

Die Regulation des Hypoxie-Signalwegs durch Enhancer of Zeste Homolog 2 in Brust-, Gliom- und Lungenkrebszellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Isabel Schröter
aus Remscheid

Gießen 2023

**Aus dem Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Neuropathologie**

Gutachter/in: Prof. Dr. Till Acker
Gutachter/in: Prof. Dr. Marco Stein
Tag der Disputation: 14.06.2024

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 04.12.2023

Isabel Schröter

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Zusammenfassung	2
Einleitung	3
Primäre Hirntumoren - das Glioblastom.....	3
Sekundäre Hirntumoren.....	5
Die Bedeutung von Hypoxie und Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) in Tumoren	6
Histonmodifikation als genregulatorischer Mechanismus	9
Die vielfältigen Funktionen von EZH2 unter physiologischen Bedingungen.....	10
Regulation und Veränderungen von EZH2 in Tumoren	13
Endogene EZH2-Antagonisten.....	15
Pharmakologische Ansätze zur EZH2-Inhibition	16
Molekulare Wechselwirkungen zwischen HIF und EZH2.....	17
Fragestellung der Studie	18
Material und Methoden	19
Materialien	19
Methoden	25
Zellkultur.....	25
RNA	29
Proteine.....	30
Statistische Analyse	32
Ergebnisse.....	33
Der Effekt der EZH2-Depletion auf die HIF-2 α -Expression unter akuten Hypoxie- Bedingungen in Glioblastom-, Bronchialkarzinom- und Mammakarzinomzellen <i>in</i> <i>vitro</i>	33
Untersuchung des HIF-2 α -Levels in EZH2-depletierten Tumorzellen unter akuten Hypoxie-Bedingungen im Hinblick auf die HIF-2 α -Proteinstabilität	37
Der Effekt auf den proteasomalen HIF-2 α -Abbau in EZH2-depletierten Tumorzellen unter akuten Hypoxie-Bedingungen	40
Bedeutung der EZH2-Methylierungsaktivität für die verminderte HIF-2 α -Produktion in Tumorzellen.....	42
Diskussion.....	46
EZH2-Depletion reduziert die HIF-2 α -Expression unter akuten Hypoxie-Bedingungen in Glioblastom-, Bronchialkarzinom- und Mammakarzinomzellen <i>in vitro</i>	47
Wirkung der EZH2-Depletion auf die Proteinstabilität von endogen und exogen exprimiertem HIF-2 α	48
Diskussion der Beobachtungen in MDA-MB-231 POR-Zellen	49
Die HIF-2 α -Reduktion in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen unter akuten Hypoxie-Bedingungen ist unabhängig vom proteasomalen HIF-2 α -Abbau	50

Diskussion der Beobachtungen in A549-Zellen.....	50
Diskussion der Beobachtungen in G55-Zellen.....	51
Bedeutung der EZH2-Methylierungsaktivität für die HIF-2 α -Regulation in Tumorzellen.....	52
Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse	54
Klinische Relevanz der erhobenen Daten	57
Abkürzungsverzeichnis.....	59
Projektvorstellungen.....	60
Literaturverzeichnis	60
Danksagung	68
Supplement.....	70

Anmerkung:

In dieser Arbeit wird stets das generische Maskulinum verwendet, um die Lesbarkeit zu erleichtern. Dennoch sind alle Geschlechter gleichermaßen angesprochen.

Abstract

Glioblastoma, a primary brain tumour, has very limited treatment options and a poor prognosis despite intensive research. The situation is similar with secondary brain tumours such as brain metastases from breast and lung carcinomas. In all three tumour entities, proteins with gene regulatory functions have been described as upregulated or mutated, including Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) and the Hypoxia-Inducible Factors (HIF). The histone methyltransferase EZH2 forms the catalytic unit of the enzyme Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). It catalyses the trimethylation of lysine 27 in histone H3, which leads to gene repression. In various tumours, overexpression or mutation of EZH2 is present, leading to pathological changes in genome regulation. Previous studies have found that protein levels of EZH2 can be positively affected by the hypoxia-inducible transcription factor HIF-1 α , which is associated with poorer prognosis, metastasis and tumour proliferation. Hypoxia frequently occurs inside fast-growing tumours and induces the two isoforms HIF-1 α and HIF-2 α through the oxygen and PHD (prolyl hydroxylase) dependent regulation of their protein stability, thereby promoting tumour progression. While the interaction between HIF-1 α and EZH2 has already been investigated in several studies and cancer models, the interaction between EZH2 and HIF-2 α remains largely unknown.

In this project, the molecular interaction between EZH2 and HIF and the role of EZH2 in the hypoxia signalling pathway were investigated in breast cancer, glioblastoma and lung cancer model systems. For this purpose, the cell lines MDA-MB-231 POR, G55, and A549 were cultured under various conditions and mRNA analyses were performed by RT-qPCR and protein analyses by Western blot. Our findings support the hypothesis that EZH2 enhances HIF levels, especially during oxygen deprivation. This was clearly evident in the MDA-MB-231 POR cell line as EZH2 knockdown under hypoxia resulted in a pronounced downregulation of HIF-2 α at the mRNA and protein expression levels. Additional experiments did not corroborate that the impact of EZH2 on HIF-2 α was mediated via PHD function or involved the regulation of HIF-2 α protein stability. Instead, EZH2 regulates HIF-2 α through the control of mRNA expression levels. Pharmacological inhibition of the methyltransferase function of EZH2 with GSK126 reduced HIF-2 α protein levels in some cell lines, but failed to recapitulate the HIF-2 α mRNA downregulation observed with EZH2 knock-down. In summary, the results hint at a novel EZH2-dependent, complex regulatory pathway that controls HIF-2 α mRNA under hypoxia in a methyltransferase- and PRC2-histone-independent manner and may be specific for certain types of breast cancer.

Zusammenfassung

Das Glioblastom, ein primärer Hirntumor, hat trotz intensiver Forschung sehr begrenzte Therapieoptionen und eine schlechte Prognose. Ähnlich verhält es sich mit sekundären Hirntumoren wie Hirnmetastasen von Brust- und Lungenkarzinomen. In allen drei Tumorentitäten sind Proteine mit genregulatorischer Funktion als hochreguliert oder mutiert beschrieben worden, unter anderem Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) und die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF). Die Histonmethyltransferase EZH2 bildet die katalytische Einheit des Enzyms Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). Sie katalysiert die Trimethylierung des Lysins 27 im Histon H3 und bewirkt auf diese Weise eine Genrepression. In verschiedenen Tumoren liegt eine Überexpression oder Mutation von EZH2 vor, was zu pathologischen Veränderungen der Genomregulation führt. In vorangegangenen Studien wurde festgestellt, dass die Proteinmenge von EZH2 positiv durch den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 α beeinflusst werden kann, was mit einer schlechteren Prognose, Metastasierung und Tumorpheriferation einhergeht. Hypoxie tritt häufig im Inneren schnell wachsender Tumoren auf und induziert die beiden Isoformen HIF-1 α und HIF-2 α , die durch ihre sauerstoff- und PHD (Prolylhydroxylase)-abhängig regulierte Proteinstabilität die Tumorprogression begünstigen. Während die Interaktion zwischen HIF-1 α und EZH2 bereits in mehreren Studien und Krebsmodellen untersucht wurde, blieb die Wechselwirkung zwischen EZH2 und HIF-2 α weitgehend unbekannt.

In diesem Projekt wurden die molekularen Interaktionen zwischen EZH2 und HIF und die Rolle des EZH2 im Hypoxie-Signalweg in Brustkrebs-, Glioblastom- und Lungenkrebs-Modellsystemen untersucht. Dazu wurden die Zelllinien MDA-MB-231, MCF7, G55, und A549 unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und es erfolgten mRNA-Analysen mittels RT-qPCR und Proteinanalysen mittels Western Blot. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass EZH2 die HIF-Mengen besonders bei Sauerstoffmangel verstärkt. Dies zeigte sich deutlich in der Zelllinie MDA-MB-231, da ein EZH2-Knockdown unter Hypoxie zu einer ausgeprägten Herabregulation von HIF-2 α auf mRNA- und Proteinexpressionsebene führte. Zusätzliche Experimente konnten jedoch nicht bestätigen, dass die Wirkung von EZH2 auf HIF-2 α über die Funktion von PHDs vermittelt wird oder EZH2 die PHD-mediierte HIF-2 α -Proteinstabilität verändert. Stattdessen reguliert EZH2 HIF-2 α über die Kontrolle der HIF-2 α -mRNA-Expression. Die pharmakologische Hemmung der Methyltransferasefunktion durch den EZH2-Inhibitor GSK126 reduzierte die HIF-2 α -Proteinlevels in einigen Zelllinien, konnte aber die Herunterregulation der HIF-2 α -

mRNA, die unter EZH2-Knockdown beobachtet wurde, nicht reproduzieren. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf einen komplexen neuen EZH2-abhängigen regulatorischen Mechanismus hin, der HIF-2 α -mRNA unter Hypoxie in einer Methyltransferase- und PRC2-Histon- unabhängigen Weise kontrolliert. Dieser könnte insbesondere relevant für bestimmte Subtypen von Brustkrebs sein.

Einleitung

Hirntumoren gehören zu den tödlichsten Krebsarten, für die derzeit nur wenige Therapieoptionen zur Verfügung stehen, und sind die zweithäufigste Krebsart bei Kindern. Sie betreffen das Bewusstseins- und Wahrnehmungsorgan und sind daher sowohl mit einer hohen psychosozialen Morbidität als auch mit langfristigen sozioökonomischen Folgen verbunden. Es werden primäre von sekundären Hirntumoren unterschieden, deren Charakteristika die nachfolgenden Kapitel beinhalten.

Primäre Hirntumoren - das Glioblastom

Zu den primären, also hirneigenen Hirntumoren gehört eine Vielzahl an Tumoren unterschiedlichsten Ursprungs, beispielsweise Gliome, embryonale Tumoren, Pinealtumoren, Meningeome, Lymphome oder melanozytische Tumoren. Das Glioblastoma multiforme gehört zu den bösartigsten Tumoren des Gehirns und ist der Gruppe der Gliome zugehörig. Es ist mit einer Inzidenz von 3,2 Fällen auf 100.000 Einwohner im Jahr die häufigste Form und umfasst etwa 15% der hirneigenen Hirntumoren (Haberer 2021; Louis et al. 2021). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei circa 60 Jahren. Neben genetischen Dispositionen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom, Vorerkrankungen wie der Neurofibromatose und vorangegangener Radiotherapie werden weitere Risikofaktoren diskutiert, die bisher nicht abschließend bestätigt wurden. Die Prognose hat sich in den letzten Jahren nicht wesentlich geändert – die mittlere Überlebensrate liegt auch unter Therapie bei etwa 15 Monaten und nur 6,8 % der Patienten überleben länger als 5 Jahre. Gliome werden nach der WHO-Klassifikation eingeteilt, die aus vier Stufen mit ansteigender Pathogenität besteht. Dabei befindet sich das Glioblastom auf der vierten und höchsten Stufe (WHO Grad 4) (Rahman et al. 2015; Gallego 2015; Haberer 2021).

Hinsichtlich ihrer Pathogenese können Glioblastome in primär und sekundär (aufgrund vorheriger Grunderkrankung oder Hirnschädigung) eingeteilt werden. Die meisten Glioblastome entstehen primär (ca. 90%) (Ohgaki und Kleihues 2013). Auf molekularer Ebene existieren einige Marker in Gliomen, deren Bestimmung wegweisend für die Diagnose des Glioblastoms sowie für die Therapieentscheidung und das Ansprechen auf die gewählte Therapie ist. Eine Mutation im Isocitrat-Dehydrogenase-Gen (IDH) führt in den Gliomen Astrozytom und Oligodendrogliom zur vermehrten Entstehung des Onkometaboliten 2-Hydroxyglutarat und verstärkter DNS-Methylierung durch die Hemmung 2-Oxoglutarat-abhängiger DNS-Demethylasen. Seit 2021 wird die Diagnose Glioblastom nur an IDH-Wildtyp-Gliome vergeben. Zusätzlich liegen bei Glioblastomen Mutationen im TERT-Promoter, eine Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens und eine Veränderung der Kopienzahl der Chromosomen 7 und 10 (+7/-10) vor (Louis et al. 2021).

Eine weitere molekulare, epigenetische und therapierelevante Veränderung in Glioblastomen betrifft den MGMT-Gen-Promoter. Durch Hypermethylierung im MGMT-Gen-Promoter kann die O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase nicht mehr exprimiert werden. Diese ist normalerweise für die Entfernung von Alkylgruppen verantwortlich und kann eine Therapie mit alkylierenden Substanzen wie dem Chemotherapeutikum Temozolomid weniger wirksam machen. Eine MGMT-Hypermethylierung und IDH-Mutation wirken sich positiv auf das Therapieansprechen bei einer Chemotherapie aus (Gerson 2004). Die primäre Therapie des Glioblastoms besteht aus der neurochirurgischen Resektion des Tumors, je nach Mutationsstatus gefolgt von Strahlen- und/oder Chemotherapie. Als Chemotherapeutikum wird das liquorgängige und oral verfügbare Alkylans Temozolomid verwendet. Zusätzlich kann eine apparativ-interventionelle Therapie eingesetzt werden, bei der alternierend elektrische Felder („Tumor Treating Fields“) angelegt werden. Supportive Maßnahmen wie die Gabe von Glucocorticoiden zur Abschwellung des Hirngewebes erfolgen unabhängig vom Mutationsstatus (Haberer 2021).

Sekundäre Hirntumoren

Sekundäre Hirntumoren entstehen durch eine nicht hirneigene zugrundeliegende Tumorerkrankung, die eine Metastasierung ins Gehirn verursacht. Es metastasieren einige der häufigsten Tumorentitäten ins zentrale Nervensystem, wodurch sekundäre Hirntumoren häufiger als primäre Hirntumoren sind. So machen das Bronchial- und Mammakarzinom, das Melanom und das kolorektale Karzinom zusammen mehr als 70 % der Hirnmetastasen aus. Mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von unter zwei Monaten ist die Prognose schlecht und kann durch palliative Therapien nur geringfügig verbessert werden (Lah et al. 2020).

Das Bronchialkarzinom war 2018 in Deutschland mit knapp 23 % die häufigste Krebstodesursache bei Männern und mit fast 16 % die zweithäufigste der Frauen (Erdmann et al. 2021). Die Metastasierung erfolgt in Knochen, Leber, Nebennieren, das Gehirn und Lymphknoten (Ukena und Schönfeld 2018). Von den ins Gehirn metastasierenden Tumoren ist das Bronchialkarzinom mit Abstand das häufigste. Es weist in 57 % der Fälle bereits bei Diagnosestellung Metastasen auf, wobei in 20 % der Fälle Hirnmetastasen vorliegen (Lah et al. 2020). Dies hat Einfluss auf das Therapieregime im klinischen Alltag. Wegen der häufigen Hirnmetastasierung und damit verbundenen schlechten Prognose beispielsweise des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist die prophylaktische Schädelbestrahlung in allen Stadien fester Bestandteil der Therapie. Eine Hirnmetastasierung tritt bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom in circa 16% auf (Seute et al. 2008, Cagney et al. 2017). Liegt ein nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom vor, treten in etwa 15% der Fälle Hirnmetastasen auf. Die mittlere Überlebensdauer liegt bei dem kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom mit vorliegender Hirnmetastasierung bei 6 Monaten (Lamba et al. 2021; Cagney et al. 2017; Soffietti et al. 2020). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt insgesamt für das Bronchialkarzinom zwischen 10 und 20%, ist aber bei Metastasierung nochmals verringert (Ukena und Schönfeld 2018).

Das Mammakarzinom ist in Deutschland das häufigste Karzinom der Frau und zusätzlich für die meisten Todesfälle durch Krebserkrankungen bei Frauen verantwortlich (Robert Koch-Institut). Die mediane 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 88 % (AMBOSS GmbH 2022), obwohl auch nach bis zu 10 Jahren noch in 5 bis 10 Prozent Rezidive und Fernmetastasen auftreten können. Die Metastasierung findet am häufigsten in Skelett (50%), Gehirn, Leber und Lunge statt (Wöckel et al. 2021). 15 bis 20 % der Patienten mit metastasierendem Mammakarzinom bilden Hirnmetastasen aus (Lah et al. 2020). Die Verkürzung der medianen Überlebenszeit auf 2 bis 25

Monate zeigt die deutliche Prognoseverschlechterung, sobald Hirnmetastasen auftreten. Die therapeutischen Möglichkeiten sind aufgrund der neurokognitiven Nebenwirkungen einer Resektion oder Radiatio sehr eingeschränkt (Wöckel et al. 2021).

Im Inneren von malignen Tumoren herrscht Sauerstoffmangel, da diese häufig so schnell wachsen, dass die vaskuläre Versorgung nicht ausreichend ist. Durch adaptive Veränderungen des zellulären Stoffwechsels und der Kommunikation können die Tumoren jedoch unter diesem Sauerstoffmangel überleben und sich weiter verbreiten. Bei verminderter Verfügbarkeit von Sauerstoff steigt die Menge der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIFs), die als Transkriptionsregulatoren fungieren, an. Deren Rolle in der Tumorentstehung und -progression soll im Folgenden näher erläutert werden.

Die Bedeutung von Hypoxie und Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) in Tumoren

HIF-1 α und HIF-2 α sind zwei Isoformen, die bei Verminderung der Sauerstoffkonzentration, also bei Hypoxie, stabilisiert werden. In Anwesenheit von Sauerstoff werden HIF-1 α und HIF-2 α von Prolylhydroxylasen (PHD) hydroxyliert, durch das Von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) und Elongin C ubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut. Unter Hypoxiebedingungen, wie beispielsweise in Tumoren, sind PHDs gehemmt, da sie Sauerstoff für die Hydroxylierung von HIF benötigen. Neben Sauerstoff sind außerdem 2-Oxoglutarat und zweiwertiges Eisen für diesen Prozess erforderlich (Schofield und Ratcliffe 2004). Kann dieser Vorgang bei Sauerstoffmangel nicht ablaufen, werden die HIF- α -Untereinheiten nicht abgebaut. Eine α -Untereinheit kann mit der dauerhaft vorhandenen HIF-1 β -Untereinheit ein funktionell aktives Dimer bilden. Als Dimer kann HIF im Zellkern an die HRE (hypoxia responsive element) -Region binden und so die Transkription der Zielgene bewirken (Kaelin und Ratcliffe 2008; Papale et al. 2018). Die Regulation der HIF-Proteine unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen ist in **Abbildung 1** schematisch dargestellt. Sie regulieren als Transkriptionsfaktoren unter anderem die Genexpression von ‚vascular endothelial growth factor‘ (VEGF), Erythropoietin (EPO), dem Glucosetransporter GLUT-1 oder Carboanhydrase-IX. Dadurch werden beispielsweise die Angiogenese in der Entwicklungsphase von Lebewesen und die erneute Bereitstellung von Sauerstoff durch einwachsende Blutgefäße sowie erhöhtes Angebot von roten Blutkörperchen

(Erythrozyten) in hypoxischen Geweben gesteuert. Darüber hinaus werden adaptive Mechanismen des Zellstoffwechsels von HIF-Proteinen reguliert, beispielsweise wird die anaerobe Glykolyse verstärkt, um die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu verhindern (Semenza 2012). HIF-1 α und HIF-2 α liegen in verschiedenen Gewebearten nicht im gleichen Verhältnis vor. Darüber hinaus gibt es neben vielen Gemeinsamkeiten auch Unterschiede in den Zielgenen der HIF-Proteine. So wurde HIF-2 α mehr als HIF-1 α mit der Hemmung der Zelldifferenzierung und Förderung des Zellwachstums assoziiert, was für die Wichtigkeit von HIF-2 α in der Tumorprogression sprechen könnte. Auch wirkt HIF-2 α stärker als HIF-1 α auf die Transkription von EPO. Im klarzelligen Nierenkarzinom ist HIF-2 α im Vergleich zu HIF-1 α überrepräsentiert und trägt maßgeblich zur Tumorprogression bei. Neben HIF-1 α und -2 α existieren weitere Isoformen wie HIF-3 α und Spleißvarianten, die Gegenstand aktueller Forschung sind. HIF-3 α wird zum Beispiel eine negative Rückkopplung mit begleitend hemmendem Effekt auf HIF-1 α und -2 α zugeschrieben (Kaelin und Ratcliffe 2008).

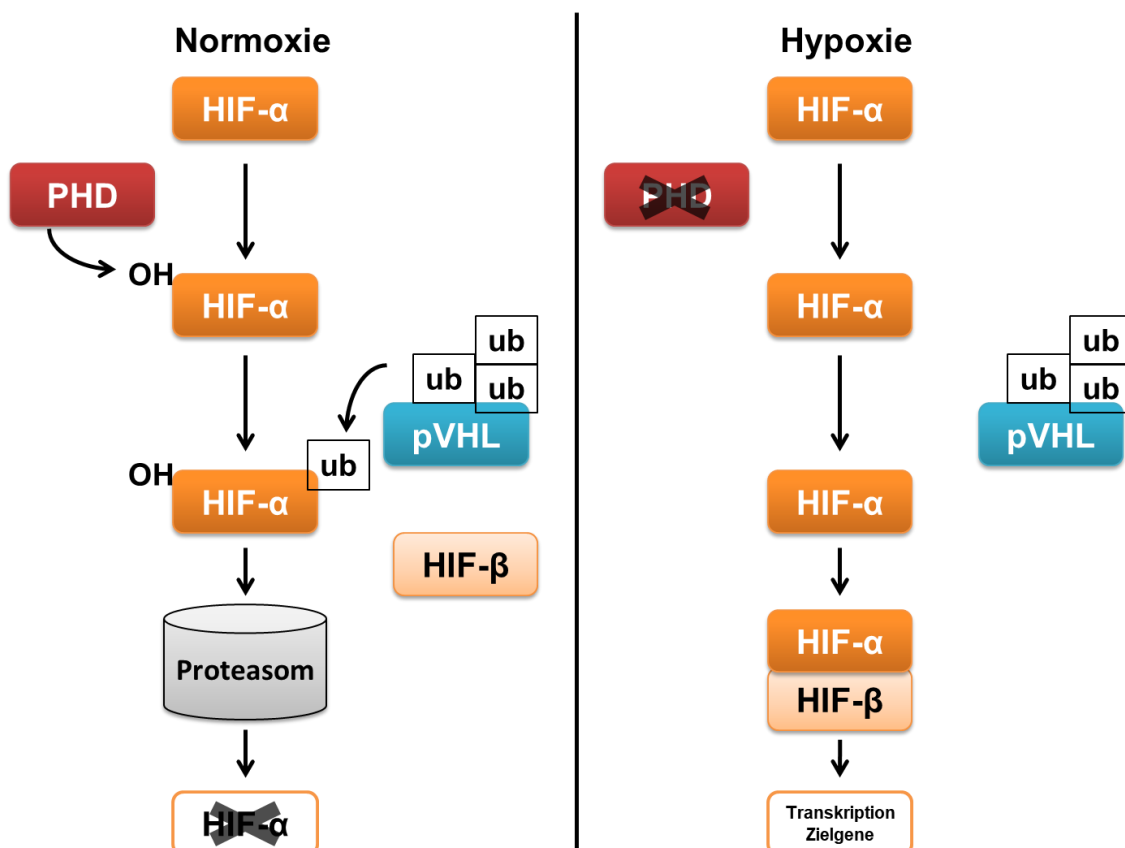


Abb. 1. HIF-Regulation unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1/2- α von Prolyhydroxylasen (PHD) hydroxyliert. Daraufhin ubiquitinyliert das Von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) die hydroxylierten HIF-Proteine und diese werden im Proteasom abgebaut. Bei Hypoxie sind PHDs gehemmt, sodass keine Hydroxylierung und folglich kein Abbau von HIF- α stattfindet. Stattdessen erfolgt die Zusammenlagerung mit HIF- β und das entstandene Dimer fungiert im Zellkern als

Transkriptionsfaktor für die Zielgene (Kaelin und Ratcliffe 2008). Abbildung verändert nach (Simon 2016).

In vielen Tumorentitäten sind HIF-Proteine hochreguliert. Ein Grund dafür ist der zunehmende Sauerstoffmangel bei schnellem Zellwachstum. Andererseits kann HIF auch durch tumoreigene Mutationen akkumulieren, beispielsweise durch Mutationen, die mTOR aktivieren, oder durch Mutationen im Ras-Gen. HIF wird in der Folge weniger effektiv hydroxyliert und weniger abgebaut. Den Abbau von HIF beeinflussen ebenfalls VHL-Mutationen, die im Hämangioblastom oder dem klarzelligem Nierenkarzinom zu finden sind. Als Folge der HIF-Akkumulation werden neben den bereits erwähnten Genen auch mit dem Tumorwachstum assoziierte Genprodukte wie PDGF, TGF α , TGF β , SDF-1, CXCR4 und MMP1 hochreguliert (Kaelin und Ratcliffe 2008). Insgesamt geht eine erhöhte HIF-Menge in Tumoren mit persistierenden Tumorstammzellen, verstärktem Tumorwachstum, -invasion und -metastasierung und genetischer Instabilität einher (Semenza 2012).

Heutzutage befinden sich bereits medikamentöse Inhibitoren des HIF-Signalwegs in der klinischen Anwendung. Darunter sind mTOR-Inhibitoren wie Everolimus oder Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Sunitinib, die zum Beispiel zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms verwendet werden. VEGF-Inhibitoren wie Bevacizumab werden unter anderem gegen das Mamma- oder Bronchialkarzinom eingesetzt (Zinner et al. 2015, Socinski et al. 2018, Robert et al. 2011, Welt et al. 2016, Lang et al. 2013). Beim erblichen VHL-Syndrom kommt es zum Funktionsverlust des VHL-Proteins mit erhöhter Neigung zu vaskulären Tumoren wie Hämangioblastomen, Phäochromozytomen oder auch klarzelligem Nierenzellkarzinomen. Diese ist bedingt durch den verminderten Abbau von HIF und daraus resultierender stärkerer Expression von HIF-Zielgenen wie beispielsweise VEGF (Ben-Skowronek und Kozaczuk 2015). Kürzlich hat die FDA (Food and drug administration) auch den HIF-2 α -Inhibitor WELIREG™ (Belzutifan) zur Behandlung von Patienten mit VHL-Syndrom assoziierten Tumoren zugelassen (FDA 2021; Deeks 2021).

Nicht nur HIF-Proteine, sondern auch viele andere molekulare Faktoren sind seit einigen Jahren Bestandteil der Tumorforschung und wurden auf ihre Eignung als mögliches therapeutisches Ziel geprüft. Darunter sind auch die Histonmethyltransferasen wie EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), die unter anderem eine genregulatorische Funktion erfüllen und in zahlreichen Tumorentitäten dysreguliert sind. Auf die Interaktion zwischen EZH2 und dem bereits beschriebenen HIF-2 α wurde in dieser Studie der Fokus gelegt. Zum besseren Verständnis der möglichen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen soll an dieser Stelle

zunächst die Histonmodifikation beschrieben werden, die unter anderem von Histonmethyltransferasen durchgeführt wird.

Histonmodifikation als genregulatorischer Mechanismus

Die DNS als Träger des Erbguts ist im Zellkern auf Histone gewickelt und auf diese Weise als Chromatin verpackt. Es existieren vier verschiedene Histone (Histon H2A, H2B, H3 und H4), die alle gemeinsam jeweils doppelt in einem Histon-Oktamer vorliegen. Um diesen Proteinkomplex sind 146-147 Basenpaare der DNS gewunden, und diese Einheit des Chromatins wird Nukleosom genannt (Luger et al. 1997). Die N-terminalen Enden der Histone ragen aus dem kugelförmigen Kern des Nukleosoms heraus und können an mehreren Aminosäureseitenketten durch verschiedene epigenetische Veränderungen kovalent modifiziert werden. Beispiele dafür sind die Methylierung an Lysin oder Arginin, Phosphorylierung oder Acetylierung. Eine Modifikation kann eine Lockerung oder Kompaktierung des Chromatins bewirken, wodurch bestimmte DNS-Sequenzen mehr oder weniger zugänglich für DNS-bezogene Prozesse wie die Transkription, Replikation, Rekombination und Reparatur werden. Die Zugänglichkeit von genregulatorischen Promotor- und Enhancer-Sequenzen wird letztlich die Genexpression der jeweiligen Gensequenzen bestimmen. Zu den zahlreichen enzymatischen Regulatoren von Histonmodifikationen gehört unter anderem die Histon-H3-Lysin-27 (H3K27) -spezifische Methyltransferase Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). Der schematische Aufbau eines Nukleosoms und der Histone ist in **Abbildung 2** sichtbar. Die besondere Rolle, die EZH2 als katalytische Einheit von PRC2 einnimmt, soll in den nächsten Kapiteln zusammengefasst werden (Blackledge und Klose 2021; Strahl und Allis 2000).

