

Aus der Klinik für Strahlentherapie  
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. med. Rita Engenhardt- Cabillic  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum  
Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg und Gießen

**Untersuchungen zu Regulationsmechanismen von  
Hypoxie-induzierbaren-Faktoren und deren Zielgenen  
in den Tumorzelllinien H23, A549 und H69**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Pierre Pasqual Mahlik  
aus Friedberg

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 08.12.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Frank Rose

Korreferent: Prof. Dr. Norbert Weissmann

Meiner Großmutter  
Renate Wagner

# INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel		Seite
1.	<b>VORWORT</b>	1
2.	<b>EINLEITUNG</b>	2
2.1	Der Zusammenhang zwischen Hypoxie und dem Hypoxie-induzierbaren-Faktor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )	2
2.2	Pathogenese und Charakterisierung der Tumorhypoxie	3
2.3	<b>Die Funktion des Hypoxie-induzierbaren-Faktors-1<math>\alpha</math> (HIF-1<math>\alpha</math>)</b>	5
2.3.1	Struktur und Regulation von HIF-1 $\alpha$ in Normoxie und Hypoxie	5
2.3.2	HIF-Isoformen: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ und deren Unterschiede	9
2.3.3	Alternative Regulationsmechanismen von HIF-1 $\alpha$	10
2.3.4	Wichtige Zielgene von HIF-1	13
2.4	<b>Das Zielgen VEGF und dessen Rolle in der Angiogenese</b>	15
2.4.1	Der Mechanismus der Angiogenese	15
2.4.2	Der angiogenetische Faktor VEGF	17
2.5	<b>Die Rolle von Onko- und Tumorsuppressorgenen in der Tumorgenese</b>	19
2.5.1	<b>Das Tumorsuppressorgen PTEN</b> und die Folge dessen Mutation	20
2.5.2	<b>Das HER2(neu)-Onkogen</b> (c-erbB-2)	22
2.6	<b>Der Zusammenhang zwischen Hypoxie und Apoptose</b>	26
2.6.1	Die Morphologie der Apoptose	26

<b>Kapitel</b>		<b>Seite</b>
2.6.2.	Der Zusammenhang zwischen HIF-1, P53 und Apoptose	29
<b>2.7</b>	<b>Fragestellung</b>	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	32
<b>3.1</b>	<b>Pharmaka und Agenzien</b>	32
<b>3.2</b>	<b>Geräte</b>	34
<b>3.3</b>	<b>Herkunft der Antikörper, Plasmide und Primer</b>	35
<b>3.4</b>	<b>Humane pulmonale Tumorzelllinien</b>	36
3.4.1	A549- Zellen (NCSLC)	36
3.4.2	H23- Zellen (NSCLC)	36
3.4.3	H69- Zellen (SCLC)	37
<b>3.5</b>	<b>Zellkultur: „Splitten“ der Zellen</b>	37
<b>3.6</b>	<b>Hypoxie- Versuchsablauf</b>	38
<b>3.7</b>	<b>Der humane VEGF-ELISA</b>	38
<b>3.8</b>	<b>Das Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	39
3.8.1	Extraktion der RNA mit der Phenol- Guanidinium- Thiocynat- Methode (RNAzol)	39
3.8.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	40
3.8.3	c-DNA Synthese (RT- PCR)	40
3.8.4	Polymerase Chain Reaction (PCR)	41
3.8.5	Agarose- Gelelektrophorese	44
3.8.6	TaqMan™- PCR (Quantitative PCR)	45

Kapitel		Seite
<b>3.9</b>	<b>Das Arbeiten mit Proteinen</b>	48
3.9.1	Präparation des nukleären Extraktes	48
3.9.2	Proteinbestimmung nach Bradford	49
3.9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
3.9.4	Western Blot	52
3.9.5	Bestimmung der optischen Dichte	54
<b>3.10</b>	<b>HIF-Reportergen Assay</b>	54
<b>3.11</b>	<b>Transiente Transfektion</b>	55
<b>3.12</b>	<b>Stabile Transfektion</b>	55
<b>3.13</b>	<b>Messung der Apoptose mit dem Annexin Assay</b>	55
<b>3.14</b>	<b>Statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse</b>	57
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	58
<b>4.1</b>	<b>Übersicht</b>	58
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der humanen, pulmonalen Tumorzellen A549; H23 (NSCLC), und H69 (SCLC)</b>	59
4.2.1	Hypoxie induziert die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ in A549, H23, H69 und weiteren Tumorzellen	59
4.2.2	HIF-1 $\alpha$ ; HIF-2 $\alpha$ und HIF-3 $\alpha$ werden auf m-RNA Ebene nicht reguliert	60
4.2.3	Hypoxie induziert die m-RNA Expression des Zielgens VEGF	61
4.2.4	Hypoxie induziert die Proteinexpression von VEGF	62
4.2.5	Hypoxie induziert die m-RNA Expression von PGK, einem Zielgen der Glykolyse	63

Kapitel		Seite
4.2.6	Die m-RNA des Tumorsuppressorgens PTEN ist in H23-, H69- und A549-Zellen nachweisbar, wird aber nicht reguliert	64
4.2.7	Hypoxie hat bei A549- einen pro- und bei H23- und H69-Zellen einen anti-apoptotischen Effekt	65
<b>4.3</b>	<b>Die Überexpression von HIF-1<math>\alpha</math> und PTEN hat keinen Einfluß auf die HRE-Aktivität von HIF-1 in „transient“ transfizierten H23-Zellen</b>	67
<b>4.4</b>	<b>Betrachtung der mit HIF-1<math>\alpha</math> und PTEN „stabil“ transfizierten H23-Zellen</b>	69
4.4.1	Die Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN hat keinen Effekt auf die HRE-Aktivität von HIF-1 in „stabil“ transfizierten H23-Zellen	69
4.4.2	<b>Auswirkungen der Überexpression von HIF-1<math>\alpha</math> und PTEN auf die m-RNA Expression der Transkriptionsfaktoren HIF-1<math>\alpha</math>, HIF2<math>\alpha</math>, HIF3<math>\alpha</math> in „stabil“-transfizierten H23-Zellen</b>	71
4.4.3	Die Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN hat keinen Einfluß auf die m-RNA-Expression bei den Zielgenen VEGF und PGK in „stabil“ transfizierten H23-Zellen	73
4.4.4	Die Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN hat keinen Effekt auf die Protein-Expression des Zielgens VEGF in „stabil“ transfizierten H23-Zellen	75
<b>4.5</b>	<b>Der Effekt von Hypoxie auf das Onkogen HER2(neu) in H23-, H69- und A549- Zellen</b>	76
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	78
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	89
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	91
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	93
	<b>DANKSAGUNG</b>	
	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung		Seite
Abb.1	Die Struktur von HIF-1	6
Abb.2	Modell der HIF-1 $\alpha$ Regulation	8
Abb.3	Struktur der HIF Isoformen	9
Abb.4	Alternative Regulationsmechanismen von HIF-1	12
Abb.5	Wichtige Zielgene von HIF-1	14
Abb.6	Bindung der verschiedenen VEGF Proteine an die drei VEGF-Rezeptoren	18
Abb.7	Struktur von PTEN	21
Abb.8	Schematischer Ablauf der Apoptose	27
Abb.9	Die zwei Hauptwege der Caspasen-Aktivierung	29
Abb. 10	Schritte der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) in der Übersicht	42
Abb.11	Schematischer Ablauf einer RT-PCR-Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green.	47
Abb.12	Schema eines Semidry-Blot-Sandwiches	53
Abb.13	Darstellung der Verteilung lebender, nekrotischer und apoptotischer Zellen	56
Abb.14 a/b	Induktion der Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ in den Tumorzellen A549, CaCo, H23, H69, und CHO.	59
Abb. 15	Darstellung der m-RNA Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ der Tumorzellen H23, H69 und A549 unter 24 h Normoxie bzw. Hypoxie	60
Abb.16	Darstellung der Induzierbarkeit der VEGF m-RNA Expression unter Hypoxie bei H23, H69 und A549	61
Abb.17	Messung der Proteinexpression von VEGF unter Normoxie und Hypoxie bei H23, H69 und A549	62
Abb.18	Der Effekt von Hypoxie auf die Induktion der m-RNA Expression von PGK in H23, H69 und A549- Zellen	63

<b>Abbildung</b>		<b>Seite</b>
Abb. 19	Darstellung der m-RNA Expression von PTEN unter Normoxie und Hypoxie in H23, H69 und A549-Zellen	64
Abb. 20	Darstellung der Apoptoserate unter Normoxie und Hypoxie in A549-, H23- und H69-Zellen	65
Abb. 21	Darstellung der HRE-Aktivität von HIF-1 bei Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN in H23-Zellen durch „ <i>transiente</i> “ <i>Transfektion</i>	68
Abb. 22	Der Effekt der Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN auf die HRE-Aktivität von HIF in „stabil“ transfizierten H23-Zellen	69
Abb. 23	Darstellung der m-RNA Expression von HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ in H23 Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$ und PTEN „stabil“ transfiziert wurden	71
Abb. 24	Darstellung der m-RNA Expression von PTEN in H23 Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$ und PTEN „stabil“ transfiziert wurden	72
Abb. 25	Darstellung der m-RNA Expression von VEGF in H23-Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$ und PTEN „stabil“ transfiziert wurden	73
Abb. 26	Darstellung der m-RNA Expression von PGK in H23-Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$ und PTEN „stabil“ transfiziert wurden	74
Abb. 27	Darstellung der Protein-Expression von VEGF in H23-Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$ und PTEN „stabil“ transfiziert wurden	75
Abb. 28	Darstellung der relativen HER2(neu) m-RNA Induktion in H23-, H69- und A549-Zellen unter Einfluß von Hypoxie	77

## Abkürzungsverzeichnis

A549-Zellen	Adenocarcinomzelllinie
ABL	Acid Base Laboratory
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
AKT	Proteinkinase bzw. Onkogen
Ang1	Angiopoetin
APS	Ammoniumpersulfat
ARD	Acetyltransferase
ARDS	adult respiratory distress syndrome
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear translocator
AS	Aminosäure
AT-1	Angiotensin Rezeptor Typ 1
AT-2	Angiotensin Rezeptor Typ 2
BAD	pro-apoptotisches Protein der Bcl-2 -Familie
Bak	pro-apoptotisches Protein der Bcl-2 -Familie
Bax	pro-apoptotisches Protein der Bcl-2 -Familie
Bcl-2-Proteine	B-cell lymphoma 2- Protein; pro-apoptotisches Protein
bHLH	basic helix-loop-helix
BSA	bovines serum albumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca.	Karzinom
CaCo-Zellen	Adenokarzinom des Colons eines 72-jährigen männlichen Patienten
Caspasen	<b>C</b> ystein-abhängiger <b>A</b> spartat-spaltender <b>P</b> roteasen
CDNA	complementary DNA (desoxyribonucleic acid)
CHO-Zellen	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
C <sub>T</sub>	threshold cycle

DAB	Diaminbenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPO	Erythropoetin
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FAK	fokale Adhäsions Kinase
Fas/APO-1	Fas receptor oder Apo-1 genannt ("Death-Rezeptor der Apoptose)
FB <sub>PA</sub>	pulmonalarterielle Fibroblasten
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth factor
Fe <sup>2+</sup>	Eisen (2x positiv geladen)
FHIT	fragile histidine triad
FIH 1	faktor inhibiting HIF-1
FRAP	FKBP12/ rapamycin-associated protein
G	Gravitation
GLUT	Glukose-Transporter
GF	growth factor
h	Stunden
H	Hypoxie
H23-Zellen	humanes Adenokarzinom der Lunge
H69-Zellen	humanes kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HER	Human-EGF-Rezeptor
HER2(neu)	human epidermal growth factor receptor 2
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie induzierbarer Faktor-1 $\alpha$
HPH	HIF Prolylhydroxylase
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

HRE	hypoxia responsive element
HRP	horseradish peroxidase
IAP	inhibitor of apoptosis protein
Il-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IGF	insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase, eine Einheit in der Molekularbiologie und Genetik
KCL	Kaliumchlorid
kDA	Kilo Dalton
KDR	kinase domaine region
KHK	Koronaren Herzkrankheit
LOH	loss of heterozygosity
M	mol/l, z.B. in M, nM, $\mu$ M, mM
$\mu$ g	Mikrogramm (1/ 1.000.000 Gramm)
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
MAPK	mitogen-aktiviert protein kinase
Mb	Millibar (1000. Teil der nicht SI-konformen Einheit Bar zur Messung von Druck)
Mdm2	murine double minute 2 (Onkogen und negativ Regulator von P53)
MEK-1 oder MAP2K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min.	Minuten
MMAC1	<u>m</u> utated in <u>m</u> ultiple <u>a</u> dvanced <u>c</u> ancers
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (nicht SI-konforme Einheit für Druck)
m-RNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
N	Normoxie
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)

Nm	Newtonmeter
NSCLC	non small cell lung cancer
NiCl <sub>3</sub>	Nickelchlorid
NIP3	proapoptotisches Protein aus der Bcl-2-Familie
NIX	proapoptotisches Protein aus der Bcl-2-Familie
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ODD	oxygen dependant degradation
p53	protein 53, Onkogen
PBGD	Porphobilinogen deaminase= housekeeping gene
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK-1	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1,
PF-4	Platelet Factor-4
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PHD	Prolyl-Hydroxylase
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMG	phoA expression vector; ein promotor-loses gen
pO <sup>2</sup>	Sauerstoffpartialdruck
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PTEN	phosphatase and <u>ten</u> sin homologue deleted on chromosome <u>ten</u> (Tumorsuppressorgen)
PTP	protein tyrosin phosphatase
Puma	<b>P53 Upregulated Modulator of Apoptosis</b>
PVDF	polyvinylidene fluoride
pVHL	von Hippel Lindau Protein
µm	Mykrometer
Raf-1	<b>rapidly growing fibrosarcoma</b> oder <b>rat fibrosarcoma</b> (Proteinkinase)
Ras	Rat sarcoma; Proto-onkogen

RLU	relative lights units
RNA	ribonucleic acid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RTK	receptor tyrosine kinase
RT- PCR	Reverse Transkriptase-PCR
r-Pul-Adv.	Pulmonalarterielle Fibroblasten vom Kaninchen
s	Sekunde
SCLC	small cell lung cancer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SYBR-Green	fluoreszierender Cyanin-Farbstoff zum Nachweis von DNA
TAD-C	<b>Transaktivationsdomäne-C</b>
TAD-N	<b>Transaktivationsdomäne-N</b>
TAE	Tris- Acetat-EDTA
TEP1	<b>t</b> ransforming growth factor-regulated and <b>e</b> pithelial cell-enriched <b>p</b> hosphatase
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor- $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TSG	Tumorsuppressorgen
UV-Strahlung	ultraviolette Strahlung
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

# 1 Vorwort

Unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Frank Rose wurde in Kooperation mit Herrn PD Dr. Jörg Hänze am Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Giessen eine Gruppe aufgebaut, die intensiv Untersuchungen zur Rolle des Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 (HIF-1 $\alpha$ ) als Schlüsselprotein zellulärer Abläufe durchführte.

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde in der Zeit vom April 2000 bis Juni 2002 durchgeführt. Meine Aufgabe war die Charakterisierung des Hypoxieeffektes in humanen, pulmonalen kleinzelligen (H69) und nicht kleinzelligen Tumorzelllinien (A549, H23) in Bezug auf die Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ . Im Mittelpunkt der Arbeit stand HIF-1 $\alpha$ , den wir auf Proteinebene im Western Blot und auf m-RNA-Ebene mit der real-time PCR nachwiesen und dessen Einfluss auf den angiogenetischen Faktor VEGF, den wir mit Hilfe der PCR auf m-RNA-Ebene und mit dem ELISA auf Protein-Ebene untersuchten. Des Weiteren erfolgten die Bestimmung der HRE-Aktivität von HIF-1 im Reporter-gen Assay sowie die Messung der Apoptose im Annexin Assay in diesen Tumorzelllinien.

Zuletzt folgten Untersuchungen zu „alternativen Regulationsmechanismen“ von HIF-1 $\alpha$  am Beispiel von PTEN und HER2(neu) in H23-Zellen. Daten dieser Dissertation wurden 2001 auf dem internationalen ATS (American Thoracic Society) –Kongress in San Francisco, U.S.A vorgestellt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Zusammenhang zwischen Hypoxie und dem Hypoxie-induzierbaren-Faktor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )

Wenn der Sauerstoffbedarf in einem Gewebe durch das Angebot nicht gedeckt werden kann, entsteht ein Mangel, welcher je nach Dauer als akute oder chronische Hypoxie bezeichnet wird. Hypoxische Zustände entstehen sowohl während physiologischer Vorgänge, z.B. einem Aufstieg ins Gebirge und der Embryonalentwicklung, als auch im Verlauf pathologischer Prozesse wie ischämischer Erkrankungen und Tumorwachstum.

Während sich eine Unterversorgung während der Embryonalentwicklung oft letal auswirkt, hat der weiter entwickelte Organismus verschiedene Möglichkeiten, auf systemischer, lokaler und zellulärer Ebene auf Hypoxie zu reagieren [1]. Diese Anpassung erfolgt auf systemischer Ebene durch Aktivierung des Herz-Kreislauf-Systems, der Atmung und Erhöhung der Erythrozytenzahl, auf lokaler durch Gefäßneubildung und auf zellulärer Ebene z.B. durch Aktivierung der Glykolyse und führt außerdem immer zu einer verstärkten Transkription bestimmter Gene. Mit der Identifizierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF-1) wurde ein zentraler Bestandteil der durch Hypoxie vermittelten Signalkaskade identifiziert [2]. Da bereits ein leichtes Absinken des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe zu einer starken Aktivierung von HIF-1 führt, ist dieser Faktor bei der physiologischen Adaptation an Hypoxie von entscheidender Bedeutung [3, 2].

Mittlerweile ist bekannt, dass jede Zelle, und nicht wie einst vermutet nur spezialisierte Zellen, die Fähigkeit besitzt, die umgebende Sauerstoffkonzentration zu messen [4].

Bisher konnten über 100 Proteine/ Zielgene identifiziert werden, die von HIF-1 induziert werden. Hierzu gehören unter anderem VEGF und Erythropoetin [206]. Neben der zentralen Stellung, die HIF-1 bei den physiologischen Reaktionen auf Hypoxie hat, scheint es auch eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen, chronischen Lungenerkrankungen, rheumatischen Erkrankungen und vor allem in der Tumorgenese zu spielen. Des

Weiteren wird ein direkter Zusammenhang zwischen HIF-1 $\alpha$  und Apoptose auf zellulärer Ebene diskutiert.

## 2.2 Pathogenese und Charakterisierung der Tumorphypoxie

Die Entstehung der Tumorphypoxie liegt vor allem in der schnellen Proliferation des Tumorgewebes begründet. Die Tatsache, dass Tumore nur bis zu einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> allein durch Diffusion versorgt werden können, macht deutlich, dass das Wachstum solider Tumoren von einer ausreichenden Angiogenese abhängig ist [89].

Diese neugebildeten TumorgefäÙe weisen jedoch in morphologischer und funktioneller Hinsicht viele Unterschiede zu normalen, hierarchisch strukturierten GefäÙen auf, welche häufig zu heterogen verteilten Durchblutungsraten führen, die praktisch das gesamte Spektrum der Durchblutungswerte normaler Gewebe umfassen. Die Durchblutungsrate innerhalb eines Tumors kann teilweise um den Faktor 60-100 differieren. Bei zahlreichen lokal fortgeschrittenen Tumoren finden sich hypoxische Areale sowie anoxische Bereiche, die keinerlei funktionierende Sauerstoffversorgung mehr besitzen und heterogen über die Tumormasse verteilt sind. Pathogenetisch handelt es sich hierbei um eine „ischämische Hypoxie“. Da eine Vielzahl dieser neu gebildeten TumorgefäÙe ihren Ursprung aus dem venösen GefäÙabschnitt nimmt, trägt auch eine reduzierte O<sub>2</sub>-Sättigung des Blutes zur Entwicklung der Hypoxie bei („hypoxämische Hypoxie“).

Ein weiterer pathogenetischer Mechanismus der Tumorphypoxie ist die Vergrößerung der Diffusionsstrecke zwischen BlutgefäÙen und entfernt gelegenen Tumorzellen („diffusionsbedingte Hypoxie“), deren Grenze zwischen 100-200  $\mu$ m liegt [89].

Weitere Faktoren, die einen O<sub>2</sub>-Mangel im Tumorgewebe auslösen oder verstärken können, sind tumorassoziierte und / oder therapie-induzierte Anämien, die als „anämische Hypoxie“ bezeichnet wurden [138, 139, 140].

Intratumorale Hypoxie ist also die Folge einer unzureichenden Sauerstoffversorgung aufgrund funktioneller und struktureller Störungen der Mikrozirkulation, der Verschlechterung der Diffusionsbedingungen und tumor-bedingter Anämie.

Ein niedriger  $O_2$ -Partialdruck ( $pO_2$ ) ist daher ein typisches Charakteristikum beinahe aller Formen solider Tumore, einschließlich Gehirn, Colon, Brust, Cervix, Prostata, Kopf und Hals [6]. Gut erforscht ist der Zusammenhang, dass fast alle Tumore einen niedrigeren medianen  $pO_2$  haben als das ursprüngliche Gewebe.

Messungen der Oxygenierung mittels Mikroelektroden ergaben eine durchschnittliche Sauerstoffspannung von etwa 40-50 mmHg in „normalem“ Gewebe im Vergleich zu Werten um 5-10 mmHg und weniger, die in Tumorzellen gemessen wurden [156, 157]. Zusätzlich zeigten klinische Studien, dass in einigen Fällen das invasive Wachstum und die metastatische Streuung mit dem Grad der Tumorphoxie assoziiert sind [158, 159].

Konsequenzen, die sich aus der Tumorphoxie ergeben, sind die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, insbesondere HIF-1, dessen Zielgene entscheidend an der Adaptation an Hypoxie beteiligt sind und eine essentielle Rolle in der Tumorprogression spielen [67].

## 2.3 Die Funktion des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF-1 $\alpha$ )

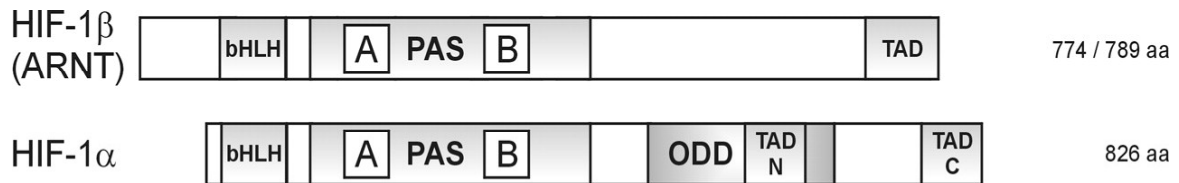
### 2.3.1 Struktur und Regulation von HIF-1 $\alpha$ in Normoxie und Hypoxie

Die Identifizierung von HIF-1 als Hauptregulator der O<sub>2</sub>-abhängigen Genexpression war ein erster großer Schritt in der Analyse des Mechanismus, welcher der Adaptation an hypoxische Bedingungen zu Grunde liegt.

Entdeckt wurde der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF-1) im Rahmen der Analyse von Erythropoetin als Modell für hypoxisch regulierte Genexpression. Deletionsstudien des EPO-Gens identifizierten eine kleine Region, die für die hypoxische Induzierbarkeit verantwortlich war. Wurde diese Sequenz aus einem Transgen herausgeschnitten, konnte keine weitere Induktion unter Hypoxie gezeigt werden. Dies war durch erneutes Hineinklonieren reversibel. Semenza und Kollegen beschrieben 1992/93 die Hypoxie-abhängige Bindung nukleärer Proteine daran und prägten den Begriff Hypoxia-inducible-Factor-1 (HIF-1) [31, 32]. Nachdem die Klonierung von HIF-1 gelungen war, konnte in der Folge die bindende DNA-Region auf die Nukleotide 5'-R-CGTG-3' weiter eingegrenzt werden. Diese Konsensus-Sequenz wird als Hypoxie-responsives Element (HRE) bezeichnet [141].

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer  $\alpha$ - (120 kDa) und  $\beta$ - (91- 94 kDa) Untereinheit besteht [8], wobei die Klonierung der  $\beta$ -Untereinheit durch Wang und Semenza 1995 zeigte, dass diese bereits bekannt war und als aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) bezeichnet wurde. Beide Transkriptionsfaktoren gehören zur Unterfamilie der basic helix-loop-helix (bHLH) Proteine, die eine bestimmte charakteristische Sequenz besitzen, bekannt als PAS-Domäne (PER/ ARNT/ SIM), bestehend aus den Untereinheiten PAS-A und PAS-B. Die bHLH und PAS-Region ist für die heterodimere Formation zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit und für die DNA-Bindung der Zielgene verantwortlich [5, 8]. HIF-1 $\alpha$  besitzt zusätzlich eine C- und eine N-terminale Transaktivations-Domäne (TAD-C und TAD-N), die durch eine Inhibitions-Domäne verbunden sind [29]. Das TAD-N ist Teil der ODD-(oxygen dependant degradation) Domäne, während das TAD-C als Zielregion für die post-translationale Modifikation dient,

z.B. der Phosphorylierung [33] und Acetylierung [34], und zuletzt mit Koaktivatoren, wie p300/CBP interagiert, was zur transkriptionellen Aktivität von HIF führt [21].



### Abb. 1: Die Struktur von HIF-1

Die basic helix-loop-helix (bHLH) und die PER-ARNT-SIM (PAS) Domänen von HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  dienen der Dimerization untereinander sowie der DNA-Bindung. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird über die O<sub>2</sub>-abhängige ODD-Domäne (AS 429-608), welche zwei regulierende Prolin-Enden besitzt, reguliert. HIF-1 $\beta$  besitzt diese Domäne nicht. TAD ist die Transaktivationsdomäne, wobei TAD-N (AS 531 und 575) Teil der ODD-Domäne ist und TAD-C (AS 786-826) der Interaktion mit den Koaktivatoren p300/CBP dient und zur transkriptionellen Aktivität von HIF-1 führt.

HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  werden ubiquitär im Gewebe vieler Spezies (Mensch, Wirbeltier, Insekt u.a.) exprimiert [17, 9, 10]. Die Aktivierung von HIF-1 hängt aber ausschließlich von der durch Hypoxie induzierten Stabilisierung der  $\alpha$ -Untereinheit ab, wohingegen die  $\beta$ -Untereinheit, da sie keine ODD-Domäne besitzt, unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck konstitutiv im Zellkern exprimiert vorliegt [11, 12]. HIF-1 $\beta$ / ARNT hat vielseitige Funktionen, da es auch anderen bHLH-PAS-Proteinen als Dimerisationspartner dient [7].

Überrascht hat die Tatsache, dass das HIF-1 $\alpha$  Protein bei eingetretenem O<sub>2</sub>-Mangel sofort, d.h. innerhalb von Sekunden, den kultivierten Zellen zur Verfügung steht [14]. Bei normalisierter O<sub>2</sub>-Zufuhr verschwindet HIF-1 $\alpha$  jedoch innerhalb von wenigen Minuten (HWZ ~5 min.) wieder [14]. Dies bedeutet, dass das HIF-1 $\alpha$ -Protein konstitutiv synthetisiert und unter Normoxie sofort über eine Ubiquitin-/Proteosom-Degradationskaskade, vermittelt durch ein Genprodukt des Tumorsuppressorgens von Hippel-Lindau (pVHL), wieder abgebaut wird [13, 11, 15].

Die Bindung zwischen HIF-1 und dem pVHL bedarf der post-translationalen Hydroxilierung zweier Prolin-Reste (Pro-402 und Pro-564), die sich innerhalb des

Polypeptid-Segmentes bekannt als ODD- (oxygen dependent degradation) Domäne von HIF-1 $\alpha$  befinden [16, 17]. Diese Hydroxylierungsreaktion wird durch das Enzym Prolylhydroxylase (PHD), auch HIF Prolylhydroxylase (HPH) genannt, unterhalten und benötigt O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup> und 2-Oxoglutarat als Substrat [35]. Diese O<sub>2</sub>-abhängige enzymatische Modifikation der ODD-Domäne von HIF- $\alpha$  macht PHD zu einem wichtigen O<sub>2</sub>-Sensor [9]. Bisher sind drei Isoformen des PHD charakterisiert worden: PHD-1, PHD-2 und PHD-3 [9, 17, 42]. Das PHD-1 ist ausschließlich im Zellkern, PHD-2 nahezu vollständig im Zytoplasma und PHD-3 im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen worden [42]. PHD-2 weist dabei die stärkste Bindungsaktivität auf und nur PHD-2 und 3 zeigten eine Induzierbarkeit der mRNA unter Hypoxie [43].

Die hydroxylierten Prolin-Enden werden dann im hydrophobischen Kern des pVHL, dem von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein, als Teil des E3-Ubiquitin-Ligase-Protein-Komplexes gebunden [18, 19], was zur Destruktion durch Ubiquitinierung und nachfolgender proteosomalen Lyse des HIF-1 $\alpha$  Proteins in Normoxie führt.

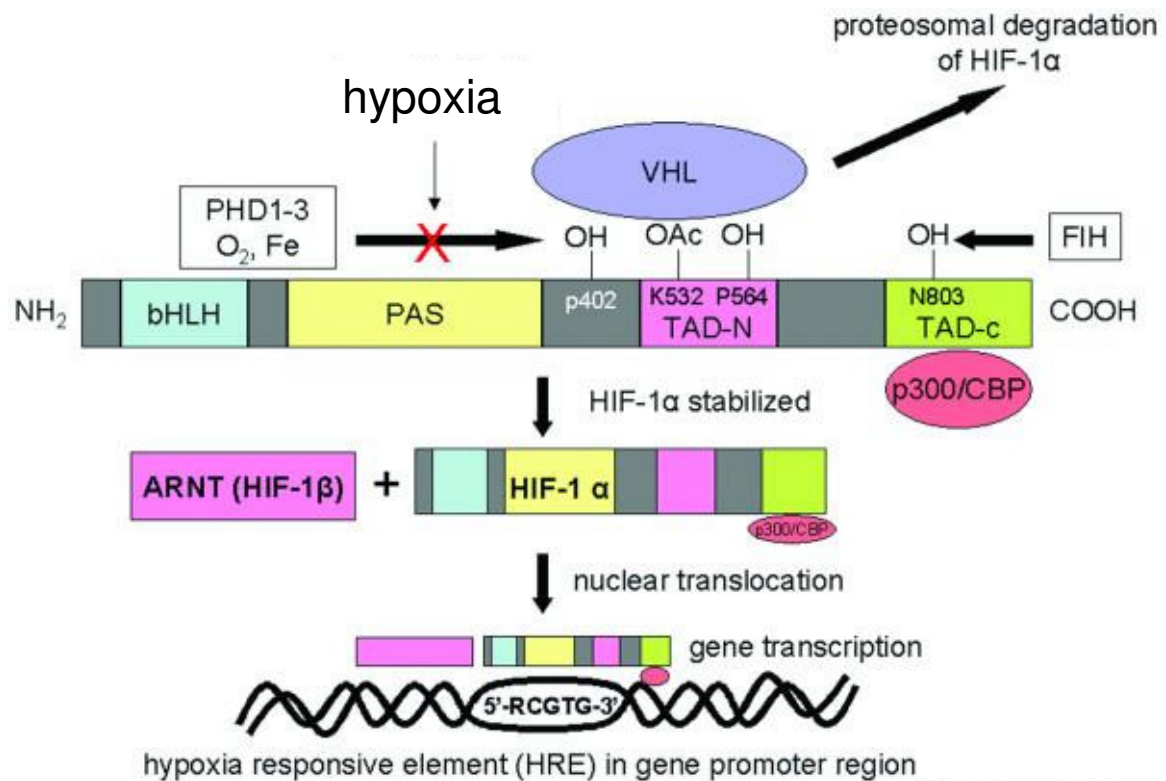
Weitere Untersuchungen zeigten, dass ein Leucin-Ende (Leu 574) für die Rekrutierung des PHD zur Hydroxylierung der Proline eine Rolle zu spielen scheint [36]. Des Weiteren wurde ein Lysin-Ende (Lys 532) innerhalb der ODD-Domäne gefunden, welches durch die Acetyltransferase ARD1 acetyliert wird, was zu einer gesteigerten Interaktion mit dem pVHL führen soll [44].

Hypoxie bewirkt eine intrazelluläre Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit, da die O<sub>2</sub>-abhängige Hydroxylierung durch PHD und somit die pVHL-vermittelte Ubiquitin- / Proteosom-Degradationskaskade blockiert wird. Dies führt zu einer raschen Kumulation von HIF-1 $\alpha$  [11].

Nur unter hypoxischen Bedingungen interagiert die Transaktivations-Domäne, das TAD-C, des stabilisierten HIF-1 $\alpha$  mit dem Ko-Aktivatoren CBP/p300, was zur vollen transkriptionellen Aktivierung führt [20, 21, 22]. Unter normoxischen Bedingungen verhindert der factor-inhibiting HIF-1 (FIH 1) diese Interaktion durch Hydroxylierung eines Asparagin-803 Endes (Asn 803) innerhalb des TAD-C Endes, welches erneut O<sub>2</sub> und Fe<sup>2+</sup> als Substrat benötigt [21, 30].

Danach transloziert die phosphorylierte  $\alpha$ -Untereinheit, unabhängig von der  $\beta$ -Untereinheit, in den Zellkern, dimerisiert mit HIF-1 $\beta$ , und der daraus resultierende HIF-1-Komplex bindet an eine spezifische Basensequenz das hypoxia responsive element (HRE) [15, 23], welches bei vielen hypoxie-adaptiven Genen in der

Promotorregion vorhanden ist. Dies führt zur transkriptionellen Aktivierung zahlreicher Zielgene und damit zu einer Adaptation an die Hypoxie.



### Abb. 2: Modell der HIF-1α Regulation

(Modifiziert nach Hitchon et al. 2004 [201])

In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>), Fe<sup>2+</sup> und 2-OG (oxoglutarat, nicht dargestellt) wird HIF-1α durch Prolylhydroxylasen (PHD) und einer Asparaginyhydroxylase (FIH-1, Asparagin-N) hydroxyliert. Die PHDs hydroxylieren zwei Prolin-Enden (Pro 402 und Pro 564) innerhalb der ODD-Domäne und ermöglichen einer E3-Ubiquitin Ligase (E3-UL), mit dem von Hippel Lindau Protein (pVHL) als Erkennungskomponente, HIF-1α direkt zu binden und es für die Destruktion durch Ubiquitinierung und nachfolgender proteosomaler Lyse zu markieren. FIH-1 unterbricht die Bindung zu dem transkriptionellen Co-Faktor p300/CBP und damit die transkriptionelle Aktivität, indem es ein Asparagin-Ende (Asn 803) in der TAD-C hydroxyliert. In Abwesenheit von O<sub>2</sub> (Hypoxie), Fe<sup>2+</sup> und/oder 2-OG sind die PDHs inaktiv, die HIF-1α Untereinheiten stabil, akkumulieren und translozieren in den Zellkern. HIF-1α dimerisiert schließlich mit HIF-1β, rekrutiert p300/CBP und aktiviert über die Bindung an HRE die Transkription zahlreicher Zielgene.

### 2.3.2 HIF-Isoformen: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ und deren Unterschiede

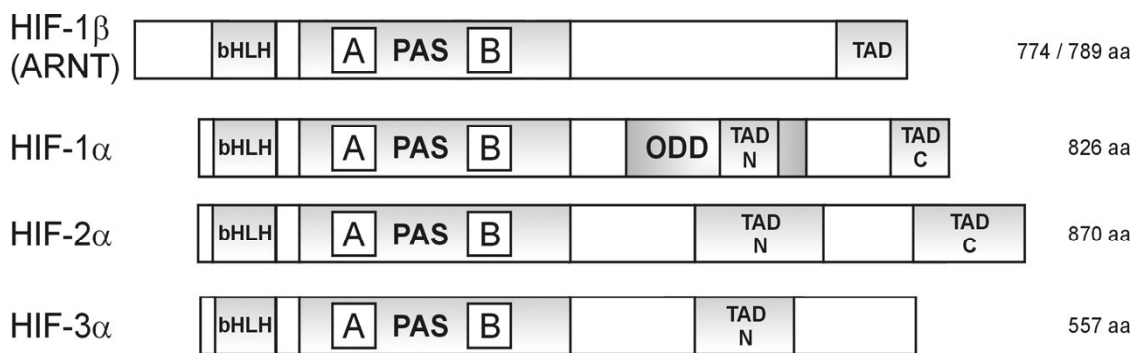
Neben HIF-1 $\alpha$  gibt es zwei weitere Mitglieder der bHLH-PAS-Familie mit ähnlicher Struktur: HIF-2 $\alpha$ , auch bekannt als endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), und HIF-3 $\alpha$  [24, 45]. Die Struktur und Funktion von HIF-1 $\alpha$  sind bisher besser untersucht als die von HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ .

Bisher wird von fünf Isoformen (Splice-Varianten) von HIF-1 $\alpha$  berichtet. HIF-1 $\alpha$ <sup>FL</sup> und HIF-1 $\alpha$ <sup>736</sup> z.B. aktivieren den VEGF-Promotor unter Hypoxie [25]; HIF-1 $\alpha$ <sup>557</sup> (HIF-1 $\alpha$  Z) und HIF-1 $\alpha$ <sup>516</sup> funktionieren als dominant negative Isoformen von HIF-1 $\alpha$  [26, 27]. Der neu entdeckte HIF-1 $\alpha$ <sup>785</sup> besitzt alle Funktions-Domänen und agiert somit als Transkriptionsaktivator [28].

Ähnlich dem HIF-1 $\alpha$  werden auch HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  unter Normoxie über eine Ubiquitin- / Proteosom-Degradations-Kaskade abgebaut [37, 38].

HIF-3 $\alpha$  besitzt im Gegensatz zu den anderen beiden Transkriptionsfaktoren keine Transaktivations-Domäne (TAD-C), weshalb ihm teils eine negativ regulierende Funktion zugesprochen wird [46, 47, 48].

Es ist bekannt, dass HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  nicht auf m-RNA-Ebene reguliert sind, jedoch zeigte eine Arbeitsgruppe eine gesteigerte m-RNA bei HIF-3 $\alpha$  nach zwei Stunden Hypoxie [39]. Wie diese entsteht ist bisher nicht bekannt und bedarf weiterer Analysen.



**Abb 3: Struktur der HIF-Isoformen**  
 HIF-Proteine sind sehr ähnlich strukturiert mit ähnlich angeordneten Domänen, wie basic helix-loop-helix (bHLH), PAS (PER-ARNT-SIM), Transaktivationsdomäne TAD-N, wobei HIF-1 $\beta$  und HIF-3 $\alpha$  keine TAD-C besitzen.

Es ist jedoch festzuhalten, dass der jeweilige Effekt der HIF-Familie in Bezug auf die Genexpression je nach Zelltyp unterschiedlich ist, z.B. sind HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  abundanter in der Niere exprimiert, jedoch ist nur die Überexpression von HIF-2 $\alpha$  für das Wachstum des Nierenzellkarzinoms von Bedeutung [40].

In Mammakarzinom-Zelllinien spielt die HIF-1 $\alpha$ -Isoform in der Induktion von hypoxie-induzierten Genen eine entscheidende Rolle [41].

### 2.3.3 Alternative Regulationsmechanismen von HIF-1 $\alpha$

Es ist mehrfach belegt, dass Wachstumsfaktoren (growth factors/GF) und Zytokine in der Lage sind, HIF-1 $\alpha$  in Normoxie zu stabilisieren und/oder zu aktivieren. Hierzu zählen Wachstumsfaktoren, wie der epidermal growth factor (EGF) [49], der platelet-derived growth factor (PDGF) [50], der transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) [50], IGF1 und IGF2 (insulin-like growth factors) [52] und Insulin [52]. Zu den Zytokinen zählen unter anderem der TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor) [53], Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) [51] sowie NO und ROS, wenn auch kontrovers diskutiert.

Der Regulationsmechanismus ist im Einzelnen nicht komplett verstanden und bedarf weiterer Untersuchungen. Man geht davon aus, dass diese Faktoren sich an ihrem zellgebundenen Rezeptor (receptor tyrosin kinases) binden, was eine Phosphorylationskaskade in Gang setzt. Es existieren hauptsächlich zwei phosphorylierende Kaskaden, die zu einer Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  führen, die MAPK und die PI3-K-Kaskade [49, 54, 55, 56].

#### **MAPK** (Mitogen-activated protein kinase)

Wichtige Signal-Kaskaden, die zur Regulierung von HIF-1 $\alpha$  beitragen, gehören zur MAPK Familie; c-Jun NH<sup>2</sup>-terminal kinase (JNKs) [57], p38 MAPKs [58], und ERKs (extracellular signal-regulated kinases) [59].

ERK1 und 2 (auch p44/42 genannt) sind in der MAPK-Signal-Kaskade am besten untersucht. Deren Aktivierung durch „upstream“ Moleküle, wie Ras/ Raf-1/ MEK-1, führt zur direkten Phosphorylierung von HIF-1 $\alpha$ , was wiederum zur Aktivierung von HIF-1 unter Hypoxie, aber auch unter Normoxie, führt. Es wird vermutet, dass diese Signal-Kaskade die Interaktion zwischen p300 und TAD-C steigert

beeinflusst. [60, 61]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK-Kaskade zur gesteigerten HIF-1 $\alpha$ -Proteinsynthese führt [142].

### **PI3-K (Phosphatidylinositol-3-kinase)**

Die PI3-K-Signalkaskade läuft über die „downstream“ Kinase AKT, deren Zielmoleküle Einfluss auf den Zellzyklus, das Zellwachstum, die Apoptose und die Translation haben [63]. AKT hat somit eine bedeutende Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums. PI3-K phosphoryliert hauptsächlich PI-4, 5- Diphosphat (PIP2) zu PI-3, 4, 5, Triphosphat (PIP3). Dieses Produkt ist ein Second messenger und aktiviert mit Hilfe von PDK-1 AKT durch Phosphorylierung. Die aktivierte AKT phosphoryliert wiederum eine Reihe von Proteinen, unter anderem BAD und Caspase 9, die in der dephosphorylierten Form die Zellapoptose begünstigen. PI3-Kinase und AKT haben daher eine anti-apoptotische Wirkung [63].

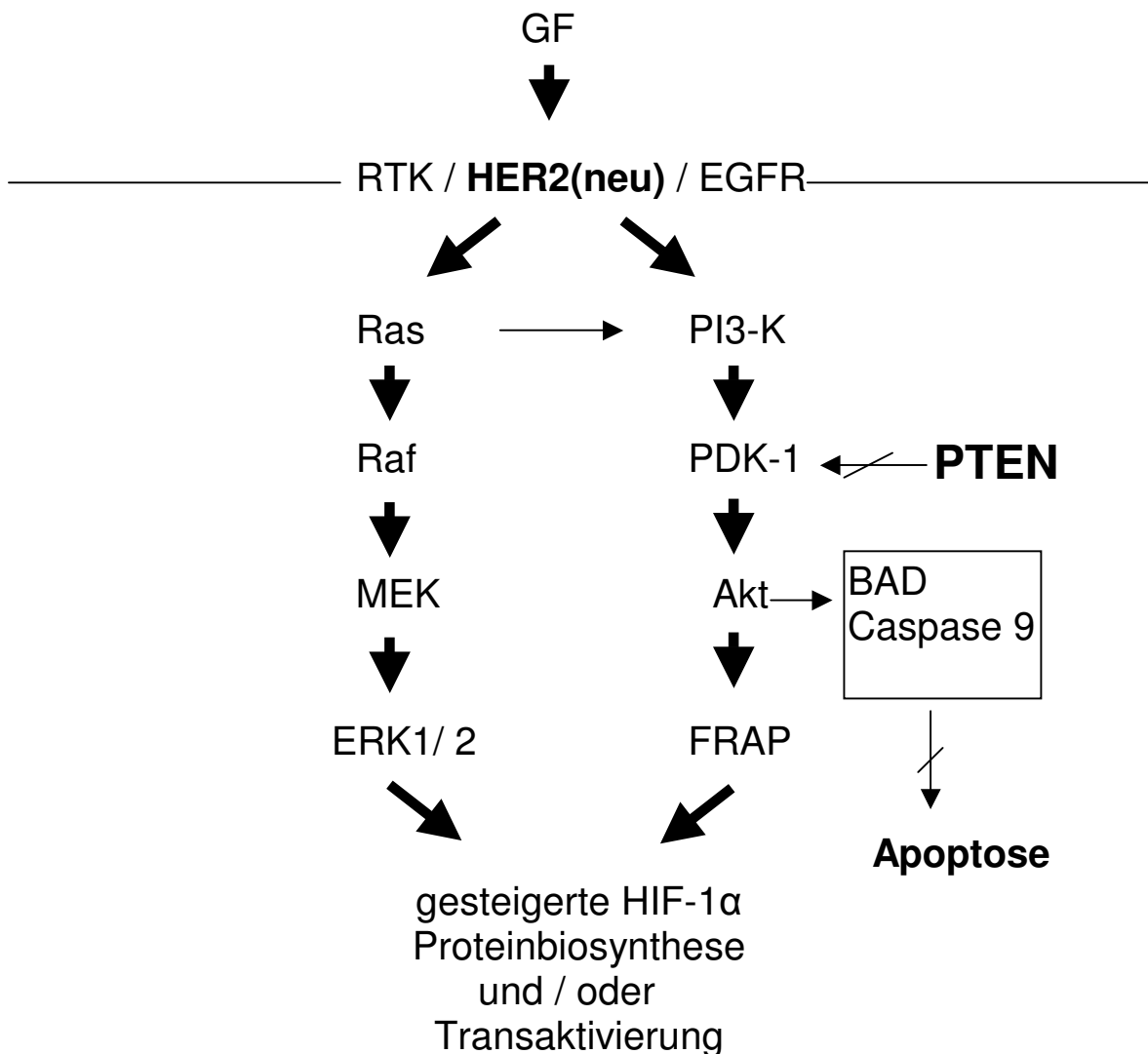
Das Tumorsuppressorgen PTEN wirkt hemmend auf die PI3-Kinase/ AKT Signalkaskade. PTEN dephosphoryliert das 3. Kohlenstoffatom des Inositolrings von PIP3 zu PIP2 (PI-4,5-Diphosphat), was zu niedrigen PIP3-Spiegeln und somit zur indirekten Inaktivierung von AKT führt [115, 116]. Die biologische Konsequenz der AKT- Inhibition ist die Stimulation der Apoptose, (durch Aufhebung der hemmenden Wirkung AKTs auf Casp9, BAD und weitere) und Inhibition des Zellzyklus (G1 Arrest) und der Zell-proliferation [117, 118]. Der Funktionsverlust PTENs führt zur verstärkten Aktivierung von AKT, durch gesteigertes PIP3, zum Schutz vor apoptotischen Stimuli, zur gesteigerten Zellproliferation, welche perfekte Voraussetzungen für die Tumorgenese / Tumorprogression bietet.

Ein weiteres Ziel von AKT ist mTOR (mammalian target of rapamycin), auch FRAP (FKBP12/rapamycin-associated protein) genannt. Das phosphorylierte FRAP aktiviert wiederum die p70 ribosomal protein S6 kinase (p70 s6k), welche die Translation der HIF-1 $\alpha$  mRNA steigert [62, 64, 65, 66].

### **Ras**

Das aktivierte H-Ras oder K-Ras (Onkogene) können sowohl den MAPK als auch den PI3-K-Signalweg aktivieren [142].

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von H-Ras zu einer gesteigerten HIF-1 $\alpha$  Protein-Expression und Aktivierung der Zielgene unabhängig von O<sup>2</sup> durch PI3-K führt [160].



#### Abb. 4: Alternative Regulationsmechanismen von HIF-1

Wachstumsfaktoren (GF), aber auch Zytokine (nicht dargestellt) binden an ihrem zellgebundenen Rezeptor (receptor tyrosin kinases (RTK)/ HER2(neu)/ EGFR), was eine Phosphorylationskaskade in Gang setzt. Ras (ein Onkogen) kann sowohl den MAPK als auch den PI3-K-Signalweg aktivieren [142].

*Die MAPK-Signalkaskade:* Die Aktivierung von Ras führt zur Phosphorylierung „downstream“ von Raf-1/ MEK-1 und ERK 1/ 2, was zur direkten Phosphorylierung von HIF-1 $\alpha$ , durch Steigerung der Interaktion zwischen p300 und TAD-C [60, 61], und wiederum zur Aktivierung von HIF-1 unter Hypoxie und unter Normoxie führt.

*Die PI3-K-Kaskade* phosphoryliert hauptsächlich PI-4, 5- Diphosphat zu PI-3, 4, 5, Triphosphat (nicht dargestellt). Dieses Produkt ist ein Second messenger und aktiviert mit Hilfe von PDK-1 AKT durch Phosphorylierung. Die aktivierte AKT phosphoryliert wiederum eine Reihe von Proteinen, unter anderem BAD und Caspase 9, die in der dephosphorylierten Form die Zellapoptose begünstigen. PI3-Kinase und AKT haben daher eine anti-apoptotische Wirkung [63]. Das phosphorylierte FRAP aktiviert wiederum die p70 ribosomal protein S6 kinase (nicht dargestellt), welche die Translation der HIF-1 $\alpha$  mRNA steigert [62, 64, 65, 66]. PTEN (ein TSG) hemmt über PDK-1 die Aktivierung von Akt (pro-apoptotisch).

### 2.3.4 Wichtige Zielgene von HIF-1

HIF-1 $\alpha$  agiert als ein wichtiger Regulator der sauerstoff-regulierten Genexpression.

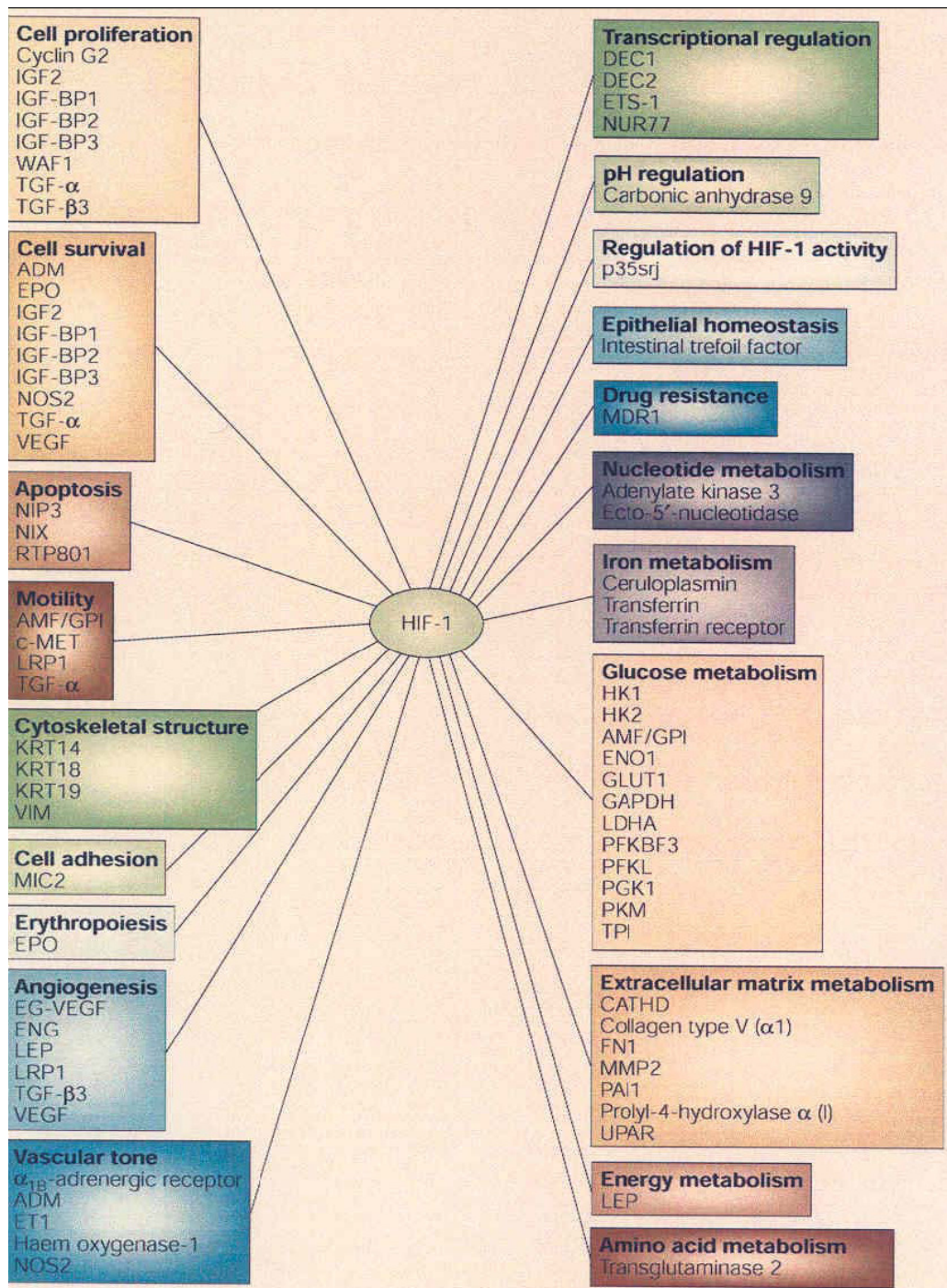
Mehr als 100 Zielgene wurden bisher identifiziert und die Anzahl scheint weiter zu steigen [206]. Die Bindung von HIF-1 an das HRE führt zur gezielten Überexpression von verschiedenen Genen und deren Proteinen, welche die Antwort des Organismus auf systemischer, lokaler und zellulärer Ebene, insbesondere unter hypoxischen Bedingungen, regulieren. Diese Zielgene spielen insbesondere in der Tumorgenese und Tumorprogression eine entscheidende Rolle, da deren Proteine einen Einfluss auf die Erythropoese, Angiogenese, das Zellwachstum und Proliferation, Glucose-, Eisen- und Energie-Metabolismus und die Apoptose haben [67].

Eines dieser Zielgene ist Erythropoetin (Epo), ein Protein, welches die Erythropoese induziert, wodurch das systemische O<sub>2</sub>-Angebot gesteigert und eine verbesserte O<sub>2</sub>-Ausschöpfung der Zelle/ Tumorzelle bewirkt wird. Epo wird unter Hypoxie ebenfalls hoch reguliert [67].

VEGF (vascular endothelial cell growth factor) ist das meist untersuchteste Zielgen und der potenteste Promoter der Angiogenese, eines Prozesses, der entscheidend bei der Tumorentwicklung ist [68]. (Näheres unter 2.4)

Unter Hypoxie erfolgt eine O<sub>2</sub>-unabhängige Energiegewinnung (ATP-Bildung) durch die anaerobe Glykolyse, welche eine wichtige Adaptation der Zelle bzw. Tumorzelle an Hypoxie darstellt [69]. Nahezu alle beteiligten Enzyme der Glykolyse, als auch die Glukose-Transporter GLUT1 und GLUT2, welche die zelluläre Glukose-Aufnahme steuern, werden durch HIF-1 reguliert [70, 71]. Die Carbonanhydrase, die das anfallende Laktat und die dadurch entstehende Azidose ausgleicht, ist ebenfalls ein weiteres Zielgen [72].

Es ist belegt worden, dass hypoxie-induzierte Wachstumsfaktoren die Zellproliferation und das Überleben der Zellen fördern. Hierzu gehören insbesondere der insulin-like-growth factor-2 (IGF-2) und der transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), die ebenfalls durch HIF reguliert werden [52]. Die Bindung dieser Faktoren an deren jeweilige spezifische Rezeptoren, den IGF2-Rezeptor und den epidermalen growth factor receptor (EGFR) führt einerseits zur HIF-1 $\alpha$  Expression und andererseits zur Zellproliferation [67].



**Abb. 5: Wichtige Zielgene von HIF-1 (Semenza et al. 2003) [67]**

Diese Zielgene spielen insbesondere in der Tumorgenese und Tumorprogression eine entscheidende Rolle, da deren Proteine einen Einfluss auf die Erythropoese, Angiogenese, das Zellwachstum und Proliferation, Glucose-, Eisen- und Energie-Metabolismus und die Apoptose haben.

## 2.4 Das Zielgen VEGF und dessen Rolle in der Angiogenese

### 2.4.1 Der Mechanismus der Angiogenese

Der Begriff der Angiogenese wurde 1935 von Hertig geprägt, hierbei handelt es sich um eine Blutgefäßneubildung aus bereits bestehenden Kapillaren und Venolen und ist von der Vaskulogenese der ursprünglich ersten Ausbildung von Blutgefäßen, durch endotheliale Vorläuferzellen, während der Embryonalentwicklung abzugrenzen [85, 93]. Ein verstärktes wissenschaftliches Interesse wurde durch die Erkenntnis geweckt, dass die Angiogenese bei der Tumorprogression von entscheidender Bedeutung ist. Mit einem tieferen Verständnis der Regulation der Angiogenese verbinden sich demnach neue therapeutische Ansätze in der Tumorthherapie.

Die Angiogenese wird unterschieden in eine sogenannte „sprouting“ und eine „non-sprouting“ Angiogenese [85, 86]. Letztere beschreibt die Durchteilung bereits bestehender Gefäße durch Fortsätze der extrazellulären Matrix.

Man geht davon aus, dass der Mechanismus der „sprouting“ Angiogenese in vier Schritten abläuft [87]. Nach Aktivierung der Endothelzellen durch einen angiogenen Stimulus (z.B. VEGF) beginnt als Erstes die proteolytische Degeneration der Basalmembran (durch Expression der interstitiellen Kollagenase (Matrix-Metallo-proteinase-1)). Danach folgt die Migration der an der degradierten Matrix angrenzenden Endothelzellen in das anliegende Gewebe. Anschließend kommt es zur Proliferation dieser Zellen entlang eines sich ausbildenden Fortsatzes. Zuletzt entsteht durch eine Art Schlauchformierung die Ausbildung des Gefäßlumens. Der letzte Schritt ist abgeschlossen, wenn die neuen Kapillaren von Perizyten und Muskelzellen umgeben sind. Hierbei scheint VEGF überwiegend an der Endothelproliferation (aber auch beim Remodeling) und Angiopoetin (Ang1) am Remodeling des primären vaskulären Netzwerkes zum adulten Gefäß und dessen „survivals“ beteiligt zu sein [94, 95]. PDGF-BB (platelet-derived growth factor) scheint auch an der Rekrutierung von Perizyten einen Einfluß zu haben [96].

Bei der Einteilung in venöses- und arterielles Gefäßsystem scheinen Ephrine eine Rolle zu spielen [94, 95, 97].

Die Angiogenese ist ein physiologischer Prozess, mit dem im Anschluss an die Vaskulogenese die Blutgefäße in der embryonalen Phase vermehrt werden. Postnatal spielt sie z.B. in der Wundheilung, dem Aufbau der Uterusschleimhaut etc. eine wichtige Rolle. Es gibt aber auch pathologische Prozesse der Angiogenese, wie z.B. bei der Koronaren Herzkrankheit (KHK), Neugeborenen- und diabetischen Retinopathie, rheumatoiden Arthritis und insbesondere bei der Tumorprogression [92].

Wie bereits unter 2.2 beschrieben, können Tumore nur bis zu einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> allein durch Diffusion versorgt werden, da sie nur bis zu einer Gefäß-Entfernung von 100-200 µm möglich ist (prävasculäre Phase). Darüber hinaus ist das weitere Tumorwachstum von einer ausreichenden Angiogenese abhängig (vasculäre Phase des Tumorwachstums) [89].

Der Mechanismus, der zur Tumorangiogenese führt, ist sehr komplex. Die Erkenntnis, dass ein avaskulärer Tumor zum Übergang in die vasculäre Phase, von der Angiogenese, somit von angiogenetischen Faktoren wie VEGF abhängig ist, führte zu der Hypothese des „angiogenetic switch“ [88, 89, 90, 91]. Diese Hypothese postuliert, dass es sowohl hemmende als auch aktivierende Faktoren der Angiogenese gibt. Der Beginn der Vasoproliferation ist somit assoziiert mit einer Inbalance zwischen Stimulatoren und Inhibitoren, zugunsten der pro-angiogenetischen Faktoren.

Es gibt verschiedene Signale, die den „angiogenetic switch“ triggern: metabolischer Stress bei niedrigem pO<sub>2</sub> und pH oder Hypoglykämie, mechanischer Stress bedingt durch Proliferation der Zellen, immunologische und inflammatorische Prozesse und genetische Mutation (Aktivierung von Onkogenen, Deletion von Tumorsuppressorgenen, die die Produktion von pro-angiogenetischen Faktoren kontrollieren) [89].

Zu den anti-angiogenetischen Faktoren zählen unter anderem Angiostatin, Endostatin, Vaskulostatin, Platelet Factor-4 (PF-4) und Interferon-alpha [89, 97].

Bisher sind mehrere pro-angiogenetische Faktoren bekannt, der Fibroblast Growth factor (aFGF und bFGF), transforming growth factor (TGF)-beta1, HGF, Integrin, Cadherin und Angiopoetin (Ang 1) [89]. Der wichtigste Faktor ist aber VEGF, deren m-RNA durch HIF-1 unter Hypoxie hochreguliert wird.

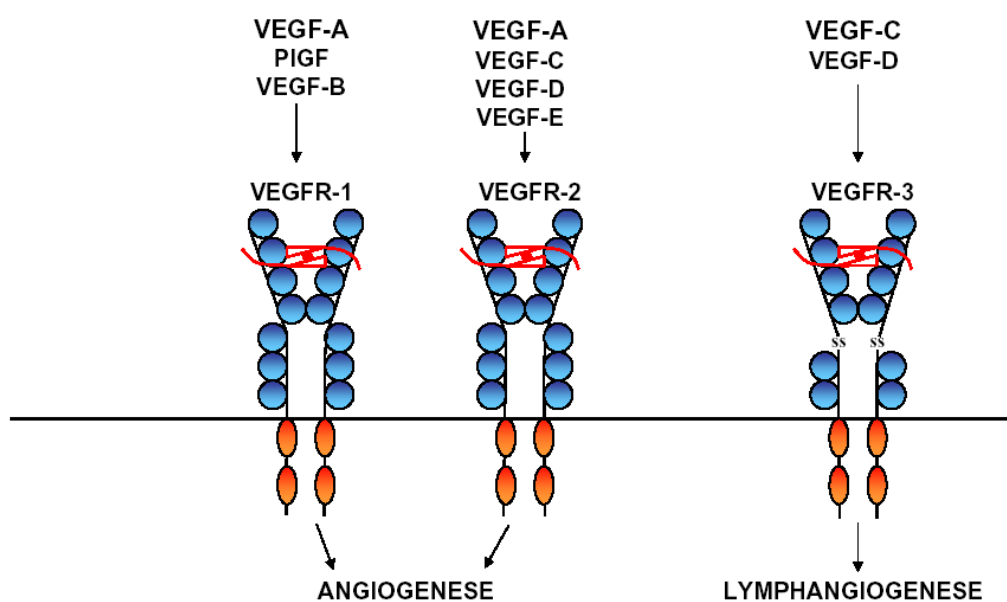
## 2.4.2 Der angiogenetische Faktor VEGF

VEGF ist das wichtigste Zielgen von HIF-1; es rekrutiert Endothelzellen in hypoxisches oder avaskuläre Gewebe und stimuliert deren Proliferation, es steigert die Permeabilität insbesondere tumor-assoziiertes Gefäße, es ist das potenteste endothelspezifische Mitogen, der wichtigste Promoter der Angiogenese und spielt eine Rolle in der Regulation der Vaskulogenese [73, 74, 75].

Das VEGF-A-Gen (14 kb) besteht aus acht Exons, die durch sieben Introns voneinander getrennt sind, Exon 1 enthält dabei hauptsächlich das Sekretionssignal des primären Translationsproduktes [76]. Es ist auf Chromosom 6 lokalisiert [77]. Das VEGF-A kommt beim Menschen in fünf verschiedenen Isoformen vor, durch alternatives Spleißen. Aufgrund des Unterschieds in der Anzahl der Aminosäuren werden sie als VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> bzw. VEGF-A<sub>206</sub> bezeichnet [76]. Die am stärksten exprimierten und bisher am besten untersuchten Formen sind VEGF-A<sub>165</sub> und -A<sub>121</sub>. Die dominierende und mitogenste Form ist VEGF-A<sub>165</sub>. Ihr Molekulargewicht als Dimer beträgt 46 kDa [78]. Sie ist, wie die anderen Formen auch, ein Dimer aus zwei Untereinheiten mit identischem NH<sub>2</sub>-Terminus. Diese werden durch Disulfidbrücken miteinander verbunden [79]. VEGF-A ist ein endothel-spezifischer Wachstumsfaktor und ein Schlüsselfaktor der Angiogenese [80]. In Deletionsstudien konnte die essentielle Rolle von VEGF-A bei der embryonalen Entwicklung des Gefäßsystems gezeigt werden. Bereits die Inaktivierung eines VEGF-A-Allels führte zur Letalität des Embryos durch gestörte Endothelentwicklung [81]. Die 165, 189 und 206 AS-Isoformen haben eine Heparin-bindende Domäne, die eine Verankerung in der extrazellulären Matrix ermöglichen und somit eine höhere biologische Aktivität verleihen. VEGF-A bindet an zwei der VEGF-Rezeptoren zum einen an den hochaffinen Rezeptortyrosinkinase Flt-1 (fms-like-tyrosin-kinase), auch VEGFR-1 genannt, zum anderen an KDR (kinase domain region), auch VEGFR-2 genannt [82, 83]. Die VEGF-Rezeptoren besitzen multiple extrazelluläre IgG-ähnliche Domänen, eine Transmembranregion und eine intrazellulär gelegene Tyrosinkinase-Sequenz, die durch eine Kinase-insert-region unterbrochen ist. Hierbei hat VEGFR-1 eine höhere Affinität zu VEGF als VEGF-2 [83]. Beide Rezeptoren sind essentiell für die embryonale Gefäßentwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass

die Deletion von KDR oder Flt-1 zum Tod der Embryonen führt, wobei KDR (VEGFR-2) offensichtlich für die Differenzierung und Proliferation von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen während der Vaskulogenese notwendig ist und Flt-1 (VEGFR-1) an der Ausbildung der Gefäßstrukturen der Vaskulogenese beteiligt scheint [84].

Der Vollständigkeit halber seien hier noch die weiteren Mitglieder der VEGF-Familie erwähnt: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PlGF. Diese wurden auf Grund struktureller Ähnlichkeit zusammengefasst, da sie gemeinsam ein hoch konserviertes Motiv aus acht Cysteinresten besitzen [83]. Es ist noch wenig über deren Funktion und Regulation bekannt und Gegenstand weiterer Forschung. Neben den beiden genannten Rezeptoren gibt es noch zwei weitere Rezeptoren für VEGF: VEGFR-3 und Neuropilin-1. VEGFR-3 bindet VEGF-C und D, aber nicht VEGF-A. Neuropilin-1 war bereits als ein neuronales Zelloberflächenprotein bekannt, das für die Bildung des Neuralrohrs wichtig ist. Es konnte gezeigt werden, dass es VEGF-A<sub>165</sub> und PlGF-2 bindet, aber nicht VEGF-A<sub>121</sub> [83].



**Abb.6: Bindung der verschiedenen VEGF-Proteine an die drei VEGF-Rezeptoren (nach Veikkola et al. 2000)**

Die VEGF-Rezeptoren besitzen multiple extrazelluläre IgG-ähnliche Domänen (blau), eine Transmembranregion und eine intrazellulär gelegene Tyrosinkinase-Sequenz (orange), die durch eine Kinase-insert-region unterbrochen ist. Die Disulfidbrücken sind rot dargestellt.

Untersuchungen zeigten, dass Hypoxie die VEGF m-RNA-Expression induziert, zum einen durch erhöhte Transkription, zum anderen durch verminderte m-RNA-Degradation [104, 105, 106]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass VEGFR-1 ebenfalls hypoxie-induzierbar ist, so dass das Endothel maximal rezeptiv auf die VEGF-Stimulation unter Hypoxie reagieren kann [83].

## **2.5 Die Rolle von Onko- und Tumorsuppressorgenen in der Tumorgenese**

Die Karzinogenese ist ein multi-komplexer Prozess, der das Wachstumsmuster normaler Zellen von kontrolliertem zu unkontrolliertem Wachstum umwandelt. Koordinierte Regulation der Zellproliferation und der Apoptose ist eine entscheidende Bedingung zum Erhalt der Homöostase. Der Verlust dieser Regulationsfähigkeit kann begründet sein in genetischen Veränderungen wachstumsfördernder (Proto-Onkogene) oder wachstumshemmender (Tumorsuppressorgene) Gene. Diese Veränderungen, die entweder vererbt sind oder durch verschiedene Mutagene, wie z.B. UV-Strahlung, radioaktive Strahlung, Chemikalien oder durch andere exogene, aber auch endogene Faktoren ausgelöst werden, kann man in zwei Gruppen unterteilen: „dominante Veränderungen“, wobei die Zielgene als Proto-Onkogene bezeichnet werden, die sich in einem Funktionszugewinn manifestieren („gain of function“) und „rezessive Mutationen“, deren Zielgene Tumorsuppressorgene genannt werden, die normalerweise zu dessen vollständigem Funktionsverlust führen („loss of function“). Die Aktivierung der „harmlosen“ Proto-Onkogene zu Onkogenen kann durch chromosomale Translokation, Punktmutation, Phosphorylierung und Amplifikation erfolgen. Eine Vielzahl der von Onkogenen exprimierten Proteine sind Proteinkinasen, GTP-bindende oder spaltende G-Proteine, welche meist als regulatorische Schalter für intrazelluläre Prozesse dienen. Daneben können Onkogene auch Proteine kodieren, die als Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren auftreten [107].

Die Überexpression und Aktivierung von Onkogenen und der Verlust von Tumorsuppressorgenen führen in ihrer Summe zumeist zu einer unkontrollierten Zellproliferation, dem Entrinnen vor apoptotischen Signalen in der Zelle, was zur Expansion der transformierten Zellpopulation führt.

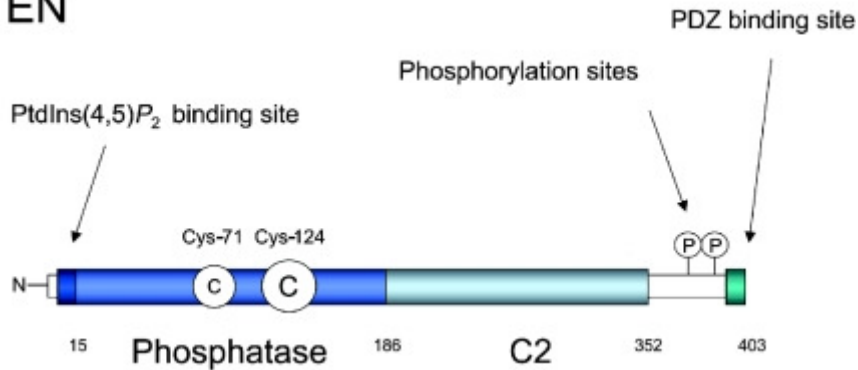
### 2.5.1 Das Tumorsuppressorgen PTEN und die Folge dessen Mutation

Die Bezeichnung PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten ) oder auch MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers), als Tumorsuppressorgen kam zu Stande, da dessen Verlust in verschiedenen Tumoren nachweisbar war. Es wurde 1997 von zwei wissenschaftlichen Arbeitsgruppen gleichzeitig als Tumorsuppressorgen identifiziert und ist auf dem langen Arm des Chromosom 10 (10q23) lokalisiert [108, 109]. Die weitere Bezeichnung TEP1 (TGF-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) einer weiteren Gruppe beschreibt den Einfluß auf Wachstumsfaktoren [110].

Durchgesetzt hat sich die Bezeichnung PTEN, da biochemische Untersuchungen gezeigt haben, dass es sich um eine Lipidphosphatase handelt.

Das PTEN-Protein besteht aus 403 AS, hat ein Molekulargewicht von 47 kDa und ist ein Mitglied der großen PTP- (protein tyrosin phosphatase) Familie [108, 110]. Strukturell besteht das PTEN-Protein aus zwei Domänen: einer N-Terminalen Phosphatase-Domäne und einer C-Terminalen C2-Domäne, an der ein etwa 50 AS langer C-Terminaler Rest hängt, der eine PDZ-Bindungsstelle enthält. Die C2-Domäne bindet in vitro Phospholipide und scheint eine Bindung von PTEN an der Zellmembran zu ermöglichen. Die N-terminale Domäne enthält eine Phosphatase-Domäne mit einer entsprechenden Bindungsstelle. Diese Phosphatase-Domäne ist verantwortlich für die Bindung mit Phosphatidyl- Inositol-3, 4, 5-Triphosphat (Ptd- Ins-3, 4, 5- P<sup>3</sup>) [112, 113]. Weiteres strukturelles Verständnis und deren Funktionen sind derzeit Gegenstand der Forschung.

## PTEN



**Abb.7: Struktur von PTEN (nach Leslie, N. R. 2004)**

Dargestellt ist die Struktur von PTEN mit seiner Phosphatase-Domäne mit einer entsprechenden N-terminalen Bindungsstelle (blau), die für die Bindung mit Phosphatidyl- Inositol- 3, 4, 5-Triphosphat verantwortlich ist; die C2-Domäne mit entsprechender Bindungsstelle (grün) bindet in vitro Phospholipide and scheint eine Bindung von PTEN an der Zellmembran zu ermöglichen.

Die Rolle von PTEN als Tumorsuppressorgen (TSG) ist mehrfach belegt. Mehrere Studien bei Patienten mit Prostatakarzinom zeigten einen Funktionsverlust von PTEN, durch LOH (loss of heterozygosity) an Stelle 10q23 in ca. 50% und homozygote Deletion in ca. 10% der Fälle [125, 126]. Von weiteren PTEN Mutationen wurde berichtet: bei Brustkrebs 5%, Schilddrüsen ca. 7%, Kopf-Hals Tumoren 12%, Lymphomen 5% und Lungenkrebs 9% [127- 133]. Einen weiteren Nachweis und die Bestätigung der Rolle als TSG konnten Marsh et al. 1998 bei Patienten mit autosomal dominant vererbaren Tumor-Syndromen liefern. Hier hatten ca. 80% der Patienten mit Cowden Syndrom (multiples Hamartom-Syndrom) und ca. 60 % der Patienten mit Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom, ein autosomal-dominant vererbtes Syndrom mit Megaenzephalie, Pigmentanomalien, multiplen Hamartomen und psycho-motorischen Entwicklungsretardierung als Krankheitsbild, alles Keimbahnmutationen des Gens PTEN [134].

Biochemische Wirkung auf zellulärer Ebene:

Untersuchungen zeigten, dass PTEN hemmend auf die PI3-Kinase/ AKT Signalkaskade wirkt. Wichtigstes biologisch relevantes Substrat ist dabei PIP3 (PtdIns-3, 4, 5- P3), ein intrazelluläres Phosphoinositid (PtdIn), welches nach Phosphorylierung an D3 durch PI3-Kinase als second messenger für proliferationsstimulierende Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren) fungiert [114].

PTEN dephosphoryliert das 3. Kohlenstoffatom des Inositolrings von PIP3 zu PIP2 (PtdIns-4,5-P2), was zu niedrigen PIP3-Spiegeln und somit zur indirekten Inaktivierung von AKT führt [115, 116]. Die biologische Konsequenz der AKT-Inhibition ist die Stimulation der Apoptose, (durch Aufhebung der hemmenden Wirkung AKTs auf Casp9, BAD und weitere) und Inhibition des Zellzyklus (G1 Arrest) und der Zell-proliferation [117, 118]. Der Funktionsverlust PTENs führt zur verstärkten Aktivierung von AKT, durch gesteigertes PIP3, zum Schutz vor apoptotischen Stimuli, zur gesteigerten Zellproliferation, welche perfekte Voraussetzungen für die Tumorgenese / Tumorprogression bietet.

Weitere Wirkungsmechanismen werden PTEN zugesprochen. Vermutlich inaktiviert PTEN den PDGF-Rezeptor „upstream“ der PI3-K / AKT Signalkaskade [119].

Des Weiteren scheint PTEN (wenn auch kontrovers diskutiert) die fokale Adhäsions-Kinase (FAK) zu dephosphorylieren und somit an der Regulation zellulärer Adhäsion, Zellmigration sowie Zellinvasion, und zwar durch Kontrolle der Aktivität von FAK, beteiligt zu sein [120, 121]. PTEN könnte auch an der Angiogenese beteiligt sein. Studien von Zundel et al. 2000 und anderen zeigten eine Supprimierung von HIF-1 $\alpha$  und VEGF in Tumorzellen, über die oben genannte Signalkaskade [122, 123, 124].

### 2.5.2 Das HER2(neu)-Onkogen (c-erbB-2)

HER2(neu) ist ein Proto-Onkogen für das verschiedene Synonyme existieren: HER2, neu, c-erbB-2. Es wurde erstmals 1981 durch Shih et al. in chemisch induzierten Neuroglioblastoma der Ratte identifiziert. Man schrieb diesem Gen eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese zu [167, 168]. Fukushima et al. konnten dann 1986 dieses Proto-Onkogen auf dem langen Arm des Chromosoms 17 in der Bande 12 (17q12) lokalisieren [169]. Das Proto-Onkogen codiert für ein 185 kDa großes, 1255 Aminosäuren umfassendes Glykoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität, genannt p185, das in der Zellmembran lokalisiert ist [170]. Die extrazellulär gelegene Domäne übernimmt Ligandenbindungsfunktionen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Rezeptors zu dem als ersten beschriebenen humanen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR = **E**pidermal **G**rowth

Faktor Rezeptor = HER1) werden diese Rezeptoren zu einer HER-Familie (**H**uman-**E**GF-**R**ezeptor) zusammengefasst, zu der beispielsweise auch HER3 und HER4 gehören [171]. Als Ligand kommt Heregulin in Frage. Dieses 45 kDa große Protein ist seit 1992 bekannt und besitzt die Fähigkeit, die Tyrosinkinase von HER2(neu) zu stimulieren [172]. Nicht alle Funktionen und Interaktionen des HER2(neu) Rezeptors sind vollständig entschlüsselt. Der Rezeptor schwimmt in der Zellmembran frei beweglich. Alleine ist er jedoch nicht in der Lage, den Liganden Heregulin zu binden. So bildet er funktionelle Dimere mit anderen Rezeptoren der gleichen Rezeptor-Familie, vor allem mit HER3, aber auch mit HER4 oder EGFR (=HER1). Diese Heterodimere zeigen eine hohe Affinität zu Liganden. Nach Bindung des Liganden an das Rezeptorheterodimer kommt es zur Phosphorylierung der HER2(neu)-Tyrosinkinase und zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade [172].

Unter anderem erfolgt Ras-Protein vermittelt die Aktivierung der MAP-Kinase. Weiterhin spielen die Phosphokinase C und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) eine Rolle in der Signaltransduktion von HER2(neu) [67]. Die Arbeit von Semenza et al. belegte 2001 einen neuen „alternativen Regulationsmechanismus“ durch HER2(neu), der zu einer Aktivierung der PI3-Kinase-Kaskade, die downstream über AKT und FRAP zu einer Steigerung von HIF-1 $\alpha$  und der VEGF Expression führt. Diese Arbeit konnte zeigen, dass HER2(neu) eine Steigerung der HIF-1 $\alpha$  Proteinsynthese und keine Hemmung der Degradation über die Ubiquitin-Proteosom-Kaskade bewirkt [164]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte 2005 ebenfalls eine Induktion der Proteinexpression und eine Steigerung der Translationsaktivität HIFs via der PI3-Kinase und AKT in HER2(neu) in überexprimierten Zellen unabhängig von Hypoxie zeigen, was zu einer O<sub>2</sub>-unabhängigen Angiogenese führte [163].

Eine endgültige Klärung der (patho)physiologischen Relevanz dieses Moleküls für den Krankheitsverlauf und dessen Einfluss auf HER2(neu) gerichtete therapeutische Konzepte steht noch aus. In den letzten Jahren konnten zahlreiche Arbeitsgruppen zeigen, dass zumindest für das Mammakarzinom eine HER2-Überexpression bzw. eine HER2-Amplifikation mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [164, 173, 174, 172]. Seither gilt der Nachweis einer HER2(neu)-Genamplifikation beim primären Mammakarzinom neben Lokalisation, Tumor-

stadium, Hormonrezeptor-Status und Lymphknotenstatus als zusätzlicher unabhängiger Prognosefaktor.

Von großem klinisch-onkologischen Interesse im Zusammenhang mit HER2-überexprimierenden Mammakarzinomen ist seit den letzten Jahren die Entwicklung des humanisierten monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin® =rhUMA4D5, Hoffmann LaRoche, 79630 Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gegen die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors geworden [175]. Da auch eine Resistenz von HER2-überexprimierenden Tumoren gegenüber bestimmten Chemotherapeutika diskutiert wird [164, 173], bietet sich dadurch die Möglichkeit, die HER2 überexprimierenden Zellen mit diesen Antikörpern ganz spezifisch einer Chemotherapie zugänglich zu machen. Beim Mammakarzinom konnte bereits in randomisierten klinischen Studien eine signifikant verlängerte Überlebenszeit für Patientinnen mit HER2-überexprimierenden Tumoren, unter Anwendung von Chemotherapie + Trastuzumab, nachgewiesen werden [176, 177].

Voraussetzung für den Einsatz von Herceptin® ist der Nachweis einer hohen Rezeptorexpression durch Immunhistochemie bzw. der Nachweis einer Genamplifikation durch FISH. In der Standarddiagnostik wird derzeit eine Kombination beider Methoden angewandt.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist nach dem Stand der Forschung eine HER2-Genamplifikation und Proteinüberexpression bei ca. 10-15% aller Magenkarzinome [178], ca. 10- 15% aller kolorektalen Karzinome [193] bis zu 60% aller Pankreas- [194] und bei ca. 28 % auch bei Harnblasen- [179], Speicheldrüsen-[180], bis zu 34 % bei Lungenkarzinomen [195] zu erwarten, wobei diverse Autoren zu den unterschiedlichen Tumoren verschiedene Amplifikationsfrequenzen beschreiben.

Die Datenlage zur anti-HER2 gerichteten Therapie solcher Tumoren ist bis heute jedoch noch weitgehend unklar und bedarf weiterer Studien.

Es befinden sich jedoch folgende biologisch zielgerichtete Substanzen („targeted“ Therapien) in klinischen Studien: ein monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Ligandenbindungs-Domäne des EGFR namens Cetuximab, Erbitux® in Kombination mit Chemotherapeutika in EGFR-positiver kolorektalen Karzinomen [199] und NSCLC (FLEX-Studie) und ein EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor namens Erlotinib (Tarceva®), bei Patienten mit metastasierten oder lokal

fortgeschrittenem NCSLC, nach mindestens einer vorausgegangenen Chemotherapie [198].

## 2.6 Der Zusammenhang zwischen Hypoxie und Apoptose

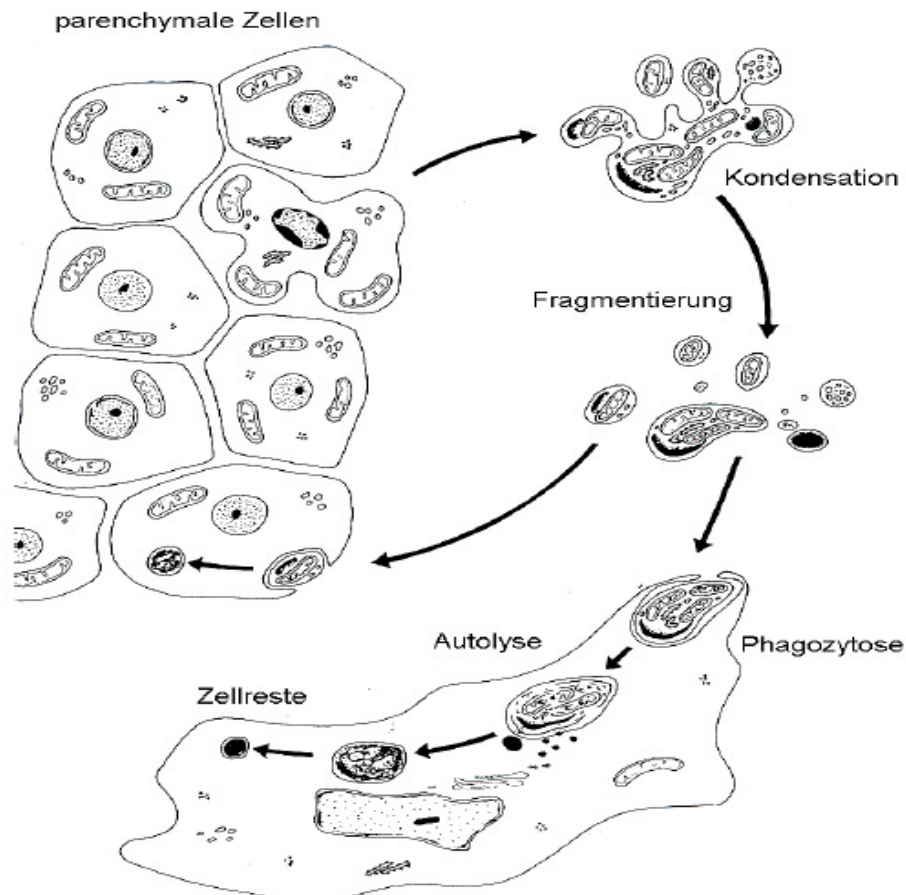
### 2.6.1 Die Morphologie der Apoptose

Das Zusammenspiel von Zelltod (Apoptose), Zellteilung (Mitose) und Differenzierung ist entscheidend für das Gleichgewicht in Geweben multizellulärer Organismen. Störungen bei diesen Prozessen haben schwerwiegende Konsequenzen: Sie bedingen Fehlbildungen von Organen, die Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten oder Krebs. Um diese Störungen zu vermeiden und das Auftreten von Fehlbildungen und Erkrankungen zu minimieren, sind alle beteiligten Prozesse genau kontrolliert, auch die Apoptose. Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten des Zelltods: die Nekrose und die Apoptose.

Nekrose wird durch mechanische Verletzung, Ischämie, Aktivierung des Komplementsystems oder bestimmte Chemikalien ausgelöst und führt zur Schädigung der Plasmamembran und Ausschüttung des Zellinhalts in die Umgebung der Zelle. Dies führt häufig zu inflammatorischen Reaktionen und damit zur Schädigung des umgebenden Gewebes. Im Gegensatz zur Nekrose, die passiv verläuft, ist die Apoptose eine aktive, transkriptionell kontrollierte, zelluläre Antwort auf moderate Zellschädigung oder verschiedene Zytokine und wird daher auch als „programmierter“, physiologischer oder regulierter Zelltod bezeichnet. Kerr, Wyllie und Curry beschrieben 1972 [135] als erste die Vorgänge während der Apoptose. Sie beobachteten, wie Zellen, die physiologischen oder pathologischen Stimuli ausgesetzt waren, morphologische Veränderungen durchliefen. Im Verlauf der Apoptose schnüren sich exozytotisch Membranvesikel, die Zytosol und teilweise Kernfragmente enthalten, von der Plasmamembran, die stets intakt bleibt, ab. Diese sogenannten apoptotischen Körperchen (apoptotic bodies) stellen ein wichtiges morphologisches Charakteristikum der Apoptose dar und führen zum Abbau der apoptotischen Zelle durch Nachbarzellen bzw. Makrophagen, ohne dass zytosolische Bestandteile in den extrazellulären Raum austreten können.

Aufgrund elektronenmikroskopischer Studien kann der Vorgang in zwei Stufen eingeteilt werden: 1. Bildung der apoptotischen Körperchen und 2. deren Phagozytose oder Degradierung durch andere Zellen. Als weitere

charakteristische Veränderungen sind die Abläufe im Kern zu nennen: das Chromatin im Zellkern, sonst locker verteilt, beginnt sich zu verdichten (zu kondensieren), bis der Kern schließlich fragmentiert (Karyorhexis).

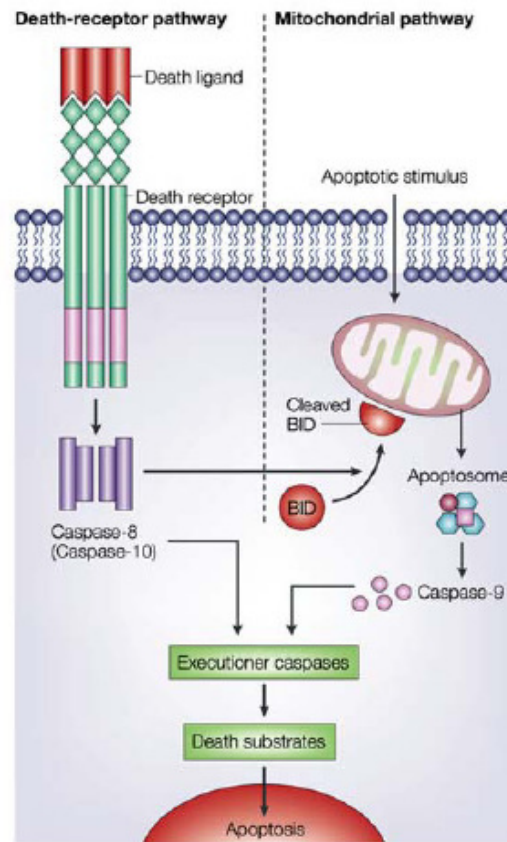


**Abb. 8: Schematischer Ablauf der Apoptose** (modifiziert nach Kerr et al. [135]). Eine parenchymale Zelle separiert sich aus dem Zellverband, die Zelle schrumpft, das Cytoplasma und das Chromatin kondensieren, der Zellkern fragmentiert (Karyorhexis) und Vesikel werden von der Cytoplasmamembran abgeschnürt. Diese sogenannten „apoptotischen Körperchen“ werden von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert und durch lysosomale Enzyme verdaut.

Eine zentrale Rolle bei Induktion und Ablauf der Apoptose spielt die Aktivierung spezifischer **Cystein-abhängiger Aspartat-spaltender Proteasen, Caspasen** genannt, die ihre Substrate – Proteine, die in gesunden Zellen der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dienen, z.B. Strukturproteine, Reparaturenzyme oder Inhibitoren pro-apoptotischer Faktoren – an Aspartatresten spalten. Derzeit sind zwölf humane Caspasen bekannt. In nicht-apoptotischen Zellen liegen sie in ihrer inaktiven Proenzym-Form vor; nach proteolytischer

Spaltung in die aktive Form, ein aktives Dimer, wird eine proteolytische Kaskade (die Caspasenkaskade) in Gang gesetzt, die den apoptotischen Zelltod herbeiführt.

Im Wesentlichen geht man heute von zwei Signalwegen aus, die zur Auslösung von Apoptose führen: Zum einen existiert der über „Death Receptors“ wie TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) Fas/APO-1 (CD95) und Caspase-8 als Schlüsselprotein vermittelte „extrinsische“ Apoptose-Induktionsweg, zum anderen die mitochondriale, „intrinsische“ Aktivierung, hauptsächlich initiiert durch den Transkriptionsfaktor p53 und katalysiert durch proapoptotische Bcl-2-Proteine, wie Bax, Bak NIP3, Bad Puma und andere. Hierbei wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt und interagiert mit Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) und Caspase-9. Beide führen letztendlich zur Aktivierung von Caspasen-Kaskaden. An der komplexen Regulation der Apoptose sind etliche weitere Proteine, wie die Mitglieder der Bcl-2-Superfamilie, teils pro- und/ oder anti-apoptotisch, p53, Mitglieder der IAP- (inhibitor of apoptosis) -Proteine, als Caspaseinhibitoren und einige Proteinkinasen, z.B PI3-K durch Akt und Bad, beteiligt, die über ihre pro- bzw. anti-apoptotische Potenz in die Entscheidung über Leben oder Tod der Zelle eingreifen [136].



**Abb. 9: Die zwei Hauptwege der Caspasen-Aktivierung** (Igney et al. [137])  
 Dargestellt ist der über „Death Receptors“ wie TNF (Tumor-Nekrose-Faktor), Fas/APO-1 (CD95) und Caspase-8 als Schlüsselprotein vermittelte „extrinsische“ Apoptose-Induktionsweg und die mitochondriale, „intrinsische“ Aktivierung der Apoptose.

### 2.6.2. Der Zusammenhang zwischen Hypoxie, HIF-1, P53 und Apoptose

Wenn Zellen chronischer oder extremer Hypoxie ausgesetzt sind und die protektiven Mechanismen von HIF-1 $\alpha$  nicht ausreichen, resultiert daraus Apoptose. Überraschenderweise scheint HIF-1 $\alpha$  beim Einleiten des Apoptosevorganges involviert zu sein. Es konnten bisher zwei Abläufe gezeigt werden, die ein Induzieren der Apoptose durch HIF-1 $\alpha$  nachweisen:

1. Hypoxie verursacht einen Anstieg von Nip3 und NIX, proapoptotische Proteine aus der Bcl-2-Familie. In HIF-1 $\alpha$ -defizienten Zellen kann Nip3 nicht nachgewiesen

werden. Außerdem konnten Bruck et al. eine aktive HRE-Region im Nip3-Promotor zeigen, die in Hypoxie die Bildung von HIF-1 $\alpha$  erzeugt [152, 153].

2. In Hypoxie wird das Tumorsuppressorprotein p53 stabilisiert [154]. p53 ist ein hochaktiver Transkriptionsfaktor, dessen Zielgene Apoptose, durch Transaktivierung pro-apoptotischer Proteine des mitochondrialen Signalapparates z.B. die Bcl-2-Proteine Bax, Bak, Puma, Noxa oder Caspase-9 und Apaf-1 oder Proliferationsstop, durch Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren wie p21, verursachen [142]. Abgebaut wird p53 über proteosomale Degradation durch Mdm2. Dieser Vorgang ist durch Phosphorylierung, z.B. durch ATM, gestört, so dass p53 akkumulieren kann. Des Weiteren wird durch Phosphorylierung die Aktivität von p53 gesteigert [181]. Dieser Vorgang verläuft parallel zur Anhäufung von HIF-1 $\alpha$  in Hypoxie. Es gibt sogar Hinweise, dass p53 von der Anwesenheit von HIF-1 $\alpha$  abhängig ist, da es in HIF-1 $\alpha$ -defizienten Zellen nicht vorkommt [155]. Die Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  und p53 resultiert nicht nur in einer Stabilisierung von p53, sondern hemmt auch die HIF-1 $\alpha$  abhängigen Transkriptionsvorgänge. Dieser Effekt kann durch die Konkurrenz um den Co-Aktivator p300 erklärt werden [182]. Damit stellt sich die Frage, ob HIF-1 $\alpha$  ein pro-apoptotischer Faktor ist. Hierauf ist zu antworten, dass Hypoxie und noch stärker HIF-1 $\alpha$  nach dem heutigen Kenntnisstand pro- und anti-apoptotische Effekte ausüben. Die Apoptose fördernde Aktivität kommt vor allem bei prolongierter Hypoxiedauer oder starker Hypoxie / Anoxie vor und resultiert aus der Verbindung von HIF-1 $\alpha$  mit p53. Dem gegenüber steht ein anti-apoptotischer Effekt bei weniger ausgeprägter Hypoxie. Hierbei dimerisiert HIF-1 $\alpha$  mit HIF-1 $\beta$  und es kommt zur Protein-Transkription. Im Jahre 2001 konnten Suzuki et al. zeigen, dass der Phosphorylierungsgrad für den pro- oder anti-apoptotischen Einfluss verantwortlich ist. Phosphoryliertes HIF-1 $\alpha$  dimerisiert mit HIF-1 $\beta$ , während dephosphoryliertes HIF-1 $\alpha$  eine Verbindung mit p53 eingeht.

## 2.7 Fragestellung

Gegenstand der experimentellen Untersuchungen dieser Dissertationsschrift war die Charakterisierung des Hypoxieeffektes in humanen, pulmonalen Tumorzelllinien A549 und H23 (NSCLC) sowie H69 (SCLC) in Bezug auf die Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ , deren Zielgene VEGF (Schlüsselrolle in der Angiogenese) und PGK (zentrales Enzym der Glykolyse).

Grundlage dieser Charakterisierung sind zentrale Aspekte der Tumorgenese:

- Inhibition der Apoptose
- dysregulierte Proliferation durch Überexpression von Onkogenen, z.B. HER2(neu) oder Ausfall von Tumorsuppressorgenen (z.B. PTEN)
- Tumorphoxie führt zur Steigerung hypoxieabhängiger Transkriptionsfaktoren z.B. HIF-1 $\alpha$

Folgende Fragestellungen waren vergleichend in diesen Tumorzelllinien von besonderem Interesse:

- Welchen Einfluss hat Hypoxie auf die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ ?
- Werden die Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$  und -3 $\alpha$  auf m-RNA-Ebene reguliert?
- Welchen Effekt hat Hypoxie / HIF auf die Zielgene VEGK und PGK?
- Ist die m-RNA des Tumorsuppressorgens PTEN nachweisbar und wird diese unter Hypoxie reguliert?
- Ist die m-RNA des Onkogens HER2(neu) nachweisbar und wird diese unter Hypoxie reguliert?
- Ist Hypoxie / HIF-1 $\alpha$  ein pro- oder anti-apoptotischer Faktor?
- Welche Auswirkungen hat eine HIF-1 $\alpha$ - und PTEN-Überexpression auf die HRE-Aktivität HIFs und die Zielgene VEGF und PGK in transfizierten H23-Zellen?
- Sind PTEN und / oder HER2(neu) „alternative Regulatoren“ von HIF-1 $\alpha$ ?

### 3. MATERIAL UND METHODIK

#### 3.1 Pharmaka und Agenzien

- 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (TRIS), Calbiochem (San Diego, USA)
- A 1153 (Aprotinin), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- A 3678 (Ammoniumpersulfat), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Acrylamid, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Bromphenol blau, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- C 4176 (Casting Clamps), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- C 4301 (Comb), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Cell-Scraper, Falcon, BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
- Chloroform, Fluka AG (Taufkirchen, Deutschland)
- D 0632 (Dithiothreitol), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- D 5637 (3,3´Diaminbenzidine), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- DMEM: Dulbecco`s modified Eagle Medium, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Dodecylsulfat (SDS), Serva (Heidelberg, Deutschland)
- Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega (Mannheim, Deutschland)
- FCS, fetales Kälberserum, PAA (Linz, Österreich)
- Filter (0,2 µm), Nalgene (Hereford,U.K.)
- Filterpapier, Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
- Full Range Rainbow, Amersham Life Science (Braunschweig, Deutschland)
- Fungizone (Amph. B), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Gasmischung 10 % CO<sub>2</sub>, 1 % O<sub>2</sub>, Messer-Griesheim (Siegen, Deutschland)
- G 2650 (Gasket), Sigma, (Taufkirchen, Deutschland)
- G 3150 (Glas-Platten), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- G 7403 (Glycin), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- G1351 (Zweitantikörper, Anti-Chicken IgY Meerrettich-Peroxidase konjugiert), Promega (Mannheim, Deutschland)

- Gentamicin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Glove Bag, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Heparin, Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Whylen, Deutschland)
- HEPES, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- HIF-1 $\alpha$  Antikörper wurde von PD Dr. Max Gassmann aus dem Institut für Physiologie der Universität Zürich zur Verfügung gestellt
- Homogenisator Teflon-Pistill, Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland)
- Homogenisator, konisch 2 ml Glasgefäß, Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland)
- Hypoxiekammer, Keutz (Reiskirchen, Deutschland)
- Ketanest, Park-Davis GmbH (Wedel, Deutschland)
- Kollagenase, Worthington Biochemical Corporation (Freehold, New Jersey, USA)
- L 2023 (Leupeptin), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- L-Glutamin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Lipofektamin™ 2000, GIBCO BRL, Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Medium DMEM (mit Glucose und Pyruvat), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol, Fluka (Taufkirchen, Deutschland)
- NaCl, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Natrium(meta)vanadat (NaVO<sub>3</sub>), Fluka (Taufkirchen, Deutschland)
- Nicht essentielle Aminosäuren, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Nickel III Chlorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- P 0914 (Protein Standard), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- P 5318 (Pepstatin), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- P 7626 (PMSF, Phenylmethylsulfonyl Fluoride), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- P 7949 (Tween 20), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- P 8139 (Phorbol 12-Myristate 13acetate), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- PBS: Phosphate buffered saline, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Penicillin G, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

- Propanol, Fluka (Taufkirchen, Deutschland)
- Protein Assay, BioRad (München, Deutschland)
- PVDF BioTrace, Pall Gelman Laboratory (Darmstadt, Deutschland)
- RNAzol™, Peqlab (Erlangen, Deutschland)
- Rompun 2%, Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
- S 3900 (Spacers), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Natrium Pyruvat, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Streptomycin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Superfect, Qiagen (Hilden, Deutschland)
- T 9281 (Temed), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- VEGF-ELISA, human, Quantikine®, R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
- Vitamine, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Wasserstoffperoxyd (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
- Xylocain 2%, Astra GmbH (Wedel, Deutschland)
- Zellkulturplatten 150er (145 cm<sup>2</sup>), Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturplatten 94er, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturplatten 24-Loch-Platten, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturplatten 96-Loch-Platten, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturplatten 6-Loch-Platten, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen, Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

### 3.2 Geräte

- ABL 330 (Acid Base Laboratory), Radiometer (Willich, Deutschland)
- ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 SDS von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
- Bioluminometer, Berthold (Bad Wildbad, Deutschland)
- CO<sub>2</sub> –Inkubator IR 1500, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Durchflusszytometer (FACS) Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- E 5889 (Elektrophorese), Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
- Elisa-Reader, Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)

- Eppendorfkühlzentrifuge, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- Homogenisator-Antrieb, Schütt Labortechnik (Göttingen, Deutschland)
- Milli Q Wasseraufbereitungsanlage, Millipore (Eschborn, Deutschland)
- Power-Supply, Amersham Pharmacia Biotech (Wien, Österreich)
- Semi-dry Blotkammer, Keutz (Reiskirchen, Deutschland)
- Sterilbank (laminar air flow) Typ BSB, 4a, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- UV- Transluminator, Biometra Biodoc II (Göttingen, Deutschland)
- Waage, Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
- Wasserbad, Memmert GmbH (Schwalbach, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanta, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

### **3.3 Herkunft der Antikörper, Plasmide und Primer**

Der HIF-1 $\alpha$  Antikörper wurde freundlicherweise von PD Dr. Max Gassmann aus dem Institut für Physiologie der Universität Zürich zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide für die Transfektion der jeweiligen Zelllinien sowie die Primer für das Arbeiten mit der PCR und der Taqman-PCR wurden freundlicherweise von PD Dr. Jörg Hänze aus dem molekulargenetischen Labor des Instituts für Biochemie der Universität Giessen zur Verfügung gestellt.

## **3.4 Humane pulmonale Tumorzelllinien**

### **3.4.1 A549 (NSCLC)**

Die Zelllinie A549 ist aus einem humanen Lungenkarzinom (Adenokarzinom / NSCLC) isoliert und wurde von der Firma ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) bezogen. A549 bildet einen adherenten Monolayer.

Die gelieferten Ampullen wurden zügig bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes Medium (37 °C) 90 % DMEM + 10 % FCS vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen in Medium (DMEM, 10 % FCS, 1 % Glutamin 1 % Pen/ Strep, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 1 % Vitamine) aufgenommen und auf 90er Schalen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Raumluft kultiviert. Sobald sich nach ca. 24 Stunden ein Monolayer ausgebildet hatte, wurden die Zellen wie unter 3.5 beschrieben gesplittet oder für den Versuch eingesetzt.

### **3.4.2 H23-Zellen (NSCLC)**

Die Zelllinie H23 ist ebenfalls aus einem humanen Adenokarzinom der Lunge (NSCLC) isoliert und von der Firma ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) bezogen.

Die gelieferten Ampullen wurden zügig bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes Medium (37 °C) 90 % RPMI 1640 + 10 % FCS vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen in Medium aufgenommen (RPMI 1640 mit HEPES, 1 % Glutamin 1 % Pen/ Strep, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 1 % Vitamine) und auf 90er Schalen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Raumluft kultiviert. Sobald sich nach ca. 24 Stunden ein Monolayer ausgebildet hatte, wurden die Zellen wie unter 3.5 beschrieben gesplittet oder für den Versuch eingesetzt.

### 3.4.3 H69-Zellen (SCLC)

Die H69-Zellen sind aus einem humanen kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) isoliert und ebenfalls von der Firma ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) bezogen. H69 wachsen in Suspension.

Die gelieferten Ampullen wurden wie in 3.5.2 beschrieben aufgetaut und in demselben Medium kultiviert. Sobald sich nach 24 bis 48 Stunden in Suspension wachsende Konglomerate gebildet hatten, wurden die Zellen wie unter 3.5 beschrieben gesplittet oder für den Versuch eingesetzt.

## 3.5 Zellkultur: „Splitten“ der Zellen

Nachdem sich ein konfluenten Zellrasen der H23 oder A549-Zellen gebildet hatte, konnten die Zellen subkultiviert werden. Zuerst wurde von den 90er Petrischalen das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium (37 °C) gewaschen. Anschließend wurde mit 10 ml temperierter Trypsin-EDTA-Lösung (37 °C) inkubiert, bis sich der Zellmonolayer nach ca. einer Minute vom Boden der Schale gelöst hatte. Dieser Vorgang wurde im Mikroskop kontrolliert und ggf. durch leichtes Klopfen unterstützt. Die Trypsin-EDTA-Lösung mit den Zellen wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, das bereits 1 ml FCS zum Inaktivieren des Trypsins enthielt. Durch mehrmaliges Spülen der Schale wurden auch die restlichen Zellen abgelöst. Das Zentrifugenröhrchen wurde bei 250 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet resuspendiert und die Zellen auf drei 90er Petrischalen gleichmäßig verteilt. Wenn sich nach weiteren zwei Tagen wieder ein vollständiger Zellrasen ausgebildet hatte, konnte dieser Vorgang wiederholt oder die Zellen im Versuch eingesetzt werden.

Da H69-Zellen in Suspension wachsen, ist das Lösen mit Trypsin-EDTA-Lösung nicht erforderlich. Hier wurden die Zellen in Suspension mit einer Pipette aufgenommen und direkt in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Durch mehrmaliges Spülen der Schale wurden auch die restlichen Zellen aufgenommen. Ansonsten wird wie oben beschrieben fortgefahren.

### 3.6 Hypoxie-Versuchsablauf

Die präkonfluenten Zellen wurden in einem mit Stickstoff gefüllten „Gloves bag“ zweimal mit 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriertem und temperiertem Grundmedium ohne FCS (37 °C) gewaschen und anschließend ebenfalls mit äquilibriertem und temperiertem Grundmedium (serumfreiem Medium) (37 °C) versorgt und in die Hypoxiekammer gestellt. Diese kam während der Versuchszeit in ein auf 37 °C erwärmtes Wasserbad. Zum Erhalt der Hypoxie wurde alle 14 Minuten eine Minute lang mit 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> mit einem Flow von ca. 500 ml/ min begast.

Bei Beendigung der Hypoxie (meist nach 24 h) wurde im mit Stickstoff gefüllten „Gloves bag“ der Überstand einer Zellkontrolle zur Überprüfung des PH- und pO<sub>2</sub>- Wertes (Hypoxie-Kontrolle) abgenommen. Diese Zellen wurden anschließend unter dem Mikroskop zur Kontrolle der Zellvitalität und zum Ausschluss einer Kontamination begutachtet.

Der Zellüberstand der weiteren Versuchszellen wurde einzeln in Cups aufgenommen und zur Bestimmung des VEGF-Proteins mit dem humanen VEGF-ELISA eingefroren. Die in Suspension wachsenden H69-Zellen mussten zuvor zentrifugiert werden.

Die Zellen wurden je nach Fragestellung entweder:

1. mit RNazol aufgenommen und für die Messung der m-RNA von HIF-1 $\alpha$  oder dessen Zielgenen etc. bei -80 °C eingefroren
2. mit 4 °C kaltem Luciferase Lysepuffer lysiert und zur Bestimmung der Reporter-gen-Aktivität im Reporter-gen Assay vorbereitet
3. zur Messung der Apoptose weiter verarbeitet

### 3.7 Der humane VEGF-ELISA

Mit dem humanen VEGF-Immunoassay (Quantikine®) der Firma R & D Systems wurde entsprechend dem Versuchs-Protokoll das VEGF-Peptid immunologisch im Zellüberstand der Hypoxie- und Normoxie-Zellen (siehe 3.6) quantitativ gemessen.

## 3.8 Das Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 3.8.1 Extraktion der RNA mit der Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform- Methode (RNAzol™) (Chomczynski and Sacchi 1987)

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus den kultivierten Tumorzellen wurde RNAzol™ verwendet (Pepqlab, Erlangen). Diese Methode hat den Vorteil, dass mit RNAzol™ versetzte Proben ohne die Gefahr einer Schädigung der enthaltenen RNA bis zu sechs Monate bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden können.

Nach dem unter 3.6 beschriebenen Hypoxieversuch wurden die Zellen im 6-Well mit  $500\text{ }\mu\text{l}$  RNAzol mit einer Pipette abgelöst und aufgenommen, dann entweder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für einen späteren Gebrauch tiefgefroren oder direkt für die RNA-Extraktion weiter verarbeitet. Um eine Kontaminierung mit RNAsen zu verhindern, wurde bei allen Arbeitsschritten mit RNA autoklaviertes Material und Handschuhe verwendet und auf Eis gearbeitet.

Bei einem Probenvolumen von  $500\text{ }\mu\text{l}$  wurden  $50\text{ }\mu\text{l}$  Chloroform (1/ 10) dazugegeben, 15 Sekunden kräftig geschüttelt (vortexen), bis es eine milchige Konsistenz ergab, 15 Minuten auf Eis gestellt, dann bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $14.000\text{ rpm}$  5 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführt (Fällung der RNA aus der wässrigen Phase), 1 Volumen Isopropanol auf Überstand dazugegeben und invertiert, dann 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend, bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $14.000\text{ rpm}$  über 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit  $1\text{ ml}$   $70\text{ }\%$  Ethanol gewaschen, bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $14.000\text{ rpm}$  10 Minuten zentrifugiert, das Ethanol vorsichtig aufgenommen und das verbliebene Pellet kurz an der Luft getrocknet und in  $20\text{-}50\text{ }\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser gelöst.

Die RNA kann nun für alle gängigen Methoden wie z.B. RT-PCR oder Northern-Blot-Analyse verwendet werden.

### 3.8.2 Konzentrationsbestimmung von RNA (Sambrook & Russel, 2001)

Die Konzentration von RNA wurde photometrisch bestimmt. Die Messungen erfolgten bei  $\lambda = 260$  nm und 280 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von  $d = 1$  cm. Für die Konzentrationsbestimmung wurde folgende Formel verwendet:

$$c[\mu\text{g}/\text{ml}] = \text{OD}_{260} \times n \times f$$

mit

c	=	Konzentration der Ausgangslösung
$\text{OD}_{260}$	=	optische Dichte bei $\lambda = 260$ nm
n	=	Eichfaktor: 50 für dsDNA, 40 für ssRNA
f	=	Verdünnungsfaktor

Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm gibt die Verunreinigung mit Proteinen wieder; für DNA-Proben sollte das Verhältnis bei 1,6 bis 1,8 liegen, für RNA bei 1,8 bis 2,0.

### 3.8.3 c-DNA Synthese (RT- PCR)

Reverse Transkriptasen sind virale Enzyme, die in der Lage sind, m-RNA in komplementäre einzelsträngige cDNA (complementary) umzuschreiben. Die vorliegende m-RNA dient als Matrize, an die sich Oligonukleotidprimer anlagern. Von diesen Positionen aus wird die neue cDNA in 5' -3'- Richtung synthetisiert. Das Erhitzen der Proben nach Ende der Inkubationszeit dient der Inaktivierung der Reversen Transkriptase und der Trennung der m-RNA-cDNA-Hybride. Die Reverse Transkription der präparierten RNA erfolgte mittels der MMLV-RT und nach dem zugehörigen Protokoll der Firma GIBCO-BRL.

Im ersten Schritt wurde die errechnete Gesamt-RNA-Menge von 2  $\mu\text{g}$  in ein Reaktionsgefäß vorgelegt, auf ein Probenvolumen von 10  $\mu\text{l}$  mit RNase freiem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt und anschließend in einem Heizblock bei 65  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min denaturiert, um die Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren zu zerstören. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt.

Dann wurde ein RT- Mastermix hergestellt:

**Primer-Mix:**

1  $\mu$ l pdN6

2  $\mu$ l dNTP (Nukleotide)

**Enzym-Mix:**

1  $\mu$ l dTT

4  $\mu$ l Synthese-Puffer für RT- PCR

1  $\mu$ l RNase Inhibitor

1  $\mu$ l MMLV-RT (Reverse Transkriptase)

Zu jeder Probe wurden 10  $\mu$ l des RT-Mastermixes dazugegeben, so ergab sich ein Probenvolumen von 20  $\mu$ l, welches mit einem Schüttler gemischt wurde. Anschließend erfolgte die Reverse Transkription bei 39 °C für 1 h (cDNA-Synthese), dann bei 92 °C für 2 min (Inaktivierung) im Heizblock. Die cDNA-Proben wurden dann auf Eis zur Durchführung der PCR/ TaqMan- PCR gegeben oder bei -80 °C eingefroren.

### 3.8.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

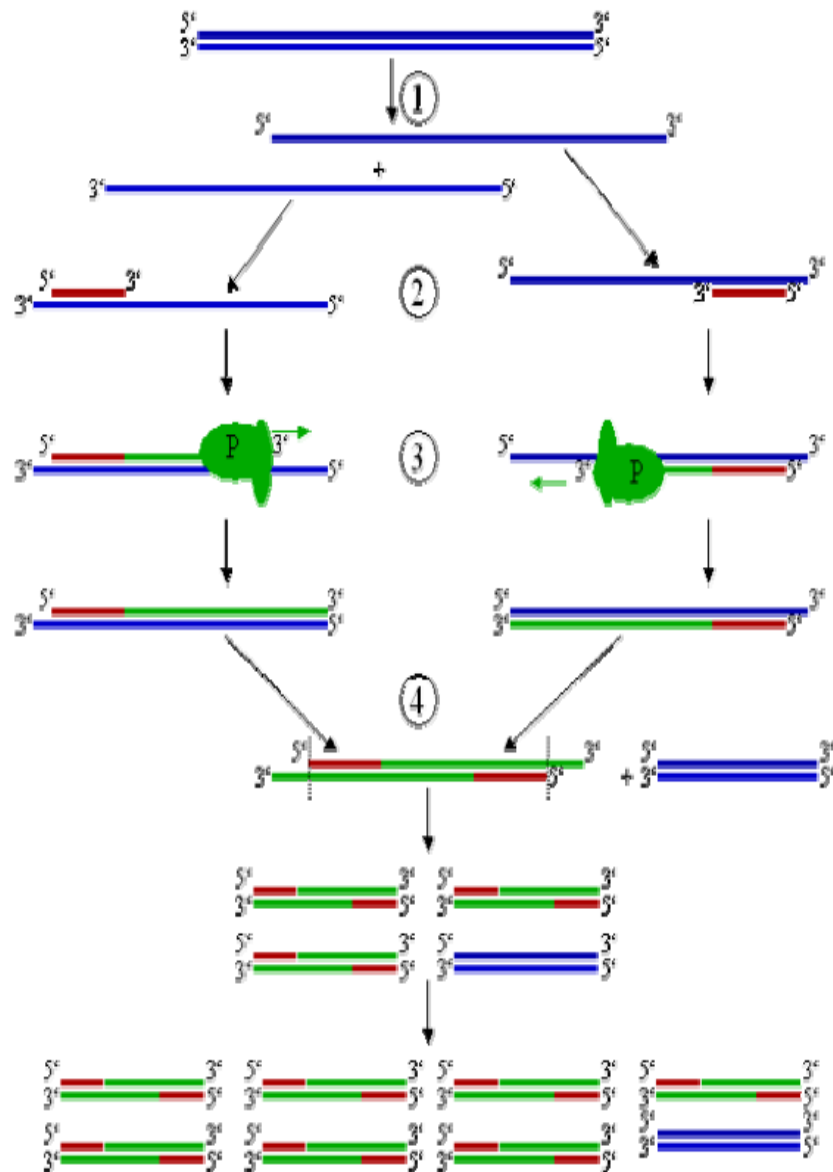
Kary B. Mullis entwickelte 1983 das Verfahren der Polymerasen Kettenreaktion (PCR), ein Verfahren, das die Molekulargenetik revolutionierte und ihm 1993 den Nobelpreis für Chemie einbrachte. Mittels der Technik der PCR (polymerase chain reaction) werden cDNA-Abschnitte spezifisch amplifiziert und die cDNA-Ausgangsmenge relativ oder absolut bestimmt. Damit ist es rückschließend möglich, DNA-Transkripte auf m-RNA-Ebene sehr sensitiv zu detektieren und zu quantifizieren, auch wenn sie nur in sehr geringer Anzahl vorliegen.

Der Ablauf der Polymerasenkettenreaktion entspricht der Replikation in der Zelle, d.h. eine Polymerase synthetisiert entlang einer Nukleinsäurematrix den dazu komplementären Strang.

Genauso wie bei der in vivo Replikation werden für die PCR außer Polymerase und Nukleotiden Primer als Startermoleküle benötigt, ein sense oder forward primer und ein antisense oder reverse primer. Die Primer flankieren ganz

spezifisch den Bereich der cDNA, der amplifiziert (= Amplikon) und gemessen werden soll.

Die Polymerase Kettenreaktion gliedert sich in drei Schritte:



**Abb.10: Schritte der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) in der Übersicht**

1. Denaturierung: Bei 90-100 °C werden die Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Basen aufgebrochen. Die DNA zerfällt in Einzelstränge.

2. Anlagerungsphase (Annealing): Während dieser Phase lagern sich die Primer (rot dargestellt) an die Einzelstränge an. Sie markieren Anfang und Ende des zu kopierenden DNA-Abschnitts. Primer sind kurze (ca. 20- 30 Basen), synthetisch hergestellte DNA-Sequenzen, die komplementär zu einer Stelle der DNA-Einzelstränge sind. Man verwendet immer einen Vor- und einen Rückwärtsprimer,

der eine lagert sich am 5'- 3' Strang, der andere am 3'- 5' Strang an. Die Temperatur während der Anlagerungsphase beträgt je nach verwendeten Primern zwischen 40 und 60 °C.

3. Verlängerung (Extension): Bei 72 °C synthetisiert die Taq-Polymerase (grün dargestellt) von den angelagerten Primern aus die Komplementärstränge. Taq-Polymerase ist eine hitzestabile DNA aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*.

4. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Schritte (Zyklen) wird die Zielsequenz exponentiell vervielfältigt und kann anschließend nachgewiesen werden (Quelle: [www.pcr.at](http://www.pcr.at)).

Zuerst wurde aus den PCR-Reagenzien ein Mastermix wie folgt hergestellt:

**PCR- Mastermix:**

2,5 µl 10 x PCR Puffer

0,5 µl dNTP (Nukleotide)

1 µl Primer 1

1 µl Primer 2

0,125 µl HST Quiagen (Hotstar)

17,9 µl H<sub>2</sub>O

23 µl Mastermix wurden in 0,2 ml Cups vorgelegt und 2 µl cDNA -Probe hinzugefügt.

Als Negativ-Kontrolle oder no-template-control enthalten 2 wells pro Primerpaar pro Platte stets statt cDNA nur H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

PCR-Parameter:

1.	15 min	95 °C	(Aktivierung der HAST-Polymerase)
2.	10 s	94 °C	(Denaturierung)
3.	30 s	60 °C	(Annealing)
4.	1:30 min	72 °C	(Extension)
5.	10 min	72 °C	(Komplettierung)

Schritte 2-4 40-mal wiederholen.

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und durch einen fluoreszierenden Farbstoff unter UV-Licht als Banden sichtbar gemacht. (s. 3.8.5)

### 3.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Hierbei wurde die Agarose in 1x TAE (Tris-Acetat-DTA) in einer Konzentration von 1 % (w/ v) durch Aufkochen gelöst, 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt (Färbung der DNA) und in einen entsprechenden Gelschlitten gegossen. Zur Analyse von PCR-Produkten wurden 10 µl des Ansatzes mit 4 µl 5x TAE-Auftragspuffer versetzt. Bei jedem Gel wurde ein kommerziell erhältlicher Längenstandard mitgeführt, um eine Abschätzung der Fragmentlänge zu ermöglichen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE bei 80-90 V für 20-30 Minuten, abhängig von der Größe des Gels und erwünschter Auflösung. Analytische Gele wurden dann auf einem UV-Transluminator (Biometra Biodoc II) betrachtet und fotografiert.

### 3.8.6 TaqMan™- PCR (Quantitative PCR)

Die TaqMan™ PCR (Lee *et al*, 1993) ist eine sehr sensitive Methode, um den Expressionsgrad unterschiedlicher Gene zu quantifizieren. Durch die Zugabe von CyberGreen, eines fluoreszierenden DNA-Interkalators, der an doppelsträngige DNS bindet, kann anhand der Fluoreszenz die Menge des PCR Produkts gemessen werden. Der Anstieg der Fluoreszenz ist dabei der Menge direkt proportional.

Um m-RNA-Level zu bestimmen, wurde zunächst mit 2 µg Gesamt-RNA eine cDNA-Synthese durchgeführt (3.8.3). Aus dieser Synthese wurden 2 µl für die TaqMan™-PCR genommen. Der Ansatz von 25 µl setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	SYBER-Green (Quiagen)
3,0 µl	MgCl <sup>2</sup>
0,5 µl	Primer forward (10 µM)
0,5 µl	Primer reverse (10 µM)
0,5 µl	dNTP
0,1251 µl	HST-Polymerase
17,5 µl	H <sub>2</sub> O
2 µl	cDNA-Probe

Die 2 µl cDNA Proben wurden in 0,2 ml PCR-Reagenz-Tubes pipettiert. In jedes Tube wurden 23 µl TaqMan Mastermix dazu pipettiert. Als Negativ-Kontrolle oder no-template-control enthalten zwei Wells pro Primerpaar pro Platte stets statt cDNA nur H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. (Ausschluss einer Kontamination)

Die TaqMan-Platten wurden kurz zentrifugiert, damit sich die cDNA mit dem Mastermix mischen und die geringen Volumina auf den Boden der Tubes gelangen konnten, und anschließend in einen PCR-Ständer gesteckt und mit

einem durchsichtigen Kunststoffdeckel versiegelt und mit dem ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 von Applied Biosystems analysiert.

Die Parameter für die PCR wurden wie folgt eingestellt: 15 Minuten bei 95 °C (Aktivierung HAST Polymerase), dann folgten 40 Zyklen mit 10 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung), 30 Sekunden bei 60 °C, 1:30 Minuten bei 72 °C (Annealing/Extension).

Im ABI PRISM<sup>™</sup> 7700 Sequence Detector erfolgt die Anregung mit einem Argonlaser und die Aufzeichnung der Daten mit einer CCD-Kamera, die während der PCR alle sieben Sekunden die Emissionsdaten sammelt. Diese Daten werden direkt an einen angeschlossenen Computer übertragen und dort analysiert. Auf diesem Wege ist es möglich, während des Laufes die Zunahme des PCR-Produktes direkt zu verfolgen. Beim TaqMan<sup>™</sup>-Lauf wird die Startmenge des Templates anhand eines Schwellenzyklus (threshold cycle, C<sub>T</sub>), ab dem das Signal detektierbar ist, berechnet.

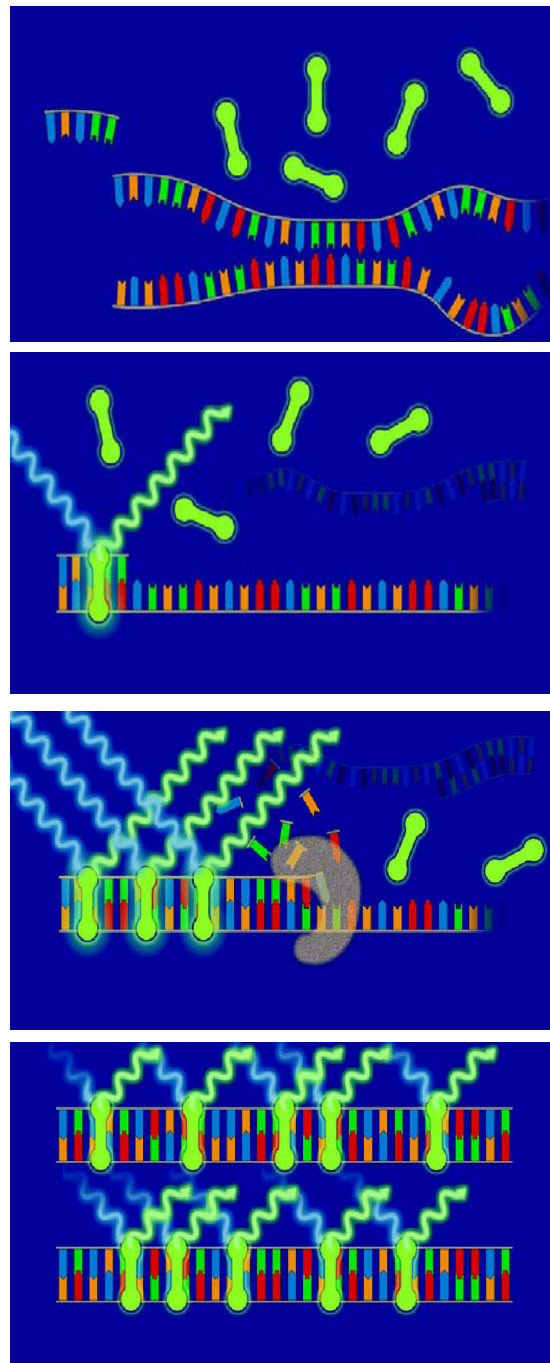
Zum Vergleich der verschiedenen Proben wurde die Deltadelta-Ct-Methode angewandt, eine sehr effiziente Methode zur relativen Quantifizierung.

Die Ct-Werte der Probe wurden wie folgt mit dem house-keeping-gen verglichen:

$$2^{-(\Delta C_t \text{ Probe} - \Delta C_t \text{ house-keeping-gen})} = \text{Endwert}$$

Eine Verdopplung dieses Wertes bedeutet eine Verdopplung der gemessenen mRNA-Transkripte.

Als house-keeping-gen wurde PBGD verwendet.



**Abb.11: Schematischer Ablauf einer RT-PCR-Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green.** (Quelle: [www.pcr.at](http://www.pcr.at))

Nach der Synthese eines neuen DNA-Doppelstrangs kommt es zur Bindung von mehreren Molekülen SYBR-Green an den neusynthetisierten Strang. Durch die Bindung des Farbstoffes wird die emittierte Fluoreszenz frei und die Intensität des Signals kann gemessen werden. Die Intensität ist direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge.

## 3.8 Das Arbeiten mit Proteinen

### 3.9.1 Präparation des nukleären Extraktes

Die prä-konfluenten Zellen wurden in einem mit Stickstoff gefüllten „Gloves bag“ zweimal mit äquilibriertem und temperiertem PBS (37 °C) gewaschen und anschließend ebenfalls mit äquilibriertem, serumfreiem Medium (37 °C) versorgt und in die Hypoxiekammer gestellt. Die Hypoxiekammer kam während der Versuchszeit in ein auf 37 °C erwärmtes Wasserbad. Zum Erhalt der Hypoxie wurde alle 15 min für 1 min mit 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub> mit einem Flow von ca. 500ml/ min begast.

Bei Beendigung der Hypoxie wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Cell-scraper von der Kulturschale abgeschabt und in 5 ml PBS aufgenommen. Die Suspension wurde bei 4 °C mit 400 g für fünf Minuten zentrifugiert. Es war stets darauf zu achten, dass man schnell arbeitete (kurze Halbwertszeit von HIF-1 $\alpha$  in posthypoxischen Zellen) und zu keiner Zeit die Kühlkette unterbrach. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in seinem 4-fachen Volumen in Puffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl + Proteaseninhibitions-gemisch) resuspendiert und für zehn Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen in einem Homogenisator für 10 Sekunden bei 3000 Umdrehung/Minute lysiert. Danach wurde erneut bei 4 °C mit 4500 g für fünf Minuten zentrifugiert, das Pellet entsprach dann den Zellkernen, die dann in ihrem 2-fachen Volumen in Puffer C (20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM KCl, 20% Glycerol + Proteaseninhibitions-gemisch) resuspendiert wurden. Nach 30-minütigem Schütteln bei 4 °C wurde zum Abschluss nochmals 30 Minuten bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand entsprach dem nukleären Extrakt, dieser wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, so dass er bei -80 °C aufbewahrt werden konnte. Der Proteingehalt wurde mit dem Bradford Protein Assay (BioRad) ermittelt, als Standard wurde Bovines Serum Albumin benutzt.

### 3.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode erfolgte nach dem BioRad-Proteinassay®-Protokoll der Firma BioRad [202]. Verwendet werden blaue Säurefarbstoffe, die als Coomassie-Brilliantblau bezeichnet werden. In Gegenwart von Proteinen im sauren Milieu verschiebt sich z.B. das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblau G250 von 465 nm zu 595 nm [203].

#### **Durchführung:**

1 µl der Proben mit unbekannter Proteinkonzentration wurde mit 799 µl BiAqua-Dest. und 200 µl des Farbstoffkonzentrates (BioRAD-Proteinassay®, Coomassie-Brilliantblau) versetzt, durchmischt, und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm im ELISA-Reader gemessen (Programm: EASY- FIT). Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve mit Proben bekannter BSA-Konzentrationen (0- 8 µg), gelöst in Puffer C (= Hintergrund).

### 3.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können nach Denaturierