

Zellzyklus

Eine neue Funktion für HIF: die Umstellung des Metabolismus im Zellzyklus

JAN DREUTE*, MAXIMILIAN PFISTERER*, M. LIENHARD SCHMITZ

* GETEILTE ERSTAUTORSCHAFT

BIOCHEMISCHES INSTITUT, UNIVERSITÄT GIESSEN

The family of hypoxia-inducible transcription factors (HIF) is typically activated by low oxygen concentrations. We observed a transient increase of the HIF-1 α protein levels during the G1 phase of the cell cycle, designated as G1-HIF. This cell cycle-regulated form of HIF ensures cell proliferation and survival under conditions of metabolic stress by increasing the levels of key metabolites during the cell cycle. The generation of G1-HIF depends on an AMPK-mediated signaling pathway.

DOI: 10.1007/s12268-024-2341-4

© The Author(s) 2024

■ Proliferierende Zellen durchlaufen eine orchestrierte Abfolge von Ereignissen, die Wachstum und Verdopplung des genetischen Materials sowie die Zellteilung ermöglichen. Der Zellzyklus ist in zwei Abschnitte unterteilt: Interphase und Mitose. Die Interphase läuft in drei Phasen ab: die erste Gap-Phase (G1-Phase), die Synthese-Phase (S-Phase) und die zweite Gap-Phase (G2-Phase). Sowohl der Eintritt in den Zellzyklus als auch die einzelnen Phasen werden durch verschiedene Kontrollmechanismen auf unterschiedlichen hierarchischen Ebenen reguliert. Dabei kann der Zellzyklus beim Auftreten unterschiedlicher Probleme wie beispielsweise DNA-Schädigung, fehlerhafter Replikation

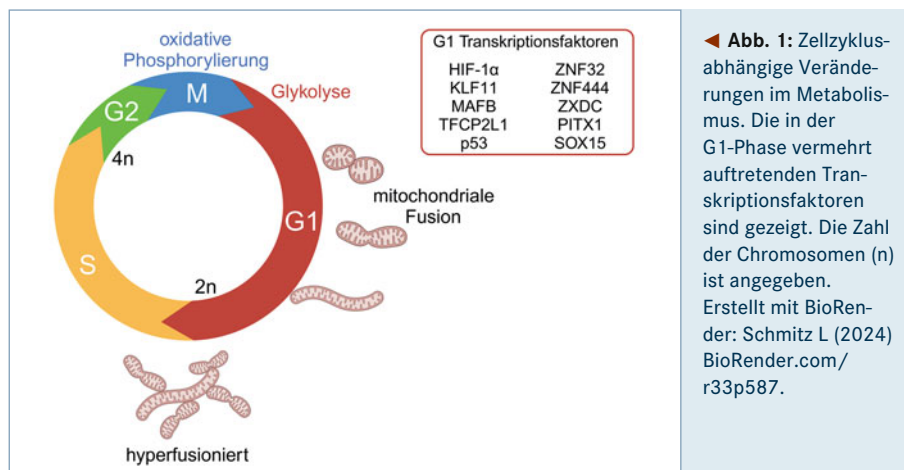
oder inkompletter Anheftung von Chromosomen an den Spindelapparat sowie bei Nährstoffmangel angehalten werden. Diese Kontrollpunkte (*checkpoints*) stellen die fehlerfreie und kontrollierte Verdopplung der Zellen sicher und wirken der Entstehung proliferativer Erkrankungen entgegen. Das molekulare Uhrwerk für das unidirektionale Durchlaufen der Zellzyklus-Phasen verwendet verschiedene cyclinabhängige Kinasen (CDKs), deren Aktivität von den jeweiligen Cyclinen kontrolliert wird [1].

