einfluss auf die Induktion von *JMJD1A* in hypoxischen Zellen hat. Dieses Ergebnis war insofern überraschend, da in ihren ChiP Assay Analysen die Bindung beider Isoformen in der Promotorregion von *JMJD1A* nachgewiesen werden konnte⁵⁸. Dies bestätigt einmal mehr, dass der strukturelle Nachweis einer solchen Bindung keine Aussage zur tatsächlichen funktionellen Aktivität erlaubt. Neuere Untersuchungen von Krieg et al. ergaben in speziellem zellulärem Kontext eine gewisse Beteiligung von HIF-2 α an der Expressionsinduktion von *JMJD1A* unter Hypoxie. Während die siRNA-vermittelte Suppression von *HIF-2 α* in MCF7-Zellen auch bei ihnen keine Auswirkung auf die *JMJD1A* Induktion unter Hypoxie zeigte, war in der Nieren-Karzinom-Zelllinie RCC4+VHL nach Ausschaltung von *HIF-2 α* eine signifikante Reduktion der *JMJD1A*-Expression unter Hypoxie festzustellen⁵⁹.

Die Rolle von HIF-1 und HIF-2 in der sauerstoffvermittelten Regulation von *JMJD1A* zusammenfassend, haben die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer dominanten Rolle von HIF-1 bestätigt.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Luciferase-Reportgen-Assays sollte die Frage geklärt werden, ob die hypoxische Induktion von *JMJD1A* direkt durch HIF-1 α vermittelt wird. Durch Klonierung und gezielte Mutationsanalysen zahlreicher Promotorkonstrukte und anschließender Untersuchung der Promotoraktivitätsänderung unter Hypoxie ließ sich im Ausschlussverfahren ein *Hypoxie-responsives Element* (HRE) identifizieren: 1208 bp vor dem *JMJD1A* Startkodon gelegen, welches sich als essenziell für die Aktivierung *JMJD1A*s durch HIF-1 α herausstellte.

In den letzten Jahren wurde die direkte Bindung von HIF-1 und HIF-2 in den Promotorenregionen auch anderer Jumonji-C-Domain-containing Histondemthylasen (JHDM) nachgewiesen, wie z.B. JARID1B, JMJD2B, JMJD2C^{59/63}. Für insgesamt 22 Mitglieder der JmjC-Proteinfamilie konnte eine signifikante Steigerung ihrer mRNA-Expression unter Hypoxieeinwirkung nachgewiesen werden⁶³. Da die Identifizierung und Charakterisierung neuer bzw. bereits bekannter Mitglieder der Jumonji-C-Domain-containing Histondemthylasen erst in den Anfängen steckt, ist davon auszugehen, dass die Anzahl der direkten oder indirekten Zielgene von HIF in dieser Gruppe noch ansteigen wird.

4.3. Hypoxie – Trigger und limitierender Faktor

Die Histondemethylase JMJD1A gehört zur Familie der Dioxygenasen, die Sauerstoff (O₂), α -Ketoglutarat (α -KG) und Eisen (Fe-II) als Kosubstrat benötigen. Für die enzymatische Hydroxylierung und Abspaltung der Methylgruppen von Lysinresten an modifizierten Histonen ist molekularer Sauerstoff somit von essenzieller Bedeutung. Zugleich konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass Hypoxie zu einer deutlichen Induktion von JMJD1A sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene führt.

Auf den ersten Blick scheint dies einem Paradoxon gleich. Postuliert man allerdings unter reduzierter Sauerstoffspannung in den Zellen eine leicht verminderte Enzymaktivität von JMJD1A, so könnte die vermehrte Expression unter moderater Hypoxie einen Kompensationsmechanismus für den partiellen Aktivitätsverlust darstellen. Hieraus ergibt sich die Frage, bei welchem Schwellenwert das System aufgrund des Substratmangels (O₂) zum Erliegen kommt. Beyer et al. untersuchten die enzymatische Aktivität von JMJD1A unter verschiedenen Hypoxiegraden. Mittels FACS-Untersuchung und indirekter Immunfluoreszenzfärbung ermittelten sie anhand der Bestimmung des H3K9me2-Methylierungsgrads in transfizierten HeLa-Zellen die Enzymaktivi-

tät von JMJD1A nach Einwirkung von 20 %, 1 %, 0,5 % und 0,2 % Sauerstoff für die Dauer von 24 Stunden. Die Zellen waren zuvor entweder mit einem funktionstüchtigen *JMJD1A*-Expressionsvektor oder einem enzymatisch inaktiven mutierten *JMJD1A*-Expressionsvektor transfiziert worden. In den Zellen, die das JMJD1A Protein überexprimierten, ließen sich deutlich verminderte Spiegel an dimethyliertem H3K9 detektieren, während die Zellen mit dem mutierten inaktivem JMJD1A-Protein erwartungsgemäß deutlich höhere Grade an H3K9-Dimethylierung aufwiesen. Eine Reduktion des atmosphärischen Sauerstoffes auf 1% resultierte in keinem sichtbaren Verlust der Enzymaktivität von JMJD1A. Lediglich bei schwerer Hypoxieeinwirkung (0,2 % O₂) ließ sich eine leichte Abschwächung der Demethylaseaktivität feststellen. Jedoch schien diese durch eine Überexpression von JMJD1A ausgeglichen werden zu können, da in der Immunfluoreszenzfärbung in JMJD1A stark exprimierenden Zellen unter 0,2% O₂ kein signifikanter Unterschied im H3K9-Methylierungsgrad nachweisbar war⁵⁹. Auch wenn die vorliegenden Ergebnisse nur *in vitro* erzielt wurden und daher nur mit Vorsicht auf *in vivo* Verhältnisse zu übertragen sind, sprechen sie doch für eine hohe Kapazität von JMJD1A auch unter schwerster Hypoxie der Funktion als Histondemethylase gerecht zu werden. Eine Sauerstoffspannung von 1% führt bereits zu einer deutlichen intrazellulären Akkumulation von HIF-1 α und Aktivierung seiner Zielgene⁶⁴. Die HIF-vermittelte Induktion von JMJD1A erfolgt daher in Bereichen, in denen von einer suffizienten Enzymaktivität auszugehen ist.

