

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN  
PROF. DR. GERD SCHMITZ  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Hypoxia inducible factor 1 (HIF 1)  $\alpha$ - und  $\beta$  - vermittelte Induktion  
der ABCA1-Promotor-Aktivität.*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Antonia Hohenstatt*

2009



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN  
PROF. DR. GERD SCHMITZ  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Hypoxia inducible factor 1 (HIF 1)  $\alpha$ - und  $\beta$  - vermittelte Induktion  
der ABCA1-Promotor-Aktivität.*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Antonia Hohenstatt*

2009

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

*PD Dr. Thomas Langmann*

2. Berichterstatter:

*Prof. Dr. Christian Hengstenberg*

Tag der mündlichen Prüfung:

13.07.2009



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	ATP binding cassette (ABC) transporter .....	4
1.1.1	Strukturelle Eigenschaften von ABC-Transportern.....	7
1.1.2	ABCA-Subfamilie .....	8
1.1.3	ABCA1 .....	8
1.2	Hypoxia inducible factor 1 (HIF1) .....	16
1.2.1	HIF1 $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit .....	17
1.2.2	Signaltransduktion der Hypoxie.....	19
1.2.3	Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren .....	20
1.2.4	Biologische Funktion von HIF1 $\alpha$ .....	21
1.3	Zielsetzung der Arbeit .....	24
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Geräte und Material.....	26
2.1.1	Geräte .....	26
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel .....	26
2.1.3	Chemikalien .....	27
2.1.3	Medien, Puffer und Lösungen .....	28
2.1.4	DNA .....	29
2.1.5	Molekularbiologische Kits und Enzyme.....	30
2.1.6	Organismen und Zellen.....	31
2.2	Methoden .....	31
2.2.1	Zellkultur.....	31
2.2.2	DNA/Plasmide.....	32
2.2.3	Klonierung von DNA-Fragmenten .....	36
2.2.4	Fluoreszenzsequenzierung .....	41
2.2.5	Transfektion .....	42
2.2.6	Luciferase-Reportergen-Assay.....	42
2.2.7	Proteinbestimmung .....	45
2.2.8	EMSA-Assay .....	45
3	Ergebnisse .....	50

3.1	Klonierung eines responsiven VEGF-Promotorkonstrukts und des ABCA1-Promotors in den pGL3 basic Luciferase- Vektor.....	50
3.2	Transfektion.....	54
3.3	Luciferase-Assay.....	55
3.3.1	Promotor-Aktivität in HepG2-Zellen.....	55
3.3.2	Promotor-Aktivität in RAW 264.7 Zellen.....	57
3.4	Gelshift-Assay: HIF1 bindet an den ABCA1-Promotor <i>in vitro</i> .....	59
4	Diskussion .....	62
4.1	Induktion des ABCA1 Gens durch Überexpression von HIF1 $\alpha$ und $\beta$ .....	62
4.2	Zusammenfassung und Ausblick.....	64
5	Literaturverzeichnis .....	66
6	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	73
6.1	Abbildungen .....	73
6.2	Tabellen .....	75

# 1 Einleitung

## 1.1 ATP binding cassette (ABC) transporter

ABCA1, dessen Gen-Promotor in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist ein Mitglied der *ATP binding cassette transporter* Superfamilie, die eine der größten bisher beschriebenen Proteinfamilien darstellt. Aufgrund der Verteilung der Gene über das gesamte Genom und wegen der Sequenzhomologien zwischen einzelnen Spezies scheinen ABC-Transporter, evolutionär gesehen, ein frühes Transportsystem darzustellen [1].

Mitglieder der ABC-Transporter-Familie kommen in fast allen Organismen vor. Ihre Hauptfunktion ist, vereinfacht gesagt, die aktive Beförderung eines breiten Spektrums unterschiedlicher Substanzen über intra- und extrazelluläre biologische Membranen. Dabei sind die verschiedenen ABC-Transporter im Allgemeinen meist spezifisch für ein Substrat oder eine Gruppe ähnlicher Substrate. Die Energiegewinnung erfolgt dabei aus der Hydrolyse von gebundenem ATP [2],[3].

ABC-Transporter sind essentiell für viele Vorgänge in der Zelle, Mutationen in diesen Genen können kausal zu Erbkrankheiten führen. So verursacht z. B. ein Defekt im *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) Protein, das den Chloridhaushalt z.B. von Lungenepithelzellen aufrecht erhält, Mukoviszidose bzw. Zystische Fibrose [4].

Mutationen im ABCA1-Transporter führen zur familiären HDL-Defizienz oder Tangier Erkrankung [5-8]. Eine Reihe retinaler Erkrankungen werden durch Defekte von ABCA4 (ABCR) [9], die progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ II durch ABCB11 (*bile salt export pump*) und Typ III durch ABCB4 (*multidrug resistance 3*) verursacht [10;11].

Andere *ATP binding cassette transporter* scheinen im Darm an der Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere beteiligt zu sein. Zu diesen zählt das ABCB1. Entdeckt wurde ABCB1 aufgrund seiner Fähigkeit, Tumorzellen gegen



eine Reihe von hydrophoben Chemotherapeutika, wie z.B. Vinblastin, resistent zu machen. Da MDR1 die Permeabilität der Zellen für Chemotherapeutika verändert [12], wird es auch als *multi drug resistance* Protein bzw. P-Glykoprotein bezeichnet.

Eine wichtige Rolle spielen die humanen ABC-Transporter auch in der Physiologie des Fettstoffwechsels, speziell im Sterol-, Phospholipid- und Gallensäuretransport [13-15].

Durch die vollständige Charakterisierung eukaryotischer Genome konnten alle ABC-Transporter von *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* identifiziert und in Subfamilien eingeteilt werden [16]. Derzeit sind 48 Mitglieder der ABC-Transporter-Familie bekannt, die aufgrund struktureller Unterschiede bzw. aufgrund von Sequenzhomologien in sieben Subfamilien eingeteilt werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Eigenschaften bisher bekannter humaner ABC-Transporter. Neben der offiziellen Gennomenklatur, sind gebräuchliche Synonyme, die Domänenstruktur, die Gewebsexpression und die Funktion angegeben.

**Tabelle 1: Überblick über die Domänenstruktur, Gewebsexpression und Funktion von humanen ABC-Transportern.**

Gen	Alias	Domänenstruktur	Gewebsexpression; zelluläre Lokalisation	Funktion und Substrate
ABCA1	ABC1	(TMD <sup>1</sup> -ABC <sup>2</sup> ) <sub>2</sub>	Makrophagen, Leber, apikale Plasmamembran	Cholesterinefflux auf HDL, Cholinphospholipide
ABCA2	ABC2	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Gehirn, Lysosom	Medikamentenresistenz (Estramustin), Steroide
ABCA3	ABC3, ABCC	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Lunge	Surfactant Sekretion
ABCA4	ABCR	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Photorezeptoren	N-Retinylidene-PE Efflux
ABCA5		(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Muskulatur, Herz, Hoden	
ABCA6		(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Leber	Phospholipide
ABCA7		(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Milz, Thymus, PBMC	Spingolipide, Serin-Phospholipide
ABCA8		(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Ovar	
ABCA9		(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Herz	
ABCA10		(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Muskulatur, Herz	
ABCA12		(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Magen	
ABCA13		(TMD-ABC) <sub>2</sub>	n.e.	
ABCB1	MDR, PGY1	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Exkretorische Organe, apikale PM	Medikamentenresistenz, Phospholipide, PAF, Aldosteron, Cholesterin, amphiphile Moleküle, $\beta$ - Amyloid
ABCB2	TAP1	TMD-ABC	Ubiquitär, ER	Peptidtransport
ABCB3	TAP2	TMD-ABC	Ubiquitär, ER	Peptidtransport
ABCB4	MDR3, PGY3	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Leber, apikale PM	Phosphatidylcholintransport
ABCB5		(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Ubiquitär	
ABCB6	MTABC3	TMD-ABC	Mitochondrien	Fe/S Cluster Transport
ABCB7	ABC7	TMD-ABC	Mitochondrien	Fe/S Cluster Transport
ABCB8	MABC1	TMD-ABC	Mitochondrien	Fe/S Cluster Transport
ABCB9		TMD-ABC	Herz, Gehirn, Lysosomen	
ABCB10	MTABC2	TMD-ABC	Mitochondrien	
ABCB11	BSEP, SPGP	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Leber, apikale PM	Gallensäuretransport
ABCC1	MRP1	TMD0-(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Lunge, Hoden, PBMC, basolaterale PM u. Endosomen	Medikamentenresistenz, GSH, Glucuronat-, Sulfat-Konjugate, GSSG, Sphingolipide, LTC <sub>4</sub> , PGA <sub>1/2</sub> , 17 $\beta$ -Glucuronosyl-Estradiol
ABCC2	MRP2	TMD0-(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Leber, apikale PM	GSH, Glucuronat-, Sulfat-Konjugate, Bilirubin-Glucuronid, LTC <sub>4</sub> , 17 $\beta$ -Glucuronosyl-Estradiol, Tauroolithocholat-3-sulfat, Anionische Medikamente
ABCC3	MRP3	TMD0-(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Lunge, Darm, Leber, basolaterale PM	Glucuronat-, Sulfat-Konjugate, 17 $\beta$ -Glucuronosyl-Estradiol, Tauroolithocholat-3-sulfat
ABCC4	MRP4	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Prostata, PM	Xenobiotika, Nukleoside
ABCC5	MRP5	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Ubiquitär, basolaterale PM	Xenobiotika, Nukleoside
ABCC6	MRP6	TMD0-(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Niere, Leber, basolaterale PM	Anionische Cyclopentapeptide (z.B. BQ123)
ABCC7	CFTR	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Exokrine Gewebe	Chloridionen, ATP
ABCC8	SUR1	TMD0-(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Pankreas	Sulfonylharnstoff Rezeptor
ABCC9	SUR2	TMD0-(TMD-ABC) <sub>2</sub>	Herz, Muskulatur	Sulfonylharnstoff (K <sup>+</sup> Regulation)
ABCC10	MRP7	TMD0-(TMD-ABC) <sub>2</sub>	n.e.	
ABCC11	MRP8	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	n.e.	
ABCC12	MRP9	(TMD-ABC) <sub>2</sub>	n.e.	
ABCD1	ALD	TMD-ABC	Peroxisomen	VLCFA Transportregulation
ABCD2	ALDL1, ALDR	TMD-ABC	Peroxisomen	VLCFA
ABCD3	PMP70, PXMP1	TMD-ABC	Peroxisomen	VLCFA
ABCD4	PMP69, P70R	TMD-ABC	Peroxisomen	VLCFA
ABCE1	OABP, RNS41	(ABC) <sub>2</sub>	Ovar, Hoden, Milz	Oligoadenylat
ABCF1	ABC50	(ABC) <sub>2</sub>	Ubiquitär	translation elongation initiation factor 2
ABCF2		(ABC) <sub>2</sub>	Ubiquitär	
ABCF3		(ABC) <sub>2</sub>	Ubiquitär	
ABCG1	White, ABC8	ABC-TMD	Ubiquitär	Phospholipide, Cholesterin
ABCG2	MXR, ABCP, BCRP	ABC-TMD	Plazenta, Darm, apikale PM	Medikamentenresistenz, Toxin-Efflux
ABCG4	White2	ABC-TMD	Leber	
ABCG5	White3	ABC-TMD	Leber, Darm, apikal	Steroltransport
ABCG8	White4	ABC-TMD	Leber, Darm, apikal	Steroltransport

### 1.1.1 Strukturelle Eigenschaften von ABC-Transportern

Ein funktioneller ABC-Transporter besteht normalerweise aus zwei Transmembrandomänen (TMD), die üblicherweise aus sechs membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices und zwei Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD) bestehen. Letztere werden auch als ATP-Bindungsdomänen (ABC) bezeichnet [17] (Abbildung 1).

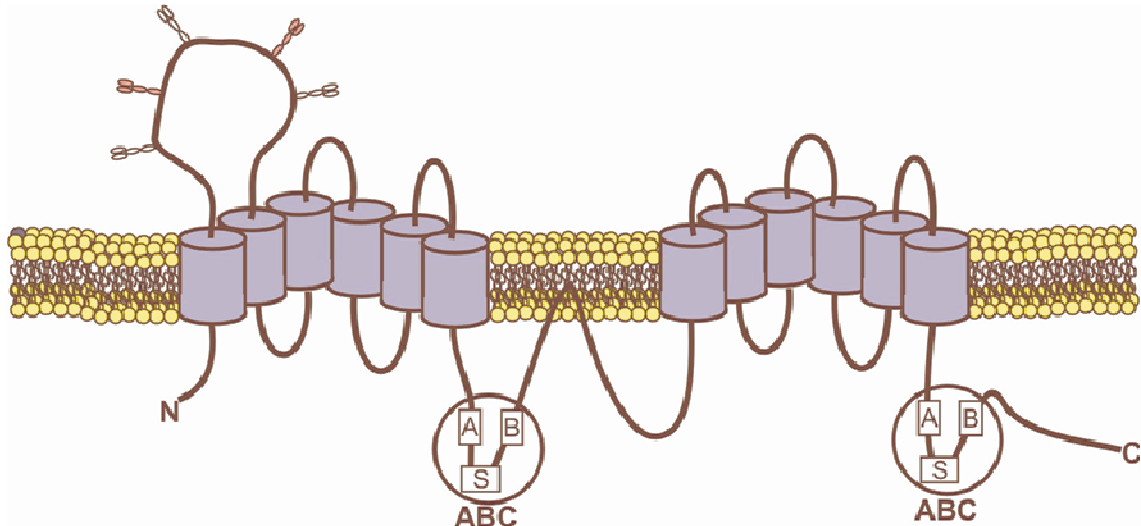


Abbildung 1: Dreidimensionaler schematischer Aufbau eines funktionstüchtigen fullsize ABC-Transporters mit seinen Transmembrandomänen und den ATP binding cassettes (=ABC).

Die Nukleotidbindungsdomänen enthalten drei kurze, hochkonservierte Peptidabschnitte, das Walker A und Walker B Motiv und zusätzlich das Signatur (C) Motiv, das die *consensus* Sequenz "Leu-Ser-Gly-Gly-Gln" enthält [18;19]. Das C-Motiv ist wahrscheinlich an der funktionellen Kopplung der ATP-Bindung bzw. Hydrolyse und der Konformationsänderung der Transmembranabschnitte beteiligt [20].

Eukaryotische ABC-Gene können entweder als *fullsize* oder als *halfsize* Transporter vorliegen. Dabei liegen *fullsize* Transporter als Polypeptidkette vor und besitzen zwei TM-Domänen und zwei NBD und sind somit funktional. *Halfsize* Transporter, die nur eine TM-Domäne und NBD besitzen, müssen deshalb für ihre Funktionsfähigkeit Homo- oder Heterodimere bilden [20], wobei bei humanen ABC-Transportern verschiedene Anordnungsmöglichkeiten verwirklicht sind.

### 1.1.2 ABCA-Subfamilie

Die ABCA-Subfamilie besteht ausschließlich aus *fullsize* Transportern. ABCA1, ABCA4 (ABCR) und ABCA2 gehören mit 2261, 2273 und 2436 Aminosäuren zu den größten Proteinen dieser Gruppe. Aufgrund phylogenetischer Analysen und Intron-Strukturen wird die ABCA-Familie in zwei Subgruppen unterteilt [2]. Die erste Gruppe enthält sieben Gene, die auf sechs Chromosomen im Genom verteilt vorliegen, ABCA1 (9q22-q31), ABCA2 (9q34), ABCA3 (16p13,3), ABCA4 (1p22), ABCA7 (19p13,3), ABCA11 (4p16), ABCA12 (2q35). Die andere Gruppe mit fünf Genen (ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9 und ABCA10) dagegen befindet sich als Cluster auf Chromosom 17q24 [2].

Sieben dieser ABCA-Mitglieder werden interessanterweise durch Lipide kontrolliert oder beeinflusst [21;22] Dies verdeutlicht die besondere Rolle dieser Subfamilie im gesamten Lipidstoffwechsel [13].

### 1.1.3 ABCA1

Der humane *ATP binding cassette transporter 1* (ABCA1) ist ein aus 2261 Aminosäuren bestehendes Protein [23], das ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert wird, vor allem in Leber, Lunge, Plazenta und in fetalen Zelltypen. ABCA1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Phospholipid- und Cholesterinstoffwechsels [8].

Die ABCA1-Expression wird in Abhängigkeit von Import und Export der Lipide reguliert. Außerdem erfolgt eine differenzierungsabhängige Hochregulation von ABCA1 während der Monozyten-Makrophagen-Differenzierung, die auf eine besondere Rolle des Proteins in Makrophagen hinweist [23]. Wegen der Homologie zu anderen, bereits charakterisierten ABC-Transportern, wird angenommen, dass ABCA1 den Co-Transport von Phospholipiden und freiem Cholesterin von der Zellinnenseite zur Außenseite ermöglicht [24]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ABCA1 keinen aktiven Transporter, sondern ein ATP getriebenes Regulatorprotein darstellt [25].

#### 1.1.3.1 Bedeutung von ABCA1 für den Lipidstoffwechsel

Beim physiologischen Lipidstoffwechsel werden Nahrungslipide, unter anderem Cholesterin, vom Dünndarm absorbiert und in Chylomikronen zur Leber transportiert. Diese gibt das Cholesterin als *very low density lipoprotein* (VLDL) an das Blut ab. Anschließend wandeln sie sich nach Abgabe ihres Triglyzeridanteils zu LDL um und werden von den peripheren Zellen über LDL-Rezeptoren aufgenommen. Ein Großteil des LDL wird nicht metabolisiert, gelangt über das Blut zurück zur Leber und wird dort in Gallensäuren umgewandelt. Zusätzlich sind auch *high density lipoproteins* (HDL) am Lipidstoffwechsel beteiligt. Sie werden als Vorstufen sowohl von der Leber als auch von peripheren Körperzellen, Enterozyten und Makrophagen sezerniert. Diese nehmen Cholesterin von VLDL, LDL und den peripheren Geweben auf und verestern es mit Hilfe des LCAT-Enzyms. Das entstandene HDL kann von der Leber aufgenommen werden und bewerkstelligt damit einen reversen Cholesterintransport von der Peripherie zur Leber [26] (Abbildung 2).

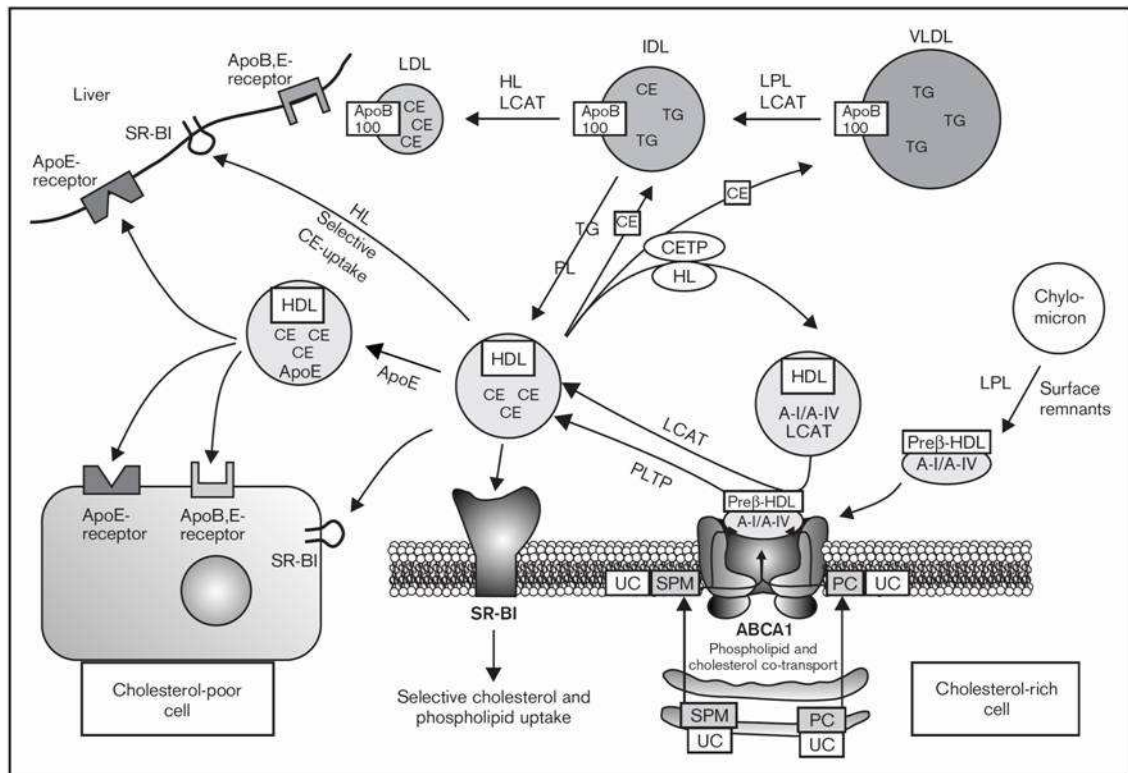


Abbildung 2: Der ABCA1-Transporter vermittelt den Cholesterinausstrom aus peripheren Zellen auf HDL-Vorstufen. Dieses Lipid wird von HDL und seinen Vorläuferpartikeln übernommen. Das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert HDL assoziiertes Cholesterin im Plasma. Schließlich entstehen sphärische HDL-Partikel (HDL3 und die größeren HDL2). Phospholipid-Transfer-Protein (PLTP), Cholesterin-Transfer-Protein (CETP), hepatische Lipase (HL) und endotheliale Lipase (EL) modifizieren HDL-Partikel im Plasma. HDL assoziierte Cholesterinester werden von der Leber aufgenommen oder in andere Lipoproteine umgewandelt [5].

Bisher sind, neben passiver Diffusion über Membranen, drei Stoffwechselwege bekannt, über die Cholesterin aus Makrophagen transportiert und auf HDL, als Akzeptor von Lipiden, transferiert wird (Abbildung 3).

Einer dieser Stoffwechselwege wird durch den Golgi-Apparat über ABCA1 und apoA-I vermittelt. Lipidfreies apoA-I ist ein physiologischer Akzeptor, der am Cholesterin und Phospholipidefflux von Zellen beteiligt ist. Dieser Vorgang ist abhängig von der Funktionsfähigkeit von ABCA1. Es wird angenommen, dass ABCA1 als Rezeptor für apoA-I fungiert [27]. Helicale lipidfreie Apolipoproteine von HDL, wie apoA-I, A-II und E, induzieren den Cholesterin- und

Phospholipidefflux der Zellen und generieren frühe HDL-Partikel, die physiologische und biochemische Charakteristika von pre- $\beta$ -HDL aufweisen.

Zusätzlich zu diesem Stoffwechselweg existiert in Cholesterin beladenen Makrophagen, unter Abwesenheit von Lipoproteinakzeptormolekülen, ein basaler Lipidefflux. Dieser Mechanismus funktioniert unabhängig von ABCA1 und damit auch bei Patienten mit familiärer HDL-Defizienz. Eventuell wird dies über andere ABC-Transporter-Proteine, wie ABCG1, MDR1 und ABCG4, reguliert [28].

In einem dritten Stoffwechselweg wird die mitochondriale Herstellung von 27-Hydroxycholesterin und 24(S), 25-Epoxycholesterin aus Cholesterin über CYP-27 beeinflusst. Diese Oxysterole können über einen direkten Sekretionsweg unabhängig von anderen Lipidakzeptormolekülen aus der Zelle sezerniert werden [29;30].



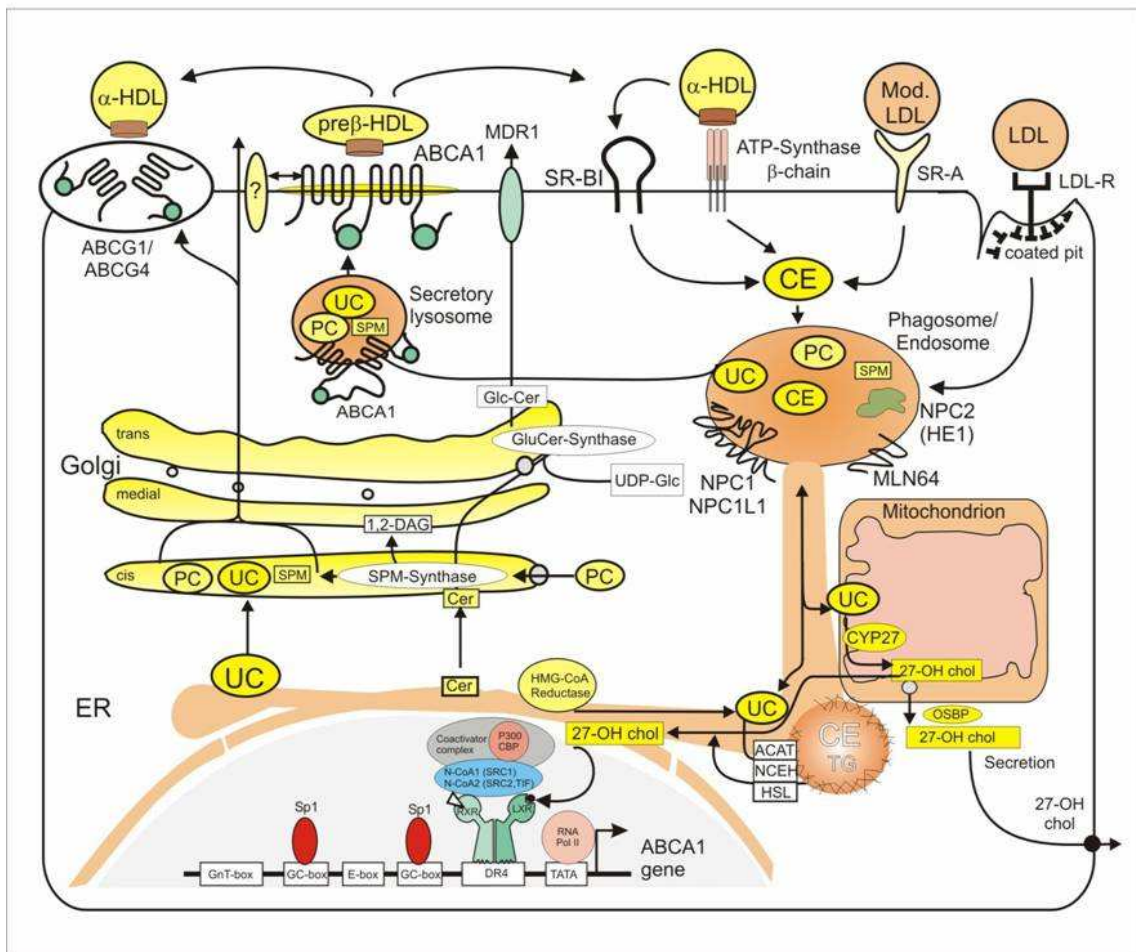


Abbildung 3: Model für Lipideinstrom, -Synthese, -Speicherung und -Ausstrom [31].

### 1.1.3.2 Familiäre HDL-Defizienz (Tangier Erkrankung) und ABCA1

Die Bedeutung dieses aktiven reversen Cholesterintransports wurde durch die Aufklärung des genetischen Defekts bei der autosomal rezessiv vererbten Tangier Erkrankung erkannt. Diese Krankheit ist sehr selten und wurde erstmals 1961 von Fredrickson beschrieben [32]. Durch DNA-Sequenzanalysen betroffener Patienten wurden verschiedene Mutationen im ABCA1-Gen entdeckt, die für die Symptome der Tangier Erkrankung verantwortlich sind [6-8] (Abbildung 4).



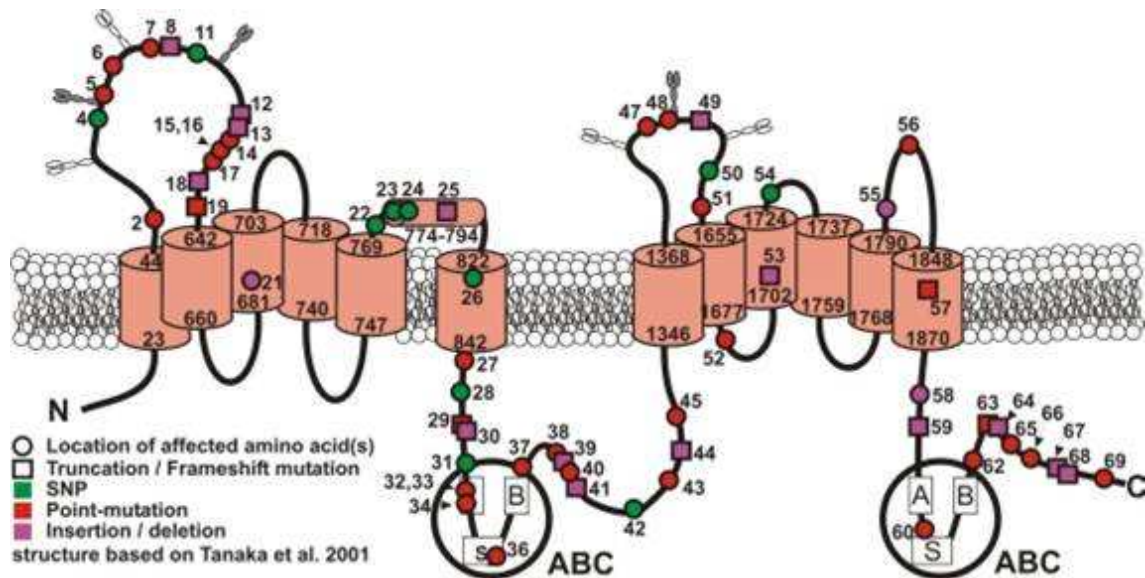


Abbildung 4: Mutationen von ABCA1 die zu der Tangier Erkrankung führen [33].

Charakteristisch für diese Krankheit sind eine fast vollständige HDL-Defizienz, ein stark verminderter zellulärer Cholesterin- und Phospholipidefflux und dadurch eine Akkumulation von Cholesterinestern in diesen Zellen. Zusätzlich wird auch die Konzentration und die Zusammensetzung des Plasma-HDL-Pools durch den Verlust der Funktionsfähigkeit von ABCA1 beeinflusst. Es finden sich hauptsächlich kleine prä- $\beta$ 1-HDL Partikel, die lediglich apoA-I und Phospholipide, aber kein freies Cholesterin und apoA-II enthalten [34]. Die niedrigen Plasma-HDL-Spiegel bei der Tangier Erkrankung sind vor allem auf die fehlende Umwandlung von prä- $\beta$ 1-HDL Partikel zu reifem  $\alpha$ -HDL und einem damit verbundenen verstärkten Abbau von apoA-I zurückzuführen [35].

Durch Studien mit ABCA1 *knockout* Mäusen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Bei diesen Mäusen sind, analog zum Phänotyp der Tangier Erkrankung, der Verlust von HDL-Cholesterin und apoA-I, stark verminderte Serum Cholesterin Konzentrationen und Fettablagerungen in verschiedenen Geweben mit hohem Zellumsatz charakteristisch. Ähnlich wie bei Tangier Patienten, zeigen Fibroblasten der ABCA1  $-/-$  Mäusen eine starke Verminderung von apoA-I abhängigem Phospholipid- und Cholesterinefflux. Dies lässt darauf schließen, dass ABCA1 für den Co-Transport beider

Substanzklassen nötig ist. Durch die Versuche mit *knockout* Mäusen wurde auch gezeigt, dass sowohl Erythrozyten als auch Thrombozyten ABCA1 für ihre Membranhomöostase benötigen, da sie insbesondere für ihre Membranstabilität auf HDL angewiesen sind [5;36].

Im Gegensatz zu der starken Verminderung des apoA-I abhängigen Phospholipid- und Cholesterinefflux, sowohl in Fibroblasten von Tangier Patienten als auch von *knockout* Mäusen, wird der Phospholipid- und Cholesterinefflux durch Überexpression von ABCA1 gesteigert [5]. Daher nimmt man an, dass funktionelle Wechselwirkungen zwischen apoA-I und ABCA1 für die initiale Lipidierung von apoA-I notwendig sind. Über eine Reihe von Zwischenschritten entsteht aus dem lipidierten apoA-I discoidales HDL, das durch die LCAT zu sphärischem HDL umgewandelt werden kann.

Im Moment existieren drei verschiedene Erklärungsmodelle, mit dem der Wirkungsmechanismus zwischen ABCA1 und apoA-I, der zu einem Lipidefflux führt, erklärt werden kann. Im ersten Modell wird davon ausgegangen, dass es zu keiner direkten Interaktion zwischen ABCA1 und apoA-I kommt. ABCA1 abhängig sollen Phospholipide zur äußeren Membranschicht gelangen und dort anschließend zur Lipidierung von apoA-I führen. Beim zweiten Modell kommt es zu einer initialen Bindung von apoA-I an die Membran mittels des Carboxy-Terminals. Das gebundene apoA-I assoziiert in einem zweiten Schritt mit ABCA1, welches anschließend direkt Lipide auf das Apolipoprotein überträgt. Im dritten Modell wird von einer direkten Interaktion von ABCA1 und apoA-I ausgegangen, die dann zu einer ABCA1 vermittelten Übertragung von Lipiden auf apoA-I führt.

Am wahrscheinlichsten ist zurzeit ein Zwei-Phasen-Modell, das auf Experimenten von Zannis *et al.* mit Wildtyp apoA-I und verschiedenen Mutanten von apoA-I, mit Punktmutationen und Deletionen, basiert. Im ersten Schritt des Modells bildet sich dabei ein Komplex zwischen ABCA1 und seinen Liganden. Eine Bindung zwischen apoA-I und ABCA1 scheint zwar notwendig, aber nicht ausreichend für den Lipidefflux zu sein. Der zweite Schritt beinhaltet den ABCA1 vermittelten Transfer von Lipiden der Zelle auf apoA-I, wobei die

Bildung eines produktiven Komplexes zwischen apoA-I und ABCA1 wohl Voraussetzung ist. Dies wurde mit der mutanten Form von ABCA1 Trp590Ser, die mit der Tangier Erkrankung assoziiert ist, bewiesen. Bei dieser Form wird zwar ein Komplex zwischen apoA-I und ABCA1 gebildet; es kommt aber nicht zur Lipidierung [37].

#### 1.1.3.3 Transkriptionelle ABCA1-Regulation

Die sterolabhängige ABCA1-Induktion wird primär über das LXR/RXR System vermittelt (Abbildung 5). Dieses besteht aus den Kernrezeptoren *liver X receptor* (LXR)  $\alpha$  und  $\beta$ , die obligat mit dem *retinoid X receptor* (RXR) ein Heterodimer bilden und direkt an den Promotor von Zielgenen, wie ABCA1 binden. Die physiologischen Liganden von LXR und RXR sind Oxysterole bzw. 9-cis Retinsäure. Dabei ist es von physiologischer Relevanz, dass Oxysterole proportional zur Konzentration von Cholesterin ansteigen [38]. Weder freies Cholesterin noch Cholesterinester können jedoch direkt an LXR binden. Diese müssen zuerst in Oxysterole umgewandelt werden, um als Liganden zu fungieren. Hierbei ist 27-Hydroxycholesterin, das in den Mitochondrien mittels CYP27 aus Cholesterin synthetisiert wird, der wichtigste endogene Ligand in Makrophagen. Aufgrund der starken Hochregulation von ABCA1 durch Oxysterole werden synthetische LXR-Agonisten als vielversprechende Kandidaten für eine therapeutische Modulation des durch ABCA1 regulierten reversen Cholesterintransports angesehen [39]. Problematisch bei der Anwendung von LXR-Agonisten sind allerdings unerwünschte Nebenwirkungen. So entwickelten Mäuse, die mit synthetischen LXR-Agonisten behandelt wurden, aufgrund einer extrem gesteigerten Fettsäure-Produktion eine Fettleber. Bei der Behandlung mit dem LXR-Agonisten T0901317 kam es bei Mäusen zu einer massiven Hypertriglyzeridämie. Einmal direkt durch die gesteigerte Induktion des Fettsäuresynthase Promotors über LXR $\alpha$  und zum anderen indirekt über die LXR $\alpha$  vermittelte Aktivierung von SREBP1c, das ein Haupttranskriptionsfaktor für die Fettsäurebiosynthese ist [40;41]. Potentielle Strategien um die positiven Effekte von LXR-Agonisten auf den reversen Cholesterintransport zu nutzen, aber gleichzeitig nicht die Gene des

Fettsäuremetabolismus zu induzieren, wurden von Lund *et al.* zusammengefasst. Dabei sollen LXRh selektive Agonisten identifiziert und neue LXR-Agonisten mit schwächerer transkriptioneller Wirkung auf SREBP1c synthetisiert werden [42;43].

Neben Sterolen und anderen Fettsäuren, die als physiologische Stimulatoren von LXR/RXR und SREBP gelten, beeinflussen auch eine Reihe anderer natürlicher und synthetischer Substanzen die ABCA1-Genexpression. Zu diesen zählen unter anderem Retinoide, synthetische PPAR-Liganden (Glitazone), Hormone, Zytokine und Medikamente. Die meisten dieser Stoffe wirken über eine direkte Stimulation des ABCA1-Promotors und nicht über die Proteininstabilität [44].

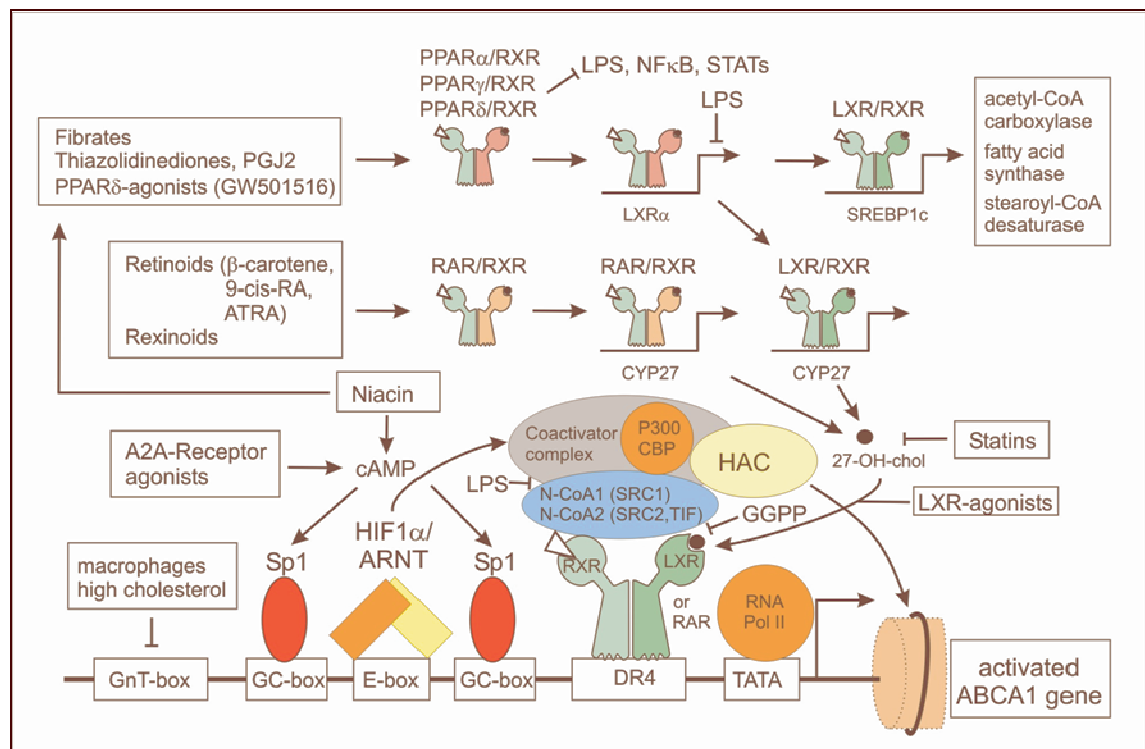


Abbildung 5: Aktivierende Mechanismen des ABCA1-Promotors [45].

## 1.2 Hypoxia inducible factor 1 (HIF1)

Der *hypoxia inducible factor 1* ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle in der Sauerstoff Homöostase spielt. Bisher sind über 60 Gene identifiziert worden, die für Proteine kodieren, die an physiologischen

Prozessen wie der Angiogenese, der Erythropoese, dem Glukosetransport, der Glykolyse, dem Eisentransport und der Zellproliferation beteiligt sind. In der folgenden Tabelle ist diese Regulation zusammengefasst [46].

Tabelle 2: HIF1 regulierte Gene [47]

Funktion	Gen
<b>Glycolyse</b>	Aldolase A Aldolase C Glukosetransporter 1 Glukosetransporter 3 Glycerinaldehyd-3P-Dehydrogenase Hexokinase 1 Hexokinase 2 Lactatdehydrogenase A Phosphofruktokinase L Phosphofruktokinase, Thrombozyt Phosphoglyceratkinase I Pyrovatkinase M Triosephosphatisomerase
<b>Angiogenese</b>	Plasminogenaktivator Inhibitor I TGF $\beta$ 3 VEGF VEGF-Rezeptor FLT1
<b>Nukleotidmetabolismus</b> <b>Gefäßtonus</b>	Adenylatkinase 3 adrenerger Rezeptor Endothelin 1 Adrenomedullin Nitric oxid synthase 2
<b>Eisenmetabolismus</b>	Ceruloplasmin Transferrin Transferrinrezeptor
<b>Zellproliferation</b>	Insulin-like growth factor 2 IGF binding protein 1 IGF binding protein 2 IGF binding protein 3 TGF $\beta$ 3 p21
<b>Erythropoese</b>	Erythropoietin
<b>Apoptose</b>	NIP3
<b>Kollagenmetabolismus</b>	Prolyl-4-Hydroxylase
<b>pH-Regulation</b>	Carboanhydrase 9

### 1.2.1 HIF1 $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit

*Hypoxia inducible factor 1* ist ein Heterodimer und besteht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit. Die Expression von HIF1 $\alpha$  ist unter Hypoxie sehr hoch und in den meisten Zellen während normoxischen Bedingungen nicht nachweisbar. Das

liegt an der geringen Halbwertszeit von weniger als fünf Minuten [48]. Im Gegensatz dazu unterliegt die  $\beta$ -Untereinheit einer konstitutiven Expression, die über einen Sauerstoff unabhängigen Weg reguliert wird. Diese ist auch unter dem Namen *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) bekannt [49]. Während das menschliche HIF1 $\alpha$ -Gen auf dem Chromosom 14 (14q21-q24) lokalisiert ist, befindet sich das ARNT-Gen auf Chromosom 1 (1q21) [50].

Beide Untereinheiten enthalten am Aminosäure-Ende ein *basic helix loop helix* (bHLH) und eine *per ARNT sim* (PAS) Domäne, die die Heterodimerisierung und das Binden an DNA ermöglichen. Zusätzlich enthält HIF1 $\alpha$  die *oxygen dependent degradation domain* (ODD), die eine Rolle bei der Degradierung unter normalen Sauerstoffkonzentrationen spielt. Für die transkriptionelle Regulation der HIF1-Zielgene, enthält das HIF1 $\alpha$ -Gen zwei *transactivation domains* (TAD). An diese können Koaktivatoren wie p300/CBP binden. HIF1 bindet an die DNA-Sequenz 5'-RCGTG-3' [51] (Abbildung 6), die auch in der E-box Sequenz 5'-CACGTG-3' enthalten ist.

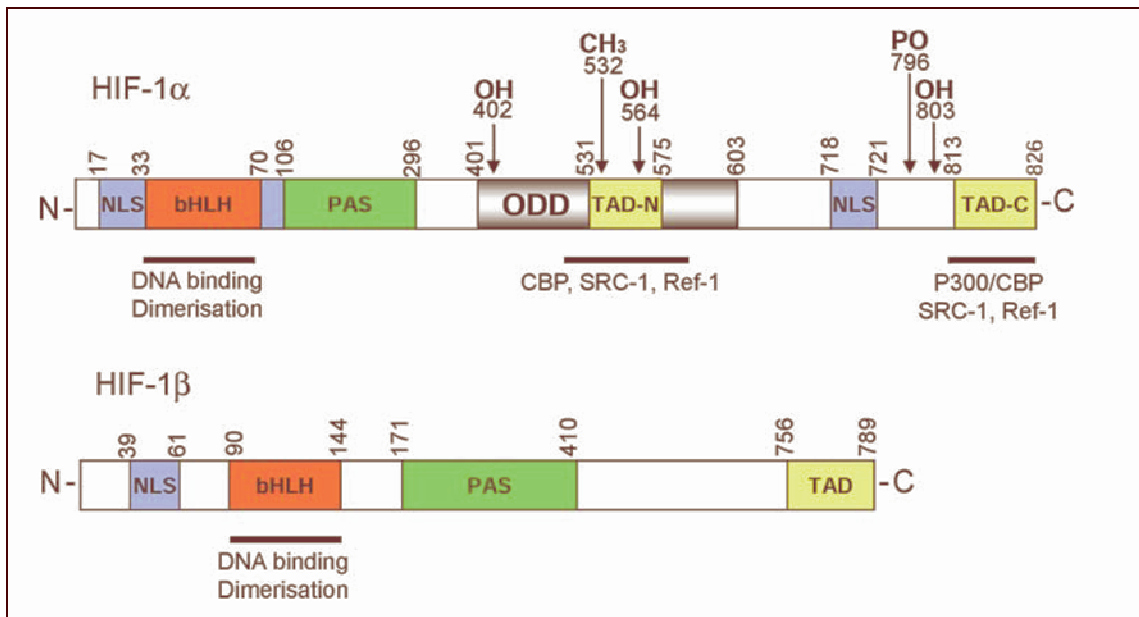


Abbildung 6: Struktur und Funktion von HIF1 [50]. Funktions- und Bindedomänen mit deren Co-Faktoren von HIF1 $\alpha$  und  $\beta$ . bHLH: basic helix loop helix, ODD: oxygen dependent degradation domain, TAD-N und TAD-C: N und C terminale Aktivierungsdomäne, NLS: nuclear localisation signal, PAS: per ARNT sim

### 1.2.2 Signaltransduktion der Hypoxie

Unter Normoxie wird HIF1 $\alpha$  rasch durch Ubiquitinierung und durch Proteasomen abgebaut. Dieser Abbau wird über die Bindung an das von Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein (VHL) vermittelt. VHL ist ein Erkennungsbestandteil einer Ubiquitin-Protein-Ligase, die den proteasomalen Abbau von HIF1 $\alpha$  vermittelt. Die Bindung zwischen der  $\alpha$ -Untereinheit und VHL wird durch die Hydroxylierung von Prolin und die Acetylierung von Lysin mit einem Polypeptidsegment, der *oxygen dependent degradation* (ODD) domain getriggert. *Factor inhibiting HIF1* (FIH) ist ein zusätzlicher Repressor von HIF1 $\alpha$ . Dieser hydroxiliert N803 und verhindert so die Anlagerung von p300/CBP an HIF1 $\alpha$ , was zu einer Herunterregulation der Transkriptions-Aktivität führt [49] (Abbildung 7).