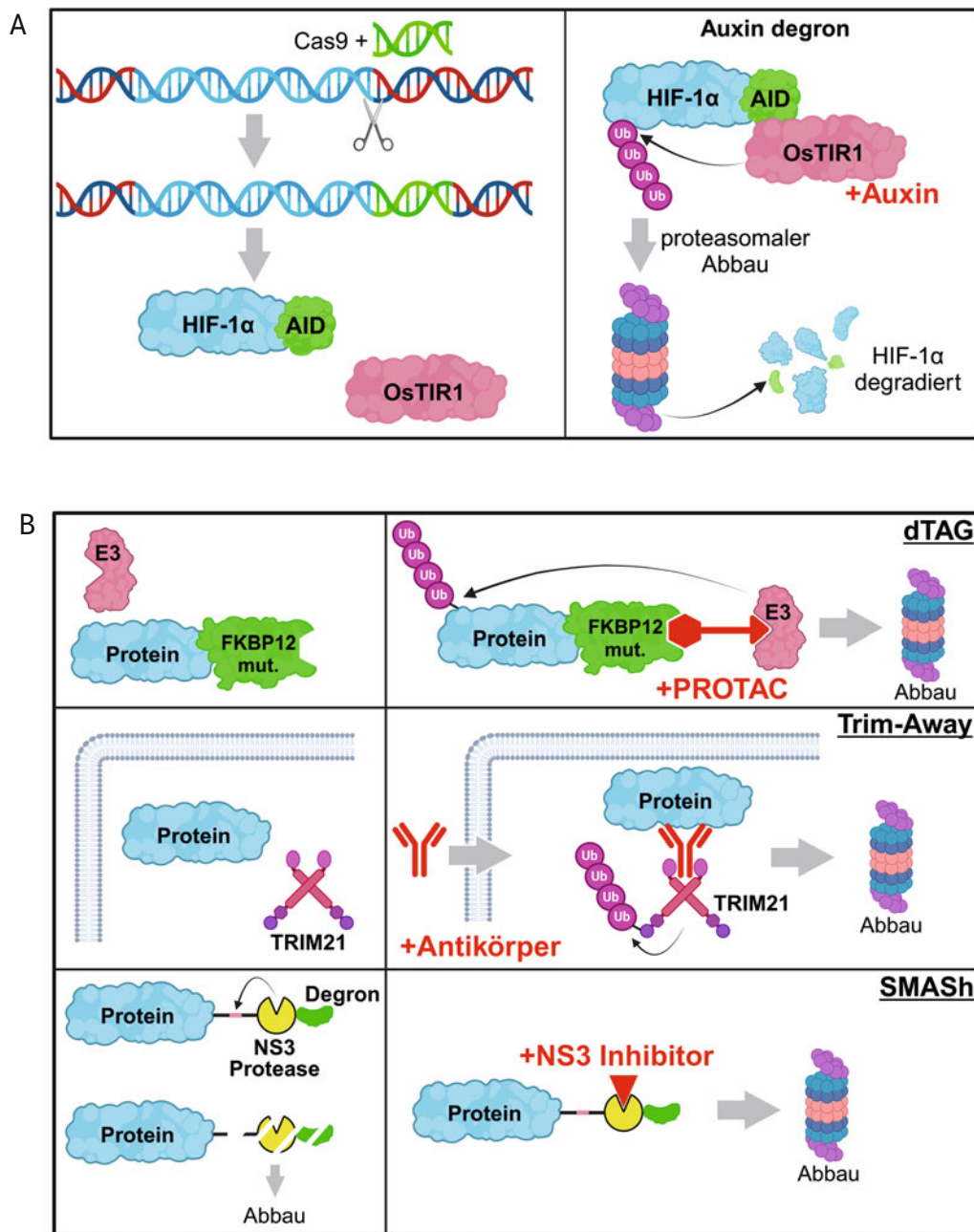
Die Verdopplung einer Zelle erfordert nicht nur die Replikation der DNA, sondern auch aller anderen molekularen Bausteine, was eine anabole Anpassung des Metabolis-

