

Zentrum Physiologie und Pathophysiologie  
Abteilung Herz- und Kreislaufphysiologie  
Centre Physiology and Pathophysiology  
Department of Cardiovascular Physiology



Forschungsschwerpunkte Research Foci

---

- ▷ Mechanismen des zellulären Sauerstoff-Sensing
  - ▷ Bedeutung der hypoxischen Genexpression für die kardiale Anpassung an mechanische Last
  - ▷ Einfluss der PHD Sauerstoffsensoren auf Tumorwachstum und Tumorangiogenese
  - ▷ Mechanisms of cellular oxygen sensing
  - ▷ Impact of hypoxia-inducible gene expression on cardiac adaptation to mechanical load
  - ▷ Influence of PHD oxygen sensors on tumour growth and tumour angiogenesis
-



**Abteilungsdirektorin Head of Department**

Prof. Dr. med. Dörthe M. Katschinski

**Kontaktdaten Contact**

Abteilung Herz-, Kreislaufphysiologie  
 UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN  
 Humboldtallee 23, D-37073 Göttingen  
 Telefon +49-551 / 39-5896, Fax +49-551 / 39-5895  
 fischer@physiol.med.uni-goettingen.de  
 www.veg-physiol.med.uni-goettingen.de/hkp/hkp.htm

**Hochschullehrer/innen Professors and Lecturers**

+49-551 /

Katschinski, Dörthe M.	Prof. Dr. med.	katschinski@physiol.med.uni-goettingen.de	39-9778
------------------------	----------------	---	---------

**Weitere Arbeitsgruppenleiter/innen Other Group Leaders**

Hägele, Sonja	Dr. rer nat.	haegele@physiol.med.uni-goettingen.de	39-5647
Kleinschmidt, Malte	Dr. rer nat.	kleinschmidt@physiol.med.uni-goettingen.de	39-5648
Köditz, Jens	Dr. rer. nat.	koeditz@physiol.med.uni-goettingen.de	39-5648
Vogel, Sabine	Dr. rer nat.	vogel@physiol.med.uni-goettingen.de	39-5647
Zieseniss, Anke	Dr. rer nat.	zieseniss@physiol.med.uni-goettingen.de	39-5648

## EINLEITUNG

Das wissenschaftliche Interesse der Abteilung gilt der Beeinflussung von zellphysiologischen Funktionen durch Sauerstoff. Der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ist der Master-Regulator für die sauerstoffabhängige Genexpression. Unter normoxischen Bedingungen ist HIF-1 $\alpha$  nicht nachweisbar, da es sehr schnell ubiquitiniert und im Proteasom proteolytisch abgebaut wird. Dieser Vorgang wird über einen von Hippel-Lindau Tumorsuppressor (pVHL)-vermittelten Prozess gesteuert. pVHL bindet dabei HIF-1 $\alpha$  und koppelt es so an einen größeren Proteinkomplex, der schließlich zur kovalenten Verknüpfung von Polyubiquitin mit HIF-1 $\alpha$  führt. Unter hypoxischen Bedingungen wird die polyubiquitinierung inhibiert und HIF-1 $\alpha$  stabilisiert. Danach wird HIF-1 $\alpha$  posttranslational modifiziert, transloziert in den Kern, heterodimerisiert mit ARNT, bindet DNA an spezifischen Stellen, rekrutiert Ko-Faktoren und aktiviert schließlich die Expression von sauerstoffabhängigen Genen. Zu diesen Genen gehören u.a. der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (Angiogenese), der Glukosetransporter-1 und glykolytische Enzyme (metabolische Adaptation) sowie Erythropoietin und Transferrin (Erythropoese und Eisenstoffwechsel). Kürzlich wurden HIF-1 $\alpha$  Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD) entdeckt, die unter Verbrauch von Sauerstoff die Proline 402 und 564 von HIF-1 $\alpha$  hydroxylieren. Diese Hydroxylierung ist für die Bindung von pVHL absolut notwendig; d.h. unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  nicht hydroxyliert, pVHL kann nicht binden, und HIF-1 $\alpha$  wird somit stabilisiert. Mittlerweile wurden insgesamt drei HIF-1 $\alpha$  modifizierende PHDs identifiziert (PHD1, 2 und 3). Die Regulation von HIF-1 $\alpha$  ist bedeutsam in physiologischen (z.B. Angiogenese/Vaskulogenese, Höhenanpassung) aber auch pathologischen (z.B. kardiale Hypertrophie, ischämische Erkrankungen, Wachstum und Metastasierung von Tumoren, Wundheilung) Situationen mit reduziertem Sauerstoffpartialdruck. Eine gezielte Beeinflussung der HIF-1 $\alpha$  Stabilität und Aktivität könnte daher die Anpassungsfähigkeit gegenüber Gewebhypoxie (z.B. im Rahmen von Therapien des Herzinfarktes oder des Schlaganfalles) verbessern. Umgekehrt könnte eine gezielte Destabilisierung von HIF-1 $\alpha$  zur anti-Angiogenese (z.B. im Rahmen von Tumortherapien) genutzt werden.

## PREFACE

The general research focus of the Department is to discover the influence of hypoxia on cell physiology. The hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is the master regulator for oxygen-dependent gene expression. Since HIF-1 $\alpha$  is rapidly ubiquitinated and degraded via the proteasome in normoxia, the protein is almost not detectable under this condition. The degradation is triggered by the von Hippel-Lindau (pVHL) protein. pVHL is binding HIF-1 $\alpha$  and couples the protein to an ubiquitin complex, which finally results in the polyubiquitination of HIF-1 $\alpha$ . Under hypoxic conditions HIF-1 $\alpha$  is stabilized since the ubiquitination is inhibited. After stabilization, HIF-1 $\alpha$  is posttranslationally modified, accumulates in the nucleus, heterodimerizes with ARNT, binds to specific DNA sequences, re-

cruits co-factors and finally activates the expression of oxygen-dependent genes. Among those are VEGF (angiogenesis), Glut-1 and glycolytic enzymes (metabolic adaptation) as well as erythropoietin and transferrin (erythropoiesis and iron metabolism). Recently, HIF-1 $\alpha$  modifying Prolyl-4-Hydroxylases have been identified, which hydroxylate proline 402 and 564 of HIF-1 $\alpha$  under consumption of oxygen. The hydroxylation is strictly required for the binding of pVHL. Since under hypoxic conditions HIF-1 $\alpha$  is not hydroxylated, pVHL can not bind, which results in HIF-1 $\alpha$  stabilization. In total, three HIF-1 $\alpha$  modifying PHDs have been identified (PHD1, 2 and 3). The regulation of HIF-1 $\alpha$  is involved in physiological (for example angiogenesis/vasculogenesis) but also in pathophysiological conditions (for example cardiac hypertrophy, ischemic diseases, tumor growth and metastasis, wound healing). Targeting HIF-1 $\alpha$  stability or HIF-1 activity could therefore be of use for challenging the adaptation of cells towards hypoxia.

### 1. Mechanismen des Sauerstoffsensing

Die Prolyl-4-hydroxylasen (PHD) 1-3 wurden identifiziert aufgrund ihrer gemeinsamen Fähigkeit, HIF-1 $\alpha$  zu hydroxylieren und damit die Hypoxie-regulierte Genexpression zu beeinflussen. Durch die Etablierung und Charakterisierung von genetisch veränderten Mausmodellen zeichnen sich allerdings deutliche Unterschiede in den physiologischen PHD Isoform-spezifischen Funktionen ab. PHD-Isoform spezifische Eigenschaften betreffen Funktionen wie Angiogenese, Erythropoese /Sauerstofftransport, das kardiovaskuläre System, Metabolismus und Gewebemöostase. In Hefe-2 Hybrid-Analysen haben wir PHD-Isoform-spezifische Proteininteraktionspartner identifiziert. Zusätzlich haben wir stabil transfizierte PHD knockdown Zellmodelle erstellt und hinsichtlich PHD Isoform-spezifischer Pathways untersucht. Kenntnisse über die PHD Isoform-spezifischen Funktionen sind wichtig für die Entwicklung von PHD Inhibitoren, die derzeit in präklinischen und klinischen Studien hinsichtlich ihrer Effektivität zur Behandlung von Anämien oder zur Gewebeprotektion getestet werden.

### 1. Mechanism of oxygen sensing

The prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) 1-3 enzymes have been identified based on their ability to regulate the stability of hypoxia-inducible factor (HIF)  $\alpha$  subunits and thus to modify hypoxia-inducible gene expression. Transgenic mouse models provided insights into the isoform-specific functions of these oxygen sensors with physiological implications for angiogenesis, erythropoiesis/oxygen transport, cardiovascular function, metabolism and tissue homeostasis. In yeast two hybrid screens we further identified PHD isoform-specific protein interaction partners of the PHDs. This will help to identify PHD-isoform specific functions. In addition, we developed stable transfected PHD knock down cell lines, which

were screened for PHD isoform-specific pathways. This knowledge is important for the ongoing development of small molecule PHD inhibitors that are currently tested in preclinical and clinical trials for the treatment of anemia and for cytoprotection.

#### Arbeitsgruppenleiter/innen Group Leaders

Prof. Dr. D.M. Katschinski

#### Kooperationen Cooperations

Prof. Dr. R. Wenger, Institut für Physiologie, Universität Zürich, Schweiz

#### Drittmittelförderung Funding

Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG Ka 1269/8-1

#### Ausgewählte Publikationen Selected Publications

Barth S, Nesper J, Hasgall PA, Wirthner R, Nytko KJ, Edlich F, Katschinski DM, Stiehl DP, Wenger RH, Camenisch G (2007) The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. *MOL CELL BIOL*, 27(10): 3758-68.

Köditz J, Nesper J, Wottawa M, Stiehl DP, Camenisch G, Franke C, Myllyharju J, Wenger RH, Katschinski DM (2007) Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor. *BLOOD*, 110(10): 3610-7.

Wirthner R, Balamurugan K, Stiehl DP, Barth S, Spielmann P, Oehme F, Flamme I, Katschinski DM, Wenger RH, Camenisch G (2007) Determination and modulation of prolyl-4-hydroxylase domain oxygen sensor activity. *METHOD ENZYMOL*, 435: 43-60.

Stiehl DP, Wirthner R, Köditz J, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH (2006) Increased prolyl-4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J BIOL CHEM*, 281(33): 23482-91.

## 2.

### Bedeutung der hypoxischen Genexpression für die kardiale Anpassung an mechanische Last

Eine intakte Sauerstoffhomöostase im Herzen ist entscheidend während der Herzentwicklung aber auch für die Adaptation des adulten Myokards an eine eingeschränkte Sauerstoffversorgung. Die Geometrie der Herz-Ventrikel bestimmt unter anderem den myokardialen Sauerstoffverbrauch, der proportional zur Wandspannung ist. Diese ist als Folge einer erhöhten mechanischen Last des Herzens gesteigert. Die Bedeutung von HIF-1 $\alpha$  für die Anpassung an kardiale Ischämie ist beschrieben. Das Wissen über die Bedeutung von HIF-1 $\alpha$  für die Anpassung an mechanische Last dagegen ist limitiert. Daher wurden HIF-1 $\alpha^{+/+}$  und HIF-1 $\alpha^{+/-}$  Mäuse untersucht hinsichtlich der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und der kardialen Funktion nach einer transversalen Aortenkonstriktion. Wir konnten zeigen, dass HIF-1 $\alpha$  an der Erhaltung der kardialen Funktion nach chronischer Druckbelastung beteiligt ist. Dieser Effekt betrifft vor allem die HIF-abhängige Modulation der kardialen Kontraktilität, während die kardiale Hypertrophie durch das partielle Defizit an HIF-1 $\alpha$  nicht beeinflusst wurde. Aufbauend auf diese Untersuchungen haben wir Herz-spezifische PHD (Prolyl-4-Hydroxylase-domain = „zelluläre Sauerstoffsensoren“) knock out und PHD transgene Mäuse hergestellt. Über Inhibition der PHD Aktivität lässt sich die HIF $\alpha$  Stabilität beeinflussen. Daher sollen die neu etablierten Mausmodelle genutzt werden, um zu ermitteln, ob PHDs therapeutisch sinnvolle Zielmoleküle sind zur Beeinflussung der HIF-abhängigen Adaptation des Herzens an mechanische Last.

## 2.

### Impact of hypoxia-inducible gene expression on cardiac adaptation to mechanical load

An intact oxygen homeostasis in the heart is important for cardiac development but also for adaptation of the adult myocard to a decrease in the oxygen supply. The ventricular geometry of the heart is a major determinant for myocardial oxygen consumption. Accordingly, myocardial oxygen consumption is proportional to ventricular wall tension, which is increased as a consequence of pressure overload. Although the role of HIF-1 $\alpha$  for the cellular adaptation to a decrease in the oxygen availability is well described, the influence of HIF-1 $\alpha$  for the development of cardiac hypertrophy that occurs in response to sustained pressure overload is largely unknown. Therefore HIF-1 $\alpha^{+/+}$  and HIF-1 $\alpha^{+/-}$  mice were studied regarding left ventricular hypertrophy and cardiac function after subjected to transverse aortic constriction. Our results point to an involvement of HIF-1 $\alpha$  in the preservation of cardiac function after chronic pressure overload. This effect is mainly mediated via HIF-dependent modulation of cardiac contractility whereas cardiac hypertrophy was unaffected by a partial loss of HIF-1 $\alpha$ . Recently, we established PHD heart-specific knock out and transgenic mice. Inhibition of PHD activity results in modulation of the HIF-pathway. To this end, the newly generated mouse models will be used to analyze, if the PHD enzymes are suitable therapeutic targets to modulate the HIF-dependent cardiac adaptation towards mechanical load.

#### Arbeitsgruppenleiter/innen Group Leaders

Prof. Dr. D.M. Katschinski

Dr. A. Zieseniss

#### Kooperationen Cooperations

Prof. Dr. G. Hasenfuß, Abteilung Kardiologie und Pneumologie, UMG Göttingen

#### Drittmittelförderung Funding

Klinische Forschergruppe 155, Teilprojekt 6

#### Ausgewählte Publikationen Selected Publications

Rohrbach S, Teichert S, Niemann B, Franke C, Katschinski DM (2008) Caloric restriction counteracts age-dependent changes in prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) 3 expression. *BIOGERONTOLOGY*.

Katschinski DM (2006) Is there a molecular connection between hypoxia and aging? *EXP GERONTOLOGY*, 41(5): 482-4.

## 3.

### Einfluss der PHD Sauerstoffsensoren auf Tumorwachstum und Tumorangiogenese

Solide Tumore zeichnen sich durch eine Unterversorgung mit Sauerstoff aus. Im Vergleich zu gesundem Gewebe scheinen sich Tumorzellen gegenüber dieser Sauerstoffmangelsituation (Hypoxie) besser anpassen zu können. Durch die Hypoxie im Tumor werden Gene verstärkt aktiviert, die das weitere Tumorwachstum sowie die Metastasierung des Tumors fördern können durch das Hineinwachsen von neuen Gefäßen. Mittlerweile sind die molekularen Abläufe für diese Vorgänge recht gut untersucht. Im Mittelpunkt des Geschehens steht der Transkriptionsfaktor HIF-1. Das HIF-1 $\alpha$  Protein wird unter

hypoxischen Bedingungen stabilisiert und aktiviert, während die Zufuhr von Sauerstoff diesen Prozess unterbinden kann. Beteiligt an der Sauerstoff-abhängigen HIF-1 $\alpha$  Proteinstabilisierung sind sogenannte PHDs, die als zelluläre Sauerstoffsensoren angesehen werden können. Da es bisher im Tumorgewebe nicht gelungen ist, die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  direkt zu unterbinden, stellen v.a. die PHD2 und 3 Enzyme attraktive Zielmoleküle dar, um die Anpassung des Tumors an Hypoxie zu beeinflussen. Zunächst muss allerdings der Einfluss der PHDs auf das Tumorstadium bzw. auf das Ansprechen von Tumoren auf Chemotherapie besser verstanden werden. Wenn der Transkriptionsfaktor HIF-1 nicht das einzige von den PHD Enzymen abzubauen Molekül wäre, könnte eine Manipulation ihrer Aktivität ansonsten ineffektiv sein oder im schlimmsten Fall sogar ungewollte Folgen haben. Um dies zu untersuchen werden PHD Wild-Typ und PHD knock down Tumore, die in SCID (Severe combined immunodeficiency = schwere angeborene Störung des Immunsystems) Mäuse transplantiert werden, hinsichtlich Tumorstadium und Tumorstadium untersucht.