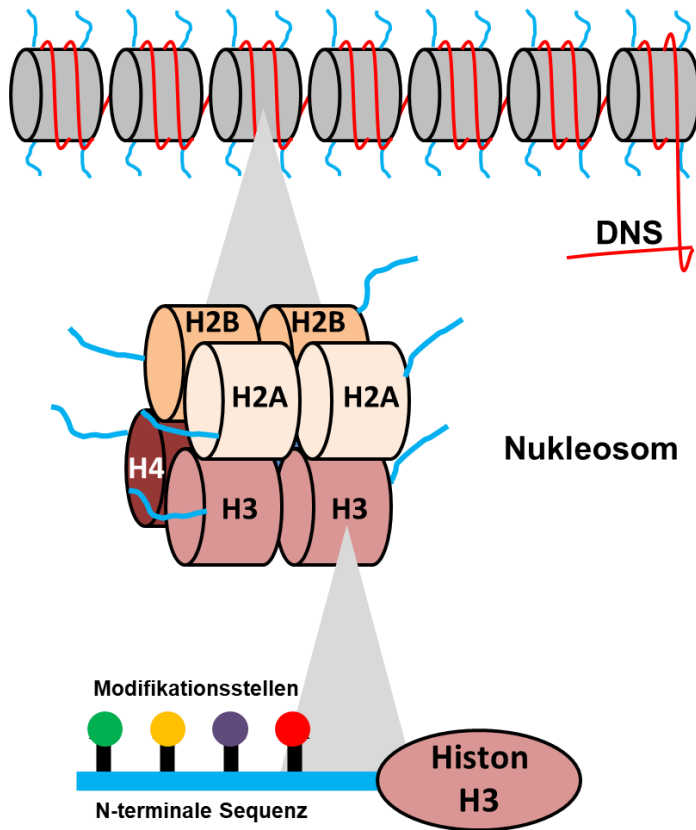


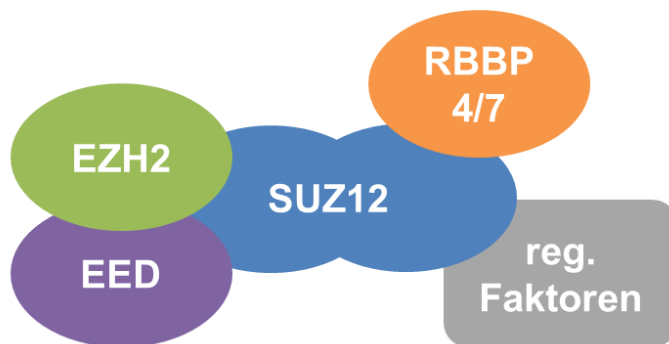
Abb. 2. Nucleosomenstruktur und Aufbau von Histonen. Die DNS ist in kondensierter Form auf Histone gewickelt und auf diese Weise als Chromatin verpackt. Vier verschiedene Histone (Histon H2A, H2B, H3 und H4) liegen gemeinsam jeweils doppelt in einem Histone-Oktamer vor. Um diesen Proteinkomplex sind die Basenpaare der DNS gewunden. Diese Einheit des Chromatins wird Nucleosom genannt. Die N-terminalen Sequenzen der Histone ragen aus dem Kern des Nucleosoms heraus und können an mehreren Aminosäureseitenketten durch verschiedene epigenetische Veränderungen kovalent modifiziert werden. Abbildung verändert nach (Strahl und Allis 2000)

Die vielfältigen Funktionen von EZH2 unter physiologischen Bedingungen

Die Polycomb Repressive Komplexe (PRCs) sind eine Gruppe von Histonmethyltransferasen, von denen PRC1 und 2 am intensivsten erforscht sind. Sie lagern sich mit wechselnden Komponenten zusammen, um ihre Funktion entfalten zu können. PRC1 monoubiquityliert durch seine katalytische Untereinheit RING1A und RING1B das Histon H2A, während PRC2 als einzige Histonmethyltransferase das Histon H3 am 27. Lysin methyliert, das danach H3K27me3 genannt wird. Das Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) -Protein ist die katalytische Untereinheit von PRC2 (Papale et al. 2018). EZH2 ist in den letzten Jahren unter anderem als potenzielles therapeutisches Ziel zum Gegenstand eingehender Forschung geworden, da es mit der Tumorentstehung und -progression in Verbindung steht (Fioravanti et al. 2018). Die Mono-, Di- oder Trimethylierung von H3K27 wird durch die SET-Domäne von EZH2 katalysiert (Laugesen et al. 2019; Cao et al. 2002). Donor der Methylgruppe ist hier S-Adenosyl-Methionin (SAM), das dabei zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) reagiert (Fioravanti et al. 2018). Für die katalytische Funktionalität von PRC2 sind neben EZH2 mindestens die Proteine EED und SUZ12 in dem PRC2-Komplex

erforderlich. Weitere Komponente des Komplexes ist RBBP4/7 für die Bindung an Histon H3. AEBP2, JARID2, PCL1-3, EPOP oder PALI können im PRC2-Komplex regulatorische Funktionen erfüllen und lagern sich ihm je nach Reaktion in verschiedener Konstellation an. Statt EZH2 kann auch EZH1 im Komplex vorliegen, allerdings ist EZH1 weniger enzymatisch aktiv als EZH2 (Laugesen et al. 2019). EZH1 kann allerdings hochreguliert sein, wenn EZH2 in geringerem Maße vorhanden ist (Wassef et al. 2019). EZH1 ist wie EZH2 in vielen Tumorentitäten hochreguliert (Aubert et al. 2019). Die Zusammensetzung von PRC2 und EZH2 als dessen katalytische Einheit zeigt die **Abbildung 3**.

Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)



EZH2-Proteindomänen

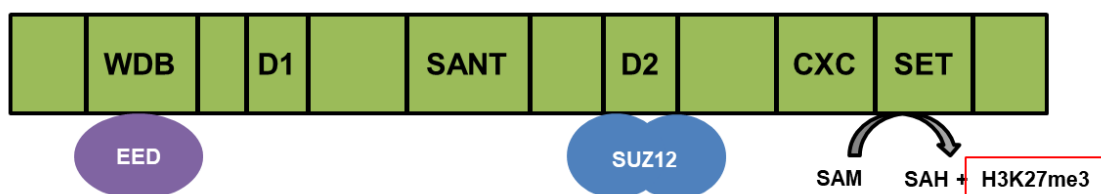


Abb. 3. Aufbau des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) und Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2). PRC2 besteht neben EZH2 aus EED und SUZ12. RBBP4/7 ist wichtig für die Bindung an Histon H3. Weitere Komponenten sind regulatorische Faktoren wie AEBP2, JARID2, PCL1-3, EPOP oder PALI und lagern sich ihm in verschiedenen Konstellationen an. Das EZH2-Protein enthält mehrere funktionelle Domänen. Diese heißen WD-40-Bindungsdomäne (WDB) zur Bindung von EED, Domäne 1 und 2 (D1/2, letztere interagiert mit SUZ12), die SANT-Domäne zur Interaktion mit den Histonen und die Cystein-reiche Domäne CXC. Die SET-Domäne stellt die Methylgruppe aus S-Adenosyl-Methionin (SAM) für die Histonmethyltransferase bereit und bildet damit die katalytische Einheit von PRC2. Abbildungen verändert nach (Herviou et al. 2016; Blackledge und Klose 2021).

In der Regel wird die Trimethylierung von H3K27 durch die Komplexbildung von EZH2, EED, SUZ12, AEBP2 und RbAp46/48 ermöglicht, und dies führt zu einer PRC2-abhängigen Hemmung der Genexpression. Findet diese Trimethylierung von Histon H3 statt, kann in der Folge PRC1 an monoubiquityliertes Histon H2A und Histon H3K27me3 binden und eine Chromatinkondensierung und die PRC2-bedingte Hemmung der Genexpression verstärken (Gan et al. 2018). DNS-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen können in der Hemmung der Genexpression kooperativ mitwirken (Papale et al. 2018).

EZH2 kann im Komplex mit PRC2 auch Nicht-Histon-Proteine methylieren und daraus folgend ebenfalls eine Hemmung der Genexpression bewirken. Dabei werden im Zytosol beispielsweise GATA4 oder Talin direkt von EZH2 methyliert (He et al. 2012; Gunawan et al. 2015). EZH2 kann in phosphorylierter Form Transkriptionsfaktoren methylieren und damit zum Beispiel die Expression von NF- κ B-Downstream-Genen in Brustkrebszellen aktivieren (Lee et al. 2011).

Ebenfalls kann EZH2 unabhängig vom PRC2-Komplex in Prostatakarzinomzellen den Androgen-Rezeptor koaktivieren und das Zellwachstum steigern, wobei hier unklar ist, ob die EZH2-Methyltransferaseaktivität notwendig ist (Xu et al. 2012). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass EZH2 direkt mit den Onkoproteinen der MYC-Familie, c-MYC und N-MYC, interagieren kann, und dadurch deren Stabilisierung in einer Methyltransferase-unabhängigen Weise verursacht (Wang et al. 2022).

Kim et al. zeigten ferner, dass EZH2 auch unabhängig von seiner katalytischen Aktivität und dem PRC2-Komplex die Expression des Androgen-Rezeptors direkt an dessen Promoter aktivieren kann (Kim et al. 2018). Die bisher beschriebenen, vielfältigen Funktionen von EZH2 sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

EZH2-Funktionen	Zielstruktur
PRC2-abhängige Histonmethylierung	H3K27me3 -> Hemmung der Genexpression
PRC2-abhängige Non-Histonmethylierung	GATA4, Talin, NF κ B-Downstream-Gene, STAT3
PRC2-unabhängige Methylierung	unbekannt

PRC2-unabhängige Proteinstabilisierung ohne Methylierung	c-MYC, N-MYC
direkte Transkriptionsregulation ohne Methylierung	Androgen-Rezeptor (Promoter)

Tab. 1. EZH2-Funktionen und die Zielstrukturen. EZH2 hat verschiedene Funktionen, die entweder im PRC2-Komplex oder von freiem EZH2 ausgeführt werden. Dabei kann EZH2 Histon H3 und auch Non-Histon-Proteine wie GATA4 methylieren, aber auch unabhängig von seiner Methylierungsfunktion Proteine stabilisieren oder den Promoter von Zielstrukturen wie dem Androgenrezeptor direkt binden und aktivieren (Gan et al. 2018; He et al. 2012; Gunawan et al. 2015; Lee et al. 2011; Kim et al. 2013a; Kim et al. 2018; Xu et al. 2012).

Letztlich kann EZH2 einerseits PRC2-abhängige Funktionen einnehmen, indem es als Histonmethyltransferase und dadurch genrepressiv agiert oder als Methyltransferase regulierend auf Proteine wirkt. EZH2 hat auch PRC2-unabhängige Funktionen, die entweder über Protein-Interaktionen wirken oder direkt auf die DNS abzielen. Hierbei kann die enzymatische Aktivität von EZH2 über die SET-Domäne auch entbehrlich für die resultierende Reaktion sein.

Insgesamt ist EZH2 physiologisch ein Regulator des Zellzyklus, sorgt für die Reparatur von DNS-Schäden und verringert die Zellalterung (Duan et al. 2020). So hat EZH2 für die Regeneration von Zellen eine essentielle Bedeutung durch zellprotektive Effekte in chronisch geschädigten Geweben wie bei Erkrankungen des Pankreas (Mallen-St Clair et al. 2012). In überschießendem Maß können diese Effekte allerdings auch onkogen wirken, wie den kommenden Kapiteln zu entnehmen ist.

Regulation und Veränderungen von EZH2 in Tumoren

EZH2 wurde bei vielen verschiedenen Erkrankungen, insbesondere Tumorerkrankungen, als dysreguliert beschrieben. So ist es in den Tumorentitäten Glioblastom, Melanom, T-Zell- und Non-Hodgkin-Lymphom, Prostata-, Lungen-, Brust- und Blasenkarzinom sowie dem hepatozellulären Karzinom hochreguliert oder mutiert (Kim und Roberts 2016), wobei es funktionsverstärkende („Gain-of-function“) und funktionshemmende („Loss-of-function“) sowie weitere EZH2-Mutationen gibt. Loss-of-function, Nonsense-, Missense- und Frameshift-Mutationen in EZH2 führen zur Förderung von myelodysplastischen Syndromen und myeloproliferativen Erkrankungen (Ernst et al. 2010; Nikoloski et al. 2010; Simon et al. 2012).

Im Gegensatz dazu ist die Überexpression von EZH2 eher tumorassoziiert. HIF-1 α kann als Transkriptionsfaktor indirekt die EZH2-Expression aktivieren, worauf später in diesem Kapitel ausführlicher Bezug genommen wird (Cao et al. 2010). Außerdem bewirkt Myc als Onkogen durch direkte Bindung an den EZH2-Promoter dessen Überexpression in Prostatakarzinomzellen (Koh et al. 2011). Über denselben Mechanismus kann E2F die EZH2-Expression steigern, wie beispielsweise in Harnblasen- und kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen (Bracken et al. 2003). Bestimmte Micro-RNAs sind in Glioblastomen herabreguliert, was zu vermehrter EZH2-Expression führt. Insgesamt resultiert daraus eine vermehrte Angiogenese, Zellproliferation und Invasion der Tumorzellen (Smits et al. 2010; Xiaoping et al. 2013).

Darüber hinaus tritt in B-Zell-Lymphomen eine Gain-of-function-Mutation am Tyrosin 641 (Y641F) in der katalytischen SET-Domäne von EZH2 auf, die zu einer vermehrten Trimethylierung von H3K27 führt (Morin et al. 2010; Bödör et al. 2011). Eine Punktmutation an Alanin 677 und 687 in Non-Hodgkin-Lymphomen hat denselben Effekt (McCabe et al. 2012a).

EZH2 selbst kann, PRC2-unabhängig, auch die E2F1-vermittelte Zellapoptose hemmen, wodurch unkontrollierte Zellteilung gefördert wird (Wu et al. 2010). Es bindet in phosphorylierter Form direkt an STAT3 und methyliert dieses. Die direkte Aktivierung des STAT3-Signalwegs durch EZH2-abhängige Methylierung (s. **Tabelle 1**) begünstigt die Entstehung von Glioblastomen und Glioblastom-ähnlichen Stammzellen (GSC) (Kim et al. 2013a). EZH2 kann ferner mit SNAIL1 interagieren, die Expression von E-Cadherin vermindern, und könnte auf diese Weise die epitheliale zur mesenchymalen Transition (EMT) unterstützen (Ma et al. 2016a; Cao et al. 2008). Es konnte in kolorektalen Karzinomzellen *in vitro* auch gezeigt werden, dass eine EZH2-Hemmung oder dessen Knockdown vermehrte Apoptose und Autophagie bewirken (Yao et al. 2016). Ein weiterer Effekt des EZH2-Knockdowns konnte unter anderem in der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 gesehen werden. So hatten die Zellen mit weniger EZH2 eine geringere Tendenz zur Invasion und Ausbildung von Metastasen und enthielten weniger Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die bei der Metastasierung von Tumoren federführend sind (Xia et al. 2020).

EZH2 ermöglicht Tumorzellen auch, Resistenzen gegen Chemotherapeutika auszubilden, beispielsweise in kleinzelligen Lungenkarzinomen oder Glioblastomen. In der letztgenannten Tumorentität führt die EZH2-bedingt erhöhte ABC-Transporter-Expression zur Chemoresistenz (Fan et al. 2014). Auch in Melanom-, Ovarialkarzinom- und kolorektalen Karzinomzellen unterstützt eine hohe EZH2-Expression die

Umgehung des Immunsystems durch Tumorzellen und damit deren Überleben im Organismus (Peng et al. 2015; Nagarsheth et al. 2016; Zingg et al. 2017).

Die Ergebnisse der vorangegangenen Studien sprechen insgesamt dafür, dass ein EZH2-Exzess in Form einer Hochregulation oder Gain-of-function-Mutation nicht nur in unterschiedlichsten Tumorentitäten vorliegt, sondern auch maßgeblich an deren Entstehung und Progress sowie Therapieresistenz beteiligt ist. In der Zelle existieren aber Gegenspieler, die die Wirkung von EZH2 antagonisieren können und somit einen Einfluss auf die Interaktion von EZH2 mit anderen Metaboliten haben. Sie werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Endogene EZH2-Antagonisten

Wichtige Gegenspieler der Histonmethyltransferasen sind die Histondemethylasen. Die Histondemethylasen UTX (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on X chromosome) und JMJD3 (Jumonji domain containing protein 3) antagonisieren die EZH2-Aktivität, indem sie die Methylgruppen von H3K27 entfernen. Wie auch PHDs, die die HIF-Proteine regulieren, gehören sie zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Die Histondemethylasen benötigen als Kofaktoren Sauerstoff und 2-Oxoglutarat zur Oxidation der Methylgruppe. Die katalytische Untereinheit der Histondemethylasen heißt JmjC-Domäne (Chang et al. 2019; Hong et al. 2007). Beispielsweise in Medulloblastomen, Blasen-, Prostata- und Pankreaskarzinomen sind inaktivierende Mutationen von UTX beschrieben. Außerdem wurde eine Hochregulierung von JMJD3 in Prostatakarzinomen beschrieben (Kim und Roberts 2016; Xiang et al. 2007).

Auf der RNA-Ebene kann EZH2 ebenfalls gehemmt werden. MicroRNAs wie miRNA-32, miR-137 und miR-506 vermindern durch direkte Bindung an den EZH2-Promoter die EZH2-Expression, wodurch in verschiedenen Studien eine Hemmung von Tumorproliferation, Angiogenese und Metastasierung in Melanomen, Glioblastomen und Kolonkarzinomen nachgewiesen werden konnte (Ma et al. 2016b; Zhang et al. 2015; Sun et al. 2015).

Durch die wachsende Bedeutung von EZH2 besonders im Bereich der Onkologie wurden in den letzten Jahren einige Inhibitoren entwickelt, die exogen auf EZH2 abzielen. Diese sollen nun im nächsten Kapitel beschrieben werden.

Pharmakologische Ansätze zur EZH2-Inhibition

Viele aktuell eingesetzte EZH2-Inhibitoren zielen auf dessen Histonmethyltransferase-Aktivität ab. Dabei interagieren sie entweder mit dem universell als Methylgruppendonor fungierenden SAM oder direkt mit der SET-Domäne von EZH2 (Fioravanti et al. 2018). 3-Deazaneplanocin (DZNeP) ist der am längsten verwendete EZH2-Inhibitor. Seine Wirkung entfaltet er durch Interaktion mit SAM, weshalb er weniger EZH2-selektiv, sondern ein genereller Histonmethyltransferase-Inhibitor ist. Er konnte in Studien die Tumoraktivität senken. Aufgrund einer geringen Plasma-Halbwertszeit und hoher Toxizität im Tiermodell ist er allerdings aktuell für die klinische Anwendung nicht geeignet (Glazer et al. 1986; Tan et al. 2007; Miranda et al. 2009). Mit GSK126 existiert seit 2012 ein selektiver Inhibitor der EZH2-Methyltransferaseaktivität, der sowohl den EZH2-Wildtyp als auch die Gain-of-function-Mutante Y641 binden und so das Tumorwachstum in diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen hemmen kann (McCabe et al. 2012b). GSK126 ist 1000-fach spezifisch für EZH2 gegenüber anderen Histonmethyltransferasen und 150-fach spezifisch für EZH2 gegenüber EZH1 (Fioravanti et al. 2018). Einige klinische Phase-1-Studien sind bereits abgeschlossen. Erste Ergebnisse zeigten eine geringe Reduktion der Tumoraktivität bei den teilnehmenden Patienten. Hierbei waren die kurze Halbwertszeit des Inhibitors und die dadurch geringere Dosis im Körper limitierend. (Yap et al. 2019). UNC1999 ist der erste oral verfügbare Inhibitor und ebenfalls SAM-kompetitiv, wirkt also hemmend auf die EZH2-Methyltransferaseaktivität. Gegen die Mutante Y641 ist er auch wirksam. UNC1999 ist in Bezug auf Histonmethyltransferasen ähnlich selektiv wie GSK126, aber hemmt EZH1 und EZH2 in gleichem Maß. Im Gegensatz zu GSK126 war der antiproliferative Effekt von UNC1999 auf MLL-Zellen im Mausmodell größer (Fioravanti et al. 2018). SAH-EZH2 ist ein EZH2-Analog, das mit EED interagiert und so die Komplexbildung mit EZH2 verhindert. Dadurch entsteht weniger H3K27me3. Es zeigte bisher einen antiproliferativen Effekt, der mit reduziertem H3K27me3-Level, aber stärker noch mit reduziertem EZH2-Protein korrelierte (Kim et al. 2013b).

Neben dem Einsatz als alleinige Therapie sind EZH2-Hemmer in Studien als Augmentation, also effektverstärkend durch Hinzugabe zur vorherigen Antitumorthherapie (Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Sunitinib, Interleukin-2-Antagonisten) erfolgreich im Einsatz gegen das klarzellige Nierenkarzinom, das Melanom, das kolorektale Karzinom oder die AML (Adelaiye-Ogala et al. 2017; Göllner et al. 2017; Nagarsheth et al. 2016; Zingg et al. 2017). GSK126 wirkte auch in

Kombination mit den Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-Fluoruracil im Mausmodell antiproliferativ auf das Lungen- und Kolonkarzinom (Huang et al. 2019).

Einige Studien haben bereits erste Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen HIF und EZH2 geliefert, doch das Verständnis ihrer gegenseitigen Abhängigkeiten in verschiedenen zellulären Umgebungen und der molekularen Mechanismen ist noch lange nicht vollständig. Es folgt eine Zusammenfassung der bisherigen Studienlage.

Molekulare Wechselwirkungen zwischen HIF und EZH2

Eine simultane Hochregulation von HIF-1 α und EZH2 wurde in Mammakarzinomzellen gezeigt, und dies war mit einer schlechteren Gesamtprognose der Patienten assoziiert (Dong et al. 2014). Auch können die HIF-Proteine das EZH2-Level und dessen Wirkung in der Zelle verstärken. So wurde herausgefunden, dass HIF-1 α als Transkriptionsfaktor indirekt die EZH2-Expression aktivieren kann, indem es die Expression der tumorsuppressiven microRNA mi-R101 vermindert. Diese hemmt normalerweise die EZH2-Translation (Cao et al. 2010). Unter Hypoxiebedingungen kann HIF-1 α außerdem den PRC2-Komplex inaktivieren und zur Akkumulation von freiem EZH2 führen. Dadurch kann in triple-negativen Brustkrebszellen eine Komplexbildung von EZH2 mit FOXM1 induziert werden. Insgesamt resultiert eine erhöhte Tumorinvasivität unter anderem durch die verstärkte Expression von Matrix-Metalloproteinasen, die umliegendes Gewebe zerstören, sodass die Infiltration der Nachbarstrukturen und der Einbruch in das Gefäßsystem erleichtert werden (Mahara et al. 2016a; Mahara et al. 2016b).

Über den Einfluss, den EZH2 auf das HIF-Level hat, ist bisher weniger bekannt. Allerdings kann der EZH2-Inhibitor GSK126 in der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 eine Herabregulation von VEGF-A auslösen. Dessen Genexpression wird direkt von HIF als Transkriptionsfaktor gesteuert. Die Behandlung der Zellen mit GSK126 führte zu verringerter Migration der Zellen und weniger Angiogenese (Chen et al. 2016).

Die eher spärliche Datenlage zum Einfluss von EZH2 auf die HIF-Proteine und deren molekulare Wechselwirkungen führt in Kombination mit dem wachsenden klinisch-therapeutischen Interesse an den beiden Strukturen zur Fragestellung dieser Studie.

Fragestellung der Studie

Die Grundlage dieser Studie war ein kleiner Loss-of-Function-Screen, der in unserem Labor mittels shRNA-abhängiger Depletion durchgeführt wurde, um die Wirkung von selektierten Histon-Demethylasen und Histon-Methyltransferasen auf den HIF-Signalweg zu untersuchen. In diesen Versuchen wurde überraschenderweise eine regulatorische Wechselwirkung zwischen EZH2 und HIF-2 α beobachtet.

EZH2 und HIF sind in den meisten veröffentlichten Studien unabhängig voneinander als onkogen bzw. Tumorproliferation fördernd beschrieben worden. In Kombination können sie das Wachstum, die Invasion und die Metastasierung von Tumoren zusätzlich verstärken. Einige Studien deuten bereits auf eine wechselseitige Beeinflussung von EZH2 und HIF hin. Bislang sind jedoch nur wenige Mechanismen bekannt, über die HIF EZH2 beeinflusst. EZH2 könnte seinerseits HIF regulieren - im Komplex mit PRC2 oder frei vorliegend, direkt oder indirekt - und auf dessen Genregulation oder Proteinstabilität einwirken. Die weitere Klärung der Rolle von EZH2 in diesem Mechanismus, insbesondere bei der HIF-2 α -Regulation, wurde daher in dieser Studie anhand der *in vitro* Tumorzellmodelle Glioblastom, Mammakarzinom und Bronchialkarzinom verfolgt. Die beiden letztgenannten Tumorarten wurden insbesondere wegen ihrer hohen Neigung zur Metastasierung ins Gehirn ausgewählt.

Material und Methoden

Materialien

Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	finale Konzentration
Puromycin (Invivogen, # ant-pr-1)	10 mg/mL	1 µg/mL
Blasticidin (Thermo, R210-01)	6 mg/mL	3 µg/mL
Plasmocin (Invivogen, #ant-mpt-1)	25 mg/mL	25 µg/mL
Plasmocure (Invivogen, # ant-pc)	100 mg/mL	50 µg/mL
Ampicillin (Sigma, # A9598)	50 mg/mL	50-100 µg/mL

Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Produktnummer	Hersteller	Verdünnung
Anti-HIF-1α	Kaninchen	10006421 (polyklonal)	Cayman	1:5.000
Anti-HIF-2α	Kaninchen	NB100-122 (polyklonal)	Novus	1:500
Anti-EZH2	Kaninchen	#5246S (monoklonal)	Cell Signaling	1:5.000
Anti-Tubulin	Maus	DLN-09992 (monoklonal)	Dianova	1:10.000
Anti-H3	Kaninchen	4499T (monoklonal)	Cell Signaling	1:5.000
Anti-H3K27me3	Kaninchen	9733T (monoklonal)	Cell Signaling	1:5.000
Anti-H3K27me3	Kaninchen	07-449 (polyklonal)	Millipore	1:2.500
Anti-V5	Maus	R960-25	Invitrogen	1:500

		(monoklonal)		
Anti-3H9- α -GFP	Ratte	3h9-100 (monoklonal)	Chromotek	1:1.000

Sekundärantikörper

Antikörper	Produktnummer	Hersteller	Verdünnung
Ziege-anti-Maus	115-035-146	Dianova	1:5.000
Ziege-anti-Kaninchen	111-035-144	Dianova	1:5.000
Ziege-anti-Ratte	712-1333	Rockland	1:5.000

Bakterienkultivierung

-Bakterienstamm für Transformationen: *Escherichia coli* stabl3

-LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 20 g LB-Puder (Roth, #X964.1) wurde in 1 Liter Reinstwasser suspendiert und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Aufbewahrung bei 4°C.

-Reinstwasser: steril gefiltertes Wasser (Porengröße 0,22 μ M)

Inhibitoren

-MG132 (Millipore, # 474790)

-GSK126: Ein für EZH2 hochselektiver Inhibitor (MedChemExpress, # HY-13470), 5 mg GSK126-Pulver sind als 20 mM Stammlösung in 474,83 μ L gefiltertem DMSO (0,22 μ m-Filter) nach Herstellerangaben gelöst.

Plasmide

-pcDNA3.1 D/V5-His-TOPO: Säugetierexpressionsvektor, CMV-Promoter, Selektion im Säugetier: Neomycin, bakterielle Resistenz: Ampicillin, enthält das V5-Epitop und ein Polyhistidin-Tag (6X His) (Invitrogen)

-pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.HIF-2 α : Säugetierexpressionsvektor mit menschlichem HIF-2 α (Julia Wenner)

-pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.HIF-2 α mPPN: Säugetierexpressionsvektor mit einer nicht degradierbaren menschlichen HIF-2 α -Sequenz mit mutierten Prolylhydroxylierungsstellen (Julia Wenner)

-pcDNA3.1-EGFP: pcDNA3.1, die von Hui-Ke Jiao mit EGFP versehen wurde

-pGIPZ non silencing control: Lentiviraler Expressionsvektor (nicht zielgerichtet), der als Negativkontrolle für sämtliche Transduktionen verwendet wurde (Open Biosystems, # RHS4346)

-pGIPZ shRNA hEZH2 #3: Kurze Haarnadel-RNA gegen menschliches EZH2 in einem lentiviralen pGIPZ-Vektor (Open Biosystems # V2LHS_17510)

Primer

Alle Primer stammen von der Firma Sigma-Aldrich.

Primer	Sequenz (5'-3')
HIF-1 α -5-vorwärts	CCATTAGAAAGCAGTTCCGC
HIF-1 α -5-rückwärts	TGGGTAGGAGATGGAGATGC
HIF-2 α -vorwärts	CGAACACACAAGCTCCTCTC
HIF-2 α -rückwärts	GTCACCACGGCAATGAAAC
EZH2-2-vorwärts	GTACACGGGGATAGAGAATGTGG
EZH2-2-rückwärts	GGTGGGCGGCTTTCTTTATCA
HPRT-4-vorwärts	TATGGCGACCCGCAGCCC
HPRT-4-rückwärts	GCAAGACG TTCAGTCCTGTCCAT

RNA-Isolierung

- RNeasy Mini Kit: Qiagen, #74106
- QIAshredder-Kit: Qiagen, #79656
- RNase-Free DNase Set: Qiagen, #79254
- DEPC-H₂O: 1 mL Diethylpyrocarbonat (Roth, #K028) wurde über Nacht in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.
- β -Mercaptoethanol (Roth, # 4227.3)
- RLT-Lysepuffer (Qiagen, # 1015762)

Western Blot

- 8% Trenngel: 2,7 mL 30% Polyacrylamid, 2,6 mL unterer Puffer, 4,7 mL destilliertes Wasser, 100 μ L APS (10%), 10 μ L TEMED.
- 15% Trenngel: 5 mL 30% Polyacrylamid, 2,6 mL unterer Puffer, 2,4 mL destilliertes Wasser, 100 μ L APS (10%), 5 μ L TEMED.
- Sammelgel: 0,65 mL 30% Polyacrylamid, 1,3 mL oberer Puffer, 3 mL destilliertes Wasser, 50 μ L APS (10%), 5 μ L TEMED.
- APS: Ammoniumpersulfat (AppliChem, # A1142, 10%)
- TEMED: Tetramethylenediamin (AppliChem, # A1148.0100)
- 30% Polyacrylamid (Roth, # 3029.1, 37,5:1)
- Unterer Puffer
 - 1,5 M Tris Base (121,1) (Roth, # 9090.3)

- 0,4% SDS (20%) (Roth, # 2326.2)
- Oberer Puffer
 - 0,5 M Tris Base (121,1)
 - 0,4% SDS (20%)
- 2-Propanol (Sigma-Aldrich, #33539)
- Frischhaltefolie (Barriofilm)
- Protein Assay Reagent A (Biorad, # 500-0113)
- Protein Assay Reagent B (Biorad, # 500-0114)
- Protein Assay Reagent S (Biorad, # 500-0115)
- Lyse-Puffer (Lämmli)
 - 10 mM Tris HCl (MG 157,6 g)
 - 2 mM EGTA (MG 380,35 g) (AppliChem, # A0878.0100)
 - 20 mM NaF (MG 41,99 g)
 - 2% SDS
- Probenpuffer
 - 40 mL 10% SDS
 - 16 mL 1 M Tris pH 6,8
 - 20 mL Glycerol 100%
 - 19 mL H₂O
 - 50 µL Beta-Mercaptoethanol (Roth, # 4227.3)
 - 200 µL 1% Bromphenolblau (1g H₂O festes Bromphenolblau auf 100 mL H₂O)
- Proteinleiter Page Ruler (Thermo Scientific, # 26625)
- Spectra Multicolor High Range Protein Ladder (Thermo Scientific, # 26616)
- 10x Running-Puffer
 - 250 mM Tris Base (MW: 121,1)
 - Glycin (Sigma, # G-8898)
 - 1% SDS
- Methanol (Sigma-Aldrich, # 32213-1L-M)
- 10x Wettransfer-Puffer
 - Tris Base (121,1)
 - Glycin
- Blockierungspuffer
 - Milchpulver (Roth, # T145.2)
 - Waschpuffer
- Waschpuffer
 - 1x PBS (Sigma, # S3264-2506)
 - 0,1% Tween 20 (Sigma, # P9416)

-20x PBS

-140 mM NaCl

-2,7 mM KCl

-10 mM Na₂HPO₄

-1,8 mM KH₂PO₄ in destilliertem Wasser (pH 7,4)

-Stripping-Puffer

-200 mM Glycin, 0,05% Tween 20 in destilliertem Wasser

-Pierce ECL Westernblot Substrate (Thermo Scientific)

1. Detection Reagent 1 (# 1859701)

2. Detection Reagent 2 (# 1859698)

-Plus ECL (Western Lightning)

1. Oxidizing Reagent Plus (# 0RT2655)

2. Enhanced Luminal Reagent Plus (# 0RT2755)

Zelllinien

A549: Menschliche Lungenadenokarzinomzellen (ATCC # CCL-185)

G55: Menschliche Glioblastomzellen (M. Westphal und K. Lamzus, Hamburg, Deutschland)

MDA-MB-231: Menschliche Mammakarzinomzellen (ATCC #HTB-26), in diesem Fall von Omelyan Trompak mit dem POR-Plasmid transduziert, das neben einer konstant aktiven Renilla-Luciferase eine Firefly-Luciferase unter der Kontrolle von HIF-2 α -ODD enthält

HEK293T: Menschliche embryonale Nierenzellen (ATCC # CRL-3216)

Speziell für diese Arbeit (Sabine Gräf) oder deren Vorarbeit (Sandra Baumgart) generierte Zelllinien:

Name	Konstrukt/Lentivirus Database	MOI	Selektion
A549 shNsc	pGIPZ non silencing control (Open Biosystems)	100	Puromycin 1 μ g/mL
A549 shEZH2	pGIPZ shRNA hEZH2 #3 (V2LHS_17510) (Open Biosystems)	100	Puromycin 1 μ g/mL
G55 shNsc	pGIPZ non silencing control	20	Puromycin 1 μ g/mL
G55 shEZH2	pGIPZ shRNA hEZH2	20	Puromycin 1 μ g/mL
MDA-MB-231 POR shNsc	pGIPZ non silencing control	50	Puromycin 1 μ g/mL Blasticidin 3 μ g/mL

MDA-MB-231 POR shEZH2	pGIPZ shRNA hEZH2	50	Puromycin 1 µg/mL Blasticidin 3 µg/mL
MDA-MB-231 POR shNsc Co	pGIPZ non silencing control	50	Puromycin 1 µg/mL Blasticidin 3 µg/mL
MDA-MB-231 POR shEZH2 Co	pGIPZ shRNA hEZH2	50	Puromycin 1 µg/mL Blasticidin 3 µg/mL
MDA-MB-231 POR shNsc IM	pGIPZ non silencing control	50	Puromycin 1 µg/mL Blasticidin 3 µg/mL
MDA-MB-231 POR shEZH2 IM	pGIPZ shRNA hEZH2	50	Puromycin 1 µg/mL Blasticidin 3 µg/mL

Medium, Puffer und andere Reagenzien

- DMEM (Gibco, # 41966-029, 1x)
- Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Gibco, # 31985-047)
- FBS (Astro, # S0115)
- Trypsin-EDTA (Gibco, # 25300-054)
- PBS (Gibco, # 10010-015, 1x)
- DMSO (Roth, # A994.1)
- Casyton Puffer (Omni Life Bioscience, # 5651808)
- Standard-Zellkulturmedium für adhärenzte Zellen: 500 mL DMEM, 10% FBS

Methoden

Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden vor der Benutzung auf *Mycoplasma pneumoniae* getestet und bei Bedarf im Vorfeld mit Plasmocin oder Plasmocure behandelt. Sämtliche Arbeiten mit Zellen (Subkultivierung, Transfektion, Behandlung mit weiteren Substanzen etc.) erfolgten an einer Sterilbank (Thermo Scientific, MSC-Advantage) mit im Vorhinein autoklavierten oder mittels 70% Ethanol desinfizierten Utensilien.

Kultivierung der verwendeten Zellen

Die Aussaat der Zellen erfolgte nach zweiminütigem Auftauen des 1 mL-Aliquots im 37°C warmen Wasserbad (GFL®) in 10 cm Kulturschalen (Sarstedt, # 83.3902) mit 10 mL DMEM (incl. 10% FBS). Alle Zelllinien wurden als adhärenente Kultur gehalten. Nach 24 Stunden wurde das Zellmedium gewechselt, um eine zelltoxische Wirkung durch das Einfriermedium mit 10% DMSO zu verhindern. Anschließend wurden die Antibiotika zur Selektion der lentiviralen Plasmide in den oben angegebenen Konzentrationen zugegeben.

Zur Subkultivierung der Zellen für Erhaltungskulturen oder Experimente wurden die zu 80 bis 90 Prozent konfluenten Schalen mit 5 mL PBS gewaschen und für 3 bis 4 Minuten bei 37°C mit Trypsin-EDTA inkubiert. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Ablösung der Zellen von der Schale. Nach Zugabe von 5 mL DMEM (10% FBS) wurde die Zellsuspension bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurden die Zellen mit dem Verdünnungsfaktor 1:10 bis 1:24 in neue Zellkulturschalen mit sterilem Kulturmedium gegeben. Bei Erhaltungskulturen wurden erneut die zur Selektion verwendeten Antibiotika in den entsprechenden Konzentrationen hinzugegeben. Es erfolgte ein Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage. Zellen für Experimente wuchsen für die Dauer des Experiments stets in Zellkulturmedium ohne Antibiotika.

Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mit dem ‚CASY Cell Counter and Analyzer System Model TT‘ (Roche Diagnostics GmbH, # 05651697001) nach Herstellerangaben. Dazu wurden 100 µL Zellsuspension in 10 mL CASY ton Puffer gegeben. Dabei war der Aggregationskoeffizient unterhalb von 2 und der Anteil lebendiger Zellen oberhalb von 90%.

Kryokonservierung

Das Einfrieren von Aliquots jeder Zelllinie wurde jeweils unmittelbar nach dem Auftauen nach zwei bis drei Tagen und vor dem Einsatz der Zellen in Experimenten vorgenommen. Dazu wurde eine 70 bis 90 Prozent konfluente Kulturschale mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 2 mL Kryomedium (DMEM mit 10% FBS und 10% gefiltertem DMSO) suspendiert und in je ein 1 mL-Kryoröhrchen (Greiner, # 123277) gegeben. Die Aliquots wurden in einem Einfrierbehälter (mit Isopropanol gefüllt) bei -80°C langsam heruntergekühlt und nach drei bis vier Tagen in den Stickstofftank überführt.

Lentivirale Transduktion

Es wurden je nach Zelllinie und MOI 5.000 Zellen pro Well einer 24-Well-Zellkulturplatte oder 500.000 Zellen pro Well einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Als Medium wurde DMEM mit 10% FBS und 8 µg/mL Polybren verwendet. Anschließend wurden die lentiviralen Partikel hinzugegeben und die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und es erfolgte ein Mediumwechsel mit zusätzlicher antibiotischer Selektion. Bei einer Zelldichte von 80% wurden die Zellkulturen in größere Zellkulturschalen ausgesät.

Hypoxie-Behandlung

Die Behandlung der Zellen mit Hypoxie bei 1% Sauerstoff und 5% Stickstoff erfolgte in der Hypoxie-Kammer (Coy Lab, Grass Lake, USA) bei 37°C. Je nach experimentellem Design wurden die Zellkulturschalen 24 oder 48 Stunden nach der Aussaat für 24 oder 48 Stunden in der Hypoxie-Kammer inkubiert. Für reine Hypoxie-Experimente ohne zusätzliche Zugabe von Substanzen wurden 500.000 Zellen (A549, MDA-MB-231 POR oder G55, jeweils shNsc bzw. shEZH2) in 10 cm-Zellkulturplatten ausgesät und stets nach 24 Stunden für 48 Stunden in die Hypoxie-Kammer gestellt. Die Probengewinnung am Endpunkt der Experimente wurde innerhalb der Hypoxie-Kammer durchgeführt.

Kombinierte GSK126-und Hypoxie-Behandlung

Die gleichzeitige Behandlung von Zellen mit Hypoxie und dem in DMSO gelösten Inhibitor GSK126, der die Methylierungsaktivität von EZH2 pharmakologisch hemmt, wurde nach dem Protokoll von Chen et al. (Cancer Chemother Pharmacol, 2016) für die Zelllinien A549, MDA-MB-231 POR und G55 optimiert. Zunächst wurden 200.000

Zellen in je eine Vertiefung einer 6-Lochplatte (Sarstedt, # 83.3920) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Zellkulturmedium gegen DMEM (10% FBS) mit GSK126 in den Konzentrationen 40 nM, 200 nM, 1 μ M und 5 μ M ausgetauscht. Pro Zelllinie wurden drei der vier verschiedenen Konzentrationen und eine DMSO-Kontrolle, die dem DMSO-Volumen mit der höchsten GSK126-Konzentration entsprach, untersucht. Bei geringeren GSK126-Konzentrationen wurde das Zellkulturmedium bis zum maximalen DMSO-Volumen um steril gefiltertes DMSO ergänzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen bei entsprechender Kontrollgruppe für 24 Stunden in die Hypoxie-Kammer gestellt.

Kombinierte Hypoxie- und MG132-Behandlung

24 Stunden nach der Aussaat von MDA-MB-231 POR shNsc bzw. shEZH2 mit 40.000 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte wurden die Zellen für 48 Stunden in die Hypoxie-Kammer gestellt. Die Zugabe des proteasomalen Inhibitors MG132 in der Konzentration 10 μ M erfolgte anschließend entweder 3 oder 6 Stunden vor der Extrahierung der Proteinlysate. Es existierten eine entsprechende Kontrolle ohne Hypoxie-Behandlung sowie für Normoxie- und Hypoxie-Bedingungen eine Kontrolle ohne MG132-Behandlung.

Transiente Transfektion mit Hypoxie-Behandlung

Für die transiente Transfektion mit dem Fugene HD Transfection Kit (Promega, # E2312) wurden 150.000 Zellen (für die Zelllinien A549 und MDA-MB-231 POR shNsc bzw. shEZH2) oder 200.000 Zellen (für die Zelllinie G55 shNsc bzw. shEZH2) in je eine Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Zellmedium gewechselt und auf 1 mL reduziert. 2 Stunden später wurde das Transfektionsreagenz vorbereitet. Dazu wurden 3,8 μ g des jeweiligen Plasmids (pcDNA 3.1 als Kontrolle, HIF-2 α -Wildtyp oder HIF-2 α -dPPN) und 0,2 μ g EGFP-Plasmid als Kontrolle der Transfektionseffizienz in 150 μ L Opti-MEM-Zellmedium pipettiert. Anschließend wurden 16 μ L Fugene HD Transfektionsreagenz hinzugefügt, der Transfektionsansatz nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben und 8 Stunden später durch 1 mL DMEM (10% FBS) ergänzt. Nach weiteren 16 Stunden erfolgte eine Hypoxie-Behandlung für 48 Stunden bei entsprechender Kontrolle in Normoxie.

Bakterielle Transformation

Es wurden 100 μ L chemisch kompetenter *Escherichia coli* stabi3 entweder mit 10 ng Plasmid-DNA oder mit 5 μ L Reagenz aus einer Ligierungsreaktion für 20 Minuten auf

Eis inkubiert. Nach einer Inkubation bei 42°C für 30 Sekunden wurde die Probe erneut für 2 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden 500 µL LB-Medium hinzugefügt und die Probe wurde unter Vortexbewegung mit 220 rpm für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Gemeinsam mit der angepassten Antibiotikamenge wurden 50-150 µL der Probe auf eine LB-Kulturplatte ausgebracht. Bei der Transformation ligierter Plasmid-DNA wurden bis zu 250 µL der Bakterienkultur verwendet. Nach einer 12-16-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Kolonien ausgewählt und mit 4 mL einer Startkultur in S.O.C.-Medium (Thermo, # 15544034) geimpft.

Plasmid-Isolierung aus Bakterienkulturen

Die Isolierung der Plasmide aus den Glycerol-*Escherichia-coli*-Stammkulturen erfolgte nach Herstellerprotokoll des PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kits (Invitrogen, # K210007). Dazu wurden 10 µL einer Stammkultur über Nacht in 200 mL LB-Medium mit Ampicillin (1 µL Stammlösung pro mL) bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-Konzentration wurde mit dem NanoDrop-Photometer (Peqlab) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay misst die Expression der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase. Das POR-Plasmid in der Zelllinie MDA-MB-231 (generiert von Omelyan Trompak) codiert für zwei Proteine unter der Kontrolle eines starken viralen Promotors. Das eine Protein ist ein Fusionsprotein aus der HIF-2α-ODD-Domäne (oxygen dependent degradation domain) und der Firefly-Luciferase, das durch Prolylhydroxylasen (PHDs) hydroxyliert und dadurch abgebaut werden kann. Dieser Effekt ist unter hypoxischen Bedingungen vermindert, da dann die PHDs inaktiv sind. Das andere Protein ist die *Renilla*-Luciferase, die konstitutiv exprimiert wird.

Es wurden 4×10^4 Zellen als Sechsfachbestimmung für shNsc- und shEZH2-Zelllinien in die Vertiefungen einer 24-Lochplatte (Sarstedt, # 83.3922) ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen bei entsprechender Normoxie-Kontrollplatte für 48 Stunden in die Hypoxie-Kammer gestellt. Die Proben wurden am Endpunkt des Experiments nach Herstellerangaben mit passivem Lysepuffer (Promega, Dual-Luciferase Reporter Assay System) isoliert. Die Aktivität der Renilla- und Firefly-Luciferase wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, # E1941) in einem Mikroplatten-Reader (TriStar LB 941, Berthold Technologies) gemessen. Zur Analyse wurde das Firefly-Luciferase-Signal zum Renilla-Luciferase-Signal normalisiert und als relative Luciferase-Einheiten (RLU) dargestellt.

RNA

Isolierung

Zur Herstellung der RNA-Lysate wurden 350 μL RLT-Lysepuffer aus dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen, # 74106) auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Anschließend wurde das Lysat mit einem sterilen Zellschaber gesammelt, in ein 1,5 mL Eppendorf-Reagiergefäß (Sarstedt, # 72.706.400) pipettiert und bei -80°C aufbewahrt. Die RNA wurde mit dem QIAshredder-Kit (Qiagen, # 79656) homogenisiert und mit dem RNeasy Mini-Kit nach Herstellerangaben isoliert (s. Handbuch S. 27 ab Schritt 3 inklusive DNase). Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop-Photometer (Peqlab) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, und die Reinheit durch Messungen von 260/280 und 260/230 OD-Werten geprüft.

Reverse Transkription

1 μg der isolierten RNA wurde mit DEPC- H_2O zu insgesamt 12 μL Volumen ergänzt. Die reverse Transkription der RNA in die für die qRT-PCR erforderliche cDNA erfolgte mit dem Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, # K1652) nach Herstellerprotokoll. Die Reaktionszyklen erfolgten mittels ProFlex-PCR-System (Thermo Scientific). Abschließend wurde die cDNA im Verhältnis 1:10 mit DEPC- H_2O verdünnt.

Quantitative PCR

Für die quantitative Realtime-PCR wurden 4 μL der Proben in jeweils 12 Vertiefungen einer 96-Lochplatte (Sarstedt, # 72.1981.202) pipettiert. Pro Vertiefung wurden 4 μL jedes Vorwärts- und Rückwärts-Primer-Ansatzes (Konzentration 1:100 in DEPC- H_2O) mit 10 μL PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, # A2574) und 2 μL DEPC- H_2O versetzt. Die Zugabe der Primer HIF-1 α , HIF-2 α , EZH2 und HPRT (Kontrolle) erfolgte mit je 16 μL pro Vertiefung als Dreifachbestimmung pro Probe. Zusätzlich wurde eine H_2O -Kontrolle pro Primer pipettiert. Anschließend wurde die qRT-PCR nach der SYBR-green-Methode mittels Quant Studio 3 und StepOne Plus-System durchgeführt (Abgene, Thermo Fisher Scientific). Die Analyse hinsichtlich des mRNA-Gehalts in den verschiedenen Proben erfolgte über den Vergleich der über das Triplett gemittelten Ct-Werte (cycle threshold) nach Normalisierung zum HPRT-mRNA-Gehalt in den Proben.

qPCR-Schema für die SYBR-green-Methode

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Enzymaktivierung	95°C	15 Minuten	1
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	45
Anlagerung	60°C	30 Sekunden	
Verlängerung	72°C	30 Sekunden	
Denaturierung	95°C	1 Minute	1
Anlagerung/Verlängerung	60°C	1 Minute	1
Schmelzkurve	55°C	15 Sekunden	Schrittweise Erhöhung der Temperatur um 0.5°C
Ende	4°C	Gelalten	

Berechnung der relativen mRNA-Konzentration nach folgender Formel:

$$\text{mRNA} = \frac{2^{-(\text{Ct-X}(\text{Nor oder Ktrl.}) - \text{Ct-HPRT}(\text{Nor oder Ktrl.}))}}{2^{-(\text{Ct-X}(\text{Y}) - \text{Ct-HPRT}(\text{Y}))}}$$

Proteine

Gewinnung der Proteinlysate

Die Gewinnung der Proteinlysate wurde am Endpunkt jedes Experiments nach der Entfernung des Zellkulturmediums und dem Waschen mit PBS vorgenommen. Dazu wurden 50 µL (für 6-Lochplatten) oder 100 µL (für 10 cm-Kulturschalen) Lämmli-Puffer auf die Zellen gegeben, das Lysat mittels Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 mL-Eppendorf-Reagiergefäß pipettiert. Die Proteinlysate wurden bei -20°C aufbewahrt.

Proteinmessung

Vor der Proteinmessung wurde DNA mit dem Bandelin Sonopuls-Gerät durch Ultraschallbehandlung (Bandelin, Sonopuls mini20, Amplitude 90%, Dauer 30 s, 0,5 s Pulsdauer) in den Proben zerkleinert. Danach wurden je 5 µL jeder Probe als Doppelbestimmung in eine 96-Lochplatte gegeben. Die Leerkontrolle bestand aus Lämmli-Puffer. Zu allen Proben wurden 25 µL (24,5 µL Protein Reagent Assay A mit 0,5 µL Protein Reagent Assay S) pipettiert. Im Anschluss wurden zu jeder Probe 200 µL Protein Reagent Assay B hinzugefügt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 750 nm nach dem Lowry-Protokoll (Lowry et al., 1951) mittels Mikroplatten-Reader. Je nach

Proteinkonzentration wurden 20 bis 60 µg des Proteinlysats mit 5 µL Probenpuffer versetzt und mit Lämmli-Puffer auf insgesamt 20 µL für eine Geltasche ergänzt.

Western Blot

SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine nach deren Größe erfolgte mit dem Mini-Protean® Tetra Handcast System (Bio-Rad, # 1658007FC). Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden pro Probe 20 µL in je eine Geltasche eines Polyacrylamidgels (8% oder 15% Acrylamid je nach Proteingröße) gegeben und nach einer 15-minütigen Sammelphase bei 80 mV für 90 Minuten bei 120 mV elektrophoretisch aufgetrennt.

Wet Blot

Die elektrophoretische Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Transferrmembran (Thermo Scientific, # 88518) erfolgte mittels Bio-Rad-System im Nassverfahren. Nach 2 Stunden bei 250 mA war der Prozess abgeschlossen.

Auftragen der Antikörper

Nach einer einstündigen Inkubationszeit der PVDF-Membran in 5% Blockierungspuffer bei Raumtemperatur wurde der Primärantikörper (in den entsprechenden Konzentrationen in fünfprozentigem Blockierungspuffer gelöst) aufgetragen. Die Membranen wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden 3 Waschschrte mit Waschpuffer für je 10 Minuten vorgenommen, gefolgt von einer 1-2-stündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Die 3 Waschschrte wurden wiederholt und durch 5 Minuten Waschen mit PBS ergänzt.

Entwicklung

Die Chemolumineszenz wurde je nach Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers und Proteinkonzentration mithilfe des Pierce ECL Westernblot Substrate- (Thermo Scientific) oder Plus ECL-Systems (Western Lightning) erzeugt. Die Entwicklung der Membranen wurde entweder digital (Intas, ECL Chemostar) oder analog mittels Filmkassette und Röntgenfilm (Thermo Scientific, # 34089) durch das Entwicklungsgerät Curix 60 (Agfa) durchgeführt.

Stripping

Um die Membran hinsichtlich eines anderen Proteins zu untersuchen oder das vorherige Ergebnis zu optimieren, wurde die Membran 5 Minuten lang in Waschpuffer gewaschen, bei Raumtemperatur für eine Stunde mit Stripping-Puffer und für eine weitere Stunde mit Blockierungspuffer inkubiert. Nach Auftragen des Primärantikörpers über Nacht wurde wie bereits beschrieben verfahren.

Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Statistische Vergleiche wurden mittels Student t-Test angestellt. Eine statistische Signifikanz wird mit * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$ angezeigt.

Ergebnisse

Der Effekt der EZH2-Depletion auf die HIF-2 α -Expression unter akuten Hypoxie-Bedingungen in Glioblastom-, Bronchialkarzinom- und Mammakarzinomzellen *in vitro*

EZH2 ist eine Histonmethyltransferase, die wie der Transkriptionsfaktor HIF-2 α in verschiedenen Tumorentitäten hochreguliert ist. In unserem Labor wurde eine Regulation zwischen EZH2 und HIF-2 α beobachtet. In den Vorexperimenten unserer Forschungsgruppe zeigte sich in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 POR-shEZH2 ein geringerer HIF-2 α -Proteingehalt nach akuter 48-stündiger Hypoxiebehandlung als in der Kontrolle mit MDA-MB-231 POR-shNsc (Non-silencing control). Als Ursache für diese Herabregulation kommen eine Einflussnahme von EZH2 auf die HIF-2 α -Transkriptionsebene (indirekt durch Histonmethylierung oder eine andere indirekte oder direkte Aktivität von EZH2), dessen mRNA- oder Proteinstabilität oder die Translation in Betracht. Daher wurde in dieser Arbeit die Einflussnahme von EZH2 auf die HIF-2 α -mRNA, -Proteinexpression und -stabilität im Hinblick auf die Gewichtung dieser Komponenten auf molekularer Ebene genauer untersucht.