mus erfordert. Dabei ist die G1-Phase durch eine erhöhte Glykolyse, die G1/S-Phase durch die verstärkte Synthese von Nukleotidvorstufen für die Synthese von DNA und die Mitose durch eine erhöhte oxidative Phosphorylierung charakterisiert [2]. Bei Hefen verändert sich mehr als 50 % des Metaboloms im Zellzyklus, um den Anforderungen zur Durchführung der Zellverdopplung gerecht zu werden. Um die Proliferation unter Bedingungen des Nährstoffmangels zu verhindern, gibt es einen Kontrollpunkt in der G1-Phase, der bei Hefen als „Start“ und bei Zellen aus Säugetieren als Restriktionspunkt „R“ bekannt ist. Bei diesem nur unzureichend verstandenen Kontrollpunkt werden die Nährstoffkonzentrationen und die Zellgröße gemessen und überwacht, um bei geeigneten Bedingungen den irreversiblen Eintritt in den Zellzyklus zu ermöglichen. Diese Erkennung der Nährstoffverfügbarkeit wird durch verschiedene Sensorenzyme vermittelt, darunter die Kinasen mTOR und AMPK.

G1-HIF

Die verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich differentieller Enzymaktivitäten, sondern auch bezüglich schwankender Mengen vieler Proteine. Da im Zellzyklus diese unterschiedlichen Proteinmengen häufig nicht mit Veränderungen der zugehörigen mRNAs korrelieren [3], können Unterschiede nur mittels massenspektrometrischer oder anderer proteinanalytischer Verfahren untersucht werden. Darüber hinaus detektieren proteinanalytische Methoden auch massive Veränderungen in posttranslationalen Modifikationen sowie der Thermostabilität und Komplexbildung von Proteinen während des Zellzyklus [4, 5]. In unseren Studien zu Zellzyklus-spezifischen Signalvorgängen entdeckten wir in Western-Blot-Experimenten einen transienten Anstieg der Menge des typischerweise durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) aktivierten Transkriptionsfaktors HIF-1 α während der G1-Phase. Wir nannten das in der G1-Phase auftretende Protein G1-HIF, um es vom Hypoxie-regulierten





▲ **Abb. 2:** Strategien zum induzierten Abbau endogener Proteine. **A,** Links: Mittels CRISPR-Cas9 wird die genomische DNA so verändert, dass die für HIF-1 α (blau) und das AID (grün) codierenden Sequenzen zur Expression eines Fusionsproteins führen. Rechts: Nach Zugabe von Auxin kommt es zur Bindung der Ubiquitin-E3-Ligase OsTIR1 an das AID und somit zum Abbau des Fusionsproteins über das Ubiquitin-Proteasomen-System. Erstellt mit BioRender: Schmitz L (2024) BioRender.com/c31a030. **B,** schematische Darstellung weiterer ausgewählter induzierbarer Degradations-Systeme. Die linken Spalten stellen den Zustand in Gegenwart des Zielproteins dar. Die rechten Spalten zeigen die induzierten Abbauewege nach Zugabe der degradierenden Agenzien (rot). In jedem gezeigten Beispiel wird das Zielprotein (blau) durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert. Erstellt mit BioRender: Schmitz L (2024) BioRender.com/n04o550.

HIF-1 α funktionell zu unterscheiden [6]. Aber G1-HIF ist nicht der einzige Transkriptionsfaktor, der während der G1-Phase in erhöhten Mengen zu finden ist. Unter der Gruppe der in **Abbildung 1** dargestellten und

während der G1-Phase erhöhten Transkriptionsfaktoren findet sich auch das p53-Protein [7], das – ähnlich wie HIF-1 α – einen zentralen Regulator zahlreicher zellulärer Funktionen darstellt.