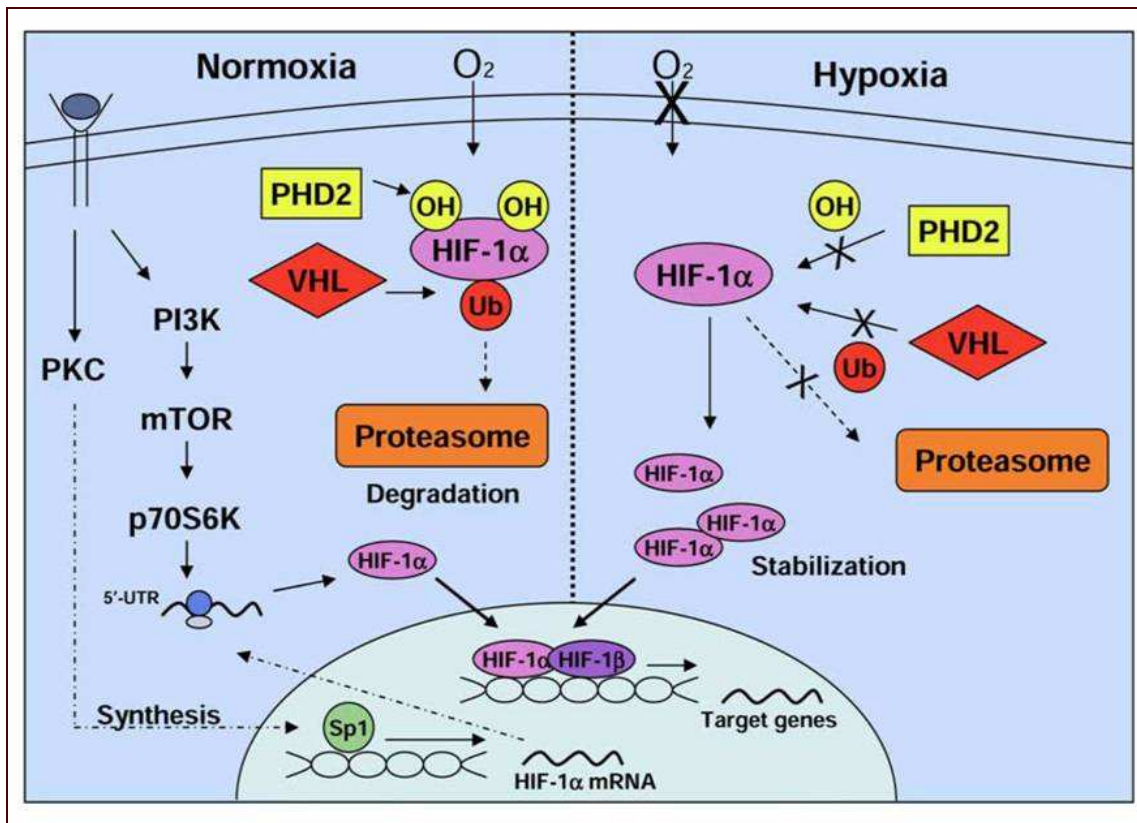


Abbildung 7: Signaltransduktion von HIF1

Dieser Prozess wird unter Hypoxie unterdrückt. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird stabilisiert, interagiert mit Co-Aktivatoren wie p300/CBP, und dimerisiert mit ARNT zum aktiven HIF1-Komplex. Dieser kann an *hypoxic response elements* (HRE) enthaltende Promotorregionen binden und dadurch die Expression dieser Gene steigern [50].

### 1.2.3 Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren

Ebenso wie durch Hypoxie kann auch durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine die Expression von HIF1 $\alpha$ -Protein, die DNA-Bindungsaktivität und die Expression von HIF1 $\alpha$  regulierten Genen induziert werden. Zu diesen gehören *epidermal growth factor*, *fibroblast growth factor 2*, Insulin, *insulin like growth factor 1 and 2* und Interleukin 1 $\beta$  [46]. Diese wirken, anders als bei der Signaltransduktion unter Hypoxie nicht über die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ , sondern über eine Steigerung der HIF1 $\alpha$ -Protein-Translation [50]. Durch die Bindung dieser Faktoren an den *rezeptor tyrosinkinase* (RTK), werden eine Reihe von Transduktionswegen angeregt. Als Beispiele sind in der unteren



Hälfte des folgenden Diagramms der Transduktionsweg über die *phosphatidylinositol 3 kinase* (PI3K) und über die *mitogen activated protein kinase* (MAPK) dargestellt [46].

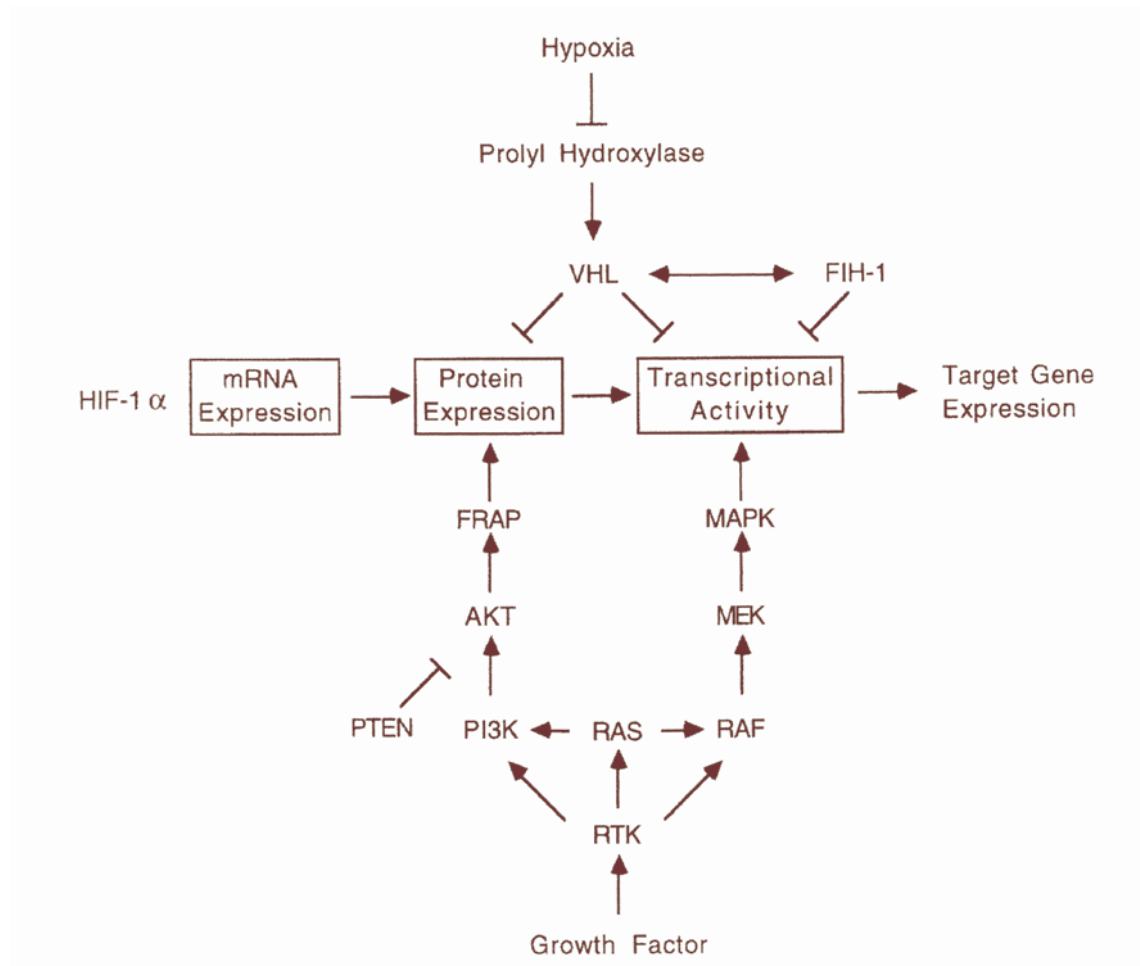


Abbildung 8: Hypoxie und Wachstumsfaktor abhängige Signaltransduktion von HIF1α. [46]

#### 1.2.4 Biologische Funktion von HIF1α

Durch Experimente von Ryan *et al.* mit einem HIF1α *knockout* Maus Embryo konnte gezeigt werden, dass HIF1 für eine normale Entwicklung notwendig ist. Die *knockout* Embryonen zeigten schwere kardiovaskuläre Veränderungen und Defizite in der neuronalen Entwicklung und waren nicht überlebensfähig. Eine Anpassung an Hypoxie ist notwendig für das Überleben und resultiert aus der Stabilisierung und Aktivierung von HIF1 und der Expression von zelltyp-

spezifischen Genen. Im Folgenden soll vor allem auf die Regulation der Angiogenese, durch den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), eingegangen werden. [50]

#### 1.2.4.1 Regulation der Angiogenese und VEGF durch HIF1

VEGF ist einer der wichtigsten Stimulatoren für die Angiogenese. Es wird zu Beginn der Kaskade gebildet und ist verantwortlich für die initiale Aktivierung der Endothelzellen. Schon bei Verlust eines VEGF-Alleles kommt es zum Absterben eines Embryos; dies zeigt die unersetzbare Rolle des VEGF bei der Entwicklung und Differenzierung des vaskulären Systems. Neben VEGF gibt es allerdings noch weitere Faktoren, die auf die Angiogenese wirken. Zu diesen gehören z. B. Angiopoietin 1 und 2, *fibroblast growth factor 2*, *placental growth factor* und *platelet derived growth factor*. Durch transgene Expression von VEGF in verschiedenen Geweben und in Kombination mit anderen Faktoren der Angiogenese konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der Expression eines einzelnen Faktors nicht für eine funktionelle und physiologische Vaskularisation genügt. Außerdem zeigte sich, dass die Effekte durch Faktoren der Angiogenese gewebespezifisch sind [52].

Die VEGF-Promotorregion beginnt ca. 1038 bp aufwärts vom Transkriptionsstartpunkt. Bei -930 bp, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt, befindet sich eine Region, die durch HIF1, Oncoproteine und Wachstumsfaktoren stimuliert werden kann.

HIF1 bindet an den VEGF-Promotor und stimuliert und aktiviert dadurch direkt die Transkription des Gens [53]. Durch die transgene Expression von HIF1 $\alpha$  in Hautzellen von Mäusen zeigt sich eine verstärkte Vaskularisation, die der physiologischen Vaskularisation sehr nahe kommt. Durch Expression des VEGF alleine konnte dieser Zustand nicht erreicht werden, was den Schluss zulässt, dass HIF1 $\alpha$  auch andere Faktoren der Angiogenese reguliert [52]. In einem Experiment von Kelly *et al.* wurde eine konstitutiv aktive Form von HIF1 $\alpha$  hergestellt. Dazu ist ein Adenovirus mit einer mutanten Form der Sequenz von HIF1 $\alpha$  konstruiert worden, die resistent gegen die Sauerstoff abhängige Degradierung ist. Durch die Mutation von Pro567Thr und Pro658Gln kommt es

an diesen Stellen nicht zu der nötigen Hydroxylierung von Prolin und das VHL kann nicht an HIF1 $\alpha$  binden. Der Abbau durch Proteasomen entfällt und HIF1 $\alpha$  bleibt auch während normoxischer Bedingungen stabil. Mit diesem Konstrukt konnte die Angiogenese auch in nicht ischämischem Gewebe stimuliert werden [52].

#### 1.2.4.2 Regulation anderer Gene

In einem Experiment von Manolo *et al.* wurde die Expression verschiedener Gene nach Induktion durch Hypoxie und durch den oben erwähnten konstitutiven HIF1 $\alpha$  Adenovirus analysiert. Dabei wurde herausgefunden, dass die Expression verschiedener Gene, die am Cholesterin- und Phospholipidmetabolismus beteiligt sind, in menschlichen Endothelzellen nach HIF1 $\alpha$ -Transduktion hochreguliert wird. Zu diesen Genen gehören, neben anderen, auch ABCA1, apo-D, *ADP ribosylation factor like 7* (ARL7), *thioredoxin interacting protein* (TXNIP), der VLDL-Rezeptor und PPAR $\gamma$ , die eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel spielen [54]. Da die Endothelzellen im Experiment von Manolo *et al.* nur relativ kurze Zeit unter Sauerstoffentzug gehalten wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Gene durch direkte HIF1 $\alpha$ -Aktivierung hochreguliert werden.

Wie oben erwähnt, bindet das Heterodimer aus HIF1 $\alpha$  und ARNT an eine spezifische Sequenz, die einer E-box entspricht. Da der ABCA1-Promotor auch ein klassisches E-box Element enthält, ist es wahrscheinlich, dass HIF1 direkt an diese Region bindet. Interessanterweise sind die direkten Co-Aktivatoren von HIF1 $\alpha$  wie CPB, p300, SRC1 und TIF2 auch an der Aktivierung des ABCA1-Promotors beteiligt, so dass es über diese, ähnlich der LXR-Induktion, zu einer Hochregulation kommen könnte. Auch über die verstärkte Expression von PPAR $\gamma$  in Endothelzellen durch HIF1 $\alpha$  und unter Hypoxie ist eine Aktivierung der ABCA1-Transkription denkbar [55].

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die ABCA1-Expression ist hoch gewebespezifisch und kann durch verschiedene Faktoren, wie z. B. Änderungen der zellulären Lipidzusammensetzung, beeinflusst werden. Die Makrophagen an arteriellen Gefäßwänden spielen im reversen Cholesterintransport bei der Entwicklung von Artherosklerose eine bedeutende Rolle. Ablagerungen von cholesterinreichem enzymatisch und oxidativ modifiziertem LDL werden von den dortigen Makrophagen aufgenommen und führen zu einem Anstieg der Cholesterinester und des freien Cholesterins innerhalb dieser Zellen und zu einer Hochregulation der Cholesterinefflux-Stoffwechselwege über ABCA1 und ABCG1 [56]. Kommt es zu Störungen des Cholesterinefflux, wie es beim metabolischen Syndrom beobachtet wird, führt dies zu einer pathologischen Cholesterin-Akkumulation, zu einer verstärkten Schaumzellbildung und schließlich zur Kalzifizierung der Läsion [57].

Hypoxie wurde als ein weiterer Faktor, der den Lipidstoffwechsel beeinflusst, identifiziert. Es wurde gezeigt, dass der VLDL-Rezeptor durch Hypoxie herunterreguliert wird und HIF1 responsive Gene in den oxLDL induzierten Zelltod involviert sind [58;59]. Andererseits wird bei dem obstruktiven Schlaf Apnoe Syndrom (OSA), das durch repetitive Episoden von Hypoxie gekennzeichnet ist und mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert ist, eine vermehrte Cholesterin-Aufnahme in Makrophagen induziert [60]. Zusätzlich wurde ABCA1 in einer Publikation von Manolo *et al.* 2004 als Hypoxie induziertes bzw. HIF1 reguliertes Gen in Endothelzellen identifiziert. Es zeigte sich eine mRNA Erhöhung von ABCA1 nach Induktion durch den konstitutiven HIF1 $\alpha$  Adenovirus in Endothelzellen [54].

HIF1 induziert neben Genen, die die Angiogenese regulieren, wie z.B. der vascular endothelial growth factor (VEGF), auch eine Reihe von anderen metabolisch wichtigen Genen [51]. Diese Gene gehören z. B. zum Glukose-Stoffwechsel, sind an der Zellproliferation beteiligt, oder sind für den Eisen Metabolismus wichtig [46]. Aufgrund dessen erscheint es möglich, dass HIF1

auch eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel spielt, wenn eine direkte ABCA1-Aktivierung durch HIF1 vorliegt.

Ziel dieser Arbeit war es, festzustellen, ob es auch in Zellen des Lipidstoffwechsels zu einer Aktivierung des ABCA1-Promotors kommt. Hierfür wurden als lipidstoffwechselrelevante Zellen, die Zelllinien HepG2 und RAW264.7 verwendet. Außerdem galt es zu testen, ob die Aktivierung von ABCA1 durch HIF1 über direkte oder indirekte transkriptionelle Mechanismen erfolgt. Als Positivkontrolle sollte die Überexpression von HIF1 $\alpha$  und ARNT und deren Wirkung auf den VEGF-Promotor dienen. Da durch einige Publikationen bereits gezeigt wurde, dass die VEGF-Expression durch Hypoxie bzw. durch HIF1 induziert wird, konnte die Transfektionsmethode mit Expressionskonstrukten für HIF1 $\alpha$  und ARNT ebenfalls für die beiden Zelltypen HepG2 und RAW 264.7 optimiert werden [52].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Material

#### 2.1.1 Geräte

In Tabelle 3 wird ein Überblick über alle verwendeten Geräte gegeben.

*Tabelle 3: verwendete Geräte*

Gerät	Verwendung	Hersteller
3100xl Genetic Analyzer ABI Prism	Sequenzierung	ABI
Analysewaage LC620P	verschieden	Sartorius
Autoklav FNR 9325E	Autoklavieren	Fedegari
Autoklav FNR 9325E	Verschieden	Fedegari
Brutschrank B 6120	Zellkultur	Heraeus
Küvette: Ultra Microvolume Cell	Konzentrationsbestimmung	Amersham
Küvette: Ultra Microvolume Cell	Konzentrationsbestimmung	Amersham
Lumat LB 9507	Luciferase-Assay	EG&G Berthold
Lumilmager	Chemilumineszenzdetektor	Boehringer
Micro Cell Counter F-300	Zellkultur	Sysmex
Netzgerät Blue Power Plus	Gelelektrophorese	Blue Power
PCR-Thermocycler: Master Cycler Gradient	PCR	Eppendorf
Primus	PCR	MWG
Pipetman P (2, 10, 20, 200, 1000 µl)	verschieden	Gilson
Spektrophotometer: GeneQuant Pro	Konzentrationsbestimmung	Biochrom
Sterilbank: Lamin Air HA 2472	Zellkultur	Heraeus
Thermomixer 5436	verschieden	Eppendorf
Vortex Genie II	verschieden	Bender und Hohbein
Zentrifugen: J2-21 M/E	verschieden	Beckmann
Biofuge 15R	verschieden	Heraeus
Microzentrifuge Force 7	verschieden	Denver Instruments

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

In Tabelle 4 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien, ihre Verwendung und Hersteller.

Material	Verwendung	Hersteller
1,5 mL Cups	verschieden	Sarstedt, No./REF 72.690.200
15 mL Falcon Tube	verschieden	Sarstedt; No./REF 62.554.502
2 mL/5 mL/10 mL/25 mL/50 mL Pipetten	verschieden	Sarstedt
2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL Filterspitzen	verschieden	Eppendorf
50 mL Falcon Tube	verschieden	Sarstedt; No./REF 62.547.254
Einmalhandschuhe	verschieden	Hartmann
Multiwell 6-well Plate	Zellkultur	Nunc™
Nitrilhandschuhe	verschieden	VWR International; Art-Nr. 112-2372
Nunc™ Flasks 75 cm <sup>2</sup> nuncion Δ-surface	Zellkultur	Nunc™; 178891
Optical 96 well Reaction Plate	Reporterger-Assay	Applied Biosystems
PCR Softstrips 0,2 ml	PCR	Biozym, Kat.Nr. 710988
Zellschaber 25 cm	Zellkultur	Sarstedt; No./REF 83.1830

### 2.1.3 Chemikalien

Die wichtigsten Chemikalien sowie ihre Bezugsquellen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Chemikalien, Verwendung und ihre Hersteller

Chemikalien	Verwendung	Hersteller
1 kb-Leiter	Standard für Agarosegele	Invitrogen; Cat. No.: 15615-016
2-Propanol	verschieden	Merck; 100995
30% Acrylamid/Bis Solution 29:1	Gelshift	BIORad; 161-0156
5x Sequenzierung buffer 6000 Reaction	Sequenzierung	Applied Biosystems, Kat.Nr.: 4303152
Ammoniumpersulfat (APS)	Gelshift	SIGMA, A3678-25G
Ampicillin	verschieden	Roth
Bromphenolblau	verschieden	Merck
Ethanol	verschieden	Merck
Ethidiumbromid	Agarosegele	Roth
FCS	Zellkultur	Biochrom; Charge 1046FF
Gelshift Binding 5x Buffer	Gelshift	Promega; E3581
Glycerin	Zellkultur	Merck
Hi Di Formamide	Sequenzierung	Applied Biosystems, Kat.Nr. 4311320
LE Agarose SeaKem	Agarosegele	BMA; Kat-Nr.: 50004

Chemikalien	Verwendung	Hersteller
L-Glutamin	Zellkultur	PAN; Kat.-Nr.: P04-80100
MEM	Zellkultur	Gibco; Kat.-Nr.: 11140-035
Methanol	verschieden	Merck (Darmstadt)
nukleasefreies Wasser	verschieden	Promega; Cat. P1193
Reporter Lysis 5x Buffer	Luciferase-Assay	Promega; E3971
SDS	verschieden	Roth; Art.: 2326.2
TEMED	Gelshift	Pharmacia; Kat. Nr.: 17-1312-01
Trypsin/EDTA in PBS(0,05/0,02%)	Zellkultur	PAN; Kat.-Nr.: P10-023100
$\beta$ -Mercaptoethanol	verschieden	Sigma; M-7154

### 2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Die Tabellen 6 und 7 geben einen Überblick über alle verwendeten Medien, Puffer und Lösungen.

Tabelle 6: verwendete Medien und Zusätze

Medium	Zusätze	Anwendung	Hersteller
DMEM High Glucose (4,5g/L)	10%FCS, 1%Penicillin/ Streptomycin	Medium für RAW264.7	PAA; E15-810
RPMI with L-Glutamine	5%FCS, 1%L-Glutamin, 1%Penicillin/ Streptomycin, 1,95 $\mu$ L $\beta$ -Mercaptoethanol	Medium für HepG2	PAA; E15-039
	fetales Kälber Serum (FCS)	Medium für RAW264. und HepG2	PAA; A15-151
	MEM		PAA; P11-010
	L-Glutamin (200mM)	Medium für RAW264	PAA; M11-004
LB Platten und Flüssigmedium	w/o Ampicillin	Selektion von DH5 $\alpha$	
SOC Flüssigmedium	w/o Ampicillin	Selektion von DH5 $\alpha$	Invitrogen, Kat. Nr. 46-0821

Tabelle 7: verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Verwendung	Zusammensetzung/ Hersteller
10x PBS	verschieden	1,5 M NaCl, 83 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 17 mM H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O (pH 7.4)
10x TBE	Gelelektrophorese	1M Tris; 1M Borsäure; 20mM EDTA (pH 7.5)
Agarosegel (1%)	Gelelektrophorese	1%,(w / v) Agarose in 1x TBE-Puffer
BCAssay Reagent A	Proteinbestimmung	Uptima, Kat.Nr.: UP95424A



Puffer/Lösung	Verwendung	Zusammensetzung/ Hersteller
BCAssay Reagent B	Proteinbestimmung	Uptima, Kat.Nr.: UP95425A
BSA Standard 2mg/ml	Proteinbestimmung	Perbio, Kat.Nr.: UP36859A
10x DNA-Auftragspuffer	Agarosegele	Tris/HCl (pH7,5; 10mM); Sodium Acetat (5 mM); EDTA (2 mM); Glycerol (10%) Bromphenolblau; 0,001% (w/v) Xylencanol
Ligasepuffer	Ligation	Invitrogen, Kat.Nr.: 15224-025
One for all buffer plus	Gelshift	Pharmacia, Kat.Nr.: 27-0901
Gelshift Binding 5x Buffer	Gelshift	Promega, E358A

## 2.1.4 DNA

### 2.1.4.1 Plasmidvektoren

In Tabelle 8 sind alle benötigten Plasmide zusammengefasst.

*Tabelle 8: verwendete Plasmide*

Plasmid	Größe	Verwendung	Hersteller
pGL3 basic	4818 bp	Luciferase-Assay	Promega
pGL3 control		Luciferase-Assay	Promega
pCMV6-XL5 mit HIF1 $\alpha$		Luciferase-Assay	OriGene, Kat.Nr. TC 119189
pCMV6-XL5 mit HIF1 $\beta$		Luciferase-Assay	OriGene, Kat.Nr. TC 119100

### 2.1.4.2 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Metabion synthetisiert und sind in Tabelle 9 dargestellt.

*Tabelle 9 verwendete Oligonukleotide*

Oligo	Verwendung	Sequenz
VEGF-Luc-1032	PCR	5'-ccc ctc gag caa ggg cct ctg tct gcc cag ctg c-3'
VEGF-Luc-990	PCR	5'-ccc ctc gag gcc aga ctc cac agt gca tac gtg g-3'
VEGF-Luc+398	PCR	5'-ccc aag ctt ctc gca cgc ccg cgc gct ctc tct g-3'
VEGF-Luc+432	PCR	5'-ccc aag ctt cag gtc act cac ttt gcc cct gtc g-3'
A1P(-174-125)F	Gelshift	5'-agg aac gtc gcc cgt tta agg ggc ggg ccc cgg ctc <b>cac gtg</b> ctt tct gct-3'
A1P(-125-174)R	Gelshift	5'-agc agc aga aag <b>cac gtg</b> gag ccg ggg ccc gcc cct taa acg ggc gac gtt-3'
Ebox(-174-125)F	Gelshift	5'-agg aac gtc gcc ggt tta agg ggc ggg ccc cgg ctc caa atg ctt tct gct-3'
Ebox(-125-174)R	Gelshift	5'-agc agc aga aag cat ttg gag ccg ggg ccc gcc cct taa acg ggc gac gtt-3'

RV primer 3 FW Luc	PCR	5'-cta gca aaa tag gct gct cc-3'
GL primer	PCR	5'-gga aga cgc caa aaa cat aaa g-3

### 2.1.4.3 Nukleotide

In Tabelle 10 sind alle verwendeten Nukleotide zusammengefasst.

*Tabelle 10: verwendete Nukleotide*

Nukleotide	Hersteller
$\alpha^{32}$ PdCT	Amersham, A0005
dTTP	Roche, Kat. Nr.: 03732711001
Poly [d(I-C)]	Roche, Kat. Nr.: 108812

## 2.1.5 Molekularbiologische Kits und Enzyme

### 2.1.5.1 Kits

Kit-System	Verwendung	Hersteller
BC Assay protein Quantitation Kit	Proteinbestimmung	Uptima, Kat.-Nr. UP40840A
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems, Kat. Nr.: 4337455
DyeEx <sup>TM</sup> 2.0 spin Kit	Sequenzierung	Qiagen, Hilden, Kat.-Nr. 63206
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Plasmidisolierung	Qiagen, Hilden, Kat.-Nr. 12362
Fugene 6 Transfektion Kit	Transfektion	Roche; Lot. No.: 93289221
QIAshredder	Homogenisation	Qiagen, Hilden, Kat.-Nr. 79656
Luciferase Assay Reagent	Luciferase-Assay	Promega; E1483
Luciferase Assay System	Luciferase-Assay	Promega; E1501
Lysis Buffer	Luciferase-Assay	Promega; E3971
NE-PER, Nuclear & Cytoplasmatic Extraction Reagents	Gelshift	Pierce; 78833
QIA quick Gel Extraction Kit	Gelaufreinigung	Qiagen; Cat. No.: 28704
QIA quick PCR Purification Kit	DNA-Aufreinigung	Qiagen; Cat. No.: 28104
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmidisolierung	Qiagen, Hilden, Kat.-Nr. 27104
Sephadex G25 Quick Spin Columns	Gelshift	Roche, Mannheim, Kat.Nr.: 1273949
TaqPCR Core Kit	PCR	Qiagen; 201225

### 2.1.5.2 Enzyme

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die einzelnen Enzyme. Alle Enzyme, die Komponenten eines verwendeten Kit-Systems sind, werden hier nicht aufgeführt.

*Tabelle 11: Enzyme, Verwendung und Hersteller*

Enzym	Verwendung	Hersteller
Klenow Enzym	Gelshift	Roche, Kat. Nr.: 11008404001
T4 Polynukleotid-Kinase	Gelshift	Invitrogen; Cat. No.: 18004-010
T4 DNA Ligase	Ligation	Gibco, Kat.Nr.: 15224-025
<i>HindIII</i>	Restriktionsverdau	Sigma; H3506-1G
<i>XhoI</i>	Restriktionsverdau	Roche; 899194

### 2.1.6 Organismen und Zellen

In Tabelle 12 sind die hier verwendeten Organismen und Zellen angegeben.

*Tabelle 12: verwendete Organismen und Zellen, ihre Eigenschaften und Herkunft*

Stamm / Zelltyp	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<i>E. coli DH5<math>\alpha</math></i>		Invitrogen; Kat. Nr.: 18258-012
RAW 264.7	Zelllinie makrophagenähnlicher Tumor-Mauszellen, induziert mit Abelson murine leukemia virus	LGC Promochem / Raschke WC
HepG2	hepatozelluläres Karzinom, human	ATCC-Nr.: HB-8065

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (bei 56° C für 30 Minuten inaktiviert), 2mM L-Glutamin und MEM bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator für 3-5 Tage kultiviert, bis sie eine konfluente Schicht (Monolayer) bildeten. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen und für 10 Minuten bei 37° C mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin, 0,02% EDTA) inkubiert. Dadurch

wurden die Zellen vom Boden gelöst. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert, nach Bestimmung der Zellzahl 1:4 gesplittet und in neue Zellkulturflaschen ausgesäht.

Die Zellen wurden für die Transfektion in 6-well Platten ausgesäht. Pro well wurden 1 Million Zellen verwendet. Wachstum und Zustand der Zellen wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskops kontrolliert.

#### 2.2.1.2 RAW 264.7 Zellen

RAW 264.7 Zellen wurden in RPMI Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (bei 56° C für 30 Minuten inaktiviert) und MEM bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem Protokoll für HepG2-Zellen. Die Zellen wurden jedoch 1:5 gesplittet.

#### 2.2.1.3 Mycoplasmentest

Die Kontamination von Zelllinien durch Mycoplasmen verändert deren Wachstum und Verhalten generell. Um dies zu verhindern, wurden in regelmäßigen Abständen alle Zelllinien auf Mykoplasmen untersucht und nur Zellen für Experimente verwendet, die eindeutig negativ getestet wurden. Dies erfolgte mit Hilfe eines *enzyme linked immuno sorbent assays* (ELISA) laut Anleitung des Herstellers (Mycoplasma Detection Kit, Roche).

### 2.2.2 DNA/Plasmide

#### 2.2.2.1 HIF1 $\alpha$ - und ARNT-Plasmide

Die Konstrukte von HIF1 $\alpha$  und ARNT wurden von der Firma OriGene als 1  $\mu$ g Plasmid-DNA bezogen. Die jeweilige Sequenz wurde von OriGene in den pCMV6-XL5 Vektor kloniert.

Die hier dargestellte HIF1 $\alpha$ -Sequenz entspricht der NCBI-Accession-Number NM\_001530.

```

1  gtgctgcctc gtctgagggg acaggaggat caccctcttc gtcgcttcgg ccagtgtgtc
61  gggctgggcc ctgacaagcc acctgaggag aggctcggag ccggggcccg accccggcga
121 ttgccgcccc cttctctcta gtctcacgag gggtttcccg cctcgacccc ccacctctgg

```

```

181 acttgccctt ccttctcttc tccgcgtgtg gagggagcca gcgcttaggc cggagcgagc
241 ctggggggccg cccgccgtga agacatcgcg gggaccgatt caccatggag ggcgccggcg
301 gcgcgaacga caagaaaaag ataagttctg aacgtcgaaa agaaaagtct cgagatgcag
361 ccagatctcg gcgaagtaaa gaatctgaag ttttttatga gcttgctcat cagttgccac
421 ttccacataa tgtgagttcg catcttgata aggcctctgt gatgaggctt accatcagct
481 atttgcgtgt gaggaaactt ctggatgctg gtgatttgga tattgaagat gacatgaaag
541 cacagatgaa ttgcttttat ttgaaagcct tggatggttt tgttatggtt ctcacagatg
601 atggtgacat gatttacatt tctgataatg tgaacaaata catgggatta actcagtttg
661 aactaactgg acacagtgtg tttgatttta ctcattccatg tgaccatgag gaaatgagag
721 aaatgcttac acacagaaat ggccttgtga aaaagggtaa agaacaaaac acacagcgaa
781 gcttttttct cagaatgaag tgtaccctaa ctagccgagg aagaactatg aacataaagt
841 ctccaacatg gaaggatttg cactgcacag gccacattca cgtatatgat accaacagta
901 accaacctca gtgtgggtat aagaaaccac ctatgacctg cttggtgctg atttgtgaac
961 ccatctctca cccatcaaat attgaaattc ctttagatag caagactttc ctcagtcgac
1021 acagcctgga tatgaaatth tcttattgtg atgaaagaat taccgaattg atgggatatg
1081 agccagaaga acttttaggc cgtcctaatth atgaatatth tcatgctttg gactctgac
1141 atctgaccaa aactcatcat gatatgttta ctaaaggaca agtcaccaca ggacagtaca
1201 ggatgcttgc caaaagaggt ggatatgtct gggttgaaac tcaagcaact gtcatatata
1261 acaccaagaa ttctcaacca cagtgcattg tatgtgtgaa ttacgttggt agtggatata
1321 ttcagcacga cttgattttt tcccttcaac aaacagaatg tgtccttaaa ccggttgaat
1381 cttcagatat gaaaatgact cagctattca ccaaagttga atcagaagat acaagtagcc
1441 tctttgacaa acttaagaag gaacctgatg ctttaactth gctggcccca gccgctggag
1501 acacaatcat atcttttagat tttggcagca acgacacaga aactgatgac cagcaacttg
1561 aggaagtacc attatataat gatgtaatgc tccctcacc caacgaaaaa ttacagaata
1621 taaatttggc aatgtctcca ttaccaccg ctgaaacgcc aaagccactt cgaaagtagt
1681 ctgaccctgc actcaatcaa gaagttgcat taaaattaga accaaatcca gagtcactgg
1741 aactttcttt taccatgccc cagattcagg atcagacacc tagtccttcc gatggaagca
1801 ctagacaaa ttcacctgag cctaatagtc ccagtgaata ttgtttttat gtggatagtg
1861 atatggtcaa tgaattcaag ttggaattgg tagaaaaact ttttgctgaa gacacagaag
1921 caaagaaccc attttctact caggacacag atttagactt ggagatgtta gtcctctata
1981 tcccaatgga tgatgacttc cagttacgth ccttcgatca gttgtcacca ttagaagca
2041 gttccgcaag cctgaaagc gcaagtcctc aaagcacagt tacagtatth cagcagactc
2101 aaatacaaga acctactgct aatgccacca ctaccactgc caccactgat gaattaaaaa
2161 cagtgacaaa agaccgtatg gaagacatta aaatattgat tgcactctca tctcctaccc
2221 acatacataa agaaactact agtgccacat catcaccata tagagatact caaagtcgga
2281 cagcctcacc aaacagagca ggaaaaggag tcatagaaca gacagaaaaa tctcatccaa
2341 gaagccctaa cgtgttatct gtcgctttga gtcaaagaac tacagttcct gaggaagaac
2401 taaatccaaa gatactagct ttgcagaata ctcagagaaa gcgaaaaatg gaactatgat
2461 gttcactttt tcaagcagta ggaattggaa cattattaca gcagccagac gatcatgcag
2521 ctactacatc actttcttgg aaacgtgtaa aaggatgcaa atctagttaa cagaatggaa
2581 tggagcaaaa gacaattatt ttaataacct ctgatttagc atgtagactg ctggggcaat
2641 caatggatga aagtggatta ccacagctga ccagttatga ttgtgaagtt aatgctccta
2701 tacaaggcag cagaaaccta ctgcaggggtg aagaattact cagagctttg gatcaagtta
2761 actgagctth ttcttaattt catctctttt tttggacact ggtggctcac tacctaaagc
2821 agtctattta tatthtctac atctaattth agaagcctgg ctacaatact gcacaactth
2881 ggttagttca attthtgatc cctthtctac ttaatttaca ttaatgctct tthtttagtat
2941 gttctthaat gctggatcac agacagctca tthtctcagt tthttggtat ttaaacattt
3001 gcattgcagt agcatcattt taaaaaatgc acctthttat tthtttattt ttggctaggg
3061 agtttatccc tthtttogaat tthttttaag aagatgccaa tataatthtt gtaagaaggc
3121 agtaacctth catcatgatc ataggcagtt gaaaaattht tacactthtt tthttcacatt
3181 ttacataaat aataatgctt tgccagcagt acgtggtagc cacaatttga caatatattt
3241 tcttaaaaaa taccagcagt tactcatgga atatatctg cgtttataaa actagtttht
3301 aagaagaaat tthttttggc ctatgaaatt gttaaacctg gaacatgaca ttgttaatca
3361 tataataatg attcttaaat gctgtatggt ttattattta aatgggtaaa gccatttaca
3421 taatatagaa agatatgcat atatctagaa ggtatgtggc atthatttgg ataaaaattc
3481 caattcagag aaatcatctg atgtthtctat agtcacttht ccagctcaaa agaaaaacaat
3541 accctatgta gttgtggaag tttatgctaa tattgtgtaa ctgatattaa acctaaatgt
3601 ttgccttacc ctggttggtat aaagatatth tgagcagact gtaaacagaa aaaaaaaat
3661 catgcattct tagcaaaatt gcctagtatg ttaatttgct caaaatacaa tgtttgattt
3721 tatgcactth gtcgctatta acatctthtt tthcatgtag atthcaataa ttgagtaatt
3781 ttagaagcat tatthtagga atatatagtt gtcacagtaa atatctgtt tthtctatgt
3841 acattgtaca aatthttcat tctthttgct ctttgtgggt ggatctaaca ctaactgtat
3901 tgtthttgta catcaataa acatctthct tggaccagga aaaaaaaat aaaaaaaat

```

## Die verwendete ARNT-Sequenz entspricht NM\_001668:

```

1 atcttggatt cgcggtagc ggaggcggcg gtcaggcgcc gcttctgggg agtggccttt
61 cttttccctt cctcccggg tcgggtggcg cggtccctcc cactgggggg gggggtggcg
121 cggcggcggt ggcactctgc gccatggcgg cgactactgc caaccccga atgacatcag
181 atgtaccatc actgggtcca gccattgcct ctggaaactc tggacctgga attcaagggtg
241 gaggagccat tgtccagagg gctattaagc ggccgaccagg gctggatttt gatgatgatg
301 gagaagggaa cagtaaattt ttgagggtgtg atgatgatca gatgtctaac gataaggagc
361 ggtttgccag gtcggatgat gacagagact ctgcggataa agagagactt gccagggaaa
421 atcacagtga aattgaacgg cggcgacgga acaagatgac agcctacatc acagaactgt
481 cagatatggg acccacctgt agtgccctgg ctcgaaaacc agacaagcta accatcttac
541 gcatggcagt ttctcacatg aagtccttgc ggggaactgg caacacatcc actgatggct
601 cctataagcc gtctttcctc actgatcagg aactgaaaca tttgatcttg gaggcagcag
661 atggctttct gtttattgtc tcatgtgaga caggcagggt ggtgatgtgt tctgactccg
721 tgactcctgt tttgaaccag ccacagtctg aatggtttgg cagcacactc tatgatcagg
781 tgacccagca tgatgtggat aaacttcgtg agcagctttc cacttcagaa aatgccctga
841 cagggcgatc cctggatcta aagactggaa cagtgaaaaa ggaaggctcag cagtcttcca
901 tgagaatgtg tatgggtcga aggagatcgt ttatttgccg aatgagggtg ggcagttagct
961 ctgtggacc agttctgtg aataggctga gctttgtgag gaacagatgc aggaatggac
1021 ttggctctgt aaaggatggg gaacctcact tcgtgggtgg ccaactgcaca ggctacatca
1081 aggctggcc cccagcaggt gtttccctcc cagatgatga cccagaggct ggccagggaa
1141 gcaagttttg cctagtggcc attggcagat tgcaggtaac tagttctccc aactgtacag
1201 acatgagtaa tgtttgtcaa ccaacagagt tcatctcccg acacaacatt gagggtatct
1261 tcacttttgt ggatcacgcg tgtgtggcta ctgttggcta ccagccacag gaactcttag
1321 gaaagaatat tgtagaattc tgtcatcctg aagaccagca gcttctaaga gacagcttcc
1381 aacaggtagt gaaattaaaa ggccaagtgc tgtctgtcat gttccggttc cggctctaaga
1441 accaagaatg gctctggatg agaaccagct cctttacttt ccagaacctt tactcagatg
1501 aaattgagta catcatctgt accaacacca atgtgaagaa ctctagccaa gaaccacggc
1561 ctacactctc caacacaatc cagaggccac aactagggtc cacagcta at taccacctgg
1621 agatgggctc aggacagctg gaccccaggc agcagcaaca gcaaacagaa ttggacatgg
1681 taccaggaag agatggactg gccagctaca atcattccca ggtggttcag cctgtgacaa
1741 ccacaggacc agaacacagc aagccccttg agaagtca gaagtttattt gccaggata
1801 gagatccaag attttcagaa atctatcaca acatcaatgc ggatcagagt aaaggcatct
1861 cctccagcac tgtccctgcc acccaacagc tattctccca gggcaacaca ttccctccta
1921 ccccccggcc ggcagagaat ttcaggaata gtggcctagc ccctcctgta accattgtcc
1981 agcctacagc ttctgcagga cagatgttgg ccagatttcc ccgccactcc aacccacccc
2041 aaggagcaac cccaacttgg acccctacta cccgctcagg cttttctgcc cagcagggtg
2101 ctacccaggc tactgctaag actcgtactt cccagtttgg tgtgggcagc ttccagactc
2161 catctcctt cagctccatg tcctccctg gtgcccacac tgcctgcctt ggtctgctg
2221 cctaccctag tctcaccaat cgtggatcta actttgctcc tgagactgga cagactgcag
2281 gacaattcca gacacggaca gcagaggggtg tgggtgtctg gccacagtgg cagggccagc
2341 agcctcatca tcgttcaagt tctagtga gc aacatgttca acaaccgcca gcacagcaac
2401 ctggccagcc tgagggtctc caggagatgc tgtccatgct gggagatcag agcaacagct
2461 acaacaatga agaattccct gatctaacta tgtttccccc cttttcagaa tagaactatt
2521 ggggtgagga taaggggtgg gggagaaaaa atcactgttt gtttttaaaa agcaaatctt
2581 tctgtaaaaa gaataaaagt tcctctccct tccttccct caccctgac atgtaccccc
2641 tttcccttct ggctgttccc ctgctctgtt gcctctctaa ggtaacattt atagaagaaa
2701 tggaatgaat ctccaaggct tttaggactg tctgaaaatt tgaggctggg tgaagttaaa
2761 acacctttcc ttatgtctcc tgacctgaaa ttgtatagtg ttgatttgtg ctgagatcaa
2821 gaggcagggt agaagaacct gacatccact gtttgccctg gatagtatgg cttgtttttg
2881 gaaagaaatt ctgaagagag tggaggagag gagaaatgtc ctcatatttg aggaccatga
2941 aacattgtag gtatatatgg ggctttagca agtttgagca taggctcttt ttgctgcctg
3001 tgagcagctc ctctggaaa agaacatgtga gtaagtga gaagagtgtg gtgtatgtgt
3061 gtgtgtgtgt gtgtgcccac acatgcttct gtatttctc ctttctccct attagggagt
3121 tatgcaaaat ttgtccccga ttttaccttt gtctttctgt gtacttttca aagagtccca
3181 aggagttaaa tcttccagggt attttccact tagtatttga gccaaagaat atttaataaa
3241 acgtcttttg tgcgcttgca tccatgcccc gccaatatac aactgtaaa caaatataga
3301 aagtccgctg ttgatacgat tgtctgttat cgaacacatt cagtataaaa gctgggttac
3361 tgcgtctttt ggtgctctca ccttatctgg aagatctgca aacattacct aaataggctg
3421 gcaagataaa cactttctg agccccagac ttggccataa agataatgct gcatttttct
3481 gtcagaatca catatgatgt gtgttctgta gaggttattt ctgcatggaa actcaacttc
3541 ttggattagc cgtcccagtg aaaatcctca ttgttggagt gtaaaccaaa tacgaagccc
3601 tcttgcaaa tagcctcttt catcccatac tcaaaatacc cagtttagca agcaactgag

```

```

3661 attttaagtct ctctggccct aagagggtttt tcctctttgc tccctccaat cttgagattg
3721 ggttttgctt tagagtgcaa gtatcataat tccgtatgat agatggggcc tggacaccca
3781 tctcaacagg gtcacttggt aattaacaat agccatataa atgcggatac aggttactac
3841 cctcaccctt taccttccctc aggtaacagt cgtagatacc agcttttttt tttttttttt
3901 taaattggct ttggccagta gctaaagtgc aagactgaat taatgagaag atatatataa
3961 tgtagtcata ggggactgag gagcaagggt gcccttgaag aggccaaagg aatgtccatt
4021 tgctgagttt cccttccctta tgtctccagt ctggtgccag gtagtggagt aaaaaaggag
4081 acagtttatt tttttattct atgtgcacac ttacagtata catatatatt tataatcaca
4141 ttacgaaac caaaaagttg agtttccaat ggaacccttg ttttttaata atcgactttt
4201 taaatgtgat caggactata atattgtaca gttattatag ggcttttggg gaagggggagg
4261 atagcgagaa gatgctctgg gggttttggt tttgcttttc cttcaggggt ttatttttga
4321 ctgttttggt ttcttggttg ccatttctgt attgctggca tctgtgctaa gctttacagt
4381 ggcaaaaata atgacatgta gcaaaagatt tcaaacaaaa tattttttcc ttttgtaaaa
4441 tttcttgtgt tgtgtgatct tgattgcggc tttatcattc ctttccagtt cataaacaac
4501 aggcacccac aaccagagga atctatagtt taagctccag acatacaaac ataaggcaca
4561 ttgtgtcttt aatttcagga atcagaaatc ataggggttct gatcacattg cacgcctccc
4621 ccctcacttg tcctcctgat cctgacacat tctgagtaac atcagcagga atgctctgac
4681 catgaggtgg gggttttggg gtgggcgttg cctgggttct tgggagagag gggaagagtc
4741 gggacttgaa aaccactagg gcacatctgg atgccttccc ccagtatgtc cttttctgga
4801 ttaaaatgag tgaattttaa actgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

Nach Transformation der Plasmide in *DH5α max efficiency* wurden Einzelkolonien über Nacht in 2 ml LB amp Medium kultiviert und durch Minipräparation mit QIAprep spin Miniprep Kit isoliert. Zur Kontrolle wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Um für die Transfektion ausreichend Plasmid-DNA zu erhalten, wurde eine Maxipräparation durchgeführt und zur Lagerung ein Glycerolstock angelegt.

#### 2.2.2.2 Isolierung der Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurden Kits der Firma Qiagen verwendet. Diese basieren auf einem modifizierten Prinzip der alkalischen Lyse, kombiniert mit Anionenaustausch, um die Plasmid-DNA zu binden.

Eine Mini-Präparation aus 1-3 ml Bakterienkultur ermöglicht die Aufreinigung von bis zu 20 µg DNA. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte laut Protokoll des Herstellers und wurde mit 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert.

Mit der Maxipräparation erhält man bis zu 500 µg Plasmid-DNA. Zur Präparation von Plasmid-DNA, die zur Transfektion eukaryotischer Zellen bestimmt ist, wird das EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Zu beachten ist, dass die verwendeten Lösungen und Gefäße frei von Endotoxinen sind. Die DNA wurde in 200 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und bei –20° C gelagert.

## 2.2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

### 2.2.3.1 Die *Polymerase chain reaction* (PCR)

Die PCR wird eingesetzt um Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch exponentiell zu amplifizieren. Es wird eine lineare oder zirkuläre Matritze mit bekannter Sequenz am 5'- und 3'- Ende benötigt, um passende Oligonukleotid-Primer synthetisieren zu können. Die PCR-Reaktion setzt sich aus folgenden Schritten zusammen: Zunächst wird die doppelsträngige Template-DNA auf 94° C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Im zweiten Schritt kommt es bei der berechneten Annealingtemperatur zur Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die DNA-Matritze. Die Annealingtemperatur hängt vom Schmelzpunkt der verwendeten Primer ab und kann mit folgender Formel abgeschätzt werden:

$$T [C^{\circ}] = (\text{Anzahl der Basen G und C}) \times 4^{\circ} C + (\text{Anzahl der Basen A und T}) \times 2^{\circ} C - 4^{\circ} C.$$

Zuletzt erfolgt die Kettenpolymerisation zu Doppelsträngen bei 72° C durch die thermisch stabile Taq-DNA-Polymerase. Diese Schritte werden in zahlreichen aufeinander folgenden Zyklen alternierend durchlaufen. Der DNA-Abschnitt zwischen den Primern wird dabei  $2^n$ -fach ( $n$ =Zykluszahl) amplifiziert. Allerdings sollte die Zykluszahl 35 nicht überschreiten, da nach 35 Denaturierungsschritten bei 94° C die Enzymaktivität weitestgehend verloren ist und neben den gewünschten Produkten vermehrt falsche Produkte entstehen.

Für die Standardreaktion, mit einem 50 µl Ansatz, wurden folgende Komponenten in ein dünnwandiges PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

10x PCR-Puffer	5,0 µl
Lösung Q	10,0 µl
dNTP	1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl
Template-DNA	1,0 µl
Oligonukleotid-Primer 1 (25 µM)	1,0 µl
Oligonukleotid-Primer 2 (25 µM)	1,0 µl
H <sub>2</sub> O	30,5 µl

Die eigentliche PCR-Reaktion erfolgte im Gene Amp 9600 der Firma Perkin Elmer mit folgendem Programm:



1. 95°C, 5 min

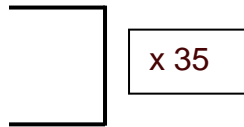
2. 95°C, 40 s;

3. 55°C, 44 s;

4. 72°C, 1 min;

5. 72°C, 10 min

6. 4°C, hold



Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

#### 2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese von DNA-Molekülen in Agarosegelen dient der Auftrennung nach ihrer Molekülgröße. Dabei macht man sich die negative Gesamtladung der DNA-Doppelhelix zunutze, die durch die deprotonierten Phosphatgruppen des Rückgrats entstehen. Dadurch wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Die Konzentration des Agarosegels wird der Größe der zu trennenden DNA-Moleküle angepasst und liegt zwischen 0,5-3%. Die angelegte Spannung kann zwischen 80-120 Volt variieren.

Das Gel wird durch das fluoreszierende Ethidiumbromid, das zwischen die Basen der DNA-Moleküle interkaliert, angefärbt. Durch Anregung mit langwelligem UV-Licht werden die DNA-Banden sichtbar gemacht, die aufgrund ihrer Wanderungstrecke, durch Vergleich mit Längenstandards, identifiziert werden können.

1 g Agarose wurde in 100 ml TBE-Puffer durch Erhitzen in einem Mikrowellengerät vollständig gelöst, mit 100 ng/ml Ethidiumbromid versetzt und nach Abkühlen auf ca. 60° C auf einen horizontalen Gelträger gegossen. Am oberen Ende des Gels entstanden durch einen eingesteckten Kamm Taschen für das Auftragen der Proben. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer mit dem TBE-Laufpuffer (20 µl EtBr/L) überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10 x Loading Dye gemischt. Der Ladepuffer enthielt die Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau, die während des Gellaufs eine farbige Bande bildeten und einen Rückschluss auf die Wanderungstrecke der DNA-

Fragmente erlaubten. Nach der Elektrophorese wurde das DNA-Bandenmuster mit dem Chemilumineszenzdetektor sichtbar gemacht. Bei präparativen Ansätzen werden Banden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Um die DNA nicht zu schädigen, sollte dabei die UV-Exposition möglichst kurz gehalten werden.

#### 2.2.3.3 UV-Spektrophotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Spektrophotometrie ist eine zuverlässige und genaue Methode um die DNA-Konzentration zu bestimmen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge, die möglichst beim Absorptionsmaximum der zu untersuchenden Substanz liegen sollte, beim Durchtritt durch wässrige Lösungen abgeschwächt wird. Die Extinktion ist abhängig von der Konzentration der untersuchten Substanz, ihrem spezifischen Extinktionskoeffizienten und der durchstrahlten Flüssigkeitsschichtdicke. Dieser Zusammenhang wird durch das Lambert-Beersche-Gesetz beschrieben:

$$E = \epsilon \times c \times D$$

E: Extinktion,  $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient ( $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ ), c: Konzentration der absorbierenden Moleküle (mol/L), D: durchstrahlte Flüssigkeitsschichtdicke (cm).

Aus dieser Beziehung kann man bei konstanter Schichtdicke (festgelegt durch die verwendete Küvette) und bekanntem Extinktionskoeffizienten (abhängig von der verwendeten Wellenlänge und den Eigenschaften der absorbierenden Teilchen) durch Bestimmung der Extinktion die Konzentration berechnen. Für die Messungen wurde die DNA mit RNase freiem Wasser verdünnt. Der Leerwert wurde ebenfalls mit RNase freiem Wasser bestimmt. Die Konzentrationen wurden auf dem GenQuant Pro Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Um Protein-Verunreinigungen auszuschließen, wurde der Quotient E260/E280 bestimmt. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### 2.2.3.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die ausgeschnittene DNA-Bande wurde mit QIAquick Gel Extraktion Kit aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte laut den Angaben und Empfehlungen des Herstellers. Für die Eluierung wurden 50 µl nukleasefreies Wasser eingesetzt.

#### 2.2.3.5 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton Othanel Smith erhielten 1978 den Nobelpreis für ihre grundlegenden Arbeiten zur Entdeckung der Restriktionsenzyme und deren Anwendung in der Molekulargenetik. Die Funktion der Restriktionsenzyme in Prokaryonten ist die Abwehr fremder DNA-Moleküle und deren Spaltung. In der eigenen DNA sind die entsprechenden Erkennungssequenzen methyliert und werden daher nicht geschnitten.

Man unterscheidet, ihren Eigenschaften entsprechend, drei Typen von Restriktionsendonukleasen. In der Molekularbiologie finden hauptsächlich TypII-Enzyme Verwendung. Diese schneiden die DNA innerhalb der Erkennungssequenz, die meist aus pallindromischen Sequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren bestehen. Durch die Spaltung können je nach Enzym *sticky ends* mit 5'- oder 3'-Überhängen oder *blunt ends* ohne Überhänge entstehen.

Die Inkubation erfolgte mit den entsprechenden Reaktionspuffern der Firma Roche (10x Puffer: A, B, L, M, H ) für zwei bis drei Stunden bei 37° C im Heizblock. Für große DNA-Mengen musste das Reaktionsvolumen erhöht und die Inkubationszeit verlängert werden. Die benötigte Enzymmenge ist abhängig von der DNA-Menge und der Anzahl der Schnittstellen. Sie läßt sich über die Definition der Enzymaktivität abschätzen: Unter optimalen Bedingungen schneidet ein Unit 1 µg λ-Phagen-DNA in einer Stunde bei 37° C. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgt anschließend durch Agarose-gelelektrophorese.

### 2.2.3.6 Ligation

Die T4-DNA-Ligase kann in Gegenwart von ATP und  $Mg^{2+}$ -Ionen mit glatten oder komplementären, kohäsiven Enden verbinden. Dabei wird eine kovalente Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen Stranges und der 3'-OH-Gruppe des anderen Stranges geknüpft. Ein molares Mengenverhältnis von 1:3 zwischen Vektor- und Insert-DNA ist für die Reaktion optimal. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Vektor-DNA (200ng/μl)	2 μl
Insert-DNA (200ng/μl)	6 μl
5x Ligasepuffer	4 μl
T4-DNA-Ligase (5U/μl)	1 μl
H <sub>2</sub> O	7 μl

Die Ligation wurde über Nacht bei 14° C (Heizblock im Kühlraum) durchgeführt.

### 2.2.3.7 Hitzeschocktransformation

Bei dieser Transformation kann mit hoher Effizienz DNA durch hitzeschockkompetente Bakterien aufgenommen werden. Es werden die chemisch kompetenten Zellen *DH5α max efficiency* der Firma Invitrogen verwendet.

Die bei -80° C gelagerten kompetenten Bakterienzellen (DH5α) wurden auf Eis aufgetaut und 100 μl der Bakteriensuspension zu dem 20 μl Ligationsansatz pipettiert. Das Gemisch wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch den nachfolgenden Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42° C wurde die Plasmid-DNA aufgenommen. Die Zellen wurden nach einer weiteren Inkubation auf Eis von fünf Minuten mit 1 ml SOC Medium gemischt und 1 Stunde bei 37° C im Heizblock geschüttelt. In dieser Zeit konnten die Bakterienzellen, die durch die Transformation erhaltene Antibiotikaresistenz ausbilden, bevor sie auf die Selektionsplatten aufgebracht wurden. 100 μl des Ansatzes wurden ausplattiert, die restlichen Zellen durch Zentrifugation pelletiert und nach Resuspension ebenfalls ausplattiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37° C im Brutschrank.

Zur Identifizierung positiver Transformanden mit rekombinantem Plasmid wurde eine Plasmid-Minipräparation und anschließend ein Kontrollverdau durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Replikaplatte für weitere Versuche angelegt.

#### 2.2.4 Fluoreszenzsequenzierung

Zur Sequenzierung der zuvor in Bakterien amplifizierten und durch eine Plasmidpräparation gewonnenen DNA der rekombinierten Plasmide wurde das BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet. Dieser als *taq cycle sequenzierung* bezeichneten Methode liegt eine Modifikation der Methode nach Sanger zugrunde.

Mithilfe einer DNA-Polymerase und eines Oligonukleotid-Primers werden unter Zugabe von dNTP und Didesoxynukleotiden, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (*dye terminatoren*) markiert sind, Kopien des zu sequenzierenden Stranges synthetisiert. Der Einbau eines ddNTP führt zum Kettenabbruch, weil die, für die Phosphordiesterbindung benötigte 3'-OH-Gruppe fehlt. So entstehen in der Größe abgestufte Fragmente, mit einem durch den Primer festgelegten 5'-Ende und einem variablem 3'-Ende, das ein spezifisches fluoreszenzmarkiertes ddNMP trägt. Die entstehenden Fragmente werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Diese wird von einem Detektor erkannt und als Abfolge von Farbsignalen, entsprechend der Sequenz des DNA-Stranges, wiedergegeben. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

Matritzen-DNA	1,0 µl
<i>terminator ready reaction mix</i>	4,0 µl
2,5x Sequenzing Puffer	4,0 µl
Primer (1pmol/µl)	3,2 µl
H <sub>2</sub> O	7,2 µl

Die Sequenzierreaktion fand als modifizierte PCR in einem Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil statt: 25 Zyklen mit je 1 Minute 96° C, 10 Sekunden 96° C, 5 Sekunden 50° C, 4 Minuten 60° C.

### 2.2.5 Transfektion

Zur Transfektion der Zelllinien HepG2 und RAW264.7 mit Plasmid-DNA wurde FuGene 6 Transfection Reagent (Roche Molecular Biochemicals) verwendet. Das Reagenz besteht aus mehreren Lipid-Komponenten, die mit den DNA-Molekülen einen Komplex bilden. Dieser Komplex wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die Transfektionsart von FuGene6 wird durch Roche nicht genauer beschrieben. Der Vorteil der nicht liposomalen Transfektion liegt in der geringeren Toxizität gegenüber den Zellen.

Es wurde folgendes Protokoll für die Transfektion angewendet:

- pro *well* einer 6-*well* Platte wurden 24 Stunden vor Transfektion  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät
- die ausgesäten Zellen wurden in DMEM bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in gesättigter Wasserdampfatmosphäre inkubiert
- insgesamt 3 µg DNA wurden mit nucleasefreiem Wasser auf 5 µl Volumen aufgefüllt und 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert
- 9 µl FuGene6 Reagenz wurden vorsichtig in 91 µl des entsprechenden Mediums pipettiert, ohne den Rand des verwendeten Gefäßes zu berühren
- die verdünnte DNA wurde in den FuGene6 Medium-Mix pipettiert und 15 Minuten bei RT inkubiert
- der Transfektions-Mix wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben, während die Zellen geschwenkt wurden, um zu hohe lokale Konzentrationen zu vermeiden
- nach 48 Stunden Inkubation bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in gesättigter Wasserdampfatmosphäre wurden die Zellen geerntet

### 2.2.6 Luciferase-Reportergen-Assay

Mit Hilfe von Reportergen-Assays ist es möglich, den Einfluss potentieller Promotoren und Enhancer auf die Transkription eines Reportergens in geeigneten Zellen zu testen. Reportergene kodieren 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. Das potentielle Promotorfragment wird in richtiger

Orientierung vor das Reportergen kloniert und der Vektor in geeignete Zellen transfiziert. Das Chloramphenicol-Acetyltransferase-(CAT)-Gen aus *E. coli*, das  $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*) aus *E. coli*, das Gen für menschliches Wachstumshormon (hGH) und das Luciferase-Gen (*luc*) aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* werden häufig als Reporter verwendet. Aufgrund besserer Reproduzierbarkeit und höherer Sensitivität wird der Luciferase-Assay vorgezogen.

Das Enzym Luciferase katalysiert die ATP abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin. Dabei entsteht Licht, das mit einem Luminometer bei 562 nm gemessen werden kann.

Nachteil des konventionellen Protokolls ist die kurze Dauer des Lichtblitzes (<1s) und die Hemmung des Enzyms durch das entstehende Reaktionsprodukt Oxyluciferin. In einem von Promega entwickelten Luciferase-Assay-System wird durch die Gegenwart von Coenzym A eine günstigere Reaktionskinetik erzielt, so dass eine über etwa 20 Sekunden konstante Lichtproduktion entsteht, die langsam abnimmt und eine Halbwertszeit von ca. fünf Minuten hat.

#### 2.2.6.1 Klonierung der Luciferase-Konstrukte

Es existiert eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Vektoren, die meist folgende Grundelemente gemeinsam haben:

- ein Reportergen mit Polyadenylierungssignal
- eine *multiple cloning site* stromaufwärts des Reportergens
- ein Polyadenylierungssignal stromaufwärts der *multiple cloning site*, um kryptische Promotor-Aktivität innerhalb der Plasmidsequenz zu unterdrücken
- ein Intron, das für die effiziente Produktion reifer cytoplasmatischer RNA in einigen Vektoren erforderlich ist
- ein bakterieller Replikationsursprung (*ori*) und ein Antibiotikaresistenzgen, um den Vektor in Bakterien amplifizieren zu können

Die Promotorsequenz wurde vor das Luciferase-Gen der Reporter Vektoren pGL3 basic und pGL3 control der Firma Promega kloniert.

Der pGL3 basic Vektor besitzt keine Promotor und Enhancersequenzen. Die Expression der Luciferase hängt damit nur vom Vorhandensein funktionaler Promotorsequenzen oberhalb des Luciferase-Gens ab.

Der pGL3 control Kontrollvektor enthält SV40-Promotor- und Enhancerelemente, was zu maximaler Expression in transfizierten Zellen führt. Kontrollvektoren dienen als Maßstab der Transkriptionseffizienz, bieten einen Vergleich der Stärke der Testsequenz in Relation zu einem bekannten Promotor und ermöglichen die Bestimmung der Hintergrundaktivität des Reportervektors. Die Promotorsequenz wurde über *Xho*I und *Hind*III Schnittstellen in die Vektoren kloniert. Zur Kontrolle wurde mit Oligonukleotidprimern des Vektors und des Inserts sequenziert.

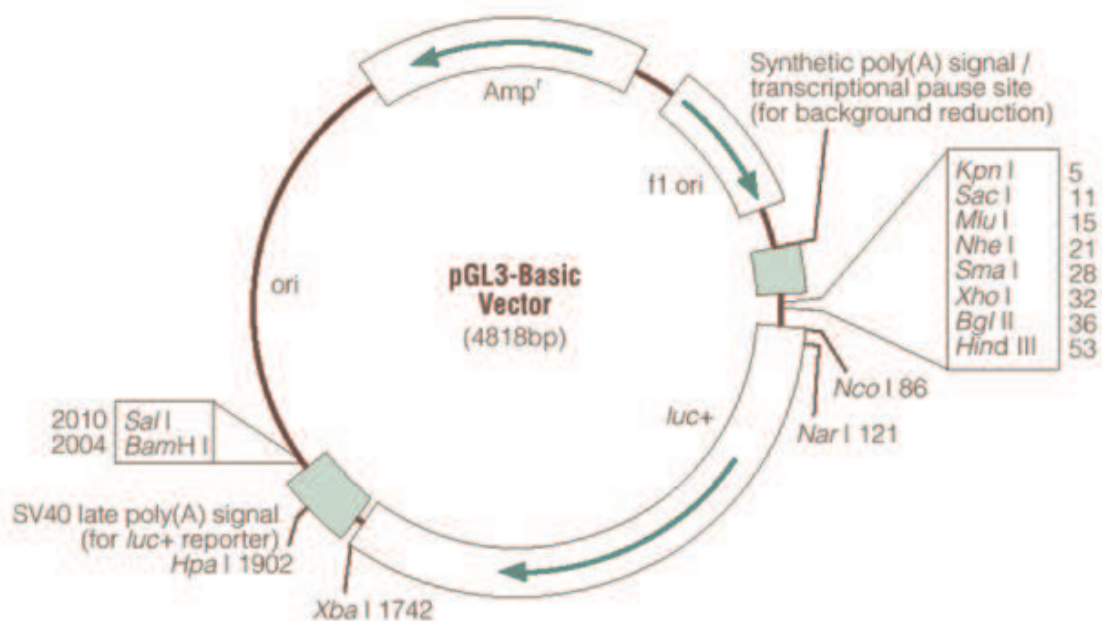


Abbildung 9: Schematische Darstellung des pGL3 basic Vektors.

#### 2.2.6.2 Luciferase-Assay

Es wurde der Luciferase-Assay der Firma Promega verwendet. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 Stunden Inkubation mit PBS gewaschen und mit 500 µl 1x Lysis Puffer lysiert. Die Zellen wurden abgeschabt und kurz abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurde sowohl der Luciferase-Assay als auch die Proteinbestimmung durchgeführt.



Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden 100 µl Zell-Lysat und 300 µl Assay-Reagent in einem Polysterolröhrchen gemischt und sofort im Luminometer gemessen. Die relative Promotor-Aktivität wurde durch Vergleich der *relative light units* (RLU) ermittelt.

### 2.2.7 Proteinbestimmung

Zur Normierung von Ergebnissen enzymatischer Tests kann die Bestimmung des Proteingehaltes in einem Zelllysate herangezogen werden. Das verwendete BC-Assay der Firma Uptima beruht auf einer modifizierten Form der Methode nach Smith. Es wird ein Biuret-Reagens durch Mischung von Bicinchoninsäure (BCA) und Cu-II-Sulfat-Lösung hergestellt.  $\text{Cu}^{2+}$  wird nach Proteinzugabe durch Bildung eines Komplexes mit der NH-Gruppe der Peptidbindungen zu  $\text{Cu}^+$  reduziert. Die  $\text{Cu}^+$  Ionen bilden mit dem BC-Assay violette Komplexe, deren Absorption bei einer Extinktion von 562 nm proportional zur eingesetzten Proteinmenge ist.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Standardkurve mit *bovinem Serum Albumin* (BSA) hergestellt. Dazu wurden folgenden BSA-Konzentrationen (µg/ml) gemessen: 20, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000. Anschließend wurden in eine 96-well Platte die BSA-Standardkonzentrationen, in aufsteigender Konzentration, und die zu berechnenden Lysatproben, in Doppelwerten, pipetiert. Pro well wurden 200 µl Cocktail aus BC-Assay Reagenz A und BC-Assay Reagenz B im Verhältnis 50:1 zugegeben und die 96-well Platte 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach konnte mithilfe des Magellan Detektors der Firma Tecan mit entsprechender Software eine Standardkurve ermittelt und die Konzentrationen der einzelnen Proben bestimmt werden.

### 2.2.8 EMSA-Assay

Der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) ist auch als *bandshift*, *gelshift* oder *gel retardation assay* bekannt und dient der Untersuchung von Wechselwirkungen der Proteine mit DNA. Die Methode beruht darauf, dass ungebundene DNA in einem nicht denaturierenden Gel eine höhere

elektrophoretische Mobilität besitzt als proteingebundene DNA. Man bezeichnet die proteingebundene DNA als *shifted* gegenüber ungebundener DNA.

Die verringerte elektrophoretische Mobilität wird durch verschiedene Faktoren verursacht:

1. Die Gelmatrix besitzt einen Siebeffekt, der die Wanderung der DNA bzw. der DNA-Protein-Komplexe beeinflusst. Generell ist die Mobilität eines DNA-Fragments umgekehrt proportional zu seinem Molekulargewicht. Bindet ein Protein an das DNA-Fragment, so wird das Protein aufgrund der negativ geladenen DNA durch das Gel gezogen, der Siebeffekt der Gelmatrix erhöht sich und der Komplex wird stärker zurückgehalten.
2. Weiterhin beeinflusst die Konformation des DNA-Fragments die Mobilität. Normalerweise liegt die DNA während der Elektrophorese als lineares Molekül oder in geknäuelter Form vor und schlängelt sich durch die Gelporen. Bindet ein Protein an das DNA-Fragment, kann dies zu Konformationsänderungen führen, die die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im Gel vermindern.
3. Die Ladung des Proteins im Verhältnis zur negativ geladenen DNA kann die Gesamtmobilität wesentlich beeinflussen. Durch die Bindung eines positiv geladenen Proteins an die negativ geladene DNA, kommt es zu einer deutlichen Verringerung der Mobilität, während die Bindung eines negativ geladenen Proteins nur zu einem geringen *shift* führt. Eine Veränderung der Pufferbedingungen kann hier zu deutlichen Veränderungen in der Mobilität der Komplexe führen, je nachdem in welchem Bereich der isoelektrische Punkt des Proteins liegt [61].

Zur Ausführung der Methode werden Kernextrakte mit einem radioaktiv markierten Doppelstrang-Oligonukleotid inkubiert, das die spezifische Bindungsstelle für das zu untersuchende Protein enthält. Zusätzlich wird dasselbe Doppelstrang-Oligonukleotid ohne radioaktive Markierung und ein Oligonukleotid mit Mutation in der spezifischen Bindungsstelle zur Competition eingesetzt. Um unspezifische Bindungen mit Proteinen zu vermeiden und um

den *background* zu verringern, wird Poly-dIdC zugefügt. Nach der Bindungsreaktion werden die Proben mit einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Banden durch Autoradiographie detektiert.

#### 2.2.8.1 Kern- und Zytoplasmaextraktion

Zur Isolierung der Kernextrakte die für den *gelshift* benötigt werden, werden die entsprechend transfizierten Zellen nach 48 Stunden Inkubation folgendermaßen behandelt:

#### 2.2.8.2 Annealing von Doppelstrang-Oligonukleotiden

Es wurden jeweils 10 µl der zusammengehörigen Einzelstrang-Oligonukleotide (100µM) für zehn Minuten bei 95° C erhitzt und dann durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden 3 µl des entstandenen Doppelstrang-Oligonukleotids in 17 µl Wasser gelöst.

#### 2.2.8.3 Radioaktives Labeling

Für das Labeling des Doppelstrang-Oligonukleotids, mit AG-Überhang, wurde  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP verwendet. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

<i>diluted</i> Doppelstrang-Oligonukleotids	5,0 µl
<i>one for all buffer</i>	2,5 µl
dTTP	1,0 µl
Klenow Enzym	1,0 µl
$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP	2,5 µl
H <sub>2</sub> O	13 µl

Es folgte eine Inkubation für zwei Stunden bei 37° C.

#### 2.2.8.4 Separation nicht gebundener Radioaktivität und Klenow DNA-Polymerase

Die Aufreinigung des gelabelten Doppelstrang-Oligonukleotids erfolgte mit Quick Spin Columns Sephadex G25. Dabei wurden die Anweisungen des Herstellers beachtet.

### 2.2.8.5 Szintillationszählung

Um die Stärke der Radioaktivität des aufgereinigten Doppelstrang-Oligonukleotids bestimmen zu können, wurde eine Szintillationszählung durchgeführt und in *counts per minute* (CPM) angegeben. Die Probe wurde auf 30000 CPM/ $\mu$ l verdünnt.

### 2.2.8.6 Herstellung eines nicht denaturierenden Polyacrylamid (PAA) Gels

Für den Gelshift-Assay wurde ein nicht denaturierendes PAA-Gel verwendet. Es besteht aus:

PAA	7,50 ml
10x TBE	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	41,25 ml
Ammoniumpersulfat	250,00 $\mu$ l
TEMED	50,00 $\mu$ l

Dieses lief ca. 30 Minuten bei 80-120 V und 135 mA vor, bevor die Proben aufgetragen wurden.

### 2.2.8.7 Pipettierschema für den Gelshift-Assay

In Tabelle 13 ist das Pipettierschema für den Gelshift-Assay zusammengefasst.

*Tabelle 13: Pipettierschema für den Gelshift-Assay*

Bezeichnung	Poly dIdC	5x GSA	Probe hot	Kompetitor cold	Kernextrakt	AK	Wasser
free probe	1	4	1				14
Untransfiziert	1	4	1		5		9
HIF1 $\alpha$	1	4	1		5		9
HIF1 $\beta$	1	4	1		5		9
HIF1 $\alpha$ + $\beta$	1	4	1		5		9
HIF1 $\alpha$ + $\beta$ +wt comp	1	4	1	1 wt	5		8
HIF1 $\alpha$ + $\beta$ +mut comp	1	4	1	1 mut	5		8
HIF1 $\alpha$ + $\beta$ + AK	1	4	1		5	2	7

Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten, um die Komplexbildung zwischen HIF1 und dem ABCA1-Promotorfragment zu ermöglichen.

Die Proben wurden anschließend mit 2 µl *loading dye* gemischt und auf das PAA-Gel aufgetragen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung eines responsiven VEGF-Promotorkonstrukts und des ABCA1-Promotors in den pGL3 basic Luciferase-Vektor

Um den Einfluss von HIF1 $\alpha$ - und ARNT-Überexpression auf die Promotor-Aktivität von ABCA1 zu testen, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Dazu wurde als Positivkontrolle ein HIF1 responsives VEGF-Promotorkonstrukt in den pGL3 basic Luciferase-Vektor kloniert.

Der ABCA1-Promoter, im Bereich von -175 bp bis 300 bp, lag bereits in pGL3 basic Luciferase-Vektor kloniert vor. Dieser wurde in vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe hergestellt.

Die Herstellung des VEGF-Promotors erfolgte mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR). Um die Oligonukleotid-Primer zu designen, wurde die Sequenz der Promotorregion des VEGF-Gens mit der *database of transcription start site* (dbtss) [62] bestimmt:

Die HIF1 $\alpha$ -Binderegion befindet sich im Bereich von -950 bp bis -1000 bp (**E-box**). Nach Forsythe *et al.*, Molecular and Cellular Biology 1996, 4604-4616 sollte der VEGF-Promotor *downstream* bis +400 bp gehen.

agct : UTR      agct : ORF      A : Selected TSS