4.4. Funktionelle Bedeutung der Histondemethylase JMJD1A

Bis zur Niederschrift der vorliegenden Arbeit (Ende 2012) hat man inklusive JMJD1A mindestens sieben unterschiedliche Histondemethylasen identifizieren können, die die Fähigkeit besitzen, Methylgruppen an den Lysin 9-Resten der N-terminalen Enden von Histon 3 (H3K9) zu entfernen⁶⁵. Durch die spezifische Entfernung der Methylgruppe, insbesondere an dimethyliertem H3K9 in verschiedensten Promotorregionen, kommt JMJD1A eine wichtige Rolle als „Transkriptionsmodulator“ in einer Vielzahl von biologischen Prozessen zuteil.

Neben der essenziellen Bedeutung, die JMJD1A in der Spermatogenese und männlichen Keimzellendifferenzierung spielt (*siehe 4.1.*), konnten Tateishi et al. anhand von Knock-out Mäusen zeigen, dass JMJD1A an der Regulation spezifischer Stoffwechselgene, wie z.B. dem *Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor alpha (PPAR α)* und *Thermogenin*, auch *Uncoupling protein 1* genannt (*Ucp1*), beteiligt ist und somit eine wichtige Aufgabe in der Gewichtsregulati-

on übernimmt. Homozygot JMJD1A-defiziente Mäuse wiesen ein deutliches Übergewicht und eine Hyperlipidämie im Erwachsenenalter auf. Ursächlich dafür zeigte sich eine Störung in der β -adrenerg vermittelten Lipolyse im braunen Fettgewebe, sowie ein reduzierter oxidativer Abbau von Fettsäuren und Glycerin im Skelettmuskel aufgrund der fehlenden Demethylierung von H3K9me2 im Promotorbereich von *PPAR α* und *Ucp1* und damit einhergehender Transkriptionsrepression dieser Gene durch JMJD1A ⁶⁶.

In *JMJD1A* defizienten Mäusen einer anderen Arbeitsgruppe, die ebenfalls mit zunehmendem Lebensalter einen adipösen Phänotyp und eine gestörte Glukosetoleranz aufwiesen, konnten anhand von Genexpressionsanalysen mittels Microarray zahlreiche weitere Gene, wie z.B. *Apolipoprotein C1 (ApoC1)*, *GATA binding protein 2 (GATA 2)*, *Glucosetransporter Typ 4-Gen (Slc2A4)* und der Metallopeptidase *Adamts 9*, indentifiziert werden, die direkt oder indirekt durch JMJD1A in ihrer Expression reguliert werden ⁶⁷.

Mit der Differenzierung von glatten Muskelzellen (SMC - *smooth muscle cell*) konnte JMJD1A in einer weiteren Arbeit in Verbindung gebracht werden. JMJD1A fungiert in diesen Zellen als Co-Regulator der Myocardin-Faktoren MRTF-A und Myocardin (myoC). Diese Interaktion und konsekutive JMJD1A-Rekrutierung bewirkt durch Demethylierung von H3K9me2 in den Promotorregionen eine Expressionssteigerung spezifischer Markergene der SMC-Differenzierung ⁶⁸.

Auch in der terminalen Ausdifferenzierung von F9-Zellen (F9-Teratokarzinomazellen, aus der frühen Embryonalentwicklung der Maus) zu parietalen Endodermzellen übernimmt JMJD1A in der Initiierung einer Reihe von Differenzierungsgenen eine Schlüsselfunktion, wie z. B. *Dab2*, *Pdlim4* und *FoxQ1* ⁶⁹. Während JMJD1A defiziente F9-Zellen interessanterweise *in vitro* einen Differenzierungsstop nach Erreichen des primitiven Endoderm-Stadiums aufwiesen, konnten in homozygoten *JMJD1A*-Knock-out-Mäusen keine erkennbaren Auffälligkeiten in der Embryonalentwicklung gesehen werden ⁶⁶. Ob *in vivo* die fehlende Demethylaseaktivität von JMJD1A durch andere Demethylasen oder maternale Substitution kompensiert wird, bleibt spekulativ. Jedoch verdeutlicht diese Diskrepanz der *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse einmal mehr, wie komplex die Interaktionsmechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene sind.

Scheinbar widersprüchlich zur Erkenntnis, dass JMJD1A in Differenzierungsvorgängen eine entscheidende Rolle spielt, konnte in mehreren Arbeiten belegt werden, dass JMJD1A auch eine wesentliche Funktion in der Regulierung des „self-renewal“ (Selbsterneuerung) von embryona-

len Stammzellen sowie induzierten pluripotenten Stammzellen übernimmt. Stammzellen entsprechen unreifen Zellen, die sich in verschiedenste Zelltypen unter Vorhandensein bestimmter Stimuli ausdifferenzieren können. Ein wichtiges Charakteristikum der Stammzelle ist die Fähigkeit der Selbsterneuerung, d. h. durch Zellteilung können Tochterzellen generiert werden, die wiederum Stammzeleigenschaften besitzen, sprich identisch mit der Mutterzelle sind (symmetrische Zellteilung) oder es werden Tochterzellen generiert, die ein höheres Maß an Ausdifferenzierung aufweisen (asymmetrische Zellteilung). Einhergehend mit dem höheren Differenzierungsgrad, verlieren diese Zellen zunehmend die Fähigkeit der Selbsterneuerung⁷⁰.

Im Jahr 2006 konnten Ko et al. *JMJD1A* als ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors STAT3 in embryonalen Mausstammzellen (mES-Zellen) identifizieren. Die Interaktion von aktiviertem STAT3 mit dem Leukemia inhibitory Factor (LIF) ist zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz von murinen embryonalen Stammzellen essenziell. Zellen mit inaktiviertem LIF und konsekutiver Unterbrechung der STAT3/LIF Signalkaskade, wiesen eine signifikant geringere *JMJD1A*-mRNA-Expression auf mit phänotypischen Zeichen einer beginnenden Differenzierung. Es konnte gezeigt werden, dass STAT3 LIF-abhängig direkt an den Promotorbereich von *JMJD1A* bindet und dessen Expression induziert. Diese Beobachtungen ließen die Autoren vermuten, dass *JMJD1A* ein kritisches Signalmolekül darstellt im Erhalt der Pluripotenz und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen⁷¹.