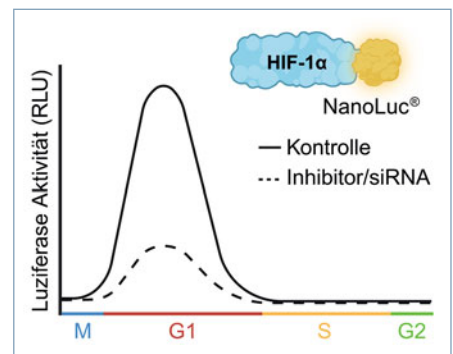
Gezielte Protein-Inaktivierung von G1-HIF

Welche Rolle spielt das G1-HIF-Protein im Zellzyklus? Um diese Frage zu beantworten, wählten wir einen *loss-of-function*-Ansatz.

Dabei sollte das untersuchte Protein reversibel, schnell und zu einem genau definierten Zeitpunkt eliminiert werden können. Hierzu verwendeten wir das in **Abbildung 2A** dargestellte Auxin Degron. Für den gesteuerten Abbau von G1-HIF wurden mithilfe der Genschiere CRISPR-Cas9 und Homologie-gesteuerter Reparatur Zelllinien hergestellt, welche die Expression des endogenen HIF-1 α -Proteins in Fusion mit einem Auxin-induzierten Degron (AID) erlauben. Diese AID-Proteinsequenz wird von einer in Reis-pflanzen vorkommenden Ubiquitin-E3-Ligase (OsTIR1) in Gegenwart des Pflanzenhormons Auxin gebunden. Die anschließende Ubiquitinierung führt zum proteasomalen Abbau des HIF-1 α -AID-Proteins innerhalb einer Stunde nach Gabe von Auxin und ermöglichte daher weitere funktionelle Untersuchungen.

Das Spektrum an Methoden zum gezielten Abbau endogener Proteine hat sich durch die Entwicklung der CRISPR-Cas vermittelten Genomeditierung enorm erweitert und hat für die Analyse von Proteinfunktionen eine kaum zu überschätzende Bedeutung. Weitere

ausgewählte Systeme zum spezifischen und gesteuerten Abbau endogener Proteine für die Leserschaft des Specials *Proteomics & Proteinanalytik* illustrieren wir in **Abbildung 2B**, zusätzliche Beispiele finden sich in der weiterführenden Literatur [8]. Beim *degradation tag* (dTAG) wird das abzubauenende Zielprotein als Fusionsprotein mit dem mutierten FKBP12^{F36V}-Protein exprimiert. Induziert wird dessen Degradation durch ein PROTAC (*proteolysis targeting chimeras*), einem chimären Molekül, das über den dTAG sowohl an das Zielprotein als auch an eine Ubiquitin-E3-Ligase bindet und sie somit in direkte räumliche Nähe bringt. Anschließend kommt es zur Poly-Ubiquitinierung des Zielproteins und dem Proteasomen-vermittelten Abbau. Beim *trim-away system* wird die Eigenschaft der Ubiquitin-E3-Ligase Trim21 zur Bindung von Antikörpern genutzt, welche natürlicherweise zytosolische Pathogene bedecken. Durch Mikroinjektion oder Elektroporation eingeführte Antikörper reichen aus, um eine Auto-Ubiquitinierung von Trim21 und den anschließenden Abbau des Antikörperge-



▲ **Abb. 3:** Quantifizierung der HIF-1 α -Proteinexpression. In Zellen, die das HIF-1 α -NanoLuc[®] Fusionsprotein exprimieren, wurden Kandidaten-Proteine mithilfe von Inhibitoren oder siRNAs gehemmt. Nach Arretierung in der Mitose wurde den Zellen der synchrone Eintritt in den Zellzyklus ermöglicht, dabei erfolgte der transiente Anstieg der Luziferase-Aktivität in der G1-Phase. In Gegenwart von Inhibitoren oder siRNAs gegen AMPK war der Anstieg der Lichtemission (gemessen in *relative light units*, RLU) stark gehemmt (gestrichelte Linie). Erstellt mit BioRender: Schmitz L (2024) BioRender.com/w09j355.