### 3. Influence of PHD oxygen sensors on tumor growth and tumor angiogenesis

Solid tumors often present hypoxic and anoxic areas. In comparison to benign tissue, tumor cells adapt better to the hypoxic conditions. Hypoxia induces several genes, which promote tumor growth as well as tumor metastasis in part by enhancing angiogenesis. In the meantime the molecular basis for this adaptation is well understood. HIF-1 is the major regulator for hypoxia-inducible gene expression in tumor tissues. HIF $\alpha$  becomes stabilized and activated in hypoxia, whereas normoxia prevents this. The cellular oxygen sensors Prolyl-4-Hydroxylase enzymes (PHD) are involved in the oxygen-dependent stabilization of HIF $\alpha$ . Thus, PHDs are attractive target molecules to modulate the adaptation of tumor tissues towards hypoxia. However, the impact of PHDs on tumor growth as well as tumor therapy needs to be characterized in more detail. This includes characterization of HIF-independent PHD functions, which could result in unexpected side effects. To this end we transplant PHD wild type versus PHD knock down tumor cells in SCID (severe immunodeficiency) mice and follow the tumor formation and tumor angiogenesis.

#### Arbeitsgruppenleiter/innen Group Leaders

Prof. Dr. D.M. Katschinski

#### Kooperationen Cooperations

PD Dr. F. Alves, Abteilung Hämatologie und Onkologie, UMG Göttingen

#### Drittmittelförderung Funding

Deutsche Krebshilfe, Wilhelm Sander Stiftung

#### Ausgewählte Publikationen Selected Publications

Ameri K, Hammond EM, Culmsee C, Raida M, Katschinski DM, Wenger RH, Wagner E, Davis RJ, Hai T, Denko N, Harris AL (2007) Induction of activating transcription factor 3 by anoxia is independent of p53 and the hypoxic HIF signalling pathway. ONCOGENE, 26(2): 284-9.

Seifert A, Katschinski DM, Tonack S, Fischer B, Navarrete Santos A (2007) Significance of prolyl

hydroxylase 2 in the interference of aryl hydrocarbon receptor and hypoxia-inducible factor-1 alpha signaling. CHEM RES TOXICOL, -: -.

## Anhang Appendix

### Medizinische Dissertationen (Dr. med.; Dr. med. dent.)

#### Doctorate Theses (Dr. med.; Dr. med. dent.)

Pelvan A, Dr. med., Transkriptionelle Steuerung des endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthasegens in humanen Endothelzellen. Dissertation Universität Göttingen 2007.

Latrich C, Dr. med., Zyxin ist ein spezifischer Vermittler von Dehnungsreizen in glatten Gefäßmuskulzellen. Dissertation Universität Göttingen 2006.

Laubert T, Dr. med., Zfml als Stabilisator des differenzierten Phänotyps kultivierter Rattenherzmuskulzellen. Dissertation Universität Göttingen 2006.

### Naturwissenschaftliche und andere Dissertationen (Dr. rer. nat. und andere)

#### Doctorate Theses (Dr. rer. nat. and others)

Nogoy NA, Dr. rer. nat., Transcriptional regulation of the human Zfml/Sf1 gene. Dissertation Universität Göttingen 2006.

### Mitgliedschaften und Mitarbeit in wissenschaftlichen Gremien und Kommissionen Memberships and Activities in Scientific Boards and Committees

Deutsche Physiologische Gesellschaft

HypoxiaNet

### Universitäre Gremien University Boards

Prof. Dr. D.M. Katschinski, Forschungskommission

Prof. Dr. D.M. Katschinski, Kommission für Entwicklung und Finanzen

### Fachgutachtertätigkeit Function as Expert Consultant

Deutsche Forschungsgemeinschaft

### Herausgebertätigkeit Editorial Work

Physiologisch

### Internationale wissenschaftliche Kooperationen

#### International Scientific Cooperations

Prof. Dr. R.H. Wenger, Institut für Physiologie, Universität Zürich, Schweiz

### Fakultätsinterne Förderung Internal Faculty Funding

Anschubfinanzierung, Forschungsförderungsprogramm 2006, „Regulation der Hypoxie-induzierbaren Faktors-1a Expression durch Polyadenylierung der 3'UTR“ (Hägele)

Anschubfinanzierung, Forschungsförderungsprogramm 2007 (Köditz)

Anschubfinanzierung, Forschungsförderungsprogramm 2008, „Consequences of elevated cardiac PHD3 levels for heart function“ (Vogel)

### EU-Projekte European Research Projects

Acronym, Förderkennzeichen, Laufzeit in Jahren (z.B. 2002 - 2005)

### Vorhandene forschungsrelevante Großgeräte Specialised Research Equipment

Hypoxie-Inkubatoren und Werkbänke, Hypoxia-workstation