Zunächst sollte die Reduktion von HIF-2 α in Abwesenheit von EZH2 unter hypoxischen Bedingungen neben MDA-MB-231 POR auch in zwei weiteren Zelllinien (Lungenkarzinom (A549) und Glioblastom (G55)) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden in unserem Labor folgende Zellen generiert: MDA-MB-231-POR-Co-shNsc und -shEZH2, MDA-MB-231-POR-IM-shNsc und -shEZH2, MDA-MB-231 POR-shNsc und -shEZH2, G55-shNsc und -shEZH2 und A549-shNsc und -shEZH2. Die MDA-MB-231-POR-IM-Zellen wurden bei entsprechender Kontrolle aus MDA-MB-231-POR mittels 15 intermittierenden Zyklen von 48h mit 21% O₂ und 48h mit 1% O₂ von Omelyan Trompak generiert, und die -shNsc und -shEZH2-Linien von Sandra Baumgart und Sabine Gräf. Diese Zelllinien wurden für 48 Stunden unter Normoxie (21% O₂) oder Hypoxiebedingungen (1% O₂) kultiviert. Anschließend wurden RNA und Proteine von den Zellen isoliert und die Proben mittels RT-qPCR und Western Blot hinsichtlich der Unterschiede von HIF-2 α auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

Mittels Western Blot wurden die Proteine HIF-2 α , HIF-1 α , EZH2 sowie H3K27me3 als Indikator der EZH2-Methylierungsaktivität detektiert und als Ladekontrollen das Zytoskelettprotein Tubulin und Histon H3 verwendet. Die Depletion von EZH2 führte zu deutlich niedrigerem H3K27me3-Level. Dies bestätigt die Funktionalität der EZH2-

Depletion, da EZH2 die Trimethylierung von H3 an K27 katalysiert. In den Proben mit EZH2-Depletion war auch der HIF-2 α -Proteingehalt unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen geringer als in den Kontrollproben. Auch der HIF-1 α -Proteingehalt war in EZH2-depletierten Zellen unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen geringer als in den Kontrollproben, diese Reduktion war nicht in allen Replikaten durchgehend zu beobachten. (**Abb. 4A-C**). Die Effizienz der shRNA-vermittelten EZH2-Depletion war in den verschiedenen Tumorzelllinien unterschiedlich: MDA-MB-231-POR-shEZH2 > G55-shEZH2 > A549-shEZH2 (**Abb. 4A-C**). In MDA-MB-231-POR-Co-shEZH2 und MDA-MB-231-POR-IM-shEZH2 (**Abb. 4D**) war die Effizienz der EZH2-Depletion ein wenig niedriger als in MDA-MB-231-POR-shEZH2 Zellen. Hier zeigte sich ebenfalls eine Verringerung des HIF-2 α -Proteingehalts in EZH2-depletierten Zellen unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen im Vergleich zu den Kontrollproben. Für HIF-1 α gilt diese Aussage nur in MDA-MB-231 POR IM-Zellen.

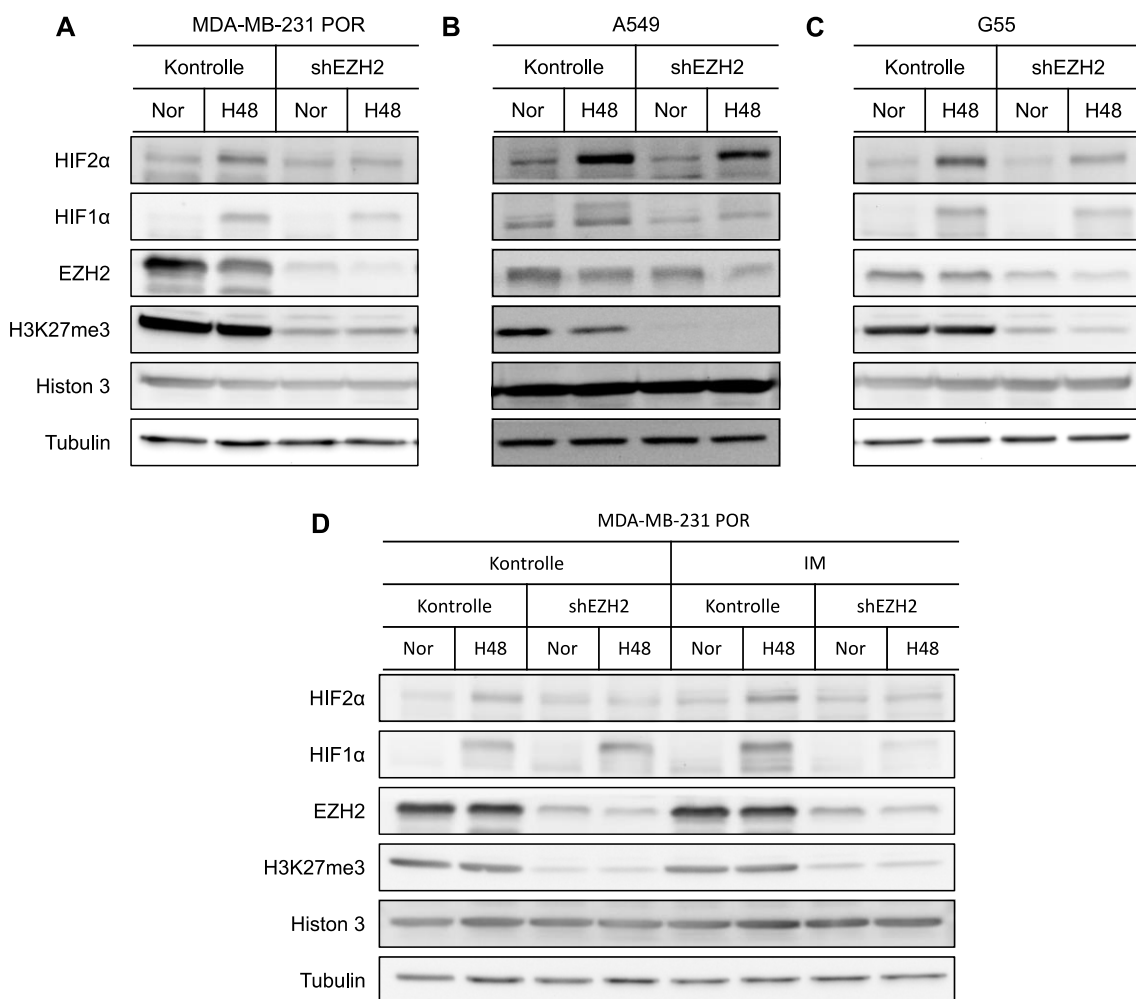


Abb. 4. EZH2-Depletion führt zu vermindertem HIF-2 α -Proteingehalt in Tumorzellen. (A) Immunoblot-Analyse von HIF-2 α , HIF-1 α , EZH2 und H3K27me3 in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231 POR) und entsprechender Kontrolle unter Normoxie

(Nor, 21% O₂) und Hypoxie (H48, 1% O₂, 48 h). EZH2 wurde mittels shRNA depletiert. Histon H3 und Tubulin dienten als Ladungskontrolle. Analoge Analyse in Lungenkarzinomzellen (A549, **(B)**) und Glioblastomzellen (G55, **(C)**). **(D)** Die in MDA-MB-231-Zellen beobachtete HIF-2 α -Reduktion erfolgte auch nach intermittierender Hypoxie (IM). HIF-1 α war in allen Zelllinien (außer MDA-MB-231 POR ohne IM) unter EZH2-Knockdown und Hypoxie reduziert, diese Reduktion war nicht in allen Replikaten durchgehend zu beobachten. (n=3)

Um den Effekt der EZH2-Depletion auf HIF-2 α auf einer weiteren molekularen Ebene zu untersuchen, wurde parallel zu den Proteinextrakten im selben experimentellen Rahmen aus oben genannten Zelllinien die mRNA isoliert und mittels RT-qPCR analysiert. Die Expression des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Gens ändert sich nicht bei unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken, weshalb die HPRT-mRNA-Messung analog zu Tubulin im Western Blot zur Normalisierung der Expressionslevel fungierte. Auch auf der mRNA-Ebene war in den Proben mit EZH2-Depletion die HIF-2 α -Expression unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen geringer als in den Kontrollproben (**Abb. 5**). Es waren zelllinienspezifische Unterschiede bezüglich des HIF-2 α -mRNA-Levels sichtbar. In MDA-MB-231-POR-shEZH2 lag das mRNA-Level bei ca. 50% im Vergleich zu MDA-MB-231-POR-shNsc, in A549-shEZH2 lag das mRNA-Level bei ca. 60-70% im Vergleich zu -shNsc und in G55-shEZH2 lag das mRNA-Level bei ca. 90% im Vergleich zu G55-shNsc. Bezüglich der HIF-1 α -Expression zeigte sich ebenfalls eine leichte Herabregulation unter EZH2-Depletion, jedoch nicht so eindeutig wie bei HIF-2 α und nicht in allen Replikaten (**Abb. 5**).

Zusätzlich zeigten sich zelllinienspezifische Unterschiede in der EZH2-Depletion. In A549-shEZH2-Zellen war die EZH2-mRNA-Reduktion gering, das mRNA-Level lag bei ca. 50-60% im Vergleich zu A549-shNsc. Dies deutet gemeinsam mit den Western Blot-Ergebnissen auf eine insgesamt in dieser Zelllinie verminderte Effizienz der EZH2-Depletion hin (**Abb. 5B**). In G55-shEZH2-Zellen lag das EZH2-mRNA-Level bei ca. 30-35% im Vergleich zu G55-shNsc. Die Depletion war stärker als in A549-Zellen, aber weniger stark als in MDA-MB-231-POR-shEZH2-Zellen mit ca. 20% im Vergleich zu MDA-MB-231-POR-shNsc (**Abb. 5C**). In den MDA-MB-231-POR-Co-shEZH2- und MDA-MB-231-POR-IM-shEZH2-Zelllinien waren die EZH2-mRNA-Level bei ca. 25-35% im Vergleich zu den entsprechenden shNsc-Zelllinien (**Abb. 5D und E**).

Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen biologischen Replikaten je Zellart gezeigt (s. Supplement für die weiteren Replikate).

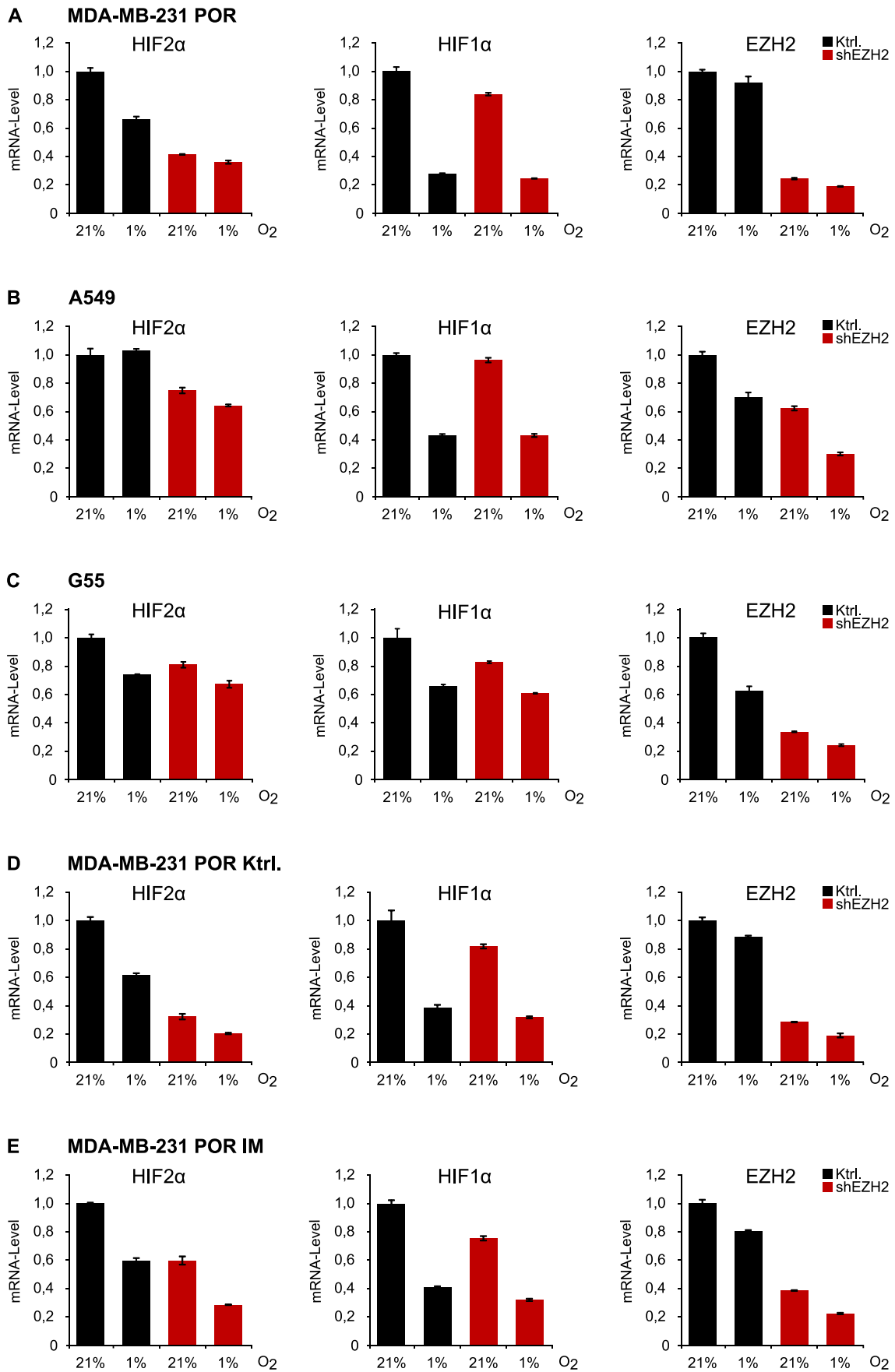


Abb. 5. EZH2-Depletion vermindert HIF-2α-mRNA in Tumorzellen. (A) RT-qPCR-Analyse von HIF-2α, HIF-1α und EZH2 in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231

POR) und entsprechender Kontrolle (Ktrl.) unter Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (1% O₂, 48 h). Zur Normalisierung der mRNA-Level wurde das Haushaltsgen HPRT verwendet und zur normoxischen Kontrolle relativiert. Es sind Mittelwerte inklusive Standardabweichung (Fehlerbalken) gezeigt. Analoge Analyse in Lungenkarzinomzellen (A549, **(B)**) und Glioblastomzellen (G55, **(C)**). **(D, E)** Die in MDA-MB-231 POR-Zellen beobachtete HIF-2 α -mRNA-Reduktion erfolgte auch nach intermittierender Hypoxie (IM). HIF-1 α war in allen Zelllinien unter EZH2-Knockdown und Hypoxie ebenfalls leicht reduziert, diese Reduktion war nicht in allen Replikaten durchgehend zu beobachten. (n=3)

Untersuchung des HIF-2 α -Levels in EZH2-depletierten Tumorzellen unter akuten Hypoxie-Bedingungen im Hinblick auf die HIF-2 α -Proteinstabilität

Die HIF-2 α -Veränderungen auf der Protein- und mRNA-Ebene waren reproduzierbar in allen untersuchten EZH2-depletierten Zelllinien zu beobachten. Diese Ergebnisse können durch mehrere regulatorische Mechanismen erklärt werden, die jeweils unterschiedliche Möglichkeiten der EZH2-HIF-2 α -Interaktion darstellen. Als Beispiele sind eine veränderte HIF-2 α -mRNA- und -Proteinexpression oder -stabilität zu nennen. Neben der enzymatischen Aktivität von EZH2 kommt ebenfalls die direkte Protein-Protein- bzw. Protein-mRNA-Interaktion ursächlich infrage.

Die Wirkung von EZH2-Depletion auf die Stabilität des HIF-2 α -Proteins wurde mithilfe von nicht-degradierbaren Mutanten des HIF-2 α -Proteins untersucht. Dazu wurden die Zelllinien MDA-MB-231 POR, A549 und G55 (jeweils –shNsc und –shEZH2) zusätzlich zur Hypoxie-Behandlung über 48 Stunden (bei entsprechender Kontrolle in Normoxie) transient mit den Plasmiden pcDNA3.1 D/V5-His-TOPOhHIF-2 α und pcDNA3.1 D/V5-His-TOPOhHIF-2 α mPPN transfiziert. Sie codieren für den HIF-2 α -Wildtyp (HIF-2 α -wt) und eine nicht-degradierbare Mutante (HIF-2 α -mPPN), in der die Hydroxylierungsstellen für PHDs mutiert sind. Als Kontrolle wurde die Plasmid-DNA ohne Insert (pcDNA3.1) verwendet. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich ein Plasmid kotransfiziert, das für GFP codiert (pcDNA3.1-EGFP). In den pcDNA-Plasmiden steht die HIF-2 α -Expression unter Kontrolle eines viralen Promoters und die aus Plasmid synthetisierte mRNA enthält weder Introns noch regulatorische Sequenzen am 5'- oder 3'-Ende, wie sie im endogenen HIF-2 α -Gen vorhanden sind. Folglich können die HIF-2 α -spezifischen genregulatorischen Mechanismen und die endogenen HIF-2 α -mRNA-spezifischen Kontrollmechanismen auf die Plasmid-DNA und auf die daraus synthetisierte mRNA nicht wirken.

Durch exogene Überexpression der Mutante HIF-2 α -mPPN können die unter physiologischen und normoxischen Bedingungen stattfindende HIF-2 α -Hydroxylierung

durch Prolylhydroxylasen (PHD) und dessen damit verbundener Abbau in der Zelle nicht stattfinden. Diese Eigenschaft der HIF-2 α -mPPN-Plasmide ist hilfreich, um im direkten Vergleich zur Wildtyp-Variante (wt) einen Einfluss von EZH2 auf die Stabilität des HIF-2 α -Proteins und dadurch auf die intrazelluläre HIF-2 α -Proteinmenge in EZH2-depletierten Zellen zu untersuchen. Die Überexpression mittels transienter Transfektion resultiert in Doppelbanden in der Western Blot-Detektierung. Dabei stellt die obere Bande die überexprimierte Proteinmenge dar und die untere Bande die endogene HIF-2 α -Expression. Eine zusätzliche Kontrolle der Transfektion erfolgte über Western Blot-Detektierung des V5-Peptid-Tags. Die kodierende Sequenz für das V5-Tag ist in den beiden Plasmiden enthalten, aus denen HIF-2 α -wt-V5- und HIF-2 α -mPPN-V5-Polypeptide exprimiert werden. Die Proteinextrakte wurden auf V5, HIF-2 α , HIF-1 α , EZH2 und H3K27me3 untersucht und als Ladekontrolle wurden das Zytoskelettprotein Tubulin sowie Histon H3 verwendet. Der GFP-Proteingehalt in den Zellen wurde ebenfalls im Western Blot gemessen.

Insgesamt zeigte sich in den drei untersuchten Zelllinien ein heterogenes Bild. In der Zelllinie MDA-MB-231 POR (**Abb. 6A**) war das exogene HIF-2 α -wt-Protein-Level unter EZH2-Depletion und Hypoxie-Bedingungen gleichbleibend. Das exogene HIF-2 α -mPPN-Protein-Level, das von PHD-Hydroxylierung und Hypoxie unabhängig ist, war unter denselben Bedingungen leicht reduziert. In der Zelllinie A549 (**Abb. 6B**) war die exogene HIF-2 α -wt-Expression unter Hypoxie-Bedingungen nicht detektierbar (s. auch V5-Banden), während das exogene HIF-2 α -mPPN Proteinlevel bei EZH2-Depletion leicht erhöht war. In dieser Zelllinie besteht aufgrund der geringen Effizienz in der Transfektion und Transduktion mit damit einhergehender verminderter EZH2-Depletion (s. H3K27me3-Expression) sowie der nicht detektierbaren GFP-Level eine eingeschränkte Beurteilbarkeit dieses Experiments. In den hypoxischen Proben der Zelllinie G55 (**Abb. 6C**) waren die exogenen HIF-2 α -wt- und exogenen HIF-2 α -mPPN Proteinlevel bei EZH2-Depletion leicht reduziert. Gleichzeitig war endogenes HIF-2 α (untere Bande) nach EZH2-Depletion unter Normoxie und Hypoxie (MDA-MB-231 POR) bzw. nur in Hypoxie (A549) eindeutig reduziert, was die Funktionalität des EZH2-Knockdowns bestätigt. Insgesamt ließ sich ein EZH2-abhängiger PHD-vermittelter Einfluss auf die HIF-2 α -Proteinlevel nicht eindeutig bestätigen.

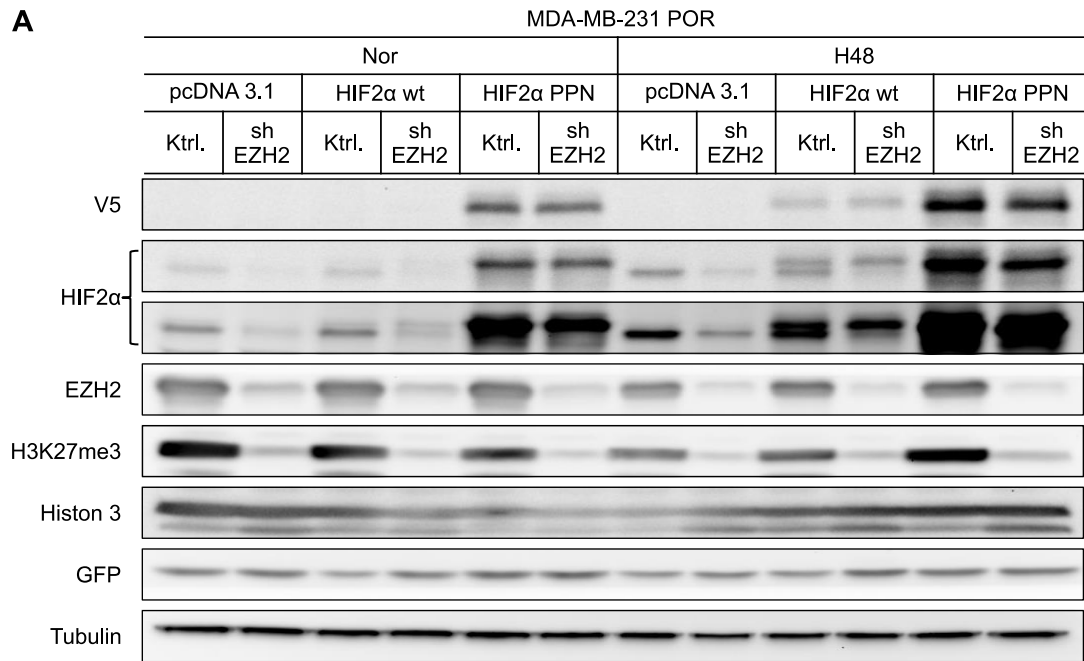
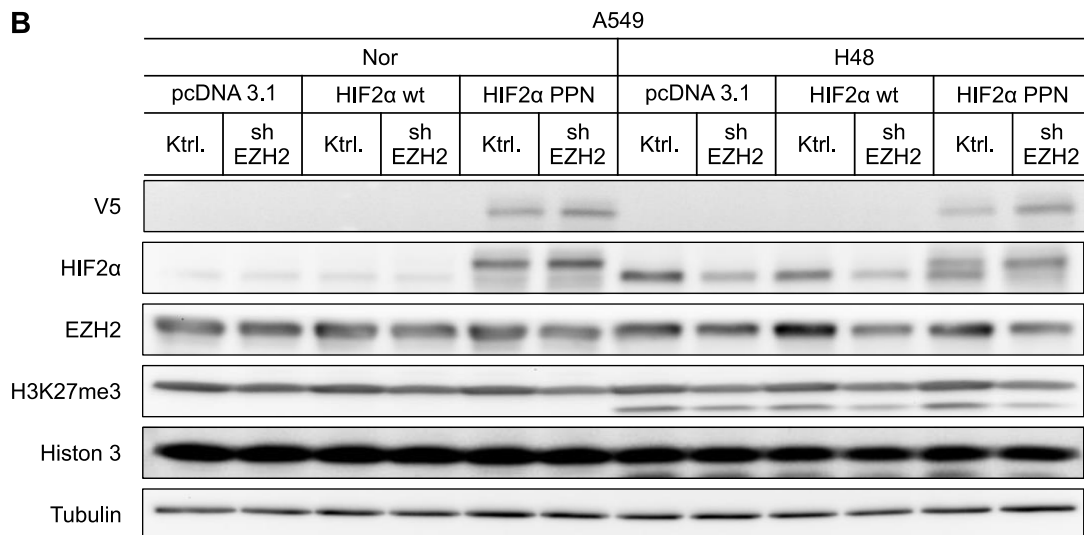
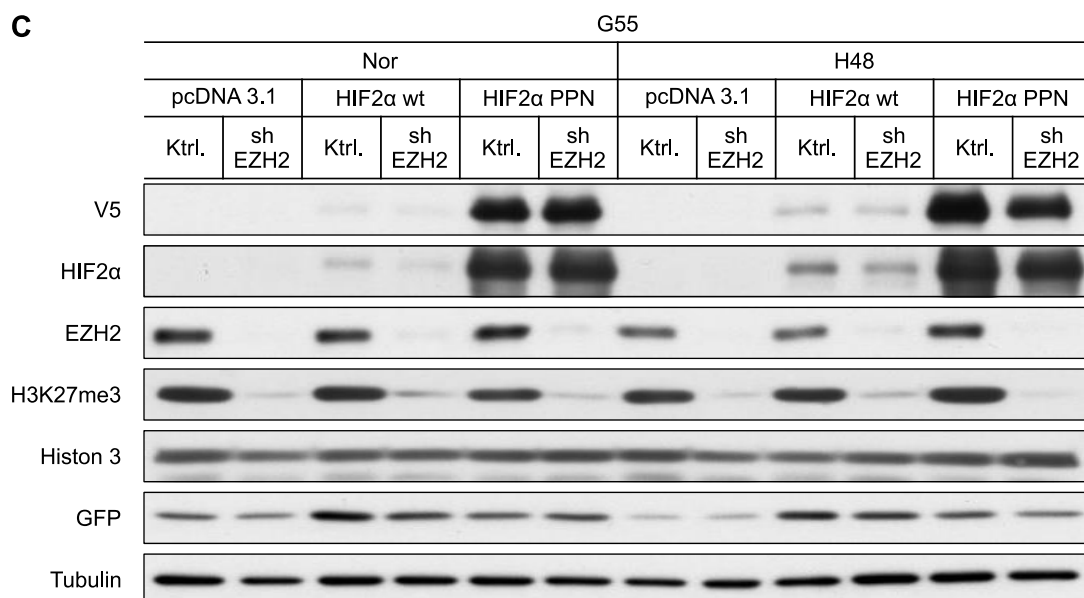
A**B****C**

Abb. 6. Die EZH2 abhängige HIF-2 α Regulation scheint unabhängig von der Prolylhydroxylasen (PHD) – Aktivität zu sein. (A) Immunoblot-Analyse von V5, HIF-2 α (zwei unterschiedliche Entwicklungszeitpunkte), EZH2 und H3K27me3 in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231 POR) und entsprechender Kontrolle unter Normoxie (Nor, 21% O₂) und Hypoxie (H48, 1% O₂, 48 h). EZH2 wurde mittels shRNA depletiert. Histon H3 und Tubulin dienten als Ladungskontrolle. GFP fungierte als Kontrolle der Transfektionseffizienz nach transienter Transfektion mit den Plasmiden pcDNA3.1 als Kontrolle sowie HIF-2 α -wt und HIF-2 α -mPPN. Analoge Analyse in Lungenkarzinomzellen (A549, **(B)**) und Glioblastomzellen (G55, **(C)**).

Der Effekt auf den proteasomalen HIF-2 α -Abbau in EZH2-depletierten Tumorzellen unter akuten Hypoxie-Bedingungen

Die bisherigen Ergebnisse wurden in der Zelllinie MDA-MB-231 POR durch einen weiteren Versuch mit MG132 ergänzt. MG132 ist ein nicht-selektiver Inhibitor des proteasomalen Abbaus. Je länger die Behandlung mit MG132 dauert, desto mehr Proteingehalt ist in den behandelten Zellen zu erwarten, da diese nicht abgebaut, aber stetig weiter hergestellt werden. Die Voraussetzung für diese Proteinakkumulation ist, dass das Protein bereits translatiert wurde. Diese Voraussetzung konnte hier genutzt werden, um herauszufinden, ob EZH2 vor oder nach der Translation von HIF-2 α Einfluss auf das HIF-2 α -Level nimmt. Die MG132-Behandlung erfolgte in MDA-MB-231 POR-shNsc und -shEZH2-Zellen während 48-stündiger Hypoxie-Behandlung entweder 3 oder 6 Stunden vor der Probenisolierung. Anschließend wurden die Proteine HIF-2 α , EZH2 und H3K27me3 und als Ladekontrollen das Zytoskelettprotein Tubulin und Histon H3 mittels Western Blot nachgewiesen. Dabei akkumulierten die Proteine HIF-2 α und HIF-1 α bei längerer MG132-Exposition mit und ohne EZH2-Depletion unter Hypoxie-Bedingungen gleichermaßen. Allerdings war der Basisgehalt dieser Proteine in den shEZH2-Proben ohne MG132-Behandlung per se geringer als in den Kontrollen. EZH2 und H3K27me3 dienten als Indikatoren der EZH2-Depletion, und als Ladekontrolle wurden das Zytoskelettprotein Tubulin sowie Histon H3 verwendet (**Abb. 7A**). Auch in diesem Experiment fand sich kein Einfluss von EZH2 auf HIF-2 α -Proteinlevel.

Für MDA-MB-231 POR konnte als zusätzliche Untersuchung der PHD-Abhängigkeit der EZH2-Wirkung auf HIF-2 α eine Luciferase-Messung durchgeführt werden. In dieser Zelllinie ist mit dem POR-Plasmid ein stabil transduziertes Konstrukt vorhanden. Dieses Plasmid kodiert für zwei verschiedene Proteine. Das erste ist ein Fusionsprotein zwischen der *Firefly*-Luciferase und der oxygen dependent degradation domain (ODD). Diese ist auch in HIF-2 α vorhanden und wird durch PHDs hydroxyliert, was dessen Abbau induziert. Das zweite Protein ist die Renilla-Luciferase. Die Menge

der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase kann über ihre Aktivität photometrisch gemessen werden. Die für 48 Stunden in Normoxie oder Hypoxie kultivierten Mammakarzinomzellen mit und ohne EZH2-Depletion zeigten in der Luciferase-Messung nach Normalisierung zum Signal der *Renilla*-Luciferase eine moderate, aber signifikante Steigerung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 7B**). Insgesamt zeigt sich nach EZH2 Depletion keine Reduktion der Luciferase Aktivität, wie bei einer EZH2 vermittelten HIF-2 α -Stabilisierung über die ODD zu vermuten wäre.

Zusammenfassend lässt sich aus den oben präsentierten Ergebnissen schließen, dass die HIF-2 α -Protein Herabregulation in EZH2-depletierten Mammakarzinom- und Glioblastomzellen eher PHD-unabhängig erfolgt. Auch ist zumindest in MDA-MB-231 POR eine Beeinflussung weiterer HIF-2 α -Abbauprozesse und damit ein Einfluss auf die HIF-2 α -Proteininstabilität unwahrscheinlich. Ob für die EZH2-HIF-2 α -Interaktion in dieser Zelllinie molekulare Prozesse auf HIF-2 α -Genexpressionsebene eine Rolle spielen, soll in zukünftigen Experimenten näher betrachtet werden.

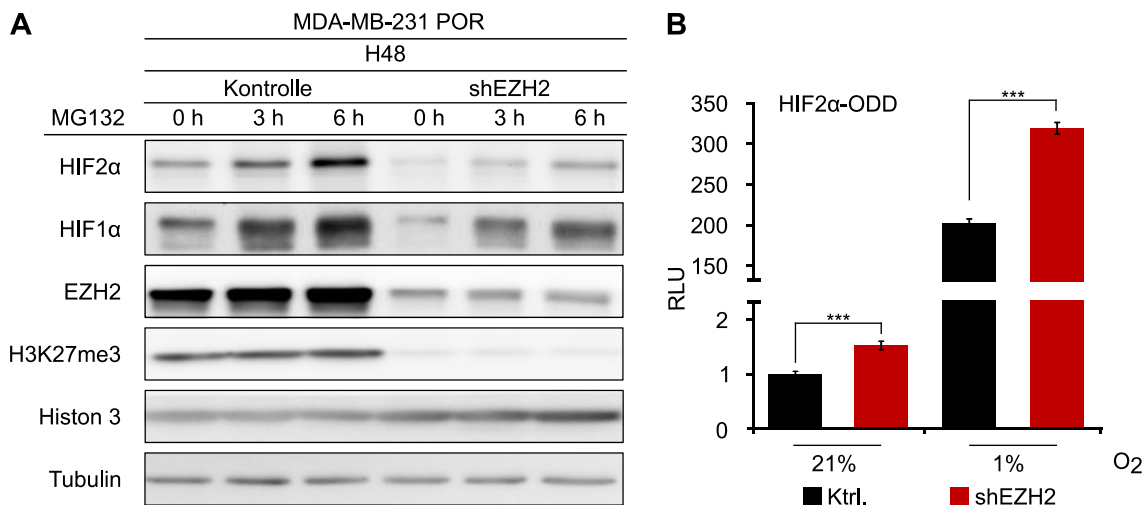


Abb. 7. Der verminderte HIF-2 α -Proteingehalt in EZH2-depletierten MDA-MB-231 POR-Zellen ist unabhängig von dessen proteasomalem Abbau. (A) Immunoblot-Analyse von HIF-2 α , HIF-1 α , EZH2 und H3K27me3 in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231 POR) und entsprechender Kontrolle unter Hypoxie (H48, 1% O₂, 48 h). Zugabe des Translationsinhibitors MG132 erfolgte entweder 3 oder 6 h vor der Proteinextraktion. Histon H3 und Tubulin dienten als Ladungskontrolle. **(B)** In MDA-MB-231 POR-Zellen wurde nach Hypoxie-Behandlung (1% O₂, 48 h) die Aktivität der *Firefly*-Luciferase gemessen und zur *Renilla*-Luciferase-Aktivität normalisiert (Darstellung der Luciferase-Aktivität in RLU (relative luciferase units)). In Normoxie und Hypoxie zeigte sich bei EZH2-Depletion (shEZH2) eine signifikante Hochregulation des HIF-2 α -ODD-gekoppelten *Firefly*-Luciferase-Signals im Vergleich zur Kontrolle (Ktrl.). Es sind Mittelwerte inklusive Standardabweichung (Fehlerbalken) gezeigt. *** P<0,001 im zweiseitigen Student-t-Test.

Bedeutung der EZH2-Methylierungsaktivität für die verminderte HIF-2 α -Produktion in Tumorzellen

Eine in der Literatur klar beschriebene enzymatische Funktion von EZH2 ist die Trimethylierung von Lysin 27 an Histon H3 (H3K27me3). Mit selektiven EZH2-Inhibitoren, wie z. B. GSK126 lässt sich gezielt diese Funktion ausschalten. Der Inhibitor interagiert laut dem molekularen Modell mit der SAM-Bindungsstelle von EZH2, die für dessen funktionelle Aktivität maßgeblich ist (McCabe et al., 2012). Bei der Inhibitor-Behandlung bleibt das EZH2-Protein selbst in der Zelle vorhanden. Das ermöglicht die Untersuchung von weiteren nicht-enzymatischen Funktionen des Proteins, dessen Level im Gegensatz dazu bei der shRNA-vermittelten Depletion insgesamt reduziert ist. Der Inhibitor wurde in DMSO gelöst und nach Ermittlung der optimalen Konzentration für jede Zelllinie in verschiedenen Konzentrationen (200 nM, 1 μ M und 5 μ M für A549 und MDA-MB-231 POR bzw. 40 nM, 200 nM und 1 μ M für G55) auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle wurde die jeweils höchste verwendete DMSO-Menge ohne Inhibitor eingesetzt. In vorangegangenen Studien (Chen et al., 2016) erwies sich eine Behandlungsdauer von 48 Stunden als optimal für die Zelllinie A549. Basierend auf dieser Information wurde ein experimentelles Design erstellt, bei dem nach einer 24-stündigen GSK126-Behandlung eine zusätzliche Hypoxie-Behandlung für 24 Stunden bei entsprechender Kontrolle in Normoxie erfolgte. Die Proteinanalysen erfolgten mittels Western Blot in den Zelllinien MDA-MB-231 POR, A549 und G55 (**Abb. 8**). Die analysierte Proteinmenge betrug 50 μ g (G55) oder 60 μ g (MDA-MB-231 POR, MDA-MB-231 POR Co/IM und A549). Es wurden die Proteine HIF-2 α , HIF-1 α , EZH2 und H3K27me3 (als Indikator der EZH2-Methylierungsaktivität) detektiert und als Ladekontrollen das Zytoskelettprotein Tubulin sowie Histon H3 verwendet. Für die Zelllinie MDA-MB-231 POR war in den Proben mit EZH2-Funktionshemmung durch GSK126 der HIF-2 α -Proteingehalt unter Hypoxiebedingungen leicht reduziert im Vergleich zur DMSO-Kontrollprobe (**Abb. 8A**). In A549-Zellen war in den Proben mit EZH2-Funktionshemmung durch GSK126 der HIF-2 α -Proteingehalt unter Hypoxiebedingungen bei der höchsten GSK126-Konzentration geringer als in der DMSO-Kontrollprobe (**Abb. 8B**). In G55-Zellen war in den Proben mit EZH2-Funktionshemmung durch GSK126 der HIF-2 α -Proteingehalt unter Hypoxiebedingungen klar reduziert im Vergleich zur DMSO-Kontrollprobe (**Abb. 8C**). In diesen Zellen war die Wirkung der EZH2-Inhibition auf die H3K27me3-Proteinmengen geringer als in den anderen beiden Zelllinien.

Die hier gezeigten Experimente lassen vermuten, dass in einigen Zelllinien EZH2 über seine Methylierungsfunktion HIF-2 α reguliert (dies scheint allerdings nicht über eine Regulation der HIF-2 α mRNA-Expressionslevel zu erfolgen, wie dies bei Knock-down von EZH2 zu beobachten ist (s. folgender Abschnitt)). Versuche mit höheren GSK126-Konzentrationen erwiesen sich allerdings als zelltoxisch.

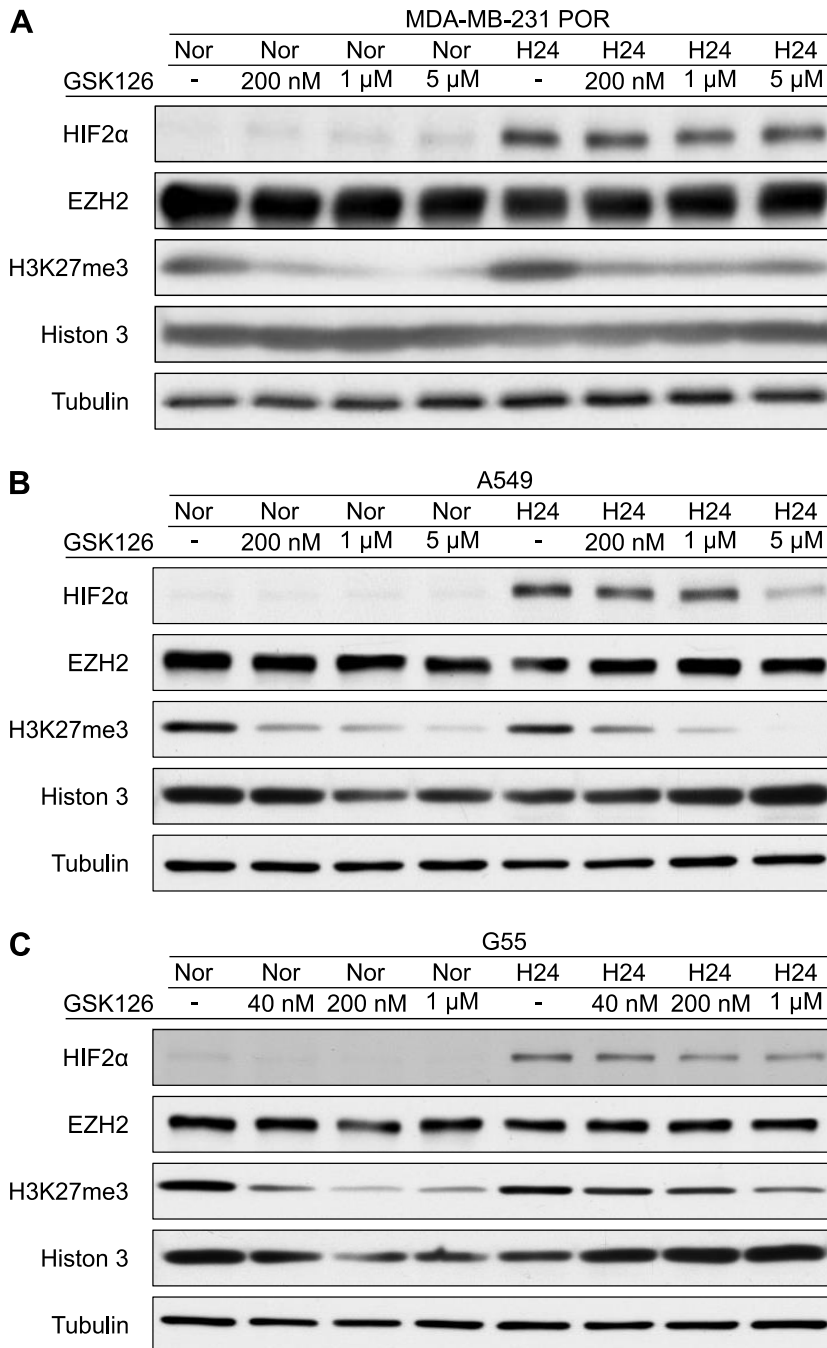


Abb. 8. Hemmung der EZH2-Methyltransferase-Aktivität mittels GSK126 führt zu zelllinientypischer Veränderung des HIF-2 α -Proteinlevels in Tumorzellen unter Hypoxie. (A) Immunoblot-Analyse von HIF-2 α , HIF-1 α , EZH2 und H3K27me3 in Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231 POR) nach 48 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des funktionellen EZH2-Inhibitors GSK126 bei entsprechender DMSO-Kontrolle (-) und zusätzlicher Hypoxiebehandlung (1% O₂, in den letzten 24 h (H24)). Histon H3 und Tubulin dienen als

Ladungskontrolle. Die HIF-2 α -Banden waren bei steigender Inhibitorkonzentration geringfügig reduziert. Analoge Analyse in Lungenkarzinomzellen (A549, **(B)**) und Glioblastomzellen (G55, **(C)**). In diesen beiden Zelllinien wurde eine leichte HIF-2 α -Reduktion bei gehemmter EZH2-Methylierungsaktivität beobachtet. (n=3)

Korrespondierend zu den Proteinanalysen wurde in den hypoxischen Proben eine RT-qPCR zur Bestimmung des pharmakologischen Effekts von GSK126 auf der mRNA-Ebene durchgeführt (**Abb. 9**). HPRT fungierte wie in den vorherigen qRT-PCRs aufgrund der Unabhängigkeit von schwankenden Sauerstoffpartialdrücken zur Normalisierung der Expressionslevel. Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach EZH2-Depletion konnte bei alleiniger EZH2-Funktionshemmung unter Hypoxiebedingungen auf der mRNA-Ebene keine Reduktion der HIF-2 α -Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festgestellt werden. Während die HIF-2 α -Expression in Mammakarzinomzellen nach GSK126-Behandlung leicht hochreguliert war (**Abb. 9A**), war keine große Änderung der HIF-1 α -mRNA Expression, und in Lungenkarzinom- und Glioblastomzellen keine klare, systematische Änderung der HIF-1 α -, und HIF-2 α -mRNA Expression sichtbar (**Abb. 9B, C**). Dies ist ein klarer Unterschied zu der beobachteten HIF-2 α mRNA-Reduktion nach Knockdown von EZH2.

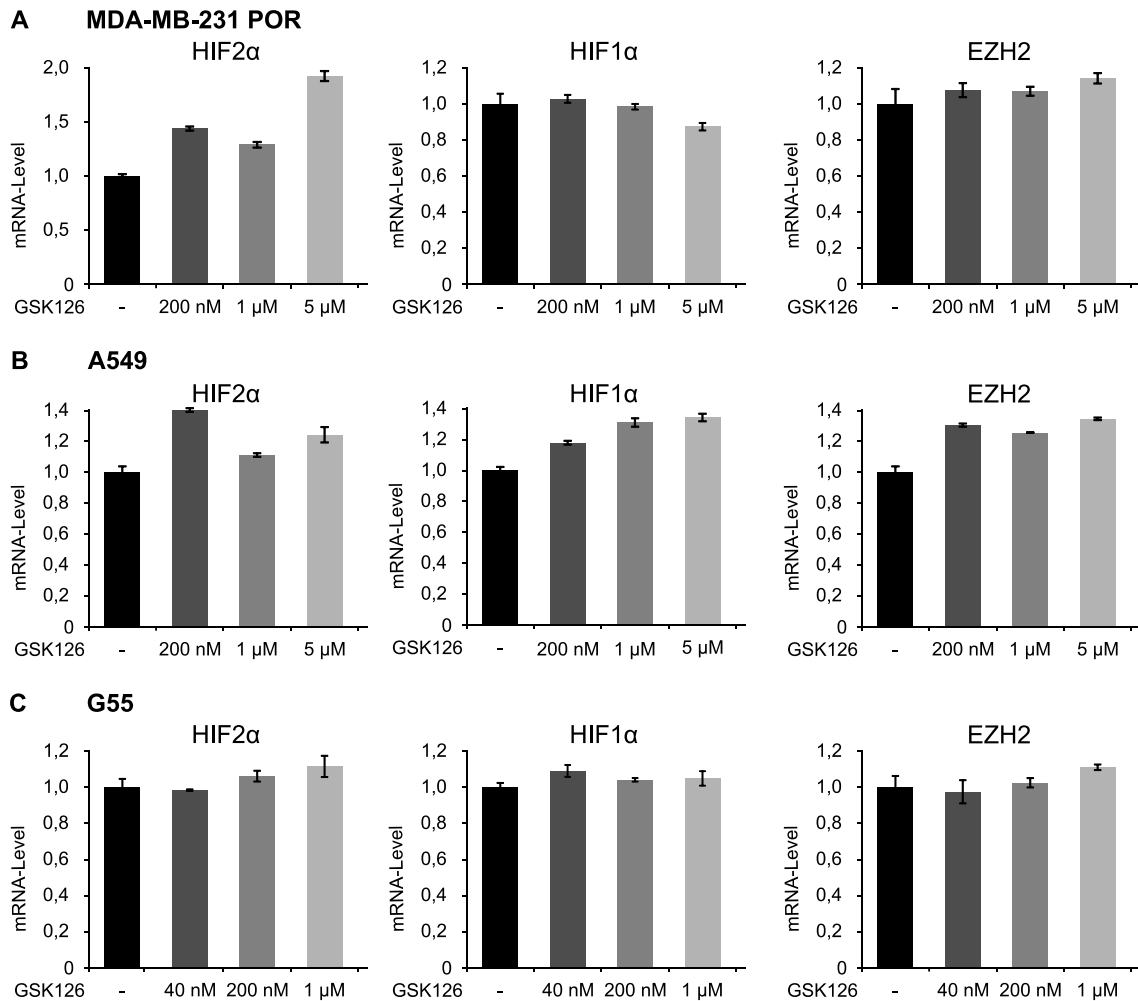


Abb. 9. Hemmung der EZH2-Methylierungsaktivität mittels GSK126 zeigt keinen klaren Einfluss auf HIF-1 α -mRNA und HIF-2 α -mRNA in Tumorzellen. (A) RT-qPCR-Analyse von HIF-2 α , HIF-1 α und EZH2 in Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231 POR) nach 48 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des funktionellen EZH2-Inhibitors GSK126 bei entsprechender DMSO-Kontrolle (-) und zusätzlicher Hypoxiebehandlung (1% O₂, in den letzten 24 h). Zur Normalisierung der Expressionslevel wurde das Haushaltsgen HPRT verwendet und zur DMSO-Kontrolle relativiert. Es sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen inklusive Standardabweichung (Fehlerbalken) gezeigt. Analoge Analyse in Lungenkarzinomzellen (A549, (B)) und Glioblastomzellen (G55, (C)) bei zellspezifisch alternierenden Inhibitorkonzentrationen.

Diskussion

In unserem Labor wurde in einem kleinen Loss-of-Function-Screening ausgewählter Enzyme, die an der Histon-Methylierung beteiligt sind, eine regulatorische Interaktion zwischen EZH2 und HIF-2 α festgestellt, die in dieser Studie weiter untersucht wurde. Frühere Studien haben gezeigt, dass der EZH2-Proteinspiegel durch das HIF-1 α -Protein positiv beeinflusst werden kann, was mit einer schlechteren klinischen Prognose, verstärkter Metastasierung und Tumorpheriferation in Verbindung gebracht wird (Cao et al. 2010). Interessanterweise wurde auch schon über die Dysregulation von EZH2 (Kim und Roberts 2016) oder HIF-2 α (Semenza 2012) bei verschiedenen Tumorarten berichtet. Dazu gehören auch die hier untersuchten Tumoren wie das Glioblastom, der häufigste bösartige Hirntumor bei Erwachsenen, der durch eine schlechte Prognose und begrenzte Behandlungsmöglichkeiten charakterisiert ist (Haberer 2021), sowie Brust- und Bronchialkarzinome, die häufig Hirnmetastasen bilden (Lah et al. 2020). Eine direkte funktionelle Interaktion von EZH2 und HIF-2 α wurde allerdings bisher nicht beschrieben.

Die Histonmethyltransferase EZH2 ist bekannt für ihre genregulatorische Funktion im Rahmen des PRC2-Komplexes. Sie sorgt durch Trimethylierung eines Lysins an der Stelle 27 von Histon H3 für eine Genrepression (Laugesen et al. 2019). Mahara et al. zeigten in ihrer Studie, dass neben der zuerst beschriebenen Funktion von EZH2 außerhalb von PRC2 auch eine Interaktion mit anderen Proteinen wie FOXM1 stattfindet (Mahara et al. 2016a). Zusätzlich sind weitere PRC2-unabhängige Funktionen von EZH2 bekannt (Lee et al. 2011; Xu et al. 2012). In dieser Studie konnte HIF-2 α als neues funktionelles Target von EZH2 identifiziert werden. Die durchgeführten Experimente zeigten keine eindeutigen Hinweise, dass EZH2 HIF-2 α über die typischen Mechanismen der PHD-medierte Degradation oder Kontrolle der Proteinestabilität reguliert. Stattdessen scheint EZH2 HIF-2 α auf mRNA-Ebene zu induzieren. Dies muss in zukünftigen Experimenten noch weiter validiert werden. Da EZH2 in zahlreichen Tumorentitäten durch unterschiedliche Mechanismen hochreguliert oder aktiviert ist, könnte dieser Mechanismus zu einer verstärkten HIF-2 α -Hochregulation im EZH2-angereicherten Tumormilieu unter hypoxischen Bedingungen führen und damit zu der Tumorstadium fördernden Funktion von HIF-2 α beitragen. Dies wäre im Einklang mit der bisherigen Beobachtung, dass EZH2 und HIF-Proteine in multiplen Tumorentitäten überproportional vertreten sind (Kim und Roberts 2016; Kaelin und Ratcliffe 2008), aber es wurde noch nicht gezeigt, ob beide Proteine gleichzeitig in denselben Tumorzellen vermehrt vorkommen.

EZH2-Depletion reduziert die HIF-2 α -Expression unter akuten Hypoxie-Bedingungen in Glioblastom-, Bronchialkarzinom- und Mammakarzinomzellen *in vitro*

In diesem Projekt wurden weit verbreitete Zelllinien verwendet, die *in-vitro*-Modellsysteme für die obengenannten Tumoren darstellen. Die durchgeführten Versuche zeigten in den drei Zelllinien MDA-MB-231 POR (Mammakarzinom), A549 (Lungenkarzinom) und G55 (Glioblastom) jeweils in drei unabhängigen Experimenten die Herabregulation von HIF-2 α in der qRT-PCR und im Western Blot, also auf RNA- und Proteinebene.

In allen drei untersuchten Zelllinien und drei Replikaten wurde eine Herabregulation von HIF-2 α unter EZH2-Knockdown und Hypoxiebedingungen beobachtet. Unterschiede von HIF-2 α unter EZH2-Knockdown und Hypoxie bestanden hauptsächlich in der verschiedenen Ausprägung der HIF-2 α -Reduktion auf der Genexpressions- und Proteinebene in den untersuchten Zelllinien. Zwar zeigte HIF-2 α in allen drei Zelllinien bei oben genannten Bedingungen die gleiche Tendenz, jedoch war die Reduktion in Mammakarzinomzellen stark auf mRNA- und Protein-Ebene nachweisbar, während sie in den anderen Zelllinien stärker auf der HIF-2 α -Proteinebene feststellbar war. Da der HIF-Proteinspiegel in verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichem Maße durch die Zelldichte beeinflusst werden kann, soll die mögliche Auswirkung dieser Parameter auf die Ergebnisse in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden. Die HIF-1 α -Veränderungen unter EZH2-Knockdown und Hypoxie waren heterogen und ließen daher keine klaren Schlussfolgerungen zu, weshalb die nachfolgenden Untersuchungen auf HIF-2 α fokussiert waren.

Zusätzlich ist in den Ergebnissen für das EZH2-mRNA- und -Proteinlevel zwischen den Zelllinien eine variierende Effizienz des shRNA-vermittelten EZH2-Knockdowns zu erkennen. Die Zelllinie A549 hatte eine geringere Effizienz für den EZH2-Knockdown als die anderen beiden Zelllinien. Überraschenderweise war in den Lungenkarzinomzellen im Gegensatz dazu die Reduktion der H3K27me3-Level bei EZH2-Knockdown stärker ausgeprägt als in den anderen Zelllinien. Ein möglicher Grund dafür könnte eine Einflussnahme anderer Faktoren auf die EZH2-Methylierungsaktivität sein, wie beispielsweise eine erhöhte Aktivität der EZH2-Gegenspieler wie micro-RNAs oder Histondemethylasen. Für eine präzisere Aussage sind diesbezüglich allerdings weitere Experimente notwendig.

Wirkung der EZH2-Depletion auf die Proteinstabilität von endogen und exogen exprimiertem HIF-2 α

PHDs hydroxylieren unter physiologischen Bedingungen HIF-Proteine, wodurch diese abgebaut werden. Unter Sauerstoffmangelbedingungen sind die PHDs größtenteils, aber nicht vollständig gehemmt. Darüber hinaus sind sie unter Hypoxiebedingungen durch einen Feedback-Mechanismus HIF-abhängig überreguliert (Henze und Acker 2010). PHDs sind sowohl sauerstoff- als auch α -Ketoglutarat-abhängig und gehören zu den α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, unter anderem zusammen mit den Histondemethylasen (Chang et al. 2019; Hong et al. 2007; Schofield und Ratcliffe 2004). Es sollte der Einfluss der PHDs in diesem Kontext mittels transienter Transfektion von HIF-2 α und dessen nicht durch PHDs destabilisierbarer Mutante HIF-2 α -mPPN eruiert werden.

In den exogen zugeführten pcDNA-Plasmiden steht die HIF-2 α -Expression unter Kontrolle eines CMV-Promoters. Die aus Plasmid synthetisierte mRNA enthält weder Introns noch regulatorische Sequenzen am 5'- oder 3'-Ende, wie sie im endogenen HIF-2 α -Gen vorhanden sind. Daher können die HIF-2 α -spezifischen genregulatorischen Mechanismen und die endogenen HIF-2 α -mRNA-spezifischen Kontrollmechanismen auf die Plasmid-DNA und die davon synthetisierte mRNA nicht wirken. Eine Induktion des Abbaus durch PHDs ist nur beim HIF-2 α -Wildtyp noch möglich. Somit kann über den Vergleich der exogenen und endogenen sowie der Wildtyp- und mPPN-Banden im Westernblot eine Aussage getroffen werden, ob PHDs unter Hypoxiebedingungen und EZH2-Knockdown einen Einfluss auf die HIF-2 α -Herabregulation auf Proteinebene haben. Außerdem kann der Ort der EZH2-HIF-2 α -Regulation durch die fehlenden mRNA-Kontrollmechanismen an der Plasmid-DNA weiter eingegrenzt werden. Wenn also zwischen den exogenen und den endogenen Banden ein Unterschied in der HIF-2 α -Stabilität unter Hypoxieeinfluss zu sehen ist, erfolgt eine Regulation durch EZH2 möglicherweise auf der HIF-2 α -Genexpressionsebene. Die Analyse mittels Westernblot bestätigte die in den Vorexperimenten bereits beobachtete Herabregulation von endogenem HIF-2 α unter EZH2-Knockdown. Die durch PHDs nicht degradierbare Mutante zeigte keine so klare Tendenz, aber eine geringe Reduktion von HIF-2 α in EZH2-depletierten Zellen. Daher kann hier keine klare Abhängigkeit der HIF-2 α -Herabregulation unter EZH2-Knockdown und Hypoxiebedingungen von PHDs abgeleitet werden. Es gab zusätzlich Probleme mit der internen Kontrolle der exogen exprimierten HIF-2 α -Proteinmenge durch GFP, sodass weitere Experimente mit zusätzlichen Kontrollen ergänzt werden

sollten. In künftigen Experimenten muss unbedingt ein Protein als interne Kontrolle verwendet werden, das von derselben Plasmid-DNA wie HIF-2 α mittranskribiert, aber separat translatiert wird und dessen Stabilität PHD-unabhängig ist. Eine Möglichkeit wäre diesbezüglich ein HIF-2 α -IRES-mCherry/RFP-Konstrukt als interne Kontrolle, das keine Co-Transfektion erfordert. Außerdem wird in den Zellen durch die stabile Transduktion mit den pGIPZ-Plasmiden konstitutiv eine geringe Menge GFP produziert, die mit einem HIF-2 α -IRES-mCherry/RFP-Konstrukt weniger interferiert als mit einer Co-Transfektion, wie sie hier durchgeführt wurde.

Im Westernblot kommt es zur Aufteilung in eine untere, endogene HIF-2 α -Bande, die ein ähnliches Muster wie in den Vorexperimenten zeigen sollte, und eine obere Bande des überexprimierten, exogenen HIF-2 α (Wildtyp oder mPPN). Insgesamt zeigte sich allerdings in den drei untersuchten Zelllinien ein heterogenes Bild. Die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien werden daher in eigenen Unterkapiteln diskutiert.

Diskussion der Beobachtungen in MDA-MB-231 POR-Zellen

In dieser Zelllinie (**Abb. 6A** im Ergebnisteil) war das exogene HIF-2 α -Wildtyp-Protein-Level unter EZH2-Depletion und Hypoxie-Bedingungen unverändert stabil. Die Stabilität der exogenen Wildtyp-Bande im Vergleich zur endogenen Variante spricht gegen einen relevanten Einfluss der PHDs auf die EZH2-HIF-2 α -Interaktion unter Hypoxie, denn in diesem Fall wäre die Proteinmenge für den überexprimierten HIF-2 α -Wildtyp durch den PHD-vermittelten Abbau vermindert. Außerdem kann aus der unveränderten exogenen Wildtyp-Bande ein Einfluss von EZH2 auf HIF-2 α eher vor dessen Translation abgeleitet werden, denn aufgrund der fehlenden Promoter konnte das exogene HIF-2 α -Proteinlevel nicht auf der Genexpressionsebene beeinflusst werden und blieb im Gegensatz zum endogenen Proteinlevel stabil. Das exogene HIF-2 α -PPN-Protein-Level, das von PHD-Hydroxylierung und Hypoxie unabhängig ist, war unter denselben Bedingungen leicht reduziert. Dies spricht ebenfalls gegen einen relevanten Einfluss der PHDs auf die EZH2-HIF-2 α -Interaktion bei Hypoxie, da HIF-2 α mit und ohne Bindungsmöglichkeit durch PHDs eine Reduktion zeigt. Aufgrund der fehlenden internen Kontrolle in diesen Experimenten ist diese Aussage allerdings nur unter Vorbehalt zu treffen. Es bestand auch eine Diskrepanz in der HIF-2 α -Proteinmenge. Diese war exogen deutlich höher als endogen, was zu gesättigten Abbaumechanismen für HIF-2 α führen könnte. Daraus resultiert eine eingeschränkte Beurteilbarkeit der Ergebnisse.

Mithilfe des POR-Plasmids in dieser Zelllinie konnte zusätzlich ein Luciferase assay (**Abb. 7B**) durchgeführt werden, anhand dessen der Einfluss der PHDs mit einer weiteren Methode beurteilt werden sollte. Die HIF-2 α -Level gemessen am Luciferase-Signal waren in den EZH2-Knockdown-Zellen nicht erniedrigt, sondern sogar erhöht. Diese Erhöhung des HIF-2 α -ODD-Levels gemessen an der *Firefly*-Luciferase-Aktivität steht im Gegensatz zur Verminderung des endogenen HIF-2 α -Levels in EZH2-depletierten Zellen. Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die EZH2-Depletion die Verminderung des HIF-2 α -Levels wahrscheinlich nicht durch veränderte HIF-2 α -Proteinstabilität verursacht. Ob die erhöhte HIF-2 α -ODD Menge in Zusammenhang mit der reduzierten Menge des endogenen Proteins steht, beispielsweise durch verminderte HIF-2 α -abhängige Aktivierung der PHD3-Genexpression, sollte in weiteren Experimenten aufgeklärt werden.

Die HIF-2 α -Reduktion in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen unter akuten Hypoxie-Bedingungen ist unabhängig vom proteasomalen HIF-2 α -Abbau

Aufgrund der Stabilität des exogenen HIF-2 α -Wildtyp-Proteins in den Experimenten mit transienter Transfektion wurde vermutet, dass die Regulation von HIF-2 α durch EZH2 bereits vor dessen Translation stattfindet. Diese These wurde durch ein weiteres Experiment mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 in der MDA-MB-231 POR Zelllinie untersucht (**Abb. 7A**). Bei längerer Behandlung mit MG132 stieg der HIF-2 α -Proteingehalt in den Zellen. Dass in den EZH2-depletierten Zellen die Level von HIF-2 α bereits vor MG132-Behandlung niedriger als in der Kontrolle waren, lässt die Möglichkeit offen, dass EZH2 HIF-2 α vor seiner Translation reguliert. Bemerkenswert ist, dass HIF-2 α mit zunehmender Behandlungsdauer mit MG132 in MDA-MB-231 POR-shNsc mit vergleichbarer Kinetik wie in -shEZH2-Zellen akkumuliert. Dieses Ergebnis wäre auch mit einem Szenario vereinbar, bei dem EZH2 HIF-2 α vor der Translation reguliert. Um eine fundiertere Aussage treffen zu können, sollte dieses Experiment auch in weiteren Zelllinien und unter Einbeziehung von Normoxie-Bedingungen durchgeführt werden.

Diskussion der Beobachtungen in A549-Zellen

In dieser Zelllinie (**Abb. 6B**) konnte bereits in den Vorexperimenten mittels shRNA nur eine geringe EZH2-Depletion erzielt werden. Aus diesem Grund war eine schlechte

Transfektionseffizienz in der transienten Transfektion zu erwarten, die auch nach Optimierungsversuchen mit erhöhter Plasmidkonzentration nicht wesentlich verbessert werden konnte. So war das exogene HIF-2 α -Wildtyp-Protein weder mit HIF-2 α -Antikörper noch mit V5-Protein-Tag-Antikörper im Western Blot detektierbar, während das endogene HIF-2 α -Protein nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich war GFP in diesem Experiment nicht detektierbar, welches in den anderen beiden Zelllinien als Kontrolle der Transfektionseffizienz genutzt wurde. Zwar war das exogene HIF-2 α -mPPN Protein-Level bei EZH2-Depletion und Hypoxie leicht erhöht, jedoch ist die Aussagekraft dieser Beobachtung aufgrund der genannten Schwierigkeiten verringert. Für eine bessere Interpretierbarkeit sollte also hier der Fokus darauf liegen, die Transfektionseffizienz zu erhöhen, beispielsweise durch Elektroporation.

Diskussion der Beobachtungen in G55-Zellen

In den hypoxischen Proben der Zelllinie G55 (**Abb. 6C**) waren die exogenen HIF-2 α -Wildtyp- und exogenen HIF-2 α -mPPN Protein-Level bei EZH2-Depletion leicht reduziert. Endogenes HIF-2 α konnte nicht klar detektiert werden, wofür auch die starke Intensität der darüber liegenden Bande des exogenen Proteins verantwortlich sein könnte. Beide exogenen Banden (insbesondere die nicht durch PHDs destabilisierbare) verhielten sich hier wie die in den Vorexperimenten detektierte endogene Bande. Deshalb konnte in dieser Zelllinie unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen kein EZH2-abhängiger PHD-vermittelter Einfluss auf das HIF-2 α -Level abgeleitet werden. Da die exogenen Banden ohne mRNA-Kontrollmechanismen und Promotoren dennoch verändert waren, liegt in dieser Zelllinie eine Interaktion von EZH2 und HIF-2 α zumindest teilweise auf der Proteinebene nahe. Diese Beobachtung deckt sich mit den Vorergebnissen, in denen im Vergleich zu den anderen Zelllinien in EZH2-depletierten Glioblastomzellen unter Hypoxie eine stärkere HIF-2 α -Reduktion im Westernblot als in der RT-qPCR sichtbar war. Eine eindeutige Aussage ist aber auch hier aufgrund der oben erwähnten fehlenden internen Kontrolle nicht möglich.

Nach den Experimenten zur transienten Transfektion lässt sich generell zusammenfassen, dass in den Zelllinien MDA-MB-231 POR und G55 kein klarer Hinweis für eine posttranslationale HIF-2 α -Beeinflussung durch PHDs in EZH2-depletierten Zellen beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse der Zelllinie A549 bieten eine weiter eingeschränkte Beurteilbarkeit wegen der schlechteren Effizienz der EZH2-

Depletion und der HIF-2 α -Überexpression. Durch die zusätzliche Luciferase-Messung, das MG132-Experiment und die deutlich getrennt detektierbaren endogen und exogen exprimierten HIF-2 α -Proteine war für die Zelllinie MDA-MB-231 POR insgesamt eine bessere Interpretation möglich als für die anderen Zelllinien.

Bedeutung der EZH2-Methylierungsaktivität für die HIF-2 α -Regulation in Tumorzellen

Die enzymatische Histontrimethylierung des Histon 3 an Lysin 27 durch den PRC2-Komplex unterdrückt die Expression der betroffenen Gene (Fioravanti et al. 2018). Da die HIF-2 α -Protein- und mRNA-Level bei geringerem EZH2-Gehalt durch EZH2-Depletion jedoch ebenfalls erniedrigt sind, kommt hier eine direkte Einflussnahme von EZH2 auf die Histonmethylierung über seine enzymatische Funktion im PRC2-Komplex nicht infrage. Dennoch kann sie durch Hemmung eines negativ regulatorischen Faktors von HIF-2 α eine Rolle spielen (sog. Disinhibition). Aus diesem Grund wurde die Wirkung der spezifischen Hemmung der enzymatischen Funktion von EZH2 auf HIF-2 α genauer untersucht. Ein Ziel war dabei, das EZH2-Protein möglichst intakt zu halten, um weitere Interaktionen mit DNA, mRNA oder Proteinen nicht zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde der EZH2-Inhibitor GSK126 ausgewählt.

GSK126 ist ein pharmakologischer EZH2-Inhibitor. Er bindet an die SAM-Bindungsstelle von EZH2, blockiert auf diese Weise spezifisch dessen enzymatische Funktion und bewirkt damit eine selektive EZH2-Hemmung (McCabe et al. 2012b). Die hohe Selektivität des Inhibitors für EZH2 gegenüber EZH1 und anderen Histonmethyltransferasen ist ein weiterer Vorteil bei der Anwendung dieses Inhibitors. Aktuell befinden sich neben GSK126 einige EZH2-Inhibitoren in klinischen Studien, deren Ergebnisse teilweise noch ausstehen (Fioravanti et al. 2018).

In der Zelllinie MDA-MB-231 POR war der HIF-2 α -Proteingehalt unter EZH2-Funktionshemmung durch GSK126 in Hypoxie nicht verändert im Vergleich zur Kontrollprobe (**Abb. 8A**). Demnach nimmt die EZH2-Methylierungsaktivität eher weniger Einfluss auf die HIF-2 α -Proteinlevel. In A549-Zellen war der HIF-2 α -Proteingehalt nach Behandlung mit GSK126 unter Hypoxie bei der höchsten GSK126-Konzentration geringer als in den Kontrollproben (**Abb. 8B**). In G55-Zellen war der HIF-2 α -Proteingehalt nach Zugabe von GSK126 unter Hypoxie ebenfalls leicht reduziert (**Abb. 8C**). In diesen Zellen war die Wirkung der EZH2-Inhibition auf die H3K27me3-

Proteinmengen geringer als in den anderen beiden Zelllinien. Versuche mit höheren GSK126-Konzentrationen, um eine bessere Hemmung der EZH2-Methylierungsfunktion zu erzielen, erwiesen sich als toxisch für die Zellen. Bereits die Ausgangskonzentration von GSK126 musste bei allen drei Zelllinien reduziert werden. In MDA-MB-132 POR und G55 erfolgte eine weitere Anpassung, da die Konzentrationen aus den Versuchen mit A549 hier ebenfalls in Kombination mit der Hypoxiebehandlung zelltoxisch waren.

In einer vorherigen Studie (Chen et al. 2016) erwies sich eine Behandlungsdauer von 48 Stunden mit GSK126 als optimal für die Zelllinie A549. Basierend auf dieser Information wurde ein experimentelles Design erstellt, bei dem nach einer 24-stündigen GSK126-Behandlung eine zusätzliche Hypoxie-Behandlung für 24 Stunden bei entsprechender Kontrolle in Normoxie erfolgte. Dabei entsprachen die 48 Stunden der optimierten Behandlungsdauer für A549-Zellen und wurden auf die anderen beiden Zelllinien übertragen. Einerseits ist dadurch eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Zelllinien gegeben, andererseits ist hier einschränkend anzumerken, dass die Behandlungsdauer eventuell für die anderen Zelllinien angepasst werden müsste, um eine bessere Interpretation der Ergebnisse zu gewährleisten. Zusätzlich wurde durch das experimentelle Design von der Behandlungsdauer mit Hypoxie aus den Vorexperimenten mit EZH2-Depletion abgewichen. Diese betrug in den Experimenten mit GSK126 lediglich 24 Stunden, da sich die Zellen in den ersten 24 Stunden in Normoxie an die GSK126-Behandlung adaptieren sollten. Das experimentelle Design stellte hier also einen Kompromiss dar, der die Aussagekraft der Ergebnisse einerseits schmälert, aber die bestmögliche Variante zur Vergleichbarkeit der Zelllinien unter gleichzeitiger dualer Behandlung mit GSK126 und Hypoxie darstellt.

Die außerdem untersuchte HIF-2 α -mRNA-Expression zeigte im Gegensatz zu den Proteinmessungen in keiner der drei Zelllinien eine Reduktion unter Behandlung mit GSK126, in MDA-MB-231 POR-Zellen war sie sogar erhöht. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass der starke regulatorische Effekt von EZH2 auf die HIF-2 α -mRNA aus den Experimenten mit shRNA-vermittelter EZH2-Depletion nicht maßgeblich auf die EZH2-Methylierungsfunktion zurückzuführen ist.

Zusammenfassend hat die GSK126-Behandlung unter Hypoxie einen anderen Effekt auf die HIF-2 α -mRNA- und -Proteinlevel als die shRNA-vermittelte EZH2-Depletion. Die Reduktion des HIF-2 α -Proteinlevels in Lungenkarzinom- und Glioblastomzellen bei hohen Inhibitorkonzentrationen könnte entweder mit der gehemmten

Methylierungsfunktion von EZH2 oder mit Nebenwirkungen bei dieser Dosierung erklärt werden. Anders verhält es sich in Mammakarzinomzellen, in denen die Hemmung der enzymatischen EZH2-Aktivität auch bei höheren Inhibitorkonzentrationen eher keinen Einfluss auf die HIF-2 α -Proteinlevel nimmt. Es ist anzumerken, dass HIF-Proteinlevel *in vitro* auch durch die Zelldichte reguliert werden, deshalb muss bei der Durchführung von weiteren GSK126-Inhibitor-Experimenten auch dieser Parameter variiert und genau untersucht werden.

In der bereits erwähnten Studie mit A549-Zellen wurde ein Zusammenhang zwischen der Behandlung mit GSK126 und verminderter VEGF-Expression festgestellt (Chen et al. 2016). HIF-Proteine sind wichtige Transkriptionsfaktoren für VEGF. Daher kommt eine EZH2-HIF-Interaktion über die EZH2-Methylierungsfunktion als Ursache für die in der dortigen Studie beobachtete verminderte VEGF-Expression infrage. Dazu passend sind auch die in dieser Studie beobachteten reduzierten HIF-2 α -Proteinlevel in A549-Zellen unter GSK126-Behandlung. Über welchen regulatorischen Weg in diesem Fall HIF-2 α und folglich VEGF herunterreguliert werden, bleibt jedoch unklar.

Ob und wie die EZH2-Methylierungsaktivität Einfluss auf HIF-2 α nimmt, sollte letztlich in weiteren Experimenten verifiziert werden, insbesondere wegen des therapeutischen Potenzials von EZH2-Inhibitoren. Klinisch wichtig sind beispielsweise in der Tumorthherapie die HIF-2 α -Proteinreduktion und die damit verbundene Herabregulation der Downstream-Targets (wie VEGF) unabhängig von der HIF-2 α -mRNA. In G55- und A549-Zellen konnte in den durchgeführten Experimenten mit GSK126 trotz fehlender mRNA-Reduktion dennoch ein Effekt auf der HIF-2 α -Proteinebene erzielt werden, was ein Indiz für eine mögliche therapeutische Wirksamkeit sein könnte. Diese wird in aktuell laufenden klinischen Studien eruiert (Fioravanti et al. 2018; Yap et al. 2019).

Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse

Die oben aufgeführten Überlegungen führen letztlich zur Hauptintention dieser Arbeit – der Beantwortung der Frage, mittels welchen molekularen Mechanismen EZH2 HIF-2 α reguliert und so die Tumorprogression verstärkt. Vielfältige Aktionsmodi von EZH2 sind möglich, es bestehen offensichtlich je nach Zelllinie Unterschiede. In **Abbildung 10** sind diese schematisch zusammengefasst.

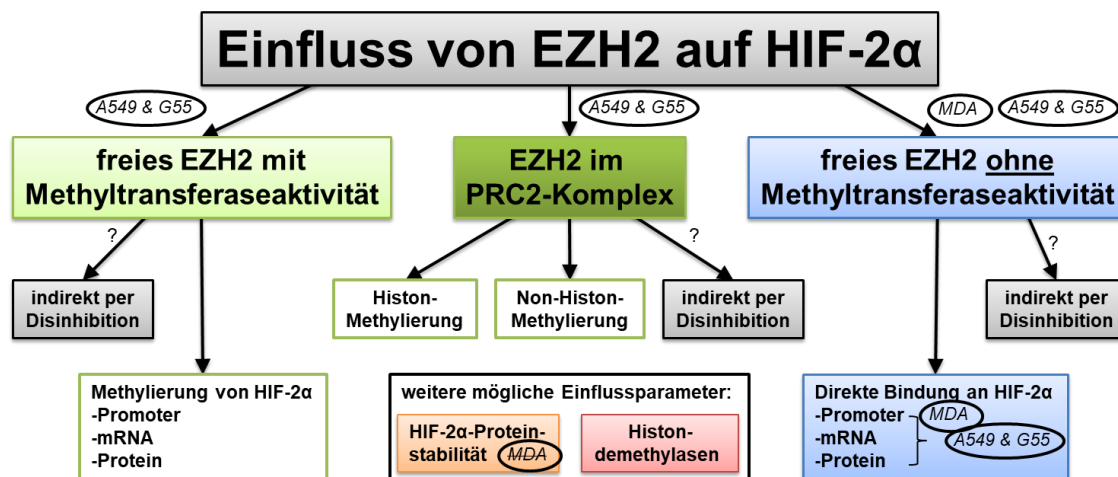


Abb. 10. Mögliche Wege der Beeinflussung von HIF-2 α durch EZH2 in Kombination mit den in dieser Studie erhobenen Ergebnissen. Grün: EZH2-Methyltransferase ist Teil der EZH2-HIF-2 α -Interaktion; blau: EZH2-Methyltransferaseaktivität wird nicht benötigt; rot/orange: Einfluss unabhängig vom oder zusätzlich zum EZH2-Protein.

Im PRC2-Komplex (He et al. 2012; Gunawan et al. 2015; Gan et al. 2018) oder potenziell auch frei vorliegend (Xu et al. 2012) kann EZH2 Histon 3 und Non-Histon-Proteine mittels Methyltransferase methylieren. Anhand der Ergebnisse aus den Experimenten mit GSK126 ist eine Methyltransferase-abhängige Interaktion (PRC2-abhängig oder –unabhängig) von EZH2 und HIF-2 α in Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231, kurz MDA) eher unwahrscheinlich. Für die beobachtete HIF-2 α -Proteinreduktion in Lungenkarzinom- und Glioblastomzellen (A549 & G55) wird die EZH2-Methyltransferaseaktivität jedoch wahrscheinlich benötigt (grüne Kästen). Es ist unklar, ob HIF-2 α oder weitere Non-Histon-Proteine direkt methyliert werden oder EZH2 über die Trimethylierung von Histon 3 genrepressiv auf zwischengeschaltete Faktoren wirkt (Disinhibition). Zusätzlich wurde in allen untersuchten Zelllinien eine HIF-2 α -mRNA- und Protein-Reduktion nach EZH2-Depletion beobachtet. EZH2 beeinflusst HIF-2 α daher über seine Methylierungsfunktion hinaus (blaue Kästen), beispielsweise über eine direkte, PRC2- und Methyltransferase-unabhängige Bindung am Promoter eines Gens wie in der Studie von (Kim et al. 2018), dessen mRNA oder dem Protein selbst. In den Zelllinien A549 und G55 ist eine Interaktion auf allen drei Ebenen sowohl methylierungsabhängig als auch –unabhängig denkbar.

Ebenso kann eine verringerte HIF-2 α -Proteinestabilität durch vermehrten Abbau mittels PHDs eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse bei EZH2-Depletion sein (orange). Dies ist basierend auf den zusätzlichen Ergebnissen aus der transienten Transfektion mit nicht-destabilisierbaren HIF-2 α -Mutanten und Behandlung mit MG132 in MDA-MB-231 POR-Zellen eher unwahrscheinlich. Sie deuten aber darauf hin, dass der EZH2-Einfluss auf HIF-2 α in MDA-Zellen bereits vor der Translation stattfindet (HIF-2 α -Promoter). Zusätzlich können Gegenspieler von EZH2, wie beispielsweise Histondemethylasen, die Interaktion von EZH2 und HIF beeinflussen (rot).

Im PRC2-Komplex oder auch frei vorliegend kann EZH2 Histon 3 und Non-Histon-Proteine wie STAT3, GATA4 und Talin methylieren (Gunawan et al. 2015; He et al. 2012; Kim et al. 2013a; Xu et al. 2012). Dafür ist jedoch die EZH2-Methyltransferaseaktivität erforderlich. Deshalb ist anhand der erhobenen Ergebnisse nach Behandlung mit GSK126 eine Methyltransferase-abhängige Interaktion (PRC2-abhängig oder –unabhängig) von EZH2 und HIF-2 α in Mammakarzinomzellen eher unwahrscheinlich. Für die beobachtete HIF-2 α -Proteinreduktion in Lungenkarzinom- und Glioblastomzellen könnte jedoch die EZH2-Methyltransferaseaktivität eine Rolle

spielen (s. Versuche mit GSK126). Ob HIF-2 α oder weitere Non-Histon-Proteine direkt methyliert werden oder EZH2 über die Trimethylierung von Histon 3 am Lysin 27 auf zwischengeschaltete Faktoren wirkt (Disinhibition), sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Zusätzlich wurde in allen untersuchten Zelllinien eine HIF-2 α -mRNA- und Protein-Reduktion nach EZH2-Depletion beobachtet. Daraus lässt sich ableiten, dass EZH2 einen Einfluss auf HIF-2 α wahrnimmt, wobei die Methylierungsfunktion Zelltyp-abhängig wohl eher eine untergeordnete Rolle spielt.

Als Erklärung für die starke Beeinflussung durch EZH2 auch auf der Genexpressionsebene von HIF-2 α in den Experimenten mit EZH2-depletierten Zellen kommt ein weiterer molekularer Mechanismus infrage. Dieser beinhaltet eine direkte, PRC2- und Methyltransferase-unabhängige Bindung am Promoter eines Gens, wie sie bereits von Kim et al. 2018 für den Androgenrezeptor in Prostatakarzinomzellen beschrieben wurde. Dieser regulatorische Weg ist insbesondere für die Mammakarzinomzellen denkbar, da hier die durchgeführten Experimente am ehesten auf eine prätranslationale Regulation von HIF-2 α durch EZH2 hinweisen. Für einen solchen oder ähnlichen Mechanismus sprechen auch die Ergebnisse von Mahara et al. Sie beschreiben, dass HIF-1 α unter Hypoxiebedingungen den PRC2-Komplex inaktiviert und EZH2 einzeln vorliegt. Daraus resultierte in triple-negativen Brustkrebszellen eine Komplexbildung von EZH2 mit FOXM1, die auf das Protein EZH2 an sich zurückzuführen ist und auf eine Protein-Protein-Interaktionsfähigkeit von EZH2 hinweist. Dies war mit erhöhter Tumorinvasivität durch vermehrte Expression von Matrix-Metalloproteasen vergesellschaftet (Mahara et al. 2016a). Zwar wurde in hiesiger Arbeit kein so klarer Zusammenhang von EZH2 und HIF-1 α festgestellt, aber aufgrund der ähnlichen Regulation, Funktion und der Struktur von HIF-1 α und HIF-2 α ist ein mit Mahara et al. vergleichbarer Mechanismus bei HIF-2 α und EZH2 mit frei vorliegendem EZH2 eine mögliche Erklärung. Alternativ wird HIF-1 α unter Hypoxiebedingungen wie HIF-2 α hochreguliert und könnte auf diese Weise den von Mahara et al. beschriebenen Prozess verstärken. Dies bedingt dann eher eine PRC2-unabhängige Interaktion von EZH2 mit seinen Reaktionspartnern. Weiterführende Experimente wie beispielsweise eine Co-Immunopräzipitation mit EZH2 und HIF-2 α und Chromatin-Immunopräzipitation von EZH2 an EPAS1/HIF-2 α -genregulatorischen Sequenzen könnten diesbezüglich Aufschluss geben.

Zusätzlich könnten Gegenspieler von EZH2, wie beispielsweise Histondemethylasen, die Interaktion von EZH2 und HIF beeinflussen. Sie sind wie die Prolylhydroxylasen, die HIF-Proteine abbauen, Sauerstoff- und α -Ketoglutarat-abhängig und daher unter

Hypoxiebedingungen gehemmt (Hong et al. 2007). Beim Vergleich der H3K27me3-Proteinlevel in Normoxie und Hypoxie in den durchgeführten Experimenten ist kein Unterschied zu sehen, der durch die veränderte Aktivität der Histondemethylasen verursacht werden könnte. Dieser Effekt ist allerdings aufgrund des EZH2-Knockdowns und der fehlenden Detektierung der Histondemethylasen nicht abschließend beurteilbar und bedarf ebenfalls erweiterter Experimente.

Auch können die verminderten HIF-2 α -Level bei EZH2-Depletion lediglich aufgrund vermehrten Abbaus durch PHDs zustande kommen. Dies ist basierend auf den zusätzlichen Ergebnissen aus der transienten Transfektion mit nicht-degradierbaren HIF-2 α -Mutanten und Behandlung mit MG132 in MDA-MB-231 POR-Zellen eher unwahrscheinlich.

Abschließend sei betont, dass die erhobenen Daten in drei Zelllinien reproduzierbar die gleiche Tendenz von HIF-2 α unter EZH2-Depletion zeigen, was einen Hinweis auf einen zelllinienübergreifenden, tumoreigenen Mechanismus in der Regulation der beiden Proteine gibt. Die Heterogenität der Daten im Vergleich der Tumorarten im Detail verlangt dennoch in zukünftigen Studien einen differenzierten Blick auf die verschiedenen Tumorentitäten und die Testung von weiteren Versuchsbedingungen (z.B. variablere Zelldichten), die in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich auf die HIF-2 α -Level wirken können. Insbesondere ist zu klären, ob dieser Interaktion von EZH2 und HIF-2 α ein zentraler Mechanismus mit zelllinienspezifischen Nuancen zugrunde liegt, oder ob doch eher je nach Tumorentität verschiedene Varianten der EZH2-HIF-2 α -Interaktion existieren – mit mehr oder weniger starkem Fokus auf der Genexpressions- oder Proteinebene.

Klinische Relevanz der erhobenen Daten

Sowohl EZH2 als auch HIF-Proteine sind Gegenstand aktueller Forschung. Es sind noch viele Komponenten unbekannt, insbesondere in Bezug auf deren Interaktion. Aufgrund der negativ prognostischen Wirkung der beiden Proteine und der limitierten Therapieoptionen insbesondere bei Patienten mit Glioblastomen ist es für die zukünftige medizinische Forschung enorm wichtig, molekulare Angriffspunkte für eine gezielte Tumorthherapie zu finden.

EZH2 und HIF-Proteine wie HIF-2 α sind bereits unabhängig voneinander als onkogen beschrieben worden. Sie können die eigene Expression wahrscheinlich sogar

gegenseitig erhöhen und so zu einer verstärkten Tumorprogression führen (Semenza 2012; Cao et al. 2010; Aubert et al. 2019). Dies macht die beiden Proteine und den möglichen zugrundeliegenden Mechanismus im Hinblick auf pharmakologische Therapiechancen besonders interessant für die weitere Forschung.

Ein pharmakologischer Ansatz wurde mit GSK126 auch in dieser Studie weiterverfolgt. Für GSK126 und weitere EZH2-Inhibitoren stehen noch klinische Studienergebnisse aus. Sie könnten allerdings in Zukunft eine vielversprechende additive Therapieoption darstellen, wie es bereits bei den VEGF-Inhibitoren der Fall ist. Gegebenenfalls sind unselektivere Inhibitoren von EZH, die auch EZH1 hemmen, effektiver, da EZH1 bei EZH2-Mangel kompensatorisch hochreguliert wird.

Der orale HIF-2 α -Inhibitor Belzutifan wurde kürzlich von der FDA zur Tumorthherapie bei VHL-assoziierten Tumoren zugelassen (Deeks 2021). In der Zukunft wird sich zeigen, ob dieser Inhibitor auch in weiteren Tumorentitäten eine relevante Wirksamkeit zeigt.

Insgesamt stehen also bereits viele unterschiedliche pharmakologische Möglichkeiten sowohl in der klinischen Forschung als auch teilweise im klinischen Alltag zur Verfügung. Sie sind das Korrelat der jahrelangen Forschung zu den Proteinen EZH2 und HIF-2 α . Besonders interessant ist deren Anwendung bei den in dieser Studie untersuchten primären und sekundären Hirntumoren. Höchste Priorität sollte es sein, den hohen Leidensdruck zu minimieren und die geringe und trotz aller Bemühungen seit Jahren etwa gleichbleibend kurze Überlebensdauer der Patienten zu verlängern. Die Inhibitoren können im Sinne einer zielgerichteten Therapie als Adjuvans oder alleinige orale oder intravenöse Therapie eingesetzt werden. Basierend auf den in dieser und anderen Studien erhobenen Daten findet eine noch nicht vollständig verstandene Wechselwirkung zwischen EZH2 und HIF-2 α statt. Daher wäre ebenfalls eine Kombination der beiden Inhibitoren für EZH2 und HIF-2 α nach weiteren Experimenten ein mögliches Therapieregime, um den hoch aggressiven Hirntumoren therapeutisch zu begegnen.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-bindende Kasette
APS	Ammoniumpersulfat
CAIX	Carboanhydrase 9
CMV	Cytomegalievirus
Co	Kontrolle
cDNA	Complementary DNA
Ct	Cycle threshold
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZNeP	3-Deazaneplanocin
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epidermale zur mesenchymalen Transition
EPAS1	Genlocus codierend für HIF-2 α
EPO	Erythropoietin
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FOXM1	Forkhead box M1
GATA4	GATA binding protein 4
GBM	Glioblastoma multiforme
GFP	green fluorescent protein
GLUT	Glucosetransporter
GSC	Glioblastoma stem-like cells
GSK126	Spezifischer EZH2-Inhibitor
H3K27(me3)	Am 27.Lysin (trimethyliertes) Histon H3
H24/48	24- oder 48-stündige Behandlung mit 1% Sauerstoff
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HRE	hypoxic response element
IDH1	Isocitratdehydrogenase 1
JMJD3	Jumonji-domain-containing protein 3
Ktrl	Kontrolle
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Moi	multiplicity of infection
mRNA	Messenger-RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
Nor	Normoxie
Nsc	Noncilinging
ODD	oxygen dependent degradation domain

PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
pcDNA	Plasmid cloning DNA
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
pH	potentia Hydrogenii
PHD	Prolyhydroxylase
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PVDF	Polyvinylidene fluoride
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Protein
RLU	Relative luciferase unit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RTKI	Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor
RT-qPCR	Realtime-quantitative PCR
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDF	Stromal cell-derived factor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardabweichung
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Short interfering RNA
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TGF	Transforming growth factor
UTX	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on X chromosome
VEGF	vascular endothelial growth factor
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
Y641F	Gain-of-function-Mutation in EZH2 am Tyrosin 641

Projektvorstellungen

Vorstellung des Projekts im Rahmen des Science Day 2021 am 12.11.2021

Literaturverzeichnis

Adelaiye-Ogala, Remi; Budka, Justin; Damayanti, Nur P.; Arrington, Justine; Ferris, Mary; Hsu, Chuan-Chih et al. (2017): EZH2 Modifies Sunitinib Resistance in Renal Cell Carcinoma by Kinome Reprogramming. In: *Cancer research* 77 (23), S. 6651–6666. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0899.

- AMBOSS GmbH (2022): Mammakarzinom. Sektion Gynäkologie, Maligne Veränderungen, zuletzt aktualisiert am 17.05.2022, zuletzt geprüft am 07.07.2022.
- Aubert, Yann; Egolf, Shaun; Capell, Brian C. (2019): The Unexpected Noncatalytic Roles of Histone Modifiers in Development and Disease. In: *Trends in genetics : TIG* 35 (9), S. 645–657. DOI: 10.1016/j.tig.2019.06.004.
- Ben-Skowronek, Iwona; Kozaczuk, Sylwia (2015): Von Hippel-Lindau Syndrome. In: *Hormone research in paediatrics* 84 (3), S. 145–152. DOI: 10.1159/000431323.
- Blackledge, Neil P.; Klose, Robert J. (2021): The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 22 (12), S. 815–833. DOI: 10.1038/s41580-021-00398-y.
- Bödör, C.; O'Riain, C.; Wrench, D.; Matthews, J.; Iyengar, S.; Tayyib, H. et al. (2011): EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. In: *Leukemia* 25 (4), S. 726–729. DOI: 10.1038/leu.2010.311.
- Bracken, Adrian P.; Pasini, Diego; Capra, Maria; Prosperini, Elena; Colli, Elena; Helin, Kristian (2003): EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. In: *The EMBO Journal* 22 (20), S. 5323–5335. DOI: 10.1093/emboj/cdg542.
- Cagney DN, Martin AM, Catalano PJ, Redig AJ, Lin NU, Lee EQ, Wen PY, Dunn IF, Bi WL, Weiss SE, Haas-Kogan DA, Alexander BM, Aizer AA (2017). Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study. In: *Neuro Oncol.* 19(11), S. 1511-1521. doi: 10.1093/neuonc/nox077.
- Cao, Paul; Deng, Zhiyong; Wan, Meimei; Huang, Weiwei; Cramer, Scott D.; Xu, Jianfeng et al. (2010): MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1alpha/HIF-1beta. In: *Molecular cancer* 9, S. 108. DOI: 10.1186/1476-4598-9-108.
- Cao, Q.; Yu, J.; Dhanasekaran, S. M.; Kim, J. H.; Mani, R-S; Tomlins, S. A. et al. (2008): Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. In: *Oncogene* 27 (58), S. 7274–7284. DOI: 10.1038/onc.2008.333.
- Cao, Ru; Wang, Liangjun; Wang, Hengbin; Xia, Li; Erdjument-Bromage, Hediye; Tempst, Paul et al. (2002): Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5595), S. 1039–1043. DOI: 10.1126/science.1076997.
- Chang, Soojeong; Yim, Sujin; Park, Hyunsung (2019): The cancer driver genes IDH1/2, JARID1C/ KDM5C, and UTX/ KDM6A: crosstalk between histone demethylation and hypoxic reprogramming in cancer metabolism. In: *Experimental & molecular medicine* 51 (6), S. 1–17. DOI: 10.1038/s12276-019-0230-6.
- Chen, Ya-Tian; Zhu, Feng; Lin, Wei-Ren; Ying, Rong-Biao; Yang, You-Ping; Zeng, Ling-Hui (2016): The novel EZH2 inhibitor, GSK126, suppresses cell migration and angiogenesis via down-regulating VEGF-A. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 77 (4), S. 757–765. DOI: 10.1007/s00280-016-2990-1.
- Deeks, Emma D. (2021): Belzutifan: First Approval. In: *Drugs* 81 (16), S. 1921–1927. DOI: 10.1007/s40265-021-01606-x.
- Dong, Min; Fan, Xin-Juan; Chen, Zhan-Hong; Wang, Tian-Tian; Li, Xing; Chen, Jie et al. (2014): Aberrant expression of enhancer of zeste homologue 2, correlated with HIF-1α, refines relapse risk and predicts poor outcome for breast cancer. In: *Oncology reports* 32 (3), S. 1101–1107. DOI: 10.3892/or.2014.3322.

Dr. Christian Kretschmer (2018): Sunitinib - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen. Hg. v. Gelbe Liste. Online verfügbar unter https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Sunitinib_49136, zuletzt aktualisiert am 14.05.2018, zuletzt geprüft am 07.07.2022.

Dr. Isabelle Viktoria Maucher (2020): Bevacizumab - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen. Hg. v. Gelbe Liste. Online verfügbar unter https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Bevacizumab_48613, zuletzt aktualisiert am 30.06.2020, zuletzt geprüft am 07.07.2022.

Duan, Ran; Du, Wenfang; Guo, Weijian (2020): EZH2: a novel target for cancer treatment. In: *Journal of hematology & oncology* 13 (1), S. 104. DOI: 10.1186/s13045-020-00937-8.

Erdmann, Friederike; Spix, Claudia; Katalinic, Alexander; Christ, Monika; Folkerts, Juliane; Hansmann, Jutta et al. (2021): Krebs in Deutschland für 2017/2018. Unter Mitarbeit von Robert Koch-Institut.

Ernst, Thomas; Chase, Andrew J.; Score, Joannah; Hidalgo-Curtis, Claire E.; Bryant, Catherine; Jones, Amy V. et al. (2010): Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. In: *Nature genetics* 42 (8), S. 722–726. DOI: 10.1038/ng.621.

Fan, Tian-Yu; Wang, Hai; Xiang, Peng; Liu, Ya-Wei; Li, He-Zhen; Lei, Bing-Xi et al. (2014): Inhibition of EZH2 reverses chemotherapeutic drug TMZ chemosensitivity in glioblastoma. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 7 (10), S. 6662–6670.

FDA (2021): FDA approves belzutifan for cancers associated with von Hippel-Lindau disease. Online verfügbar unter <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-belzutifan-cancers-associated-von-hippel-lindau-disease>, zuletzt geprüft am 07.07.2022.

Fioravanti, Rossella; Stazi, Giulia; Zwergel, Clemens; Valente, Sergio; Mai, Antonello (2018): Six Years (2012-2018) of Researches on Catalytic EZH2 Inhibitors: The Boom of the 2-Pyridone Compounds. In: *Chemical record (New York, N.Y.)* 18 (12), S. 1818–1832. DOI: 10.1002/tcr.201800091.

Gallego, O. (2015): Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. In: *Current oncology (Toronto, Ont.)* 22 (4), e273-81. DOI: 10.3747/co.22.2436.

Gan, Lu; Yang, Yanan; Li, Qian; Feng, Yi; Liu, Tianshu; Guo, Weijian (2018): Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. In: *Biomarker research* 6, S. 10. DOI: 10.1186/s40364-018-0122-2.

Gerson, Stanton L. (2004): MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (4), S. 296–307. DOI: 10.1038/nrc1319.

Glazer, Robert I.; Hartman, Kathleen D.; Knode, Marion C.; Richard, Michelle M.; Chiang, Peter K.; Tseng, Christopher K.H.; Marquez, Victor E. (1986): 3-Deazaneplanocin: A new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135 (2), S. 688–694. DOI: 10.1016/0006-291x(86)90048-3.

Göllner, Stefanie; Oellerich, Thomas; Agrawal-Singh, Shuchi; Schenk, Tino; Klein, Hans-Ulrich; Rohde, Christian et al. (2017): Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. In: *Nature medicine* 23 (1), S. 69–78. DOI: 10.1038/nm.4247.

- Gunawan, Merry; Venkatesan, Nandini; Loh, Jia Tong; Wong, Jong Fu; Berger, Heidi; Neo, Wen Hao et al. (2015): The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. In: *Nature immunology* 16 (5), S. 505–516. DOI: 10.1038/ni.3125.
- Haberer, Tilmann (2021): 030099_LL_Gliome_2021_final. Online verfügbar unter https://dgn.org/wp-content/uploads/2021/07/030099_LL_Gliome_2021_final.pdf, zuletzt geprüft am 10.03.2022.
- He, Aibin; Shen, Xiaohua; Ma, Qing; Cao, Jingjing; Gise, Alexander von; Zhou, Pingzhu et al. (2012): PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. In: *Genes & development* 26 (1), S. 37–42. DOI: 10.1101/gad.173930.111.
- Henze, Anne-Theres; Acker, Till (2010): Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (14), S. 2749–2763. DOI: 10.4161/cc.9.14.12591.
- Herviou, Laurie; Cavalli, Giacomo; Cartron, Guillaume; Klein, Bernard; Moreaux, Jérôme (2016): EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies. In: *Oncotarget* 7 (3), S. 2284–2296. DOI: 10.18632/oncotarget.6198.
- Hong, Sunhwa; Cho, Young-Wook; Yu, Li-Rong; Yu, Hong; Veenstra, Timothy D.; Ge, Kai (2007): Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (47), S. 18439–18444. DOI: 10.1073/pnas.0707292104.
- Huang, Shuo; Wang, Zhongyu; Zhou, Jie; Huang, Jiani; Zhou, Li; Luo, Jing et al. (2019): EZH2 Inhibitor GSK126 Suppresses Antitumor Immunity by Driving Production of Myeloid-Derived Suppressor Cells. In: *Cancer research* 79 (8), S. 2009–2020. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2395.
- Jan Niklas Herbel (2021): Everolimus - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen. Hg. v. Gelbe Liste. Online verfügbar unter https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Everolimus_48039#Anwendung, zuletzt aktualisiert am 03.08.2021, zuletzt geprüft am 07.07.2022.
- Kaelin, William G.; Ratcliffe, Peter J. (2008): Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. In: *Molecular cell* 30 (4), S. 393–402. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.04.009.
- Kim, Eunhee; Kim, Misuk; Woo, Dong-Hun; Shin, Yongjae; Shin, Jihye; Chang, Nakho et al. (2013a): Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. In: *Cancer cell* 23 (6), S. 839–852. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.04.008.
- Kim, Jung; Lee, Yongik; Lu, Xiaodong; Song, Bing; Fong, Ka-Wing; Cao, Qi et al. (2018): Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. In: *Cell reports* 25 (10), 2808–2820.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.11.035.
- Kim, Kimberly H.; Roberts, Charles W. M. (2016): Targeting EZH2 in cancer. In: *Nature medicine* 22 (2), S. 128–134. DOI: 10.1038/nm.4036.
- Kim, Woojin; Bird, Gregory H.; Neff, Tobias; Guo, Guoji; Kerenyi, Marc A.; Walensky, Loren D.; Orkin, Stuart H. (2013b): Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. In: *Nature chemical biology* 9 (10), S. 643–650. DOI: 10.1038/nchembio.1331.
- Koh, Cheryl M.; Iwata, Tsuyoshi; Zheng, Qizhi; Bethel, Carlise; Yegnasubramanian, Srinivasan; Marzo, Angelo M. de (2011): Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. In: *Oncotarget* 2 (9), S. 669–683. DOI: 10.18632/oncotarget.327.

- Lah, Tamara T.; Novak, Metka; Breznik, Barbara (2020): Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. In: *Seminars in cancer biology* 60, S. 262–273. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.10.010.
- Lamba N, Wen PY, Aizer AA (2021): Epidemiology of brain metastases and leptomeningeal disease. In: *Neuro Oncol.* 23(9), S. 1447-1456. DOI: 10.1093/neuonc/noab101 .
- Lang, I., et al. (2013) Bevacizumab plus paclitaxel versus bevacizumab plus capecitabine as first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer: interim efficacy results of the randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 TURANDOT trial. In: *Lancet Oncol*, 14(2): p. 125-33
- Laugesen, Anne; Højfeldt, Jonas Westergaard; Helin, Kristian (2019): Molecular Mechanisms Directing PRC2 Recruitment and H3K27 Methylation. In: *Molecular cell* 74 (1), S. 8–18. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.03.011.
- Lee, Shuet Theng; Li, Zhimei; Wu, Zhenlong; Aau, Meiyee; Guan, Peiyong; Karuturi, R. K. Murthy et al. (2011): Context-specific regulation of NF-κB target gene expression by EZH2 in breast cancers. In: *Molecular cell* 43 (5), S. 798–810. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.011.
- Louis, David N.; Perry, Arie; Wesseling, Pieter; Brat, Daniel J.; Cree, Ian A.; Figarella-Branger, Dominique et al. (2021): The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. In: *Neuro-oncology* 23 (8), S. 1231–1251. DOI: 10.1093/neuonc/noab106.
- Luger, K.; Mäder, A. W.; Richmond, R. K.; Sargent, D. F.; Richmond, T. J. (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. In: *Nature* 389 (6648), S. 251–260. DOI: 10.1038/38444.
- Ma, De-Ning; Chai, Zong-Tao; Zhu, Xiao-Dong; Zhang, Ning; Zhan, Di-Hua; Ye, Bo-Gen et al. (2016a): MicroRNA-26a suppresses epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma by repressing enhancer of zeste homolog 2. In: *Journal of hematology & oncology* 9, S. 1. DOI: 10.1186/s13045-015-0229-y.
- Ma, Y. B.; Song, D. W.; Nie, R. H.; Mu, G. Y. (2016b): MicroRNA-32 functions as a tumor suppressor and directly targets EZH2 in uveal melanoma. In: *Genetics and molecular research : GMR* 15 (2). DOI: 10.4238/gmr.15027935.
- Mahara, Sylvia; Chng, Wee Joo; Yu, Qiang (2016a): Molecular switch of EZH2 in hypoxia. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 15 (22), S. 3007–3008. DOI: 10.1080/15384101.2016.1215699.
- Mahara, Sylvia; Lee, Puay Leng; Feng, Min; Tergaonkar, Vinay; Chng, Wee Joo; Yu, Qiang (2016b): HIFI-α activation underlies a functional switch in the paradoxical role of Ezh2/PRC2 in breast cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (26), E3735-44. DOI: 10.1073/pnas.1602079113.
- Mallen-St Clair, Jon; Soydaner-Azeloglu, Rengin; Lee, Kyoung Eun; Taylor, Laura; Livanos, Alexandra; Pylayeva-Gupta, Yuliya et al. (2012): EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. In: *Genes & development* 26 (5), S. 439–444. DOI: 10.1101/gad.181800.111.
- McCabe, Michael T.; Graves, Alan P.; Ganji, Gopinath; Diaz, Elsie; Halsey, Wendy S.; Jiang, Yong et al. (2012a): Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8), S. 2989–2994. DOI: 10.1073/pnas.1116418109.

McCabe, Michael T.; Ott, Heidi M.; Ganji, Gopinath; Korenchuk, Susan; Thompson, Christine; van Aller, Glenn S. et al. (2012b): EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. In: *Nature* 492 (7427), S. 108–112. DOI: 10.1038/nature11606.

Miranda, Tina Branscombe; Cortez, Connie C.; Yoo, Christine B.; Liang, Gangning; Abe, Masanobu; Kelly, Theresa K. et al. (2009): DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. In: *Molecular cancer therapeutics* 8 (6), S. 1579–1588. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0013.

Morin, Ryan D.; Johnson, Nathalie A.; Severson, Tesa M.; Mungall, Andrew J.; An, Jianghong; Goya, Rodrigo et al. (2010): Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. In: *Nature genetics* 42 (2), S. 181–185. DOI: 10.1038/ng.518.

Nagarsheth, Nisha; Peng, Dongjun; Kryczek, Ilona; Wu, Ke; Li, Wei; Zhao, Ende et al. (2016): PRC2 Epigenetically Silences Th1-Type Chemokines to Suppress Effector T-Cell Trafficking in Colon Cancer. In: *Cancer research* 76 (2), S. 275–282. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1938.

Nikoloski, Gorica; Langemeijer, Saskia M. C.; Kuiper, Roland P.; Knops, Ruth; Massop, Marion; Tönnissen, Evelyn R. L. T. M. et al. (2010): Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. In: *Nature genetics* 42 (8), S. 665–667. DOI: 10.1038/ng.620.

Ohgaki, Hiroko; Kleihues, Paul (2013): The definition of primary and secondary glioblastoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (4), S. 764–772. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.

Papale, Marco; Ferretti, Elisabetta; Battaglia, Giuseppe; Bellavia, Diana; Mai, Antonello; Tafani, Marco (2018): EZH2, HIF-1, and Their Inhibitors: An Overview on Pediatric Cancers. In: *Frontiers in pediatrics* 6, S. 328. DOI: 10.3389/fped.2018.00328.

Peng, Dongjun; Kryczek, Ilona; Nagarsheth, Nisha; Zhao, Lili; Wei, Shuang; Wang, Weimin et al. (2015): Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. In: *Nature* 527 (7577), S. 249–253. DOI: 10.1038/nature15520.

Rahman, Rifaquat; Catalano, Paul J.; Reardon, David A.; Norden, Andrew D.; Wen, Patrick Y.; Lee, Eudocia Q. et al. (2015): Incidence, risk factors, and reasons for hospitalization among glioblastoma patients receiving chemoradiation. In: *Journal of neuro-oncology* 124 (1), S. 137–146. DOI: 10.1007/s11060-015-1820-3.

Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland für 2017/2018. Online verfügbar unter https://hessisches-krebsregister.de/media/krebs_in_deutschland_2021.pdf, zuletzt geprüft am 15.08.2022.

Robert, N.J., et al., RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2–negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *Journal of Clinical, Oncology*, 2011. 29(10): p. 1252-1260.

Schofield, Christopher J.; Ratcliffe, Peter J. (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (5), S. 343–354. DOI: 10.1038/nrm1366.

Semenza, Gregg L. (2012): Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. In: *Cell* 148 (3), S. 399–408. DOI: 10.1016/j.cell.2012.01.021.

- Seute T, Leffers P, ten Velde GP, Twijnstra A. Detection of brain metastases from small cell lung cancer: consequences of changing imaging techniques (CT versus MRI). *Cancer*. 2008 Apr 15;112(8):1827-34. doi: 10.1002/cncr.23361. PMID: 18311784.
- Simon, Camille; Chagraoui, Jalila; Krosi, Jana; Gendron, Patrick; Wilhelm, Brian; Lemieux, Sébastien et al. (2012): A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. In: *Genes & development* 26 (7), S. 651–656. DOI: 10.1101/gad.186411.111.
- Simon, M. Celeste (2016): The Hypoxia Response Pathways - Hats Off! In: *The New England journal of medicine* 375 (17), S. 1687–1689. DOI: 10.1056/NEJMcibr1610065.
- Smits, Michiel; Nilsson, Jonas; Mir, Shahryar E.; van der Stoop, Petra M.; Hulleman, Esther; Niers, Johanna M. et al. (2010): miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. In: *Oncotarget* 1 (8), S. 710–720. DOI: 10.18632/oncotarget.205.
- Socinski, Mark A.; Jotte, Robert M.; Cappuzzo, Federico; Orlandi, Francisco; Stroyakovskiy, Daniil; Nogami, Naoyuki et al. (2018): Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. In: *The New England journal of medicine* 378 (24), S. 2288–2301. DOI: 10.1056/NEJMoa1716948.
- Soffietti R, Ahluwalia M, Lin N, Rudà R. Management of brain metastases according to molecular subtypes (2020). In: *Nat Rev Neurol*.16 (10), S. 557-574. doi: 10.1038/s41582-020-0391-x
- Strahl, B. D.; Allis, C. D. (2000): The language of covalent histone modifications. In: *Nature* 403 (6765), S. 41–45. DOI: 10.1038/47412.
- Sun, Jie; Zheng, Guodong; Gu, Zhengtao; Guo, Zhenhui (2015): MiR-137 inhibits proliferation and angiogenesis of human glioblastoma cells by targeting EZH2. In: *Journal of neuro-oncology* 122 (3), S. 481–489. DOI: 10.1007/s11060-015-1753-x.
- Tan, Jing; Yang, Xiaojing; Zhuang, Li; Jiang, Xia; Chen, Wei; Lee, Puay Leng et al. (2007): Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. In: *Genes & development* 21 (9), S. 1050–1063. DOI: 10.1101/gad.1524107.
- Ukena, Dieter; Schönfeld, Nicholas (2018): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0. In: *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF)*. Online verfügbar unter <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>, zuletzt geprüft am 15.08.2022.
- Wang, Liyuan; Chen, Chan; Song, Zemin; Wang, Honghong; Ye, Minghui; Wang, Donghai et al. (2022): EZH2 depletion potentiates MYC degradation inhibiting neuroblastoma and small cell carcinoma tumor formation. In: *Nature communications* 13 (1), S. 12. DOI: 10.1038/s41467-021-27609-6.
- Wassef, Michel; Luscan, Armelle; Aflaki, Setareh; Zielinski, Dina; Jansen, Pascal W. T. C.; Baymaz, H. Irem et al. (2019): EZH1/2 function mostly within canonical PRC2 and exhibit proliferation-dependent redundancy that shapes mutational signatures in cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (13), S. 6075–6080. DOI: 10.1073/pnas.1814634116.
- Welt, A., et al., Capecitabine and bevacizumab with or without vinorelbine in first-line treatment of HER2/neu-negative metastatic or locally advanced breast cancer: final efficacy and safety data of the randomised, open-label superiority phase 3 CARIN trial. *Breast Cancer Res Treat*, 2016. 156(1): p. 97-107.

- Wöckel, Achim; Kreienberg, Rolf; Janni, Wolfgang (2021): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4. In: *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF)*. Online verfügbar unter <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>, zuletzt geprüft am 15.08.2022.
- Wu, Z. L.; Zheng, S. S.; Li, Z. M.; Qiao, Y. Y.; Aau, M. Y.; Yu, Q. (2010): Polycomb protein EZH2 regulates E2F1-dependent apoptosis through epigenetically modulating Bim expression. In: *Cell death and differentiation* 17 (5), S. 801–810. DOI: 10.1038/cdd.2009.162.
- Xia, Lilong; Zhu, Xinhai; Zhang, Lei; Xu, Yanhui; Chen, Guoping; Luo, Jing (2020): EZH2 enhances expression of CCL5 to promote recruitment of macrophages and invasion in lung cancer. In: *Biotechnology and applied biochemistry* 67 (6), S. 1011–1019. DOI: 10.1002/bab.1875.
- Xiang, Yang; Zhu, Ziqi; Han, Gang; Lin, Hanqing; Xu, Longyong; Chen, Charlie Degui (2007): JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. In: *Cell research* 17 (10), S. 850–857. DOI: 10.1038/cr.2007.83.
- Xiaoping, L.; Zhibin, Y.; Wenjuan, L.; Zeyou, W.; Gang, X.; Zhaohui, L. et al. (2013): CPEB1, a histone-modified hypomethylated gene, is regulated by miR-101 and involved in cell senescence in glioma. In: *Cell death & disease* 4, e675. DOI: 10.1038/cddis.2013.197.
- Xu, Kexin; Wu, Zhenhua Jeremy; Groner, Anna C.; He, Housheng Hansen; Cai, Changmeng; Lis, Rosina T. et al. (2012): EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. In: *Science (New York, N. Y.)* 338 (6113), S. 1465–1469. DOI: 10.1126/science.1227604.
- Yao, Yizhou; Hu, Hao; Yang, Yong; Zhou, Guoqiang; Shang, Zengfu; Yang, Xiaodong et al. (2016): Downregulation of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) is essential for the Induction of Autophagy and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. In: *Genes* 7 (10). DOI: 10.3390/genes7100083.
- Yap, Timothy A.; Winter, Jane N.; Giulino-Roth, Lisa; Longley, Jemma; Lopez, Juanita; Michot, Jean-Marie et al. (2019): Phase I Study of the Novel Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Inhibitor GSK2816126 in Patients with Advanced Hematologic and Solid Tumors. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 25 (24), S. 7331–7339. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4121.
- Zhang, Yi; Lin, Changwei; Liao, Guoqing; Liu, Sheng; Ding, Jie; Tang, Fang et al. (2015): MicroRNA-506 suppresses tumor proliferation and metastasis in colon cancer by directly targeting the oncogene EZH2. In: *Oncotarget* 6 (32), S. 32586–32601. DOI: 10.18632/oncotarget.5309.
- Zingg, Daniel; Arenas-Ramirez, Natalia; Sahin, Dilara; Rosalia, Rodney A.; Antunes, Ana T.; Haeusel, Jessica et al. (2017): The Histone Methyltransferase Ezh2 Controls Mechanisms of Adaptive Resistance to Tumor Immunotherapy. In: *Cell reports* 20 (4), S. 854–867. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.007.
- Zinner RG, Obasaju CK, Spigel DR, Weaver RW, Beck JT, Waterhouse DM, Modiano MR, Hrinchenko B, Nikolinakos PG, Liu J, Koustenis AG, Winfree KB, Melemed SA, Guba SC, Ortuzar WI, Desai D, Treat JA, Govindan R, Ross HJ. PRONOUNCE: randomized, open-label, phase III study of first-line pemetrexed + carboplatin followed by maintenance pemetrexed versus paclitaxel + carboplatin + bevacizumab followed by maintenance bevacizumab in patients with advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. In: *J Thorac Oncol*. 2015 Jan;10(1):134-42. doi: 10.1097/JTO.0000000000000366. PMID: 25371077; PMCID: PMC4276572.

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Herrn Prof. Till Acker bedanken, dass ich im Institut für Neuropathologie unter seiner Leitung meine Studien durchführen durfte. Maßgeblich an den theoretischen Vorüberlegungen und der Planung der Versuche waren der Laborleiter Attila Németh, Nuray Bögürçü-Seidel und Sabine Gräf beteiligt. Insbesondere erwähne ich an dieser Stelle das sehr wertvolle und zahlreiche Feedback von Attila und die enorme fachliche und prozedurale Expertise von Nuray und Sabine. Ihr wart mir stets eine zuverlässige und kompetente Betreuung, die mir sehr bei dieser Arbeit geholfen hat und die ich euch niemals vergessen werde.

Darüber hinaus erfuhr ich natürlich auch fachliche und moralische Unterstützung durch das gesamte Team der Neuropathologie, das während meiner Zeit im Labor mit mir gemeinsam Lösungen für alle erdenklichen Probleme fand und mir zusätzlich spannende Gespräche und humorvolle Zeiten in einem so großen und internationalen Team bereitete. Dazu gehören Aya und Julia, Sascha, Nadja, Carmen, Daniel und Hui-Ke. Auch Sandra Baumgart und Salisa Kruijning möchte ich für ihre Arbeit an diesem Projekt vor und nach mir danken.

Dank des JLU Trainee-Programms erhielt ich viele hilfreiche Fortbildungen und finanzielle Unterstützung während des Urlaubssemesters und lernte weitere Dozierende kennen, die mich im Progress meiner Promotion unterstützten, so auch Frau Prof. Veronika Grau.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Liebsten danken: Leon Brandenburg als mein Partner, mein Anker, Motivator und Berater in allen Belangen und Mama und Papa und der Rest der Familie, die mir zu jeder Zeit das Gefühl geben, dass sie hinter mir stehen und mich beraten, wo sie nur können und das tut unglaublich gut.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

Supplement

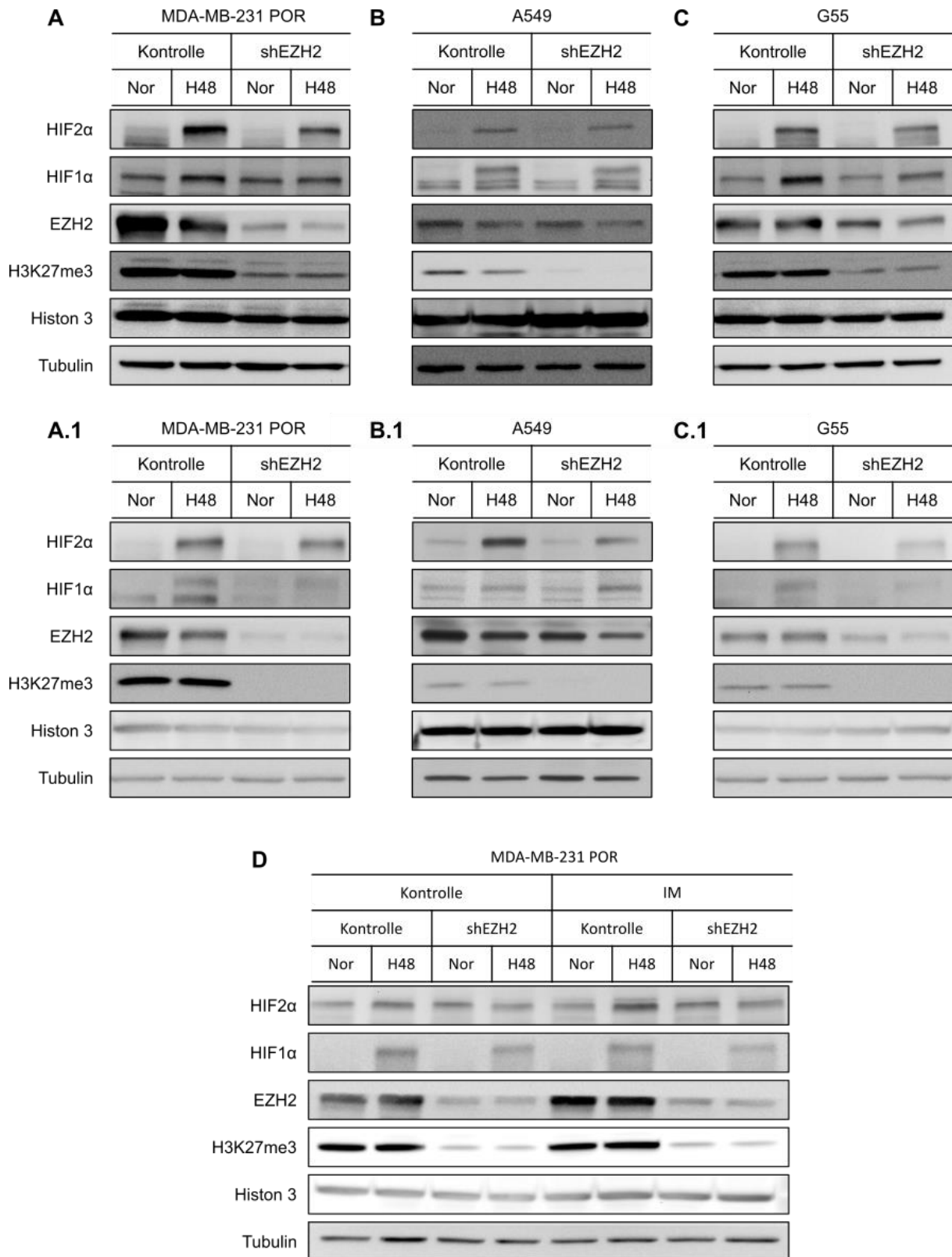
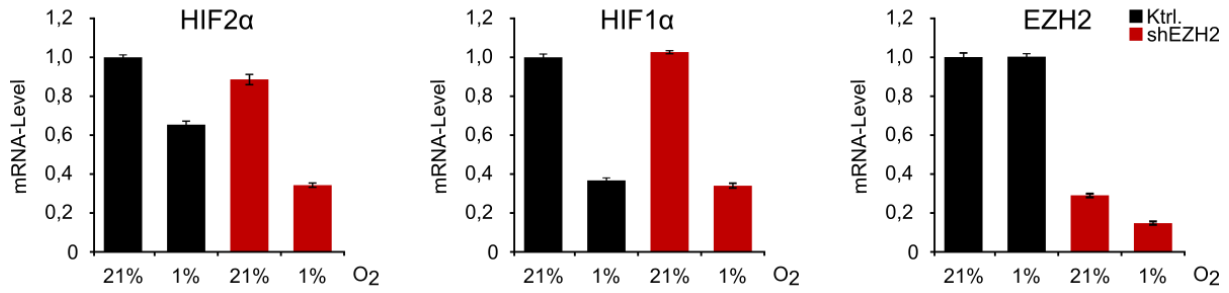


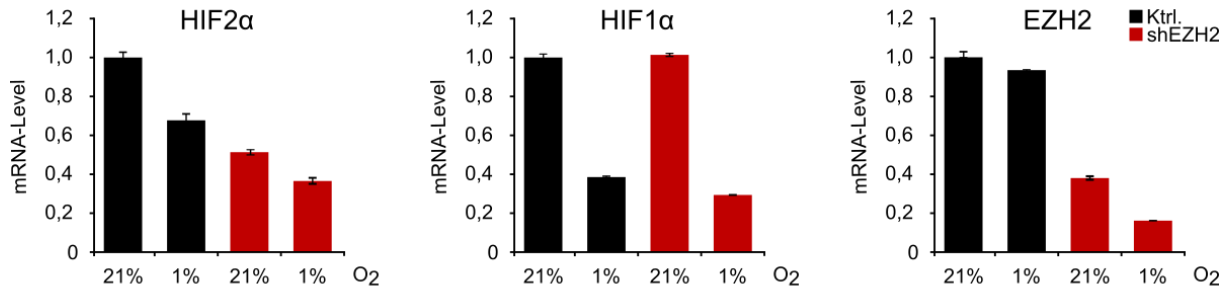
Abb. 1. EZH2-Depletion führt zu vermindertem HIF-2 α -Proteingehalt in Tumorzellen. (A) Ergänzung zu Abbildung 4 in der Hauptarbeit. Triplikate der Immunoblot-Analyse von HIF-2 α , HIF-1 α , EZH2 und H3K27me3 in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) und entsprechender Kontrolle unter Normoxie (Nor, 21% O₂) und Hypoxie (H48, 1% O₂, 48 h). EZH2 wurde mittels shRNA depletiert. Histon H3 und Tubulin dienen als Ladungskontrolle. Analoge

Analyse in Lungenkarzinomzellen (A549, **(B)**) und Glioblastomzellen (G55, **(C)**). **(D)** Die in MDA-MB-231-Zellen beobachtete HIF-2 α -Reduktion erfolgte auch nach intermittierender Hypoxie (IM). (n=3)

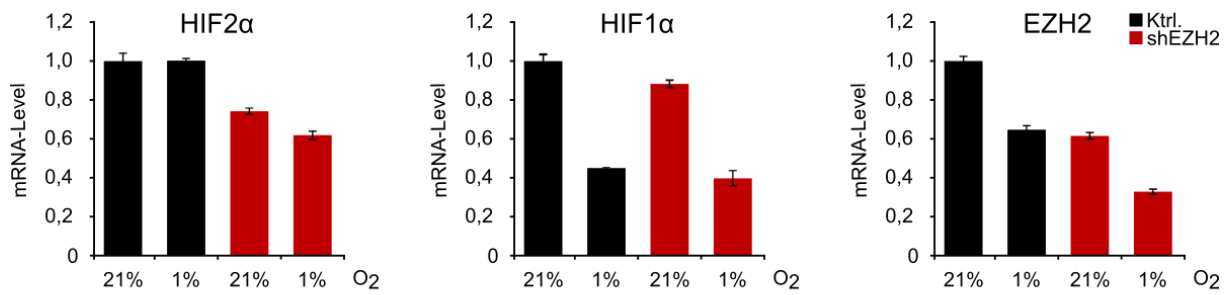
A MDA-MB-231 POR



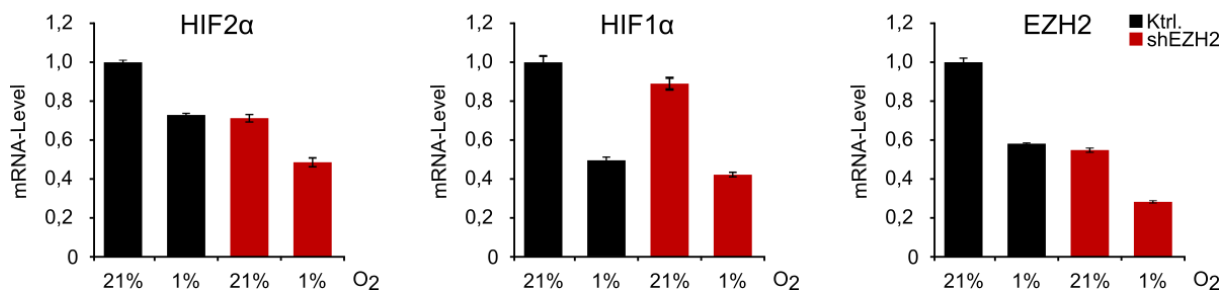
A.1 MDA-MB-231 POR



B A549



B.1 A549



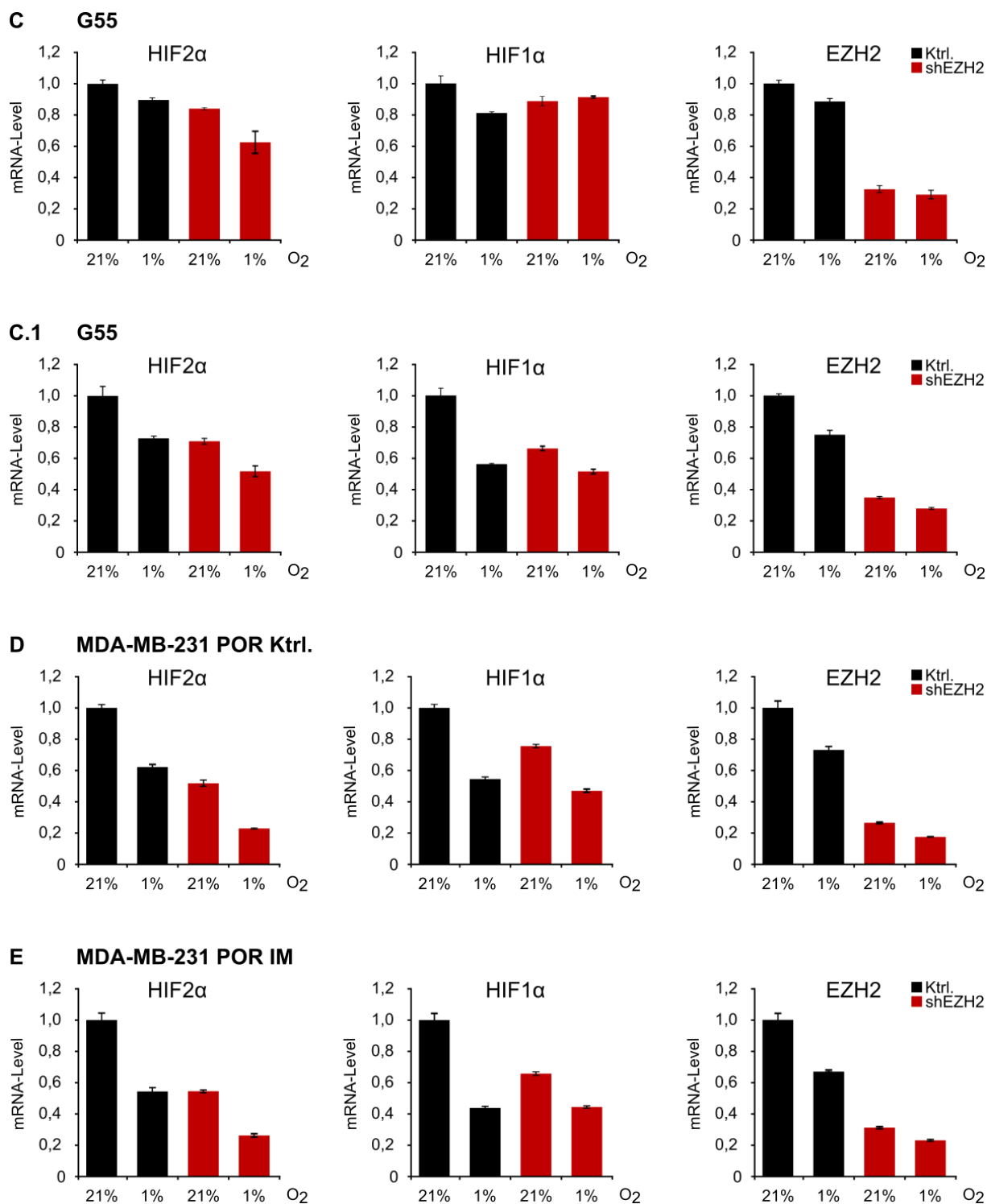


Abb. 2. EZH2-Depletion vermindert HIF-2 α -mRNA in Tumorzellen. (A) Ergänzung zu Abbildung 5 in der Hauptarbeit. Triplikate der quantitativen Realtime-PCR-Analyse von HIF-2 α , HIF1 α und EZH2 in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231 POR) und entsprechender Kontrolle (Ktrl.) unter Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (1% O₂, 48 h). Zur Normalisierung der Expressionslevel wurde das Haushaltsgen HPRT verwendet und zur normoxischen Kontrolle relativiert. Es sind Mittelwerte inklusive Standardabweichung (Fehlerbalken) gezeigt. Analoge Analyse in Lungenkarzinomzellen (A549, (B)) und Glioblastomzellen (G55, (C)). (D, E) Die in MDA-MB-231-Zellen beobachtete HIF-2 α -mRNA-Reduktion erfolgte auch nach intermittierender Hypoxie (IM). (n=3)

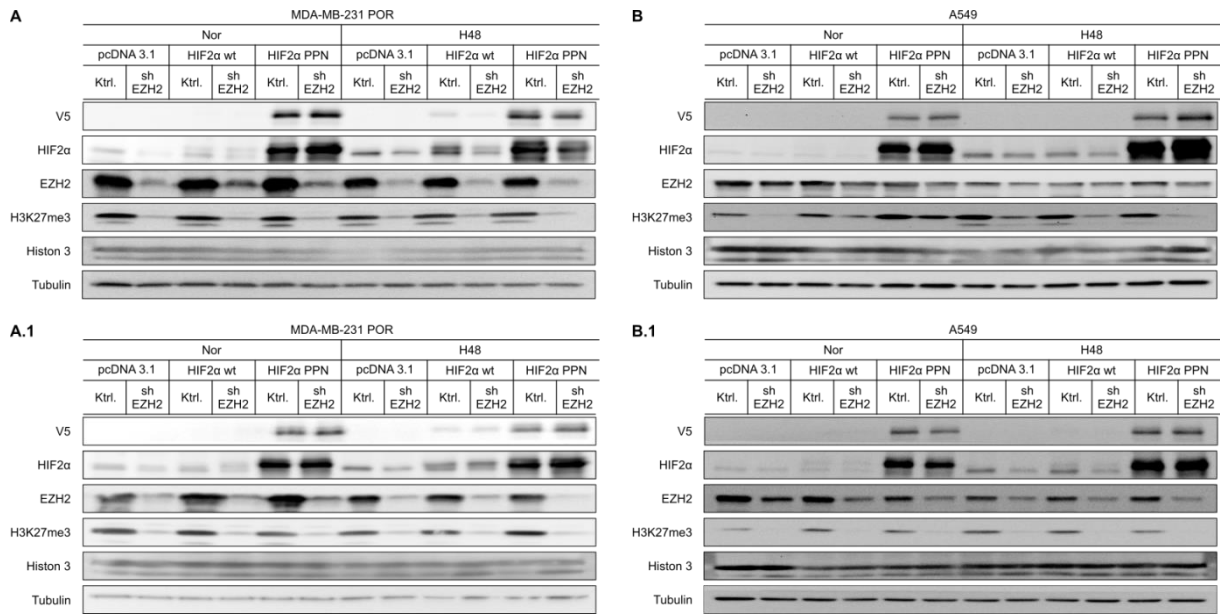


Abb. 3. Einfluss von Prolylhydroxylasen (PHD) auf die intrazelluläre HIF-2 α -Proteinmenge in EZH2-depletierten Tumorzellen. (A) Ergänzung zu Abbildung 6 in der Hauptarbeit. Triplikate (A und A.1) der Immunoblot-Analyse von V5, HIF-2 α , EZH2 und H3K27me3 in EZH2-depletierten Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231 POR) und entsprechender Kontrolle unter Normoxie (Nor, 21% O₂) und Hypoxie (H48, 1% O₂, 48 h). EZH2 wurde mittels shRNA depletiert. Histon H3 und Tubulin dienten als Ladungskontrolle. GFP fungierte als Kontrolle der Transfektionseffizienz. Analoge Analyse in Lungenkarzinomzellen (A549, (B und B.1)).

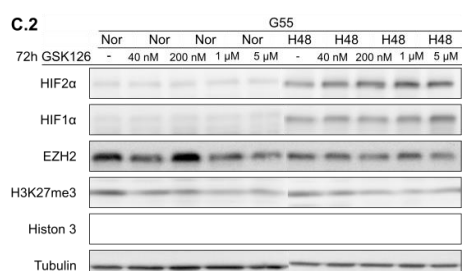
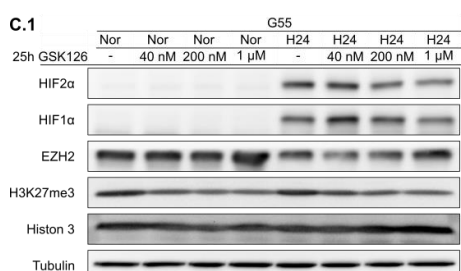
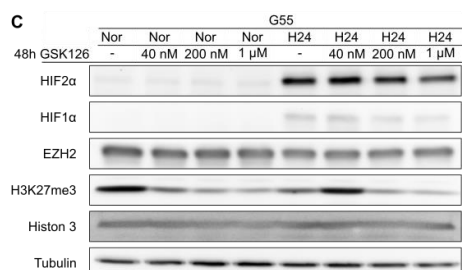
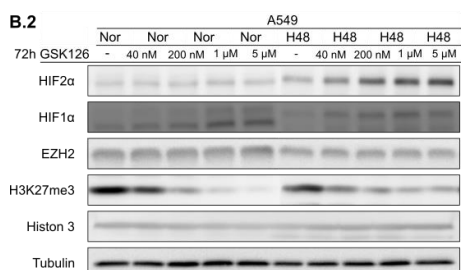
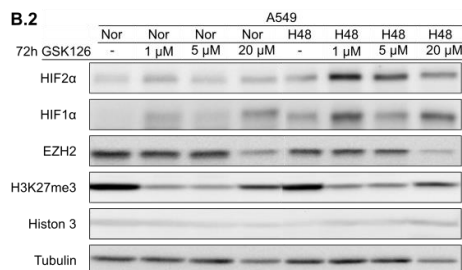
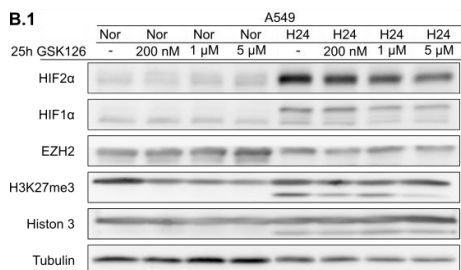
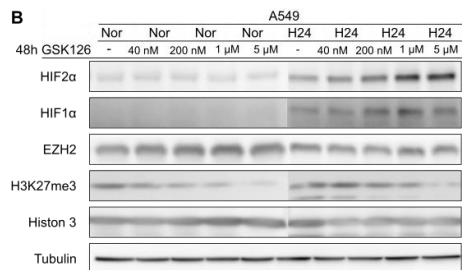
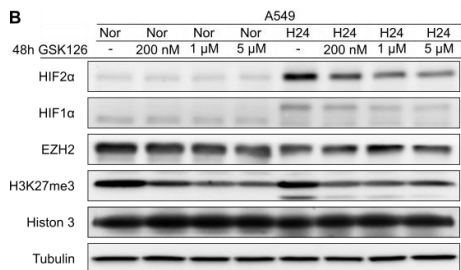
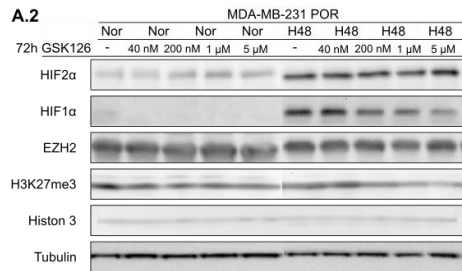
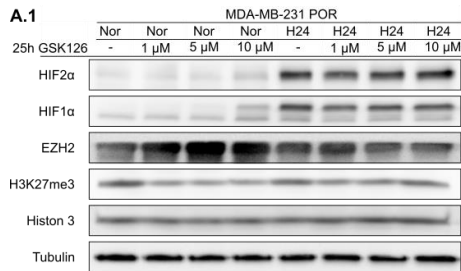
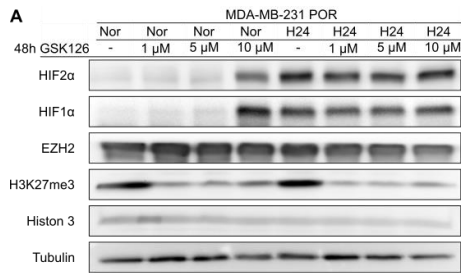


Abb. 4. Hemmung der EZH2-Methyltransferase-Aktivität mittels GSK126 führt zu zelllinientypischer Veränderung des HIF-2 α -Proteinlevels in Tumorzellen. (A) Ergänzung zu Abbildung 8 in der Hauptarbeit. Duplikat der Immunoblot-Analyse von HIF-2 α , HIF-1 α , EZH2 und H3K27me3 in Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231 POR) nach 48 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des funktionellen EZH2-Inhibitors GSK126 bei entsprechender DMSO-Kontrolle (-) und zusätzlicher Hypoxiebehandlung (1% O₂, in den letzten 24 h). Histon H3 und Tubulin dienten als Ladungskontrolle. Die HIF-2 α -Banden blieben bei steigender Inhibitorkonzentration stabil. Analoge Analyse in Lungenkarzinomzellen (A549, **(B)**) und Glioblastomzellen (G55, **(C)**). In diesen beiden Zelllinien wurde eine leichte HIF-2 α -Reduktion bei herabgesetzter EZH2-Methylierungsaktivität beobachtet. HIF-1 α zeigte in diesen Versuchen keine systematische, reproduzierbare Änderung. (n=3) In **(A.1/2)**, **(B.1/2)** und **(C.1/2)** ist zusätzlich eine Analyse der drei Zelllinien mit längerer oder kürzerer GSK126-Behandlung (25-72 h) und Hypoxie-Behandlung (24-48 h) dargestellt.