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer

bundenen Zielproteins zu erreichen. Bei Verwendung des SMASH (*small molecule-assisted shut-off*)-Systems wird das abzubauen Zielprotein mit der Hepatitis-C-Virus-NS3-Protease, einem Degron sowie einer spezifischen Schnittstelle für die NS3-Protease fusioniert. Damit trennt die intramolekulare Spaltung durch NS3 die Degron-enthaltende Kasette vom Zielprotein ab, sodass dessen Stabilität erhalten bleibt. Nach Zugabe eines hochspezifischen NS3-Inhibitors (Asunaprevir) wird die Abspaltung blockiert und das unprozessierte Zielprotein entsprechend rasch abgebaut.

G1-HIF ist für die anabole Umstellung des Metabolismus während des Zellzyklus wichtig

Die Auxin-vermittelte Ausschaltung des G1-HIF-Proteins hatte keine erkennbaren Effekte auf den Ablauf des Zellzyklus und die Zellproliferation, ein Ergebnis, wie es auch vom Phänotyp der Organ-spezifischen Deletion des *HIF1A*-Gens in Mausmodellen zu erwarten war [9]. Eine Bedeutung von G1-HIF für die Zellproliferation zeigte sich erst bei metabolischen Mangelbedingungen nach starker Reduktion der Konzentrationen von Glukose und Pyruvat oder von Glutamin. Zellen mit intaktem G1-HIF überlebten den metabolischen Stress für mehrere Tage, während die Abwesenheit von G1-HIF zum Stopp der Proliferation und schließlich zur Induktion des Zelltods führte. Die Bestimmung von Metaboliten zeigte, dass G1-HIF sowohl unter nährstoffreichen als auch in nährstoffarmen Bedingungen einen wesentlichen Beitrag für den Zellzyklus-abhängigen Anstieg von vielen Aminosäuren und Kohlenhydraten zwischen der G1- und G2/M-Phase leistet. Während der Verlust von G1-HIF in nährstoffreichem Medium noch kompensiert werden konnte, resultierte die Abwesenheit von G1-HIF bei metabolischem Stress in einem Zusammenbruch der Aminosäure-Homöostase. Auch andere Stoffwechselwege werden durch G1-HIF reguliert, da die Abwesenheit dieses Transkriptionsfaktors zu niedrigeren Spiegeln von Hexose-6-phosphat, Galactose-6-phosphat, Malat und Laktat führten. Auch die extrazellulären Laktatspiegel waren in Abwesenheit von G1-HIF vermindert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass HIF-1 α nicht nur unter hypoxischen Bedingungen zu einem Umbau des zellulären Metabolismus führt, sondern auch die Zellzyklus-abhängige Umstellung metabolischer Wege orchestriert. RNA-Sequenzierungen zeigten, dass die metabolische Regulation

durch G1-HIF auf seiner Fähigkeit beruht, die Expression von Genen zu steuern, deren Produkte die Fettsäureoxidation, den Kohlenhydratstoffwechsel, den Citrat-Zyklus und den Aminosäure-Stoffwechsel regulieren [6].

Die Akkumulation von G1-HIF erfolgt über einen AMPK-regulierten Signalweg

Interessanterweise war das transiente Auftreten des G1-HIF-Proteins während der G1-Phase unabhängig vom klassischen Hypoxie-induzierten Signalweg, bei dem die Stabilität des Proteins durch eine Hydroxylierungs-abhängige Ubiquitinierung gesteuert wird. Um den verantwortlichen Signalweg für das Auftreten des G1-HIF-Proteins zu identifizieren, sollte die Messung dieses Proteins vereinfacht und beschleunigt werden. Dazu wurden Zellen generiert, bei denen das endogene HIF-1 α -Protein mit der NanoLuciferase (NanoLuc[®]) fusioniert ist. Da die Aktivität dieses NanoLuc-Reporter-Enzyms durch die Emission von Licht leicht quantifiziert werden kann, lässt sich die Expressionsmenge des HIF-1 α -NanoLuc-Fusionsproteins einfach und auch in lebenden Zellen bestimmen. Dies macht es für die weiteren Untersuchungen geeignet, deren schematischer Ablauf in **Abbildung 3** dargestellt ist. Die Verknüpfung von Proteinen mit leicht nachweisbaren Tags – wie der hier gewählten NanoLuc oder HiBiT-Peptiden – ist generell dazu geeignet, Veränderungen von Proteinmengen in lebenden Zellen und in Echtzeit zu quantifizieren. Daher haben sie eine große Bedeutung in der Proteinanalytik.