Loh et al. konnten wenig später (2007) in ihrer Arbeit bestätigen, dass die Inaktivierung von *JMJD1A* in mES-Zellen Differenzierung bewirkt. Ferner zeigten sie, dass der embryonale Stammzellmarker und Transkriptionsfaktor Oct4 die Transkription von *JMJD1A* und *JMJD1C* durch Bindung an deren Promotor in mES-Zellen positiv reguliert. Die Aktivierung von *JMJD1A* führt durch Demethylierung von H3K9me2 in Promotorregionen zur Expressionsinduktion anderer Pluripotenz-assoziiierter Gene, wie *Tcl1*, *Tcfcp2l1* und *Zfp57*, teils Oct4 vermittelt⁷². Die Studie von Ma et al. konnte sogar belegen, dass eine Überexpression von *JMJD1A* durch Reaktivierung von Oct4 die Reprogrammierung von adulten neuronalen Stammzellen in embryonale Stammzellen fördern kann⁷³.

Das „Schicksal“ von Stammzellen wird hauptsächlich durch das biologische Microenvironment bestimmt und beeinflusst. Als Stammzellnische bezeichnet man dabei die Summe der Umgebungsfaktoren, die zur Ausbildung der Eigenschaften der Stammzelle führen. Dabei sind nicht nur zelluläre sondern auch metabolische Faktoren maßgeblicher Bestandteil der Nische⁷⁴. Ein zentraler Faktor ist der Sauerstoffgehalt der Umgebung. Hypoxie fördert nicht nur die Dedifferenzierung, sondern wird auch für den Erhalt der Pluripotenz embryonaler Stammzellen als es-

senziell angesehen⁷⁵. Es verwundert daher nicht, dass viele dieser Stammzell- und Selbsterneuerungs-Mediatoren, wie beispielsweise Oct4, als direkte Zielgene von HIF identifiziert werden konnten⁶².

Die Erkenntnis, dass die Histondemethylase JMJD1A ebenfalls einer sauerstoffabhängigen HIF-1 vermittelten Genregulation unterliegt, war Resultat der vorliegenden Arbeit. Auch wenn die funktionelle Bedeutung der durch Hypoxie vermittelten Induktion von JMJD1A noch weithin unbekannt ist, so lassen die gewonnenen Beobachtungen vermuten, dass JMJD1A als epigenetischer Vermittler und Verstärker der zellulären Antwort auf Hypoxie fungiert⁵⁷.

4.5. Die Histondemethylase JMJD1A als epigenetischer Vermittler in der zellulären Adaptation auf Hypoxie

Histonmodifikationen sind ein wichtiges Element in der epigenetischen Regulation. Die dadurch ausgelösten strukturellen Veränderungen des Chromatins tragen ganz maßgeblich zur Aktivierung bzw. Repression der Gentranskription bei. Inwiefern sich externe Einflüsse, wie z. B. eine reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit, auf epigenetischer Ebene widerspiegeln, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Um der Frage nachzugehen, welche Rolle JMJD1A unter hypoxischen Bedingung spielt, untersuchten Krieg et al. mittels Microarrayanalysen an RCC4+VHL-Zellen (Nierenkarzinomzellen), die zuvor mit einer siRNA gegen *JMJD1A* oder einer Kontroll-si-RNA transfiziert wurden, potenzielle Zielgene, die JMJD1A-abhängig unter Hypoxie (0,5% O₂ für 16h) induziert werden. 53 der 821 unter Hypoxie vermehrt exprimierten Gene zeigten eine Abhängigkeit von JMJD1A. Nicht ganz überraschend waren darunter einige bekannte HIF-Zielgene, wie *Adrenomedullin (ADM)*, *Endothelin 1 (EDN1)*, *Plasmin-Aktivator-Inhibitor 1 (SERPINE1)* und *Häm-Oxygenase 1 (HMOX1)*, zu finden. Anhand von *JMJD1A* siRNA transfizierten Kolonkarzinomzellen (HCT 116-Zellen) konnten die Autoren zeigen, dass die durch Hypoxie induzierte Expressionsinduktion von JMJD1A Zielgenen, wie *ADM* und *Wachstums-Differenzierungs-Faktor 15 (GDF15)*, mit einer reduzierten Demethylierung von H3K9 in deren Promotorbereichen einhergeht. Nach 16 Stunden Hypoxie war in den Zellen mit *JMJD1A*-Inaktivierung eine zweifach höhere Menge an H3K9me₂ im Vergleich zu den Kontrollzellen zu detektieren. Der Anstieg an dimethyliertem H3K9 zeigte sich dabei proportional zur Reduzierung von JMJD1A⁵⁷. Interessanterweise können bei exogener Überexpression von JMJD1A auf globaler Ebene keine Veränderungen in der Methylierung von H3K9 gesehen werden⁵⁹. Dies

spricht für eine gezielte Induktion von Zielgenen via JMJD1A unter hypoxischen Bedingungen und lässt ein komplexes Zusammenspiel von Histonmethylasen und Demethylasen annehmen.

Mimura et al. konnten in ihrer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit zeigen, dass HIF-1 und JMJD1A nicht nur zufällig gemeinsame Schnittmengen ihrer Zielgene aufweisen, sondern aktiv interagieren, um die Expression gemeinsamer Zielgene unter Hypoxie zu steuern. Am Beispiel des Glucosetransporter Typ 3 (GLUT3, Gen: *SLC2A3*) konnte veranschaulicht werden, dass JMJD1A mit HIF-1 im Enhancerbereich von *SLC2A3* einen Komplex bildet. Erst durch diese Komplexbildung kann JMJD1A seine enzymatische Funktion ausüben und bewirkt durch Demethylierung von H3K9 eine Veränderung der Chromatinstruktur, welche wiederum mit der Induktion von GLUT-3 einhergeht. Es stellte sich ferner heraus, dass von HIF-1 und JMJD1A gemeinsam regulierte Zielgene hauptsächlich zu einem frühen Zeitpunkt der Hypoxie reguliert werden, d.h. innerhalb der ersten acht Stunden⁸⁶.

Schlussfolgernd lässt sich somit eine entscheidende Rolle JMJD1As als direkter oder indirekter epigenetischer Vermittler von HIF-1 insbesondere in der schnellen Adaptation auf Hypoxie konstatieren.

4.6. Die Rolle von JMJD1A in der Kanzerogenese

Eine reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit kennzeichnet viele solide Tumore. Der Hypoxie-bedingte klonale Selektionsdruck begünstigt diejenigen Tumorzellen, welche ihre Genexpression auf das sauerstoffarme Milieu optimal einstellen können. Diese Tumore sind durch eine erhöhte Apoptose-Resistenz, einen niedrigen Differenzierungsgrad, eine verstärkte Angiogenese und ein erhöhtes Metastasierungspotenzial charakterisiert. Der Transkriptionsfaktor HIF spielt hierbei eine zentrale Rolle ^{76/77}. Folgende Beobachtungen lassen im Kontext mit den oben vorgestellten Befunden vermuten, dass auch die Histondemethylase JMJD1A als „Transkriptionsmodulator“ eine Rolle bei der Tumorentstehung (Kanzerogenese) spielen könnte:

1. JMJD1A wird in Hypoxie durch HIF-1 vermehrt exprimiert.
2. Eine erhöhte *Oktamer-Bindungs-Transkriptionsfaktor 4 (Oct4)* Aktivität konnte in bestimmten Stammzelltumoren (embryonales Karzinom, Germinom) nachgewiesen werden ⁷⁸.
3. JMJD1A wird durch Oct4 rekrutiert, welches seinerseits in Hypoxie via HIF-2 in seiner Genexpression induziert wird. Mögliche additive Effekte hinsichtlich der Aktivität von JMJD1A durch HIF-1 und Oct4 unter Hypoxie wären vorstellbar.
4. Ein Verlust der H3K9-Methylierung fördert chromosomale Instabilitäten, durch Induktion der H3K9me3/2 spezifische Histondemethylasen könnte dies zu erhöhten Mutationsraten in Tumoren mit unkontrollierter HIF Expression führen ^{59/79}.
5. JMJD1A spielt in der Regulation von Pluripotenz-Genen, die wichtig für die Entwicklung und Integrität von Tumorstammzellen sind, eine entscheidende Rolle.
6. JMJD1A wird durch den Transkriptionsfaktor STAT3 induziert. STAT3 vermittelt in vielen Fällen proliferative und anti-apoptotische Signale ⁸⁰.

In der Tat konnte eine hohe Expression von JMJD1A RNA und Protein in verschiedenen Karzinomen von Kolon, Prostata, Niere, Blase, Leber, Lunge und Gallenblase nachgewiesen werden ^{70/81/41/82/}. In einzelnen Studien war ein Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel von JMJD1A und der Rezidivrate bzw. dem Ansprechen auf Chemotherapie zu erkennen ^{81/83}. Hohe Expression von JMJD1A auf mRNA und Proteinebene in Resektaten von Leberzellkarzinomen war mit einer signifikanten Verkürzung des krankheitsfreien Überlebens assoziiert ⁸¹. Passend zu diesen Beobachtungen konnten Cho et al. 2011 in ihrer Arbeit zeigen, dass *JMJD1A* in Lungen- und Blasentumoren überexprimiert wird und dass eine Suppression der Histondemethylase mit-

tels siRNA zu einer signifikanten Reduzierung des Tumorwachstums *in vitro* führte. Korrelierend dazu war in den Knockout-Tumorzellen eine verminderte Transkription von der *Homeobox A1 (HOXA1)* und *Cyclin D1 (CCDN1)* zu beobachten, einhergehend mit einem Verharren der Zellen in der G1/S Phase.

Die Bindung von JMJD1A im Promotorbereich von *HOXA1* führte durch Demethylierung von H3K9me2 zur vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors. Als Folge dieser Induktion von *HOXA1* kam es zur Transkriptionssteigerung von *CCDN1*. Cyclin D1 spielt eine entscheidende regulatorische Rolle im Übergang von der G1 in die S-Phase der Zellteilung. Eine Überexpression von *CCDN1* ist für eine Vielzahl von Tumoren beschrieben und wird mit der malignen Transformation von Zellen in Verbindung gebracht ⁸⁴. Durch Injektion von transfizierten HCT116-Zellen in Nacktmäuse, die entweder mit einer siRNA gegen *JMJD1A* oder einem Leervektor bestückt waren, gelang es Krieg et al. *in vivo* zu zeigen, dass die Histondemethylase JMJD1A das Tumorwachstum fördert. Dementsprechend wiesen Mäuse mit JMJD1A inaktivierten HCT116-Zellen nach 27 Tagen ein signifikant geringeres Tumolvolumen auf im Vergleich zu HCT116-Zellen mit gesteigerter JMJD1A Expression ⁵⁷. Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen steht eine Arbeit, die von Du et al. 2011 publiziert wurde. In ihren Untersuchungen an Nasopharynxkarzinomen konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von JMJD1A mit einem höherem regionalem Lymphknotenbefall und einer schlechten Prognose assoziiert ist. Dies spricht dafür, dass die Funktion von JMJD1A in verschiedenen Zellen und Geweben abhängig vom jeweiligem Microenvironment ist ⁸⁵.

4.7. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass die Histondemethylase JMJD1A nicht nur ubiquitär in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen von Mensch und Ratte exprimiert wird, sondern auch einer sauerstoffabhängigen Genregulation unterliegt. Es gelang *JMJD1A* als direktes Zielgen von HIF-1 zu identifizieren. Anhand von Reporterassay-Analysen konnte im Promotorbereich von *JMJD1A* eine funktionelle HIF-1-Bindungsstelle detektiert werden, die kritisch für die hypoxische Induktion der Histondemethylase ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ließen erstmals ein direktes Zusammenwirken von HIF und epigenetischen Regulationsmechanismen in der zellulären Adaptation auf Hypoxie vermuten. Damit wurde ein wichtiger Beitrag für ein erweitertes Verständnis epigenetischer Signaltransduktions- und Regulationsmöglichkeiten unter Hypoxie geleistet. Erst durch Aufschlüsselung dieser komplexen Interaktionsmechanismen mit JMJD1A als Transkriptionsmodulator wird es in Zukunft möglich sein, neue therapeutische Strategien in der Onkologie und der regenerativen Medizin zu entwickeln.

5. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Übersicht einiger Zielgene von HIF-1	12
Abb. 2 Funktionelle HIF-1 α Domänen.....	13
Abb. 3 Übersicht der HIF-1 Regulation in Normoxie und Hypoxie	14
Abb. 4 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von REH und Z-33-Zellen	15
Abb. 5 Domänenstruktur von JMJD1A.....	16
Abb. 6 Nukleosomen als Grundbaustein des Chromatin.....	18
Abb. 7 Vektorkarte des pGL2-Basc Vektors (Promega).....	22
Abb. 8 Gleichung der Standardkurve	34
Abb. 9 Beispiel einer qRT-PCR mittels LightCycler™ und dazugehöriger Standardgeraden	34
Abb. 10 Graphische Darstellung der mRNA-Expression von <i>JMJD1A</i> und <i>VEGF-A</i> in HEK293-Zellen unter Einwirkung von Hypoxie bzw. Eisenchelatoren	44
Abb. 11 <i>JMJD1A</i> und <i>VEGF-A</i> mRNA-Expression von <i>JMJD1A</i> und <i>VEGF-A</i> in verschiedenen Zelllinien unter Einwirkung von Hypoxie und DFO.....	45
Abb. 12 Kinetik der <i>JMJD1A</i> mRNA Expression unter Hypoxieeinwirkung	47
Abb. 13 Graphische Darstellung der JMJD1A und HIF-1 α Proteinexpression in HEK 293-Zellen mittels Western Blot.....	48
Abb. 14 <i>JMJD1A</i> und <i>VEGF-A</i> mRNA-Expression in stabil transfizierten HMEC-1-Zellen unter Hypoxie	50
Abb. 15 Graphische Darstellung der <i>JMJD1A</i> m-RNA Expression in verschiedenen adulten und fetalen Gewebeproben.....	52
Abb. 16 Lage der potenziellen HIF-Bindungsstellen (HRE) im JMJD1A-Promotorbereich.....	54
Abb. 17 Schematische Darstellung der verschiedenen Promotorkonstrukte.....	55
Abb. 18 Induktion der Luciferase-Aktivität unter Hypoxie durch <i>JMJD1A</i> Promotorsequenzen	56
Abb. 19 Einfluss von ortsgerichteter Mutagenese des HRE-7 in <i>JMJD1A</i> Promotorkonstrukt p593 auf die Luciferase-Aktivität unter Hypoxie.....	58

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Ansatz für die Herstellung von DNS-Fragmenten (20µl)	30
Tabelle 2: PCR-Ansatz mit dem Expand Long Template PCR System (30µl).....	30
Tabelle 3: Allgemeiner Ansatz RT-PCR (20µl).....	31
Tabelle 4: Allgemeiner Ansatz für die qRT-PCR (20µl)	33
Tabelle 5: Allgemeiner Restriktionsansatz (20µl).....	36
Tabelle 6: Allgemeiner Ligationsansatz (10µl).....	37
Tabelle 7: Sequenzier-PCR Ansatz (10µl) und Reaktionsbedingungen.....	38
Tabelle 8: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels	42
Tabelle 9: Verwendete Antikörper für den Western Blot.....	43
Tabelle 10: Relative Expression der mRNA von JMJD1A in humanen Geweben	51
Tabelle 11: JMJD1A und VEGF-A mRNA-Expression in vivo nach Hypoxieeinwirkung auf Ratten	53

7. Literaturverzeichnis

- [1] H. F. Bunn und R. O. Poyton, „Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia“, *Physiol. Rev.*, Bd. 76, Nr. 3, S. 839–885, Juli 1996.
- [2] G. L. Wang und G. L. Semenza, „General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 90, Nr. 9, S. 4304–4308, Mai 1993.
- [3] G. L. Semenza und G. L. Wang, „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“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 12, Nr. 12, S. 5447–5454, Dez. 1992.
- [4] G. L. Semenza, „Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis“, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, Bd. 8, Nr. 5, S. 863–884, Okt. 1994.
- [5] A. L. Harris, „Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 2, Nr. 1, S. 38–47, Jan. 2002.
- [6] G. L. Semenza, „Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease“, *Pediatr. Res.*, Bd. 49, Nr. 5, S. 614–617, Mai 2001.
- [7] B. H. Jiang, J. Z. Zheng, S. W. Leung, R. Roe, und G. L. Semenza, „Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 272, Nr. 31, S. 19253–19260, Aug. 1997.
- [8] C. Brahimi-Horn, N. Mazure, und J. Pouyssegur, „Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications“, *Cell. Signal.*, Bd. 17, Nr. 1, S. 1–9, Jan. 2005.
- [9] A. Loboda, A. Jozkowicz, und J. Dulak, „HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical“, *Mol. Cells*, Bd. 29, Nr. 5, S. 435–442, Mai 2010.
- [10] L. E. Huang, Z. Arany, D. M. Livingston, und H. F. Bunn, „Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 271, Nr. 50, S. 32253–32259, Dez. 1996.
- [11] M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane, und W. G. Kaelin Jr, „HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing“, *Science*, Bd. 292, Nr. 5516, S. 464–468, Apr. 2001.
- [12] P. H. Maxwell, M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher, und P. J. Ratcliffe, „The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis“, *Nature*, Bd. 399, Nr. 6733, S. 271–275, Mai 1999.

- [13] P. Jaakkola, D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, Kriegsheim Av, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, und P. J. Ratcliffe, „Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation“, *Science*, Bd. 292, Nr. 5516, S. 468–472, Apr. 2001.
- [14] D. Lando, D. J. Peet, D. A. Whelan, J. J. Gorman, und M. L. Whitelaw, „Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch“, *Science*, Bd. 295, Nr. 5556, S. 858–861, Feb. 2002.
- [15] P. C. Mahon, K. Hirota, und G. L. Semenza, „FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity“, *Genes Dev.*, Bd. 15, Nr. 20, S. 2675–2686, Okt. 2001.
- [16] G. L. Wang und G. L. Semenza, „Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction“, *Blood*, Bd. 82, Nr. 12, S. 3610–3615, Dez. 1993.
- [17] S. Wellmann, C. Bühner, E. Moderegger, A. Zelmer, R. Kirschner, P. Koehne, J. Fujita, und K. Seeger, „Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism“, *J. Cell. Sci.*, Bd. 117, Nr. Pt 9, S. 1785–1794, Apr. 2004.
- [18] C. Höög, M. Schalling, E. Grunder-Brundell, und B. Daneholt, „Analysis of a murine male germ cell-specific transcript that encodes a putative zinc finger protein“, *Mol. Reprod. Dev.*, Bd. 30, Nr. 3, S. 173–181, Nov. 1991.
- [19] J. Yang, I. Ledaki, H. Turley, K. C. Gatter, J.-C. M. Montero, J.-L. Li, und A. L. Harris, „Role of hypoxia-inducible factors in epigenetic regulation via histone demethylases“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Bd. 1177, S. 185–197, Okt. 2009.
- [20] A. Sar, D. Ponjevic, M. Nguyen, A. H. Box, und D. J. Demetrick, „Identification and characterization of demethylase JMJD1A as a gene upregulated in the human cellular response to hypoxia“, *Cell Tissue Res.*, Bd. 337, Nr. 2, S. 223–234, Aug. 2009.
- [21] K. Yamane, C. Toumazou, Y. Tsukada, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Wong, und Y. Zhang, „JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor“, *Cell*, Bd. 125, Nr. 3, S. 483–495, Mai 2006.
- [22] T. Takeuchi, Y. Yamazaki, Y. Katoh-Fukui, R. Tsuchiya, S. Kondo, J. Motoyama, und T. Higashinakagawa, „Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation“, *Genes Dev.*, Bd. 9, Nr. 10, S. 1211–1222, Mai 1995.
- [23] P. M. Clissold und C. P. Ponting, „JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta“, *Trends Biochem. Sci.*, Bd. 26, Nr. 1, S. 7–9, Jan. 2001.
- [24] D. Balciunas und H. Ronne, „Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors“, *Trends Biochem. Sci.*, Bd. 25, Nr. 6, S. 274–276, Juni 2000.

- [25] P. A. C. Cloos, J. Christensen, K. Agger, und K. Helin, „Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease“, *Genes Dev.*, Bd. 22, Nr. 9, S. 1115–1140, Jan. 2008.
- [26] H. Hou und H. Yu, „Structural insights into histone lysine demethylation“, *Curr Opin Struct Biol*, Bd. 20, Nr. 6, S. 739–748, Dez. 2010.
- [27] R. D. Kornberg und Y. Lorch, „Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome“, *Cell*, Bd. 98, Nr. 3, S. 285–294, Aug. 1999.
- [28] F. Thoma, T. Koller, und A. Klug, „Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin“, *J. Cell Biol.*, Bd. 83, Nr. 2 Pt 1, S. 403–427, Nov. 1979.
- [29] B. M. Turner, „Histone acetylation and an epigenetic code“, *Bioessays*, Bd. 22, Nr. 9, S. 836–845, Sep. 2000.
- [30] B. D. Strahl und C. D. Allis, „The language of covalent histone modifications“, *Nature*, Bd. 403, Nr. 6765, S. 41–45, Jan. 2000.
- [31] S. L. Berger, „Histone modifications in transcriptional regulation“, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Bd. 12, Nr. 2, S. 142–148, Apr. 2002.
- [32] K. MURRAY, „THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES“, *Biochemistry*, Bd. 3, S. 10–15, Jan. 1964
- [33] Y. Zhang und D. Reinberg, „Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails“, *Genes Dev.*, Bd. 15, Nr. 18, S. 2343–2360, Sep. 2001.
- [34] M. Lachner und T. Jenuwein, „The many faces of histone lysine methylation“, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Bd. 14, Nr. 3, S. 286–298, Juni 2002.
- [35] C. Biancotto, G. Frigè, und S. Minucci, „Histone modification therapy of cancer“, *Adv. Genet.*, Bd. 70, S. 341–386, 2010.
- [36] M. A. Dawson und T. Kouzarides, „Cancer epigenetics: from mechanism to therapy“, *Cell*, Bd. 150, Nr. 1, S. 12–27, Juli 2012.
- [37] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstine, P. A. Cole, R. A. Casero, und Y. Shi, „Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1“, *Cell*, Bd. 119, Nr. 7, S. 941–953, Dez. 2004.
- [38] Y. Wang, J. Wysocka, J. Sayegh, Y.-H. Lee, J. R. Perlin, L. Leonelli, L. S. Sonbuchner, C. H. McDonald, R. G. Cook, Y. Dou, R. G. Roeder, S. Clarke, M. R. Stallcup, C. D. Allis, und S. A. Coonrod, „Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination“, *Science*, Bd. 306, Nr. 5694, S. 279–283, Okt. 2004.

- [39] A. Melvin und S. Rocha, „Chromatin as an oxygen sensor and active player in the hypoxia response“, *Cell. Signal.*, Bd. 24, Nr. 1, S. 35–43, Jan. 2012.
- [40] C. Martin und Y. Zhang, „The diverse functions of histone lysine methylation“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 6, Nr. 11, S. 838–849, Nov. 2005.
- [41] H.-S. Cho, G. Toyokawa, Y. Daigo, S. Hayami, K. Masuda, N. Ikawa, Y. Yamane, K. Maejima, T. Tsunoda, H. I. Field, J. D. Kelly, D. E. Neal, B. A. J. Ponder, Y. Maehara, Y. Nakamura, und R. Hamamoto, „The JmjC domain-containing histone demethylase KDM3A is a positive regulator of the G1/S transition in cancer cells via transcriptional regulation of the HOXA1 gene“, *Int. J. Cancer*, Bd. 131, Nr. 3, S. E179–189, Aug. 2012.
- [42] Y. Okada, K. Tateishi, und Y. Zhang, „Histone demethylase JHDM2A is involved in male infertility and obesity“, *J. Androl.*, Bd. 31, Nr. 1, S. 75–78, Feb. 2010.
- [43] K.-D. Wagner, N. Wagner, S. Wellmann, G. Schley, A. Bondke, H. Theres, und H. Scholz, „Oxygen-regulated expression of the Wilms’ tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)“, *FASEB J.*, Bd. 17, Nr. 10, S. 1364–1366, Juli 2003.
- [44] S. Wellmann, T. Taube, K. Paal, H. Graf V Einsiedel, W. Geilen, G. Seifert, C. Eckert, G. Henze, und K. Seeger, „Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology“, *Clin. Chem.*, Bd. 47, Nr. 4, S. 654–660, Apr. 2001.
- [45] T. Kong, K. A. Westerman, M. Faigle, H. K. Eltzschig, und S. P. Colgan, „HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia“, *FASEB J.*, Bd. 20, Nr. 13, S. 2242–2250, Nov. 2006.
- [46] W. M. Bernhardt, M. S. Wiesener, A. Weidemann, R. Schmitt, W. Weichert, P. Lechler, V. Campean, A. C. M. Ong, C. Willam, N. Gretz, und K.-U. Eckardt, „Involvement of hypoxia-inducible transcription factors in polycystic kidney disease“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 170, Nr. 3, S. 830–842, März 2007.
- [47] C. T. Wittwer, K. M. Ririe, R. V. Andrew, D. A. David, R. A. Gundry, und U. J. Balis, „The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control“, *BioTechniques*, Bd. 22, Nr. 1, S. 176–181, Jan. 1997.
- [48] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, und R. Watson, „Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions“, *Biotechnology (N.Y.)*, Bd. 11, Nr. 9, S. 1026–1030, Sep. 1993.
- [49] K. M. Ririe, R. P. Rasmussen, und C. T. Wittwer, „Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction“, *Anal. Biochem.*, Bd. 245, Nr. 2, S. 154–160, Feb. 1997.
- [50] J. Alam und J. L. Cook, „Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription“, *Anal. Biochem.*, Bd. 188, Nr. 2, S. 245–254, Aug. 1990.

- [51] J. R. de Wet, K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski, und S. Subramani, „Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 725–737, Feb. 1987.
- [52] G. Casals, J. Ros, A. Sionis, M. M. Davidson, M. Morales-Ruiz, und W. Jiménez, „Hypoxia induces B-type natriuretic peptide release in cell lines derived from human cardiomyocytes“, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Bd. 297, Nr. 2, S. H550–H555, Jan. 2009.
- [53] J. Knebel, L. De Haro, und R. Janknecht, „Repression of transcription by TSGA/Jmjd1a, a novel interaction partner of the ETS protein ER71“, *J. Cell. Biochem.*, Bd. 99, Nr. 1, S. 319–329, Sep. 2006.
- [54] P. Cramer, D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David, und R. D. Kornberg, „Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism“, *Science*, Bd. 288, Nr. 5466, S. 640–649, Apr. 2000.
- [55] F. J. Hoerndli, M. Toigo, A. Schild, J. Götz, und P. J. Day, „Reference genes identified in SH-SY5Y cells using custom-made gene arrays with validation by quantitative polymerase chain reaction“, *Anal. Biochem.*, Bd. 335, Nr. 1, S. 30–41, Dez. 2004.
- [56] Z. Liu, S. Zhou, L. Liao, X. Chen, M. Meistrich, und J. Xu, „Jmjd1a demethylase-regulated histone modification is essential for cAMP-response element modulator-regulated gene expression and spermatogenesis“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 285, Nr. 4, S. 2758–2770, Jan. 2010.
- [57] A. J. Krieg, E. B. Rankin, D. Chan, O. Razorenova, S. Fernandez, und A. J. Giaccia, „Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene expression and tumor growth“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 30, Nr. 1, S. 344–353, Jan. 2010.
- [58] P. J. Pollard, C. Loenarz, D. R. Mole, M. A. McDonough, J. M. Gleadle, C. J. Schofield, und P. J. Ratcliffe, „Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha“, *Biochem. J.*, Bd. 416, Nr. 3, S. 387–394, Dez. 2008.
- [59] S. Beyer, M. M. Kristensen, K. S. Jensen, J. V. Johansen, und P. Staller, „The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 283, Nr. 52, S. 36542–36552, Dez. 2008.
- [60] C.-J. Hu, S. Iyer, A. Sataur, K. L. Covello, L. A. Chodosh, und M. C. Simon, „Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 26, Nr. 9, S. 3514–3526, Mai 2006.
- [61] C. P. Bracken, A. O. Fedele, S. Linke, W. Balrak, K. Lisy, M. L. Whitelaw, und D. J. Peet, „Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 281, Nr. 32, S. 22575–22585, Aug. 2006.

- [62] K. L. Covello, J. Kehler, H. Yu, J. D. Gordan, A. M. Arsham, C.-J. Hu, P. A. Labosky, M. C. Simon, und B. Keith, „HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth“, *Genes Dev.*, Bd. 20, Nr. 5, S. 557–570, März 2006.
- [63] X. Xia, M. E. Lemieux, W. Li, J. S. Carroll, M. Brown, X. S. Liu, und A. L. Kung, „Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 106, Nr. 11, S. 4260–4265, März 2009.
- [64] G. L. Semenza, „Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1“, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Bd. 15, S. 551–578, 1999.
- [65] K. Agger, J. Christensen, P. A. C. Cloos, und K. Helin, „The emerging functions of histone demethylases“, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Bd. 18, Nr. 2, S. 159–168, Apr. 2008.
- [66] K. Tateishi, Y. Okada, E. M. Kallin, und Y. Zhang, „Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance“, *Nature*, Bd. 458, Nr. 7239, S. 757–761, Apr. 2009.
- [67] T. Inagaki, M. Tachibana, K. Magoori, H. Kudo, T. Tanaka, M. Okamura, M. Naito, T. Kodama, Y. Shinkai, und J. Sakai, „Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice“, *Genes Cells*, Bd. 14, Nr. 8, S. 991–1001, Aug. 2009.
- [68] K. Lockman, J. M. Taylor, und C. P. Mack, „The histone demethylase, Jmjd1a, interacts with the myocardin factors to regulate SMC differentiation marker gene expression“, *Circ. Res.*, Bd. 101, Nr. 12, S. e115–123, Dez. 2007.
- [69] M. Herzog, E. Josseaux, S. Dedeurwaerder, E. Calonne, M. Volkmar, und F. Fuks, „The histone demethylase Kdm3a is essential to progression through differentiation“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 40, Nr. 15, S. 7219–7232, Aug. 2012.
- [70] R. Jaenisch und R. Young, „Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming“, *Cell*, Bd. 132, Nr. 4, S. 567–582, Feb. 2008.
- [71] S. Y. Ko, H. Y. Kang, H. S. Lee, S. Y. Han, und S. H. Hong, „Identification of Jmjd1a as a STAT3 downstream gene in mES cells“, *Cell Struct. Funct.*, Bd. 31, Nr. 2, S. 53–62, 2006.
- [72] Y.-H. Loh, W. Zhang, X. Chen, J. George, und H.-H. Ng, „Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells“, *Genes Dev.*, Bd. 21, Nr. 20, S. 2545–2557, Okt. 2007.
- [73] D. K. Ma, C.-H. J. Chiang, K. Ponnusamy, G.-L. Ming, und H. Song, „G9a and Jhdm2a regulate embryonic stem cell fusion-induced reprogramming of adult neural stem cells“, *Stem Cells*, Bd. 26, Nr. 8, S. 2131–2141, Aug. 2008.
- [74] J. B. Sneddon und Z. Werb, „Location, Location, Location: The Cancer Stem Cell Niche“, *Cell Stem Cell*, Bd. 1, Nr. 6, S. 607–611, Dez. 2007.

- [75] M. C. Simon und B. Keith, „The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 9, Nr. 4, S. 285–296, Apr. 2008.
- [76] P. Vaupel und A. Mayer, „Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome“, *Cancer Metastasis Rev.*, Bd. 26, Nr. 2, S. 225–239, Juni 2007.
- [77] G. L. Semenza, „Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy“, *Trends Pharmacol. Sci.*, Bd. 33, Nr. 4, S. 207–214, Apr. 2012.
- [78] L. Cheng, M.-T. Sung, P. Cossu-Rocca, T. D. Jones, G. T. MacLennan, J. De Jong, A. Lopez-Beltran, R. Montironi, und L. H. J. Looijenga, „OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia“, *J. Pathol.*, Bd. 211, Nr. 1, S. 1–9, Jan. 2007.
- [79] A. H. Peters, D. O’Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schöfer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia, und T. Jenuwein, „Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability“, *Cell*, Bd. 107, Nr. 3, S. 323–337, Nov. 2001.
- [80] M. Zhao, B. Jiang, und F.-H. Gao, „Small molecule inhibitors of STAT3 for cancer therapy“, *Curr. Med. Chem.*, Bd. 18, Nr. 26, S. 4012–4018, 2011.
- [81] D. Yamada, S. Kobayashi, H. Yamamoto, Y. Tomimaru, T. Noda, M. Uemura, H. Wada, S. Marubashi, H. Eguchi, M. Tanemura, Y. Doki, M. Mori, und H. Nagano, „Role of the hypoxia-related gene, JMJD1A, in hepatocellular carcinoma: clinical impact on recurrence after hepatic resection“, *Ann. Surg. Oncol.*, Bd. 19 Suppl 3, S. S355–364, Juli 2012.
- [82] M. Björkman, P. Östling, V. Härmä, J. Virtanen, J.-P. Mpindi, J. Rantala, T. Mirtti, T. Vesterinen, M. Lundin, A. Sankila, A. Rannikko, E. Kaivanto, P. Kohonen, O. Kallioniemi, und M. Nees, „Systematic knockdown of epigenetic enzymes identifies a novel histone demethylase PHF8 overexpressed in prostate cancer with an impact on cell proliferation, migration and invasion“, *Oncogene*, Bd. 31, Nr. 29, S. 3444–3456, Juli 2012.
- [83] M. Uemura, H. Yamamoto, I. Takemasa, K. Mimori, H. Hemmi, T. Mizushima, M. Ikeda, M. Sekimoto, N. Matsuura, Y. Doki, und M. Mori, „Jumonji domain containing 1A is a novel prognostic marker for colorectal cancer: in vivo identification from hypoxic tumor cells“, *Clin. Cancer Res.*, Bd. 16, Nr. 18, S. 4636–4646, Sep. 2010.
- [84] O. Gautschi, D. Ratschiller, M. Gugger, D. C. Betticher, und J. Heighway, „Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: A key driver of malignant transformation“, *Lung Cancer*, Bd. 55, Nr. 1, S. 1–14, Jan. 2007.
- [85] Z.-M. Du, L.-F. Hu, H.-Y. Wang, L.-X. Yan, Y.-X. Zeng, J.-Y. Shao, und I. Ernberg, „Upregulation of MiR-155 in nasopharyngeal carcinoma is partly driven by LMP1 and LMP2A and downregulates a negative prognostic marker JMJD1A“, *PLoS ONE*, Bd. 6, Nr. 4, S. e19137, 2011.
- [86] I. Mimura, M. Nangaku, Y. Kanki, “ Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A” *Mol. Cell. Biol.* 32, 3018–3032 (2012).

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maxi Bettkober, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Charakterisierung der Histondemethylase JMJD1A als neues Zielgen von HIF-1" 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 (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) 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.“

26.11.2013

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Maxi Bettkober hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: “*Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJD1A via HIF-1*”

Wellmann S, Bettkober M, Zelmer A, Seeger K, Faigle M, Eltzhig HK, Bühler C.
Biochem Biophys Res Commun. 2008 Aug 8;372(4):892-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.150.

Epub 2008 Jun 4

Beitrag im Einzelnen:

Für die o.g. Publikation hat Frau Bettkober im Rahmen ihrer Dissertation alle experimentellen/methodischen Inhalte erarbeitet und geschrieben, und zusammen mit dem Betreuer im Labor, Herrn PD Dr. Wellmann, die Publikation verfasst.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift

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

10. Publikationen

Originalarbeit

Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJD1A via HIF-1.

Wellmann S, Bettkober M, Zelmer A, Seeger K, Faigle M, Eltzhig HK, Bühler C.
Biochem Biophys Res Commun. 2008 Aug 8;372(4):892-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.150.
Epub 2008 Jun 4

Artikel

FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia at first relapse

S Wellmann, E Moderegger, A Zelmer, M Bettkober, A von Stackelberg, G Henze and K Seeger
Leukemia (2005) **19**, 467–468. doi:10.1038/sj.leu.2403655 Published online 27 January 2005

11. Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation und die fachliche Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Seeger und Herrn PD Dr. Sven Wellmann ganz herzlich danken.

Mein Dank gilt in besonderem Maße Herrn PD Dr. Sven Wellmann und Andrea Zelmer für die hervorragende Betreuung, den Glauben an das Projekt, die zahlreichen wertvollen Hinweise und Anregungen sowohl während der Laborarbeit als auch bei der Zusammenstellung der Ergebnisse, sowie für die Hilfe und Geduld bei den unendlichen Fragen, die im Laufe der Zeit auftraten.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Mutter, die in all den Jahren in welcher Form auch immer unterstützend und motivierend hinter mir stand. Ohne Sie wäre vieles nicht möglich gewesen. Werner sei gedankt für die perfekte Arbeitsatmosphäre, die das Abschließen der Arbeit so viel leichter und angenehmer haben werden lassen.

Ferner sei den Eltern und Kinder von St. Leuchtturm, Regenbogen und Schatzinsel gedankt, die mich mit Carepaket und unendlich lieben Worten immer wieder auf Ihre spezielle Art und Weise motiviert und unterstützt haben. An dieser Stelle sei auch OA Dr. B. Winkler erwähnt, die mir erst den Raum zum Schreiben und damit den Abschluss dieser Arbeit ermöglicht hat.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. W. Bernhardt für die freundlicher Weise zur Verfügung gestellten Gewebeproben sowie der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Holger K. Eltzhig der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Tübingen für die freundliche Unterstützung.