```
>upstream:1200, downstream:500,
-1200 agccttggccctggcctggtgggagctctgggcagctggcctacagacg
-1150 ttcccttagtgctggcggttaggtttgaatcatcacgcaggccctggcctc
-1100 caccgccccaccagccccctggcctcagttccctggcaacatctgggg
-1050 ttgggggggcagcaggaacaagggcctctgtctgccagctgcctcccc VEGF-Luc -1032
-1000 tttgggttttgccagactccacagtgcatacgtgggctccaacaggtcct VEGF-Luc -990
-950 cttccctcccagtcactgactaaccgccgaaccacacagcttcccgttct
-900 cagctccacaaacttggcgccaaattcttctcccctgggaagcatccctg
-850 gacacttcccaaaggaccccagtcactccagcctggttggtgccgctcac
-800 tttgatgtctgcaggccagatgagggctccagatggcacattgtcagagg
-750 gacacactgtggcccctgtgccagccctgggctctctgtacatgaagca
-700 actccagtcccaaatatgtagctgtttgggaggtcagaaataggggtcc
-650 aggagcaaaactccccccaccccccttccaaagccattccctcttttagcc
-600 agagccggggtgtgcagacggcagtcactagggggcgctcggccaccaca
```

```

-550 gggaaagctgggtgaatggagcgagcagcgtcttcgagagtgaggacgtgt
-500 gtgtctgtgtgggtgagtgagtgtgtgctgtgtgggttgagggcggttga
-450 gcggggagaaggccaggggtcactccaggattccaatagatctgtgtgtc
-400 cctctccccaccgctccctgtccggctctccgcttccctgcccccttc
-350 aatattcctagcaaagagggaacggctctcaggccctgtccgcacgtaac
-300 ctcactttcctgctccctcctcgccaatgccccgcgggcgctgtctctg
-250 gacagagtttccggggcggtatgggtaattttcaggctgtgaaccttggt
-200 gggggtcgagcttcccccttcattgcggcgggtgcgggccaggcttact
-150 gagcgtccgcagagccccggcccgagccgctgtggaagggtgaggctc
-100 gcctgtccccgccccccggggcgggcgggggcggggtcccggcggggcg
-50 gagccatgcgcccccccttttttttttaaagtgcggctggtagcgggga
+1 Ggatcgcgagggttggggcagcgggtagctcggaggtcgtggcgctgg
+51 gggctagcaccagcgtctgtcgggaggcgagcggttaggtggaccggt
+101 cagcggactcaccggccagggcgctcgggtgctggaatttgatattcattg
+151 atccgggttttatccctcttcttttttctaaacatttttttttaaact
+201 gtattgtttctcgttttaattttatttttgcttgccattccccacttgaat
+251 cgggcgcagcggttggggagattgctctacttccccaaatcactgtggat
+301 ttggaaccagcagaaaaggaaagaggttagcaagagctccagagagaa
+351 gtcgagggaagagagagacggggtcagagagagcgcgcgggcgtgcgagca
+401 gcgaaaagcgacaggggcaaagtgagtgcctgcttttgggggtgaccgcc
+451 ggagcgcgcgctgagccctcccccttgggatccgcagctgaccagtcgc
g

```

VEGF-Luc +398  
VEGF-Luc +432

Die Primer wurden mithilfe des Programms Primer 3 [63] erstellt. Zusätzlich wurden mit dem Programm webcutter [64] Restriktionsenzyme ermittelt, die die gewünschte Promotorsequenz von VEGF nicht schneiden, aber in der *multiple cloning site* von pGL3 basic Luciferase-Vektor liegen. Die Analyse ergab die Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII*. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme wurden in richtiger Orientierung an die Primer angefügt und diese bei der Firma Metabion bestellt.

Die PCR wurde mit verschiedenen Primer-Kombinationen durchgeführt. Es wurde jeweils ein *forward* mit einem *reverse* Primer kombiniert. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, wobei sich folgendes Bild ergab (Abbildung 10):

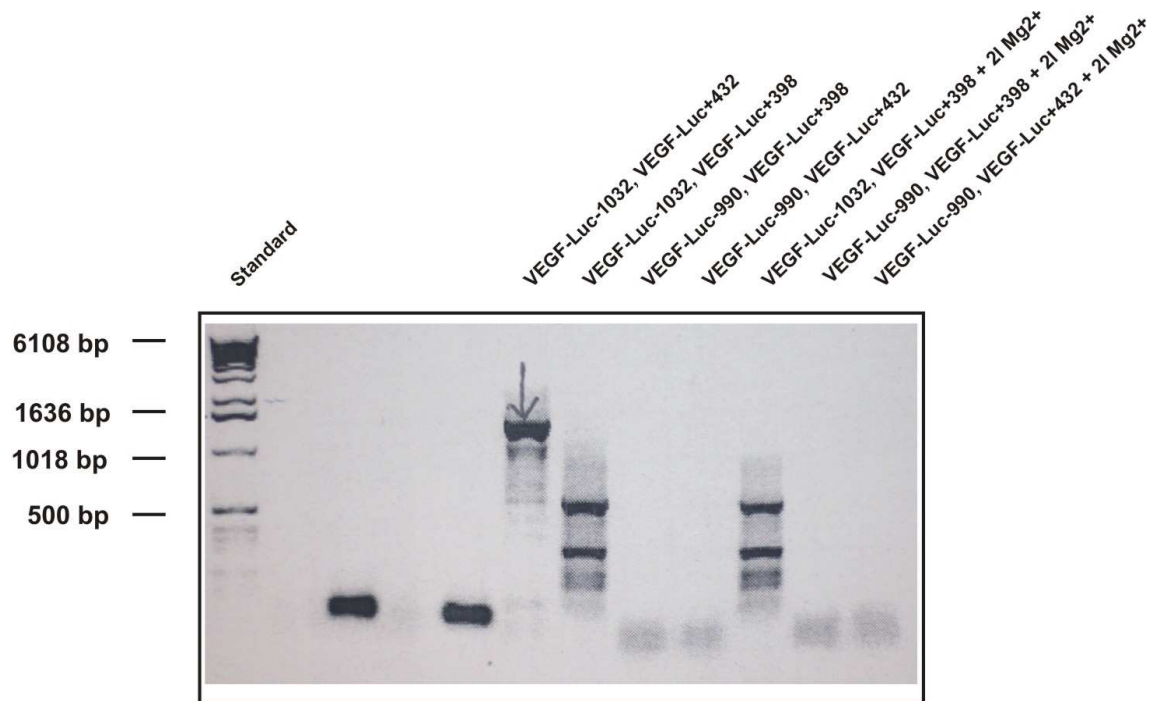


Abbildung 10: Agarosegel der PCR-Produkte. 1: Primer VEGF-Luc-1032, VEGF-Luc+432. 2: VEGF-Luc-1032, VEGF-Luc+398. 3: VEGF-Luc-990, VEGF-Luc+398. 4: VEGF-Luc-990, VEGF-Luc+432. 5: Nr 2 + 2  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . 6: Nr 3 + 2  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . 7: Nr 4 + 2  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$

Für die Bande mit der richtigen Größe (Pfeil), wurde ein eigenes Agarosegel angefertigt (Abbildung 11), die Bande ausgeschnitten und mit QIAquick Gel Extraktion Kit aufgereinigt.

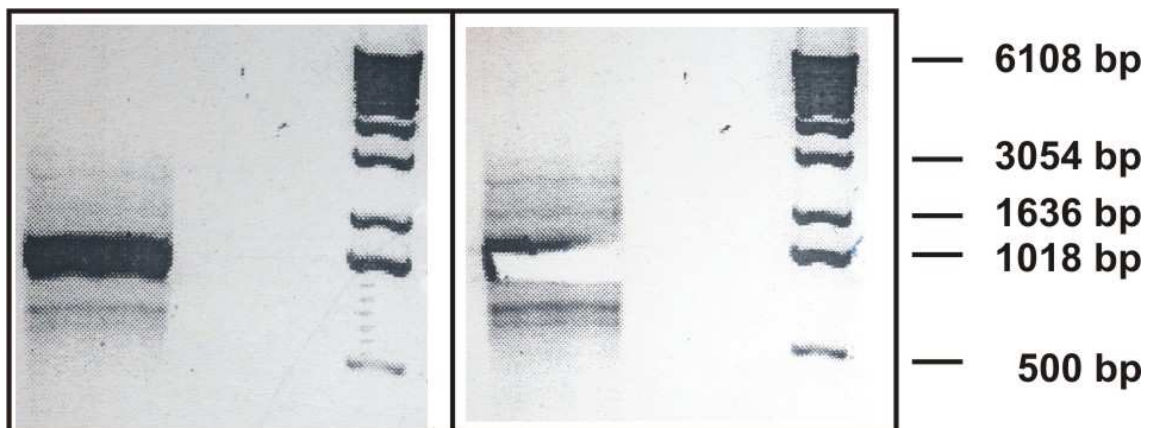


Abbildung 11 : Auf der linken Seite sieht man das PCR-Produkt mit den Primern VEGF-Luc-1032 und VEGF-Luc+432. Auf der rechten Seite das Agarosegel nach Ausschneiden der Bande.



Der Vektor pGL3 basic wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Hind*III, die innerhalb der *multiple cloning site* liegen, geschnitten. Auch das aufgereinigte PCR-Produkt des Inserts, die Promotorregion des VEGF-Gens, wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Hind*III verdaut und anschließend durch Ligation in den Vektor kloniert. Das Konstrukt wurde durch Hitzeschocktransformation in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebracht und auf selektiven Agarplatten über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurden 16 einzelne Bakterienklone in LB amp Flüssigmedium kultiviert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C wurde unter Zuhilfenahme einer Plasmidminipräparation mit QIA prep spin Miniprepkit durchgeführt. Um überprüfen zu können, ob die Klone das Plasmid enthalten, wurde ein Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Hind*III durchgeführt. Die Auftrennung in einem Agarosegel ergab bei den Klonen 1, 8, 12, 13 und 15 jeweils zwei Banden, die den, aufgrund bekannter Schnittstellen, berechneten Fragmentlängen von 1464 bp für das Insert und 4,8 kbp für den Vektor entsprachen (Abbildung 12).

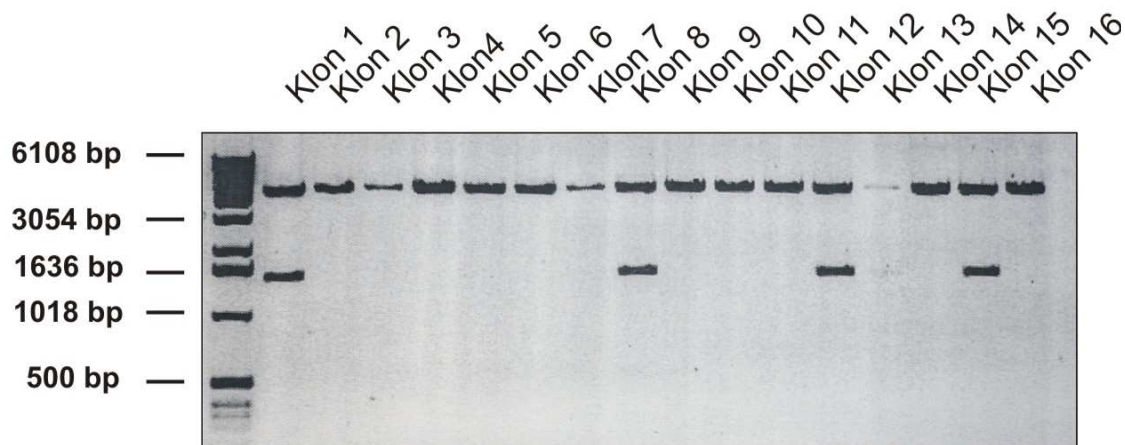


Abbildung 12: Kontrollverdau der isolierten Plasmide

Zum Nachweis der korrekten Insertsequenz wurde eine Sequenzierung der Klone mit positivem Kontrollverdau durchgeführt. Dazu wurden die Primer VEGF-Luc-1032 und VEGF-Luc+432 für das Insert und die Primer RV primer 3 FW Luc und GL Primer für den Vektor verwendet.

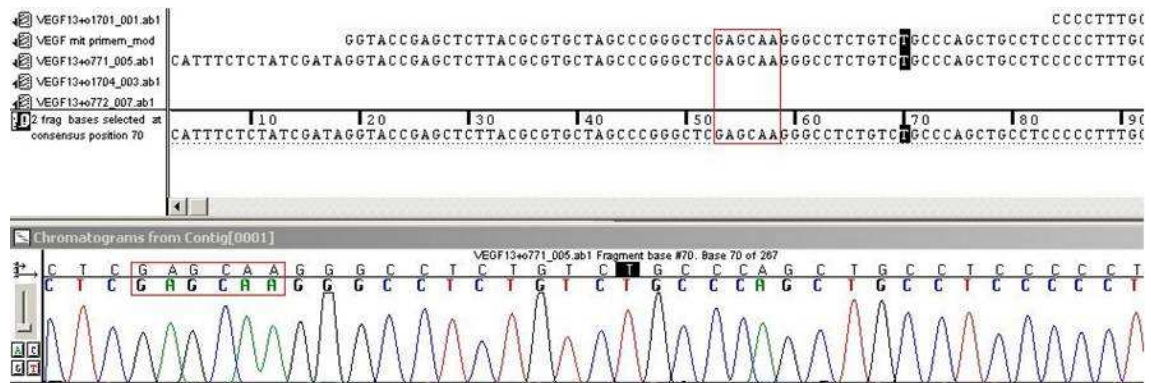


Abbildung 13: Ausschnitt aus der Sequenz des VEGF-Promotors von Klon 13. Die XhoI Schnittstelle ist durch den Rahmen hervorgehoben. An dieser Stelle liegt der Übergang von Vektor zu Insert.

Abbildung 13 zeigt den Übergang der Sequenz von Vektor zu Insert. Dieser wird durch die XhoI Schnittstelle, die durch einen Rahmen hervorgehoben ist, dargestellt. Auch die restliche Sequenz des Inserts stimmt mit der Vergleichssequenz des VEGF-Promotors überein (Abbildung 13).

Von dem Konstrukt mit richtiger Sequenz, Klon Nr. 13, wurde durch Kultivierung in LB amp Flüssigmedium Plasmid-DNA durch Maxipräparation gewonnen.

### 3.2 Transfektion

Die Transfektion wurde mit HepG2 und RAW 264.7 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden kultiviert und nach Aussähen in 6 well Platten für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro well ausgesäht.

Die Transfektion erfolgte mit FuGene6 Transfection Reagent. Die Zellen wurden jeweils in zehn verschiedenen Ansätzen transfiziert. Zur Co-Transfektion wurden das VEGF-Promotorkonstrukt, der ABCA1-Promotor, das HIF1 $\alpha$ - und das ARNT-Plasmid eingesetzt und zusätzlich ein Leervektor verwendet, um die DNA-Mengen bei den unterschiedlichen Transfektionen ausgleichen zu können. Jeweils drei wells wurden mit den gleichen Plasmiden transfiziert, um beim Luciferase-Assay eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhalten. Außerdem wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

Der erste Ansatz wurde mit pGL3 basic Vektor transfiziert, der zweite mit pGL3 control. Diese beiden Transfektionen dienten zum Vergleich und zur Kontrolle der Luciferase-Aktivität. Im dritten bis sechsten Ansatz wurde das VEGF-Promotorkonstrukt einmal mit dem Leervektor, dann entweder mit dem HIF1 $\alpha$ - oder dem ARNT-Plasmid und schließlich sowohl mit dem HIF1 $\alpha$ - als auch mit dem ARNT-Plasmid co-transfiziert. Diese Kombinationen erfolgten auch zusammen mit dem ABCA1-Promotorkonstrukt in den Ansätzen sieben bis zehn.

### **3.3 Luciferase-Assay**

Der Luciferase-Assay wurde durchgeführt, um den Einfluss einer Überexpression von HIF1 $\alpha$  und ARNT auf die Promotor-Aktivität von ABCA1 zu analysieren. Dazu wurde die Luciferase-Aktivität nach 48 Stunden Inkubation nach Transfektion mit dem Luminometer gemessen. Zur Normierung der Luciferase-Aktivitäten wurde der Quotient aus der gemessenen Luciferase-Aktivität und dem entsprechenden Wert der Gesamtproteinmenge der Zell-Lysate gebildet. Diese Werte wurden ins Verhältnis zum pGL3 basic Vektor gesetzt. Als Positivkontrolle dienten die Werte des pGL3 control Vektors. Außerdem wurden Mittelwerte aus den drei Einzelmessungen zur Auswertung der Lichtintensitäten gebildet und die Standardabweichung berechnet.

Als weitere Positivkontrolle dienten die Werte der Luciferase-Aktivität des VEGF-Promotors nach Überexpression von HIF1 $\alpha$  und ARNT.

#### **3.3.1 Promotor-Aktivität in HepG2-Zellen**

Die Überexpression von HIF1 $\alpha$ - oder ARNT-Plasmid alleine hatte nur einen geringen Effekt auf die Aktivität des ABCA1-Promotors. Die Promotor-Aktivität von ABCA1 blieb weitestgehend gleich durch separate Transfektion mit HIF1 $\alpha$ - und ARNT-Plasmid, verglichen mit der Aktivität des ABCA1-Promotor-Luciferasekonstrukts. Einzige Ausnahme war die Co-Transfektion des ABCA1-Promotors mit dem ARNT-Plasmid im zweiten Versuch. Hier ergab sich ein

Verhältnis von 13,8. Dieser Wert war allerdings auf einen Fehler bei der Transfektion zurückzuführen, es ist zu viel Plasmid-DNA eingesetzt worden.

Auffallend ist, dass es durch die Co-Transfektion der beiden Untereinheiten des HIF1-Komplexes zu einer deutlichen Steigerung der ABCA1-Promotor-Aktivität kam. Die Luciferase-Aktivität variierte in den drei Versuchen zwischen dem 61-fachen Wert und dem 1166-fachen Wert des pGL3 basic Vektors. Für das Verhältnis zwischen dem ABCA1-Promotor nach Co-Transfektion mit den Expressionskonstrukten für HIF1 $\alpha$  und ARNT und dem ABCA1-Promotor, der nur mit dem Leervektor co-transfiziert wurde, ergaben sich Werte zwischen 2,25 und 88 (Abbildung 14).

Da es zu deutlichen Schwankungen zwischen der Höhe der Messwerte in den einzelnen Versuchen gekommen ist, erschien eine Mittelwertberechnung der RLU-Werte nicht sinnvoll. Die Unterschiede zwischen den drei unabhängigen Versuchen waren auf die unterschiedliche Transfektionseffizienz zurückzuführen. Dennoch zeigten alle Versuche die gleiche Tendenz.

Als Positivkontrolle für die Transfektion und effiziente HIF1-Aktivität diente die Luciferase-Aktivität des VEGF-Promotors nach Überexpression mit HIF1 $\alpha$  und ARNT. Die Promotor-Aktivität von VEGF nach Co-Transfektion mit dem HIF1 $\alpha$ -Konstrukt war im Durchschnitt um das 5-fache höher, verglichen mit den entsprechenden Werten für den ABCA1-Promotor. Durch ARNT hingegen wurde die Promotor-Aktivität des VEGF-Promotors, im Vergleich zur Kontrolle, kaum induziert. Die Co-Transfektion der HepG2-Zellen mit beiden Untereinheiten von HIF1 führte zu einer starken Erhöhung der Promotor-Aktivität von VEGF. Die RLU-Werte lagen dabei zwischen dem 12,5-fachen und dem 21,9-fachen im Vergleich zu den RLU-Werten des VEGF-Promotors ohne Überexpression von HIF1 (Abbildung 14).

Zusammenfassend war festzustellen, dass sowohl die Promotor-Aktivität von VEGF, als auch von ABCA1 durch Co-Transfektion mit HIF1 $\alpha$  und ARNT stark erhöht wurde. Durch die Überexpression der HIF1 $\alpha$ -Untereinheit allein konnte allerdings nur die Promotor-Aktivität von VEGF signifikant gesteigert werden.

Die Promotor-Aktivität von ABCA1 blieb bei Co-Transfektion von HIF1 $\alpha$  allein nahezu konstant.

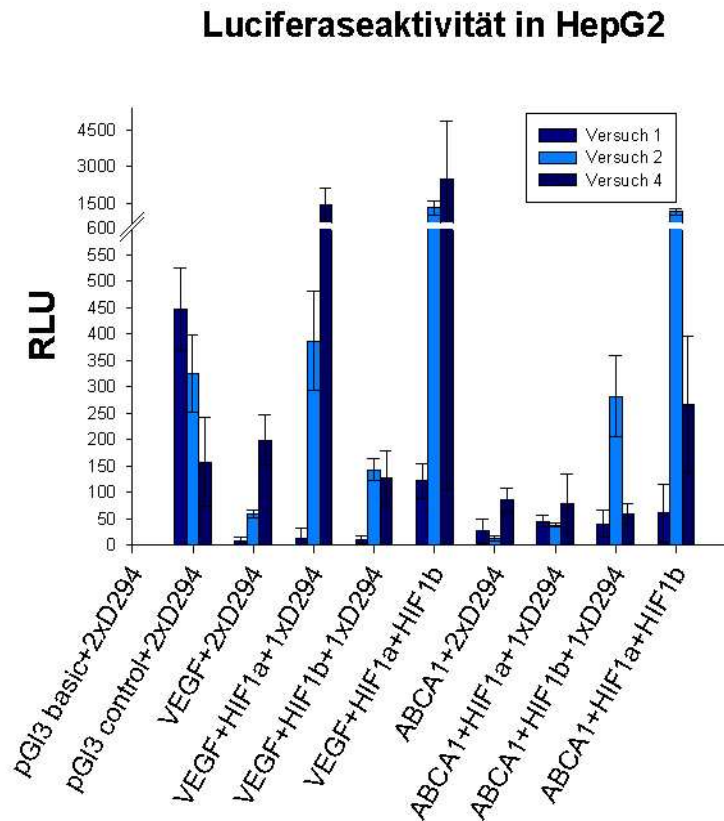


Abbildung 14: Luciferaseaktivitäten der verschiedenen Transfektionen in HepG2-Zellen. Die gemittelten Aktivitäten (RLU = relative light units) des pGL3 basic Vektors wurden als 1 gesetzt.

### 3.3.2 Promotor-Aktivität in RAW 264.7 Zellen

In Abbildung 15 wurden die drei unabhängigen Transfektionen und Luciferase-Messungen in einem Diagramm zusammengefasst. Es fällt auf, dass insgesamt wesentlich geringere Messwerte erreicht wurden als bei den Transfektionen in HepG2-Zellen.

Die Überexpression von HIF1 $\alpha$  oder ARNT alleine hatte, ebenso wie in den Versuchen mit HepG2-Zellen, einen geringen Effekt auf die Aktivität des ABCA1-Promotors, verglichen mit der Aktivität des ABCA1-Promotors ohne

Überexpression der HIF1-Untereinheiten. Die Co-Transfektion von RAW 264.7 Zellen mit beiden Untereinheiten des HIF1-Komplexes ergab wieder eine deutliche Steigerung der Promotor-Aktivität von ABCA1 verglichen mit der des ABCA1-Promotors ohne Überexpression der HIF1-Untereinheiten. Es wurden RLU-Werte zwischen 1,2 und 25 erreicht. Allerdings war zu bemerken, dass die Promotor-Aktivität des ABCA1 Gens bei den Transfektionen in RAW 264.7 Zellen wesentlich geringer angestiegen ist, als bei denen in HepG2-Zellen.

Auch für die Transfektionen in RAW 264.7 Zellen diente die Luciferase-Aktivität des VEGF-Promotors nach Überexpression mit HIF1 $\alpha$  und ARNT als Positivkontrolle für eine effiziente Transfektion und HIF1-Aktivität.

Durch Überexpression der HIF1 $\alpha$ -Untereinheit kam es zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität des VEGF-Promotors um im Durchschnitt das 5-fache im Vergleich zum VEGF-Promotor ohne Überexpression von HIF1 $\alpha$ . Durch alleinige Überexpression von ARNT konnte wiederum nur eine geringe Steigerung erreicht werden. Für die Co-Transfektion mit beiden Untereinheiten wurde die stärkste Erhöhung der Luciferase-Aktivität des VEGF-Promotors im Verhältnis zum VEGF-Promotor ohne Überexpression von HIF1 erreicht. Die RLU-Werte lagen zwischen dem 4- und 11-fachen.

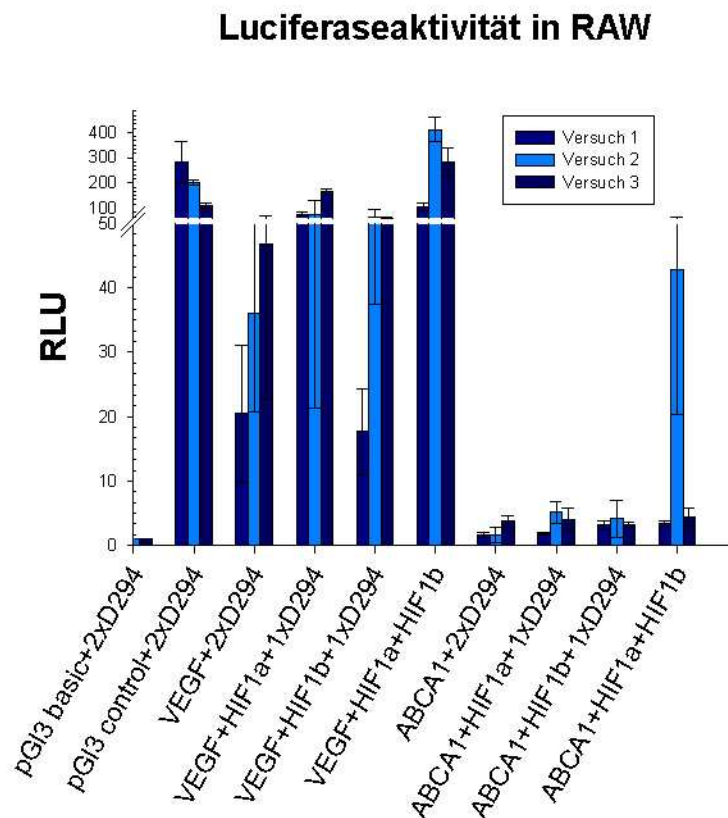


Abbildung 15: Luciferaseaktivitäten der verschiedenen Transfektionen in RAW 264.7 Zellen. Die gemittelten Aktivitäten (RLU = relative light units) des pGL3 basic Vektors wurden als 1 gesetzt.

### 3.4 Gelshift-Assay: HIF1 bindet an den ABCA1-Promotor *in vitro*

Die bisherigen Daten zeigen, dass sowohl der ABCA1-Promotor als auch der VEGF-Promotor durch HIF1 hochreguliert werden. Um die Ergebnisse aus dem Luciferase-Assay zu bestätigen, wurde im Gelshift-Assay eine mögliche Bindung von HIF1 $\alpha$  und ARNT an den ABCA1-Promotor untersucht (Abbildung 16).

Dazu wurden Kernextrakte aus HepG2 und RAW 264.7 Zelllinien 48 Stunden nach Transfektion, die wie oben beschrieben durchgeführt wurde, isoliert. So



sollte in einer Gelshiftreaktion mit dem radioaktivmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotid A1P(-175-125), welches den Sequenzabschnitt des ABCA1-Promotors zwischen -175 bp und -125 bp enthält, eine Protein-DNA Interaktion nachgewiesen werden. Um die spezifische Bindung an die E-Box Region des ABCA1-Promotors in beiden Zelllinien zu überprüfen, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den HIF1-Komplex eingesetzt.

Sowohl bei der untransfizierten Probe (Spur 2) als auch bei den Proben mit Überexpression von HIF1 $\alpha$  und ARNT (Spur 3-5), wurde bei der Gelshiftreaktion ein Protein-DNA-Komplex sichtbar. Die Banden in Spur 3-5 waren dabei etwas stärker als die Bande in Spur 2, was auf die Transfektion mit den Expressionskonstrukten von HIF1 $\alpha$  und ARNT zurückzuführen war.

Die Spezifität der Bindung konnte durch Kompetition mit dem ungelabelten Oligonukleotid A1P(-174-125) (Spur 6) gezeigt werden. Der Komplex verschwand in diesem Fall vollständig, nicht aber durch Kompetition mit dem Oligonukleotid Ebox(-174-125), das für eine mutante Form der E-box des ABCA1-Promotors kodiert (Spur 7). Durch Inkubation mit einem Antikörper gegen HIF1 $\alpha$  (Spur 8) konnte kein Supershift gezeigt werden und der Protein-DNA-Komplex wurde auch nicht abgeschwächt.



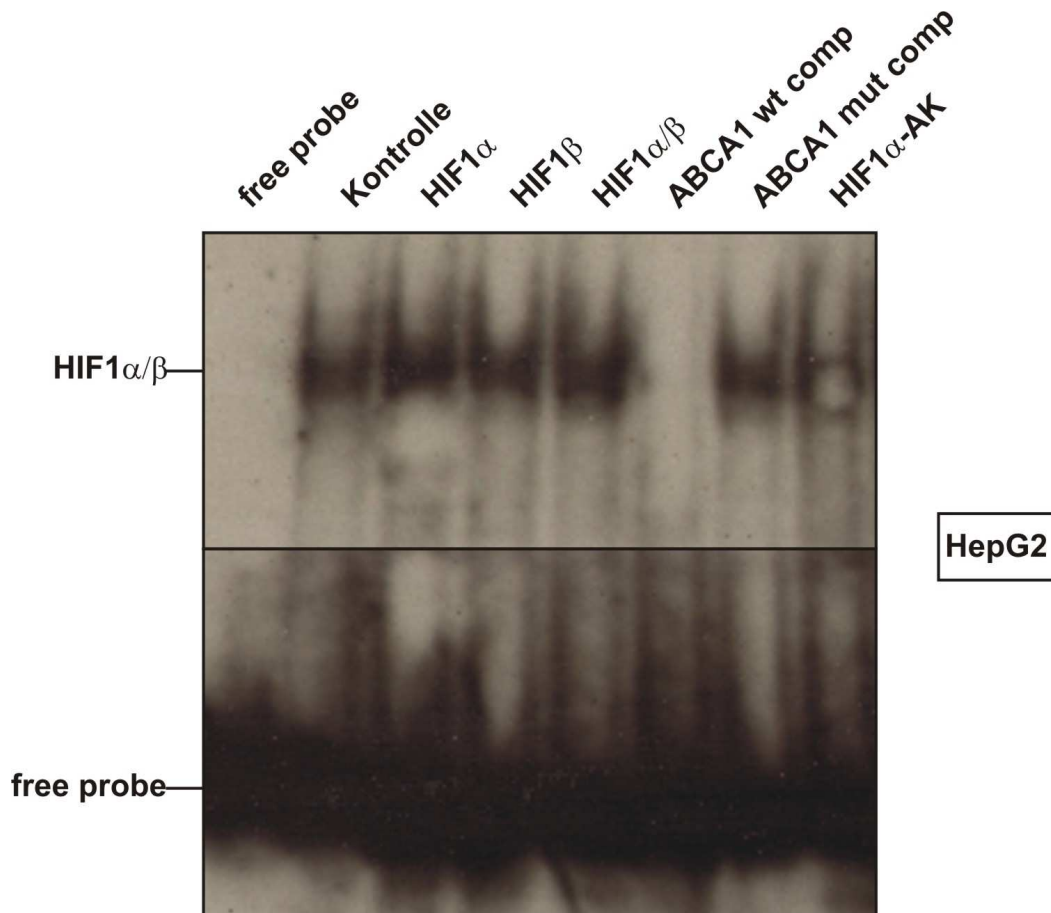


Abbildung 16: Gelshift-Assay mit Kernextrakten von HepG2-Zellen. Als DNA-Sonde wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid verwendet, welches die Sequenz des humanen ABCA1-Promotors enthielt. Spur 1: Free Probe, Spur 2: Zellkernextrakt von untransfizierten HepG2-Zellen, Spur 3: Zellkernextrakt von HepG2-Zellen nach Transfektion mit HIF1 $\alpha$ , Spur 4: Zellkernextrakt von HepG2-Zellen nach Transfektion mit ARNT, Spur 5: Zellkernextrakt von HepG2-Zellen nach Transfektion mit HIF1 $\alpha$  und ARNT, Spur 6: Konkurrenz mit unmarkiertem Oligonukleotid des Zellkernextrakts aus Spur 5, Spur 7: Konkurrenz mit mutanter Form des Oligonukleotids des Zellkernextrakts aus Spur 5, Spur 8: Zellkernextrakt aus Spur 5 mit zusätzlichem Antikörper gegen HIF1 $\alpha$ .

Aus diesen Daten kann auf eine direkte Bindung von HIF1 an den ABCA1-Promotor im Bereich von -174 bp bis -125 bp geschlossen werden, der die E-box enthält.

## 4 Diskussion

### 4.1 Induktion des ABCA1 Gens durch Überexpression von HIF1 $\alpha$ und $\beta$

Mittels DNA-Microarrays wurden 2004 von Manolo *et al.* [54] in menschlichen Endothelzellen einige Gene des Cholesterol- und Lipidstoffwechsels identifiziert, die durch die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form des Transkriptionsfaktors HIF1 $\alpha$  oder durch die Inkubation von Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen induziert wurden. Dazu gehörten ABCA1, apo-D, *ADP-ribosylation factor-like 7* (ARL7), *thioredoxin-interacting protein* (TXNIP), der VLDL-Rezeptor und PPAR $\gamma$ , die jeweils unter beiden Bedingungen stark hochreguliert wurden [54]. Die erhöhte Expression von ABCA1 in proximalen Tubulusepithelzellen der Niere (RPTEC-Zellen) unter hypoxischen Bedingungen konnte von Chi *et al.* [65], ebenfalls mithilfe von DNA-Microarray-Analysen, bestätigt werden. Innerhalb dieser Studie wurden insgesamt vier verschiedene Zelltypen untersucht, humane Endothelzellen einer Koronararterie (EC), glatte Muskelzellen (SMC), Brustepithelzellen (HMEC) und proximale Nierentubulusepithelzellen (RPTEC). Dabei zeigte der Zelltyp RPTEC eine 3- bis 5-fach erhöhte Expression von HIF1 $\alpha$ . Dies lässt einen Zusammenhang zwischen der Expression dieser beiden Gene vermuten [65].

Ziel dieser Untersuchung war es daher, festzustellen, ob der Transkriptionsfaktor HIF1 die Expression von ABCA1 reguliert. Da im Falle von Leberzellen und Makrophagen bekannt ist, dass diese ABCA1 exprimieren, wurden für alle Versuche die Zelllinien HepG2 (Leberzelllinie) und RAW264.7 (Makrophagenzelllinie) verwendet [66-68]. Durch Reporteragen-Assays konnte der Bindung des ABCA1-Promotors durch HIF1 eindeutig eine Rolle in der Regulation dieses Genes *in vitro* zugeordnet werden. Dazu wurde im Luciferase-Assay die Promotor-Aktivität von ABCA1 nach Co-Transfektion mit den Expressionskonstrukten für HIF1 $\alpha$  und ARNT mit der Promotor-Aktivität

von VEGF verglichen. Dabei zeigte sich eine hohe basale Luciferase-Aktivität nach Transfektion mit dem ABCA1-Promotor in HepG2-Zellen, die durch die Co-Transfektion dieser Zellen mit den Expressionskonstrukten für HIF1 extrem gesteigert werden konnte (siehe 3.3.1). Insgesamt zeigte sich eine vergleichbare Tendenz der Promotor-Aktivitäten des ABCA1- und VEGF-Promotors, dessen Bindung durch HIF1 bereits bekannt ist [54] (siehe 3.3.1).

Die basale Luciferase-Aktivität nach Transfektion des ABCA1-Promotors in RAW 264.7 Zellen war dagegen eher gering (siehe 3.3.2), konnte aber auch - wie bei den HepG2-Zellen - durch die Co-Transfektion mit den Expressionskonstrukten für HIF1 gesteigert werden. Allerdings war die Luciferase-Aktivität des VEGF-Promotors um rund das 10-fache höher als die des ABCA1-Promotors (siehe 3.3.2).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der ABCA1-Promotor ebenso wie der VEGF-Promoter durch den Faktor HIF1 reguliert wird. Der VEGF-Promotor kann durch alleinige Überexpression der HIF1 $\alpha$ -Untereinheit eine hohe Aktivität erreichen, die durch Co-Transfektion beider Untereinheiten zusätzlich gesteigert werden kann (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Steigerung der Promotor-Aktivität von ABCA1 nur durch das Zusammenspiel beider HIF1-Untereinheiten erreicht werden (siehe 3.3.1 und 3.3.2).

Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass auch nur eine funktionelle Einheit bestehend aus HIF1 $\alpha$  und ARNT zur Aktivierung des ABCG2-Promotors führt. HIF1 bindet dort an das *hypoxia response element* (R-CGTG) [51] auf dem Exon 1 des Promotors [69;70]. ABCG2 gehört wie ABCA1 zur Familie der ABC-Transporter.

Der nächste logische Schritt war der Nachweis der Bindung des ABCA1-Promotors durch HIF1 *in vitro*. Dazu wurde ein Gelshift mit Kernextrakten aus HepG2-Zellen durchgeführt (siehe 3.4). Die Ergebnisse des Gelshifts zeigten eine spezifische Bindung des ABCA1-Promotors durch diesen Transkriptionsfaktor. Anhand dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass HIF1, ebenso wie beim Promotor von VEGF [71], an die E-box des ABCA1-Promotors bindet und dadurch zu einer direkten Induktion der

Expression dieses Gens führt (siehe 3.4). Auch im Fall von ABCG2 konnte eine direkte Bindung des Transkriptionsfaktors HIF1 an das proximale HRE-Element (-116bp), das dem E-Box Motiv entspricht, mittels EMSA nachgewiesen werden [69].

## 4.2 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte die transkriptionelle Regulation des ABCA1-Promotors durch den Transkriptionsfaktor HIF1 in den für den Lipidstoffwechsel relevanten Zellen HepG2 und RAW 264.7 nachgewiesen werden. Mittels DNA-Mikroarrays konnte bereits eine ABCA1-Regulation unter hypoxischen Bedingungen und durch Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von HIF1 $\alpha$  in menschlichen Endothelzellen [54] und unter hypoxischen Bedingungen in RPTEC-Zellen [69] gezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen insgesamt darauf schließen, dass HIF1 eine Rolle bei der Regulation des ABCA1-Promotors spielt. Durch Luciferase-Promotor-Assays konnte eine vermehrte ABCA1-Expression in HepG2- und RAW264.7-Zellen durch den Transkriptionsfaktor HIF1 bestätigt werden (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Außerdem zeigte sich eine direkte Bindung des Promotors durch die funktionelle Einheit, bestehend aus HIF1 $\alpha$  und ARNT, im Gelshift-Assay an die E-Box (siehe 3.4). Auch Krishnamurthy *et al.* konnten eine direkte Regulation des ABCG2-Promotors durch HIF1 mittels EMSA an das proximale HRE-Element (-116bp) des Promotors nachweisen [69]. Da beide Promotoren ein E-Box Element besitzen, könnten auch andere Promotoren, die diese Sequenz enthalten, durch HIF1 reguliert werden.

Zusätzlich zu der direkten Regulation des ABCA1-Promotors durch HIF1 könnten auch indirekte Faktoren im HIF1-Stoffwechselweg zu einer verstärkten ABCA1-Expression führen. Die Stimulation des ABCA1-Promotors durch direkte Coaktivatoren von HIF1 $\alpha$ , wie CPB, p300, SRC1 und TIF2 [72-74], konnte bereits nachgewiesen werden, so dass eine indirekte Aktivierung von ABCA1 ebenfalls denkbar ist. SRC1, SRC2, CBP und p300 binden über das LXR/RXR Heterodimer an das DR-4 Element des ABCA1-Promotors (siehe Abbildung 5)

und führen so zu einer maximalen Aktivierung des ABCA1-Promotors [75]. Weiterhin konnte eine Hochregulation des Promotors mit einer Mutation im DR-4 Element durch p300 gezeigt werden, was auf eine LXR/RXR unabhängige Co-Aktivierung des ABCA1-Promotors durch p300 hindeutet [75].

Zur weiteren Charakterisierung der ABCA1-Regulation durch HIF1 können folgende Experimente hilfreich sein:

Eine andere Strategie zum Nachweis der Regulation der ABCA1-Expression durch HIF1 *in vitro* ist die Modulation dieses Transkriptionsfaktors. Dazu kann mittels siRNA ein *knockdown* der HIF1 $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten erreicht werden, der zu einer verminderten ABCA1-Expression führen sollte.

Außerdem kann eine Überprüfung der Resultate auf Protein-Ebene mittels Co-Immunpräzipitation erfolgen. Diese dient dem Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. ABCA1 und seine Interaktionspartner können im Anschluss, mithilfe eines Western Blots, detektiert werden.

Der nächste logische Schritt wäre der Nachweis der Bindung des ABCA1-Promotors durch HIF1 *in vivo*, da elementare Parameter, die die Regulation der Gene innerhalb lebender Zellen bestimmen, im Rahmen der *in vitro* Experimente nicht oder nur teilweise berücksichtigt werden. Dazu gehören unter anderem der Chromatinstatus, spezifische endogene Interaktionspartner und die physiologische Konzentration des Faktors. Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) bietet die Möglichkeit einer *in vivo* Bindung von HIF1 an den ABCA1-Promotor in Makrophagen und HepG2-Zellen zu untersuchen. Diese Bindung kann dann mit spezifischen Primern für die E-Box im ABCA1-Promoter via PCR nachgewiesen werden.

Die vorgestellten Experimente könnten zu einer weiteren Aufklärung der Rolle von HIF1 und ABCA1 im Lipidstoffwechsel beitragen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Dean M and Allikmets R, Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 5: 79-85, 1995.
2. Stefkova J, Poledne R, and Hubacek JA, ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res.* 53: 235-243, 2004.
3. Dean M, Hamon Y, and Chimini G, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J.Lipid Res.* 42: 1007-1017, 2001.
4. Quinton PM, Physiological Basis of Cystic Fibrosis: A Historical Perspective. *Physiological Reviews* 79: 3-22, 1999.
5. Schmitz G and Langmann T, Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. *Curr Opin Lipidol.* 12: 129-140, 2001.
6. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe K, Aslanidis C, Lackner KJ, and Schmitz G, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat.Genet.* 22: 347-351, 1999.
7. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, and et al., Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat.Genet.* 22: 336-345, 2006.
8. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, and Assmann G, Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat.Genet.* 20: 96-98, 1999.
9. Allikmets R, Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease. *Am.J.Hum.Genet.* 67: 793-799, 2000.
10. de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink RP, and Hadchouel M, Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95: 282-287, 1998.

11. Jacquemin E, de Vree JM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, Scheffer GL, Paul M, Burdelski M, Bosma PJ, Bernard O, Hadchouel M, and Elferink RP, The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* 120: 1448-1458, 2001.
12. Dean M and Allikmets R, Complete Characterization of the Human ABC Gene Family. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33: 2001.
13. Schmitz G, Kaminski WE, and Orso E, ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Curr Opin Lipidol.* 11: 493-501, 2000.
14. Schmitz G, Langmann T, and Heimerl S, Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J.Lipid Res.* 42: 1513-1520, 2001.
15. Borst P, Zelcer N, and van Helvoort A, ABC transporters in lipid transport. *Biochim.Biophys.Acta* 1486: 128-144, 2000.
16. Dean M, Hamon Y, and Chimini G, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J.Lipid Res.* 42: 1007-1017, 2001.
17. Dean M, Hamon Y, and Chimini G, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J.Lipid Res.* 42: 1007-1017, 2001.
18. Dean M, Hamon Y, and Chimini G, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J.Lipid Res.* 42: 1007-1017, 2001.
19. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, and Gay NJ, Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951, 1982.
20. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, and Gallagher MP, Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 365, 1990.
21. Kaminski WE, Orso E, Diederich W, Klucken J, Drobnik W, and Schmitz G, Identification of a novel human sterol-sensitive ATP-binding cassette transporter (ABCA7). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273: 532-538, 2000.
22. Kaminski WE, Piehler A, and Schmitz G, Genomic organisation of the human cholesterol-responsive ABC transporter ABCA7: tandem linkage with the minor histocompatibility antigen HA-1 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278: 782-789, 2000.



23. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani M-F, Chimini G, Kaminski WE, and Schmitz G, Molecular cloning of the human ATP-binding cassette Transporter 1 (hABC1): Evidence for sterol-dependent Regulation in Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257: 29-33, 1999.
24. Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, and Wade DP, ABCA1 is the cyclic AMP-inducible apo-lipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J. Biol. Chem.* 275: 34511, 2006.
25. Szakacs G, Langmann T, Ozvegy C, Orso E, Schmitz G, Varadi A, and Sarkadi B, Characterization of the ATPase cycle of human ABCA1: implications for its function as a regulator rather than an active transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288: 1264, 2001.
26. Renz-Polster H, Krautzig S, and Braun J, *Basislehrbuch Innere Medizin*. Elsevier Urban und Fischer, 2004.
27. Wang N, Silver DL, Thiele C, and Tall AR, ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) Functions as a Cholesterol Efflux Regulatory Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 23742-23747, 2001.
28. Schmitz G and Langmann T, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1735: 1-19, 2005.
29. Schmitz G and Langmann T, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1735: 1-19, 2005.
30. Bjorkhem I, Diczfalussy U, and Lutjohann D, Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. *Curr Opin Lipidol.* 10: 161-165, 1999.
31. Schmitz G and Langmann T, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1735: 1-19, 2005.
32. Takahashi K, Kimura Y, Nagata K, Yamamoto A, Matsuo M, and Ueda K, ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. *Med Mol Morphol* 38: 2-12, 2005.
33. [www.uni-regensburg.de/fakultaeten/medizin/klinische-Chemie/abca1.htm](http://www.uni-regensburg.de/fakultaeten/medizin/klinische-Chemie/abca1.htm). 2006.

Ref Type: Electronic Citation



34. Asztalos BF, Brousseau ME, McNarma JR, Horvath KV, Roheim PS, and Schaefer EJ, Subpopulations of highdensity lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease. *Atherosclerosis* 156: 217-225, 2001.
35. Bojanovski D, Gregg RE, Zech LA, Meng MS, Bishop C, Ronan R, and Brewer HB, In vivo metabolism of proapolipoprotein A-I in Tangier disease. *J.Clin.Invest* 80: 1742-1747, 1987.
36. Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, and et al., Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat.Genet.* 24: 192-196, 2000.
37. Zannis VL, Chroni A, and Krieger M, Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med* 84: 276-294, 2006.
38. Yokoyama S, ABCA1 und biosynthesis of HDL. *Journal Atherosclerosis and Thrombosis* 13: 1-15, 2006.
39. Schmitz G and Langmann T, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim.Biophys.Acta* 1735: 1-19, 2005.
40. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, and Mangelsdorf DJ, Regulation of absorbtion and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289: 1524-1529, 2000.
41. Schmitz G and Langmann T, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim.Biophys.Acta* 1735: 1-19, 2005.
42. Lund EG, Menke JG, and Sparrow CP, Liver X receptor agonists as potential therapeutic agents for dyslipidemia and atherosklerosis. *Arterioscler., Thromb., Vasc.Biol.* 23: 1169-1177, 2003.
43. Schmitz G and Langmann T, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim.Biophys.Acta* 1735: 1-19, 2005.
44. Schmitz G and Langmann T, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim.Biophys.Acta* 1735: 1-19, 2005.
45. Schmitz G and Langmann T, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim.Biophys.Acta* 1735: 1-19, 2005.

46. Semenza GL, Signal transduction to hypoxia inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology* 64: 993-998, 2002.
47. Semenza GL, Hypoxia inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *TRENDS in Molecular Medicine* 7: 345-350, 2001.
48. Richard DE, Berra E, Gothie´ E, Roux D, and Pouyssegur J, p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 32631-32637, 1999.
49. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, and Kim KW, Hypoxia inducible factor 1(HIF1) alpha: its protein stability and biological functions. *Experimental and Molekular Medicine* 36: 1-12, 2006.
50. Dery M-AC, Michaud MD, and Richard DE, Hypoxia inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37: 535-540, 2004.
51. Semenza GL, Expression of hypoxia inducible factor 1:Mechanisms and Consequenzen. *Biochemical Pharmacology* 59: 47-53, 2000.
52. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, and Semenza GL, Cell Type-Specific Regulation of Angiogenic Growth Factor Gene Expression and Induction of Angiogenesis in Nonischemic Tissue by a Constitutively Active Form of Hypoxia-Inducible Factor 1. *Circ Res* 93: 1074-1081, 2003.
53. Josko J and Mazurek M, Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Medi Sci Monit* 10: 89-98, 2004.
54. Manolo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JGN, and Semenza GL, Transkriptional regulation of vascular endothelial cell response to hypoxia by HIF1. *BLOOD* 105: 659-669, 2005.
55. Schmitz G and Langmann T, Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim.Biophys.Acta* 1735: 1-19, 2005.
56. Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, and Lund EG, 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J.Biol.Chem.* 276: 38378-38387, 2001.

- 
57. Mauldin JP, Srinivasan S, Mulya A, Gebre A, Parks JS, Daugherty A, and Hedrick CC, Reduction in ABCG1 in Type 2 diabetic mice increases macrophage foam cell formation. *J.Biol.Chem.* 281: 21216-21224, 2006.
58. Cuaz-Perolin C, Furman C, Larigauderie G, Legedz L, Lasselin C, Copin C, Jaye M, Searfoss G, Yu KT, Duverger N, Negre-Salvayre A, Fruchart JC, and Rouis M, REDD2 gene is upregulated by modified LDL or hypoxia and mediates human macrophage cell death. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24: 1830-1835, 2004.
59. Nakazato K, Ishibashi T, Nagata K, Seino Y, Wada Y, Sakamoto T, Matsuoka R, Teramoto T, Sekimata M, Homma Y, and Maruyama Y, Expression of very low density lipoprotein receptor mRNA in circulating human monocytes: its up-regulation by hypoxia. *Atherosclerosis* 155: 439-444, 2001.
60. Lattimore JD, Wilcox I, Nakhla S, Langenfeld M, Jessup W, and Celermajer DS, Repetitive hypoxia increases lipid loading in human macrophages-a potentially atherogenic effect. *Atherosclerosis* 179: 255-259, 2005.
61. Kerr LD, Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol.* 254: 19-32, 1995.
62. database of transcriptional start sites. <http://dbtss.hcg.jp> . 2006.  
Ref Type: Electronic Citation
63. primer 3. <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> . 2006.  
Ref Type: Electronic Citation
64. webcutter. <http://ma.lundberg.gu.se/cutter2> . 2006.  
Ref Type: Electronic Citation
65. Chi J-T, Wang Z, Nuyten DSA, Rodriguez EH, Schaner ME, Salim A, Wang Y, Kristensen GB, Helland A, Borresen-Dale A-L, Giaccia A, Longaker MT, Hastie T, Yang GP, van de Vijver MJ, and Brown PO, Gene Expression Programs in Response to Hypoxia: Cell Type Specificity and Prognostic Significance in Human Cancers. *Plos Medicine* 3: 0395-0409, 2006.
66. Bortnick AE, Rothblat GH, Stoudt G, Hoppe KL, Royer LJ, McNeish J, and Francone OL, The Correlation of ATP-binding Cassette 1 mRNA Levels with Cholesterol Efflux from various cell lines. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 28634-28640, 2000.

67. Denis M, Bissonette R, Haidar B, Krimbou L, Bouvier M, and Genest J, Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines. *Molecular Genetics and Metabolism* 78: 265-274, 2003.
68. Zarubica A, Trompier D, and Chimini G, ABCA1, from pathology to membrane function. *Eur J Physiol* 453: 569-579, 2007.
69. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, and Schuetz JD, The Stem Cell Marker Bcrp/ABCG2 Enhances Hypoxic Cell Survival through Interactions with Heme. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 24218-24225, 2004.
70. Kusuvara H and Sugiyama Y, ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Eur J Physiol* 453: 735-744, 2007.
71. Forsythe JA, Jiang B-H, Iyer N, Agani F, Leung SW, Koos R, and Semenza GL, Activation of vascular endothelial growth factor gene transkription by hypoxia inducible factor 1. *Molecular and cellular Biology* 16: 4604-4613, 1996.
72. Arany Z, Huang LE, Eckner S, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, and Livingston DM, An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 93: 12969-12973, 1996.
73. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O`Brian S, Tanaka H, and Poellinger L, Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular and cellular Biology* 20: 402-415, 2000.
74. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, and Fujii-Kuriyama Y, Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18: 1905-1914, 1999.
75. Huuskonen J, Fielding PE, and Fielding CJ, Role of p160 coactivator complex in the activation Liver X Receptor. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24: 703-708, 2004.

## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 6.1 Abbildungen

- Abbildung 1: Dreidimensionaler schematischer Aufbau eines funktionstüchtigen fullsize ABC- Transporters mit seinen Transmembrandomänen und den ATP binding cassettes (=ABC). 7
- Abbildung 2: Der ABCA1-Transporter vermittelt den Cholesterinausstrom aus peripheren Zellen auf HDL-Vorstufen. Dieses Lipid wird von HDL und seinen Vorläuferpartikeln übernommen. Das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert HDL assoziiertes Cholesterin im Plasma. Schließlich entstehen sphärische HDL-Partikel (HDL3 und die größeren HDL2). Phospholipid-Transfer-Protein (PLTP), Cholesterin-Transfer-Protein (CETP), hepatische Lipase (HL) und endotheliale Lipase (EL) modifizieren HDL-Partikel im Plasma. HDL assoziierte Cholesterinester werden von der Leber aufgenommen oder in andere Lipoproteine umgewandelt [5]. 10
- Abbildung 3: Model für Lipideinstrom,-Synthese, -Speicherung und -Ausstrom [31]. 12
- Abbildung 4: Mutationen von ABCA1 die zu der Tangier Erkrankung führen [33]. 13
- Abbildung 5: Aktivierende Mechanismen des ABCA1-Promotors [45]. 16
- Abbildung 6: Struktur und Funktion von HIF1 [50]. Funktions- und Bindedomänen mit deren Co-Faktoren von HIF1 $\alpha$  und  $\beta$ . bHLH: basic helix loop helix, ODD: oxygen dependent degradation domain, TAD-N und TAD-C: N und C terminale Aktivierungsdomäne, NLS: nuclear localisation signal, PAS: per ARNT sim 19
- Abbildung 7: Signaltransduktion von HIF1 20

Abbildung 8: Hypoxie und Wachstumsfaktor abhängige Signaltransduktion von HIF1 $\alpha$ . [46]	21
Abbildung 9: Schematische Darstellung des pGL3 basic Vektors.	44
Abbildung 10: Agarosegel der PCR-Produkte. 1: Primer VEGF-Luc-1032, VEGF-Luc+432. 2: VEGF-Luc-1032, VEGF-Luc+398. 3: VEGF-Luc-990, VEGF-Luc+398. 4: VEGF-Luc-990, VEGF-Luc+432. 5: Nr 2 + 2 $\mu$ l Mg <sup>2+</sup> . 6: Nr 3 + 2 $\mu$ l Mg <sup>2+</sup> . 7: Nr 4 + 2 $\mu$ l Mg <sup>2+</sup>	52
Abbildung 11 : Auf der linken Seite sieht man das PCR-Produkt mit den Primern VEGF-Luc-1032 und VEGF-Luc+432. Auf der rechten Seite das Agarosegel nach Ausschneiden der Bande.	52
Abbildung 12: Kontrollverdau der isolierten Plasmide	53
Abbildung 13: Ausschnitt aus der Sequenz des VEGF-Promotors von Klon 13. Die XhoI Schnittstelle ist durch den Rahmen hervorgehoben. An dieser Stelle liegt der Übergang von Vektor zu Insert.	54
Abbildung 14: Luciferaseaktivitäten der verschiedenen Transfektionen in HepG2-Zellen. Die gemittelten Aktivitäten (RLU = relative light units) des pGL3 basic Vektors wurden als 1 gesetzt.	57
Abbildung 15: Luciferaseaktivitäten der verschiedenen Transfektionen in RAW 264.7 Zellen. Die gemittelten Aktivitäten (RLU = relative light units) des pGL3 basic Vektors wurden als 1 gesetzt.	59
Abbildung 16: Gelshift-Assay mit Kernextrakten von HepG2-Zellen. Als DNA-Sonde wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid verwendet, welches die Sequenz des humanen ABCA1-Promotors enthielt. Spur 1: Free Probe, Spur 2: Zellkernextrakt von untransfizierten HepG2-Zellen, Spur 3: Zellkernextrakt von HepG2-Zellen nach Transfektion mit HIF1 $\alpha$ , Spur 4: Zellkernextrakt von HepG2-Zellen nach Transfektion mit ARNT, Spur 5: Zellkernextrakt von HepG2-Zellen nach Transfektion mit HIF1 $\alpha$ und ARNT, Spur 6: Konkurrenz mit unmarkiertem Oligonukleotid des Zellkernextrakts aus Spur 5, Spur 7: Konkurrenz mit mutanter Form des Oligonukleotids	

des Zellkernextrakts aus Spur 5, Spur 8: Zellkernextrakt aus Spur 5 mit zusätzlichem Antikörper gegen HIF1 $\alpha$ .	61
---	----

## 6.2 Tabellen

Tabelle 1: Überblick über die Domänenstruktur, Gewebsexpression und Funktion von humanen ABC-Transportern.....	6
Tabelle 2: HIF1 regulierte Gene [37] .....	17
Tabelle 3: verwendete Geräte .....	26
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien, ihre Verwendung und Hersteller.....	27
Tabelle 5: Chemikalien, Verwendung und ihre Hersteller.....	27
Tabelle 6: verwendete Medien und Zusätze .....	28
Tabelle 7: verwendete Puffer und Lösungen .....	28
Tabelle 8: verwendete Plasmide.....	29
Tabelle 9 verwendete Oligonukleotide.....	29
Tabelle 10: verwendete Nukleotide .....	30
Tabelle 11: Enzyme, Verwendung und Hersteller.....	31
Tabelle 12: verwendete Organismen und Zellen, ihre Eigenschaften und Herkunft.....	31
Tabelle 13: Pipettierschema für den Gelshift-Assay .....	48

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

geboren am	15.08.1983
in	Sulzbach-Rosenberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Schulbildung

1989-1993	Grundschule Ursensollen
1993-2002	Max-Reger-Gymnasium Amberg

### Studium

2002-2004	Vorklinischer Studienabschnitt an der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg
2004-2008	Klinischer Studienabschnitt am Klinikum der Universität Regensburg

### Berufstätigkeit

seit Januar 2009	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Abteilung für Unfallchirurgie, Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg
------------------	---



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Langmann für die Überlassung dieses Themas. Durch seine Anleitung, Motivation und ständige Diskussionsbereitschaft hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dank gebührt auch Karin Weigelt, Peter Ugocsai, Josef Ecker, Manfred Haas und Wolfgang Hauer für die angenehme Atmosphäre im Labor und die gute Zusammenarbeit. Jeder von ihnen war stets hilfsbereit, wenn es um die Lösung von Fragen und Problemen ging.

Mein ganz herzlicher Dank gilt meiner Familie, durch deren Unterstützung es mir möglich war, diese Arbeit zu einem guten Abschluss zu führen.