Zunächst wurde die Bedeutung potenzieller Sauerstoff-unabhängiger HIF-1 α -Aktivatoren für das Auftreten von G1-HIF untersucht, indem spezifische Inhibitoren genutzt oder die Proteinexpression dieser Kandidaten durch siRNAs reduziert wurden. Die quantitative Bestimmung der G1-HIF-Menge durch Messung von HIF-1 α -NanoLuc in der G1-Phase zeigte die Relevanz der Kinase AMPK für das Auftreten von G1-HIF. Weitere Untersuchungen erwiesen auch einen vorübergehenden Anstieg der AMPK-Enzymaktivität in der G1-Phase. Diese Ergebnisse bilden ein weiteres Beispiel für die engen und wechselseitigen Verknüpfungen zwischen metabolischen Regulationsmechanismen und dem Zellzyklus.

Abschließende Betrachtungen

Interessanterweise haben viele der im Zellzyklus regulierten Proteine einschließlich

des hier untersuchten G1-HIF-Proteins nach ihrer Inaktivierung keine direkte Funktion in diesem Prozess. Diese Beobachtung kann auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Zum einen wird häufig ein hohes Maß an funktioneller Redundanz und Promiskuität beobachtet, was am Beispiel der kanonischen CDK-Cyclin-Komplexe gut illustriert wird. Mit Ausnahme von CDK1 kann jede der Zellzyklus-regulierenden CDKs ohne Einschränkung der Zellproliferation ausgeschaltet werden, sogar die gleichzeitige Ausschaltung mehrerer CDKs kann ohne Effekt bleiben [10]. Zum anderen gibt es aber auch eine Gruppe von Proteinen, die lediglich eine Überwachungsfunktion haben und nur beim Auftreten von Problemen relevant werden. Ein Beispiel ist das auch in der G1-Phase hochregulierte p53-Protein, dessen genetische Eliminierung keinen Einfluss auf den Zellzyklus hat [11]. Erst beim Auftreten von DNA-Schädigung kommt es zu einer robusten p53-Aktivierung, welche zur vermehrten Expression des p21-Proteins führt und somit den Eintritt in die S-Phase verhindert. Ein weiteres Beispiel ist der Spindelkontrollpunkt, der sicherstellt, dass nur Zellen mit korrekt an den Spindelapparat angehefteten Chromosomen in die Anaphase übergehen, um damit das Auftreten von Polyploidie zu verhindern.

Die Ergebnisse unserer Experimente zeigen einen Beitrag des G1-HIF-Proteins zur Ausbildung einer anabolen Stoffwechsellaage ab der G1-Phase. Dabei dient dieses vorübergehend gebildete G1-HIF der Bereitstellung ausreichender Mengen von Bausteinen vor dem Beginn der metabolisch anspruchsvollen Prozesse der DNA-Synthese und der Verdopplung der Zellmasse. Vergleichbar mit der Funktion der oben genannten Proteine mit Überwachungsfunktion wird die Funktion des G1-HIF-Proteins erst beim Auftreten von metabolischen Mangelbedingungen sichtbar. Unter der in **Abbildung 1** dargestellten Gruppe von während der G1-Phase verstärkt exprimierten Transkriptionsfaktoren finden sich neben HIF-1 α und p53 auch KLF11, MAFB und TFCEP2L1 als weitere bekannte Regulatoren des Metabolismus.

Die Induktion von G1-HIF fällt zeitlich mit dem Restriktionspunkt zusammen, der funktional als der Punkt definiert ist, ab dem die Zelle unwiderruflich in die vollständige DNA-Synthese übergeht. Biochemisch wird der Restriktionspunkt durch die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins erkennbar. Zukünftige Studien können zeigen, inwie-

weit auch das Auftreten von G1-HIF sowie der von uns und anderen entdeckte Anstieg der AMPK-Aktivität während der G1-Phase [6, 12] weitere biochemische Charakteristika dieses Restriktionspunkts sind.

Danksagung

Die Unterstützung unserer Arbeiten erfolgt durch Fördermittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) SFB1213/2 (B03, Projekt 268555672), GRK 2573/2 (RP10, Projekt 416910386) und das Exzellenzcluster CPI (Projekt 390649896) sowie der EU (COST Action Senescence2030, CA23119). ■

Literatur

- [1] Sánchez I, Dynlacht BD (2005) New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 16: 311–321
- [2] Moncada S, Higgs EA, Colombo SL (2012) Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *Biochem J* 446: 1–7
- [3] Aviner R, Shenoy A, Elroy-Stein O, Geiger T (2015) Uncovering Hidden Layers of Cell Cycle Regulation through Integrative Multi-omic Analysis. *PLoS Genet* 11: e1005554
- [4] Becher I, Andres-Pons A, Romanov N et al. (2018) Pervasive Protein Thermal Stability Variation during the Cell Cycle. *Cell* 173: 1495–1507
- [5] Cuijpers SAG, Vertegaal ACO (2018) Guiding Mitotic Progression by Crosstalk between Post-translational Modifications. *Trends Biochem Sci* 43: 251–268
- [6] Belapurkar R, Pfisterer M, Dreute J et al. (2023) A transient increase of HIF-1alpha during the G1 phase (G1-HIF) ensures cell survival under nutritional stress. *Cell Death Dis* 14: 477
- [7] Mahdessian D, Cesnik AJ, Gnann C et al. (2021) Spatiotemporal dissection of the cell cycle with single-cell proteogenomics. *Nature* 590: 649–654
- [8] Verma R, Mohl D, Deshaies RJ (2020) Harnessing the Power of Proteolysis for Targeted Protein Inactivation. *Mol Cell* 77: 446–460
- [9] Dreute J, Pfisterer M, Schmitz ML (2024) A reductionist perspective on HIF-1alpha's role in cell proliferation under non-hypoxic conditions. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1871: 119683
- [10] Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D et al. (2004) Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118: 493–504
- [11] Donehower LA, Harvey M, Slagle BL et al. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215–221
- [12] Park JJ, Tran OH, Amin ASM et al. (2018) Transient activation of AMP-activated protein kinase at G1/S phase transition is required for control of S phase in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 504: 367–373

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/ die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. M. Lienhard Schmitz
 Biochemisches Institut
 Universität Gießen
 Friedrichstraße 24
 D-35392 Gießen
lienhard.schmitz@biochemie.med.uni-giessen.de
www.uni-giessen.de/de/fbz/fb11/institute/biochemie/forschung/ag-schmitz/agschmitz

AUTOREN



M. Lienhard Schmitz

Biologiestudium und Promotion. 1990–1993 PostDoc am Genzentrum der LMU München, Martinsried. 1993–1996 Hochschulassistent (C1) am biochemischen Institut der Universität Freiburg. 1997–2001 Gruppenleiter DKFZ Heidelberg. 2002–2005 Gruppenleiter am Departement für Chemie und Biochemie der Universität Bern, Schweiz. Seit 2005 Professor für Biochemie (W3) am Fachbereich Medizin der Universität Gießen.



Jan Dreute

2015–2020 Biologiestudium, Universität Gießen. 2020–2023 Promotion AG Schmitz, Universität Gießen. Seit 2023 PostDoc AG Schmitz, Universität Gießen.



Maximilian Pfisterer

2014–2020 Biologiestudium, TU Darmstadt. 2020–2024 Promotion AG Schmitz, Universität Gießen. Seit 2024 PostDoc AG Schmitz, Universität Gießen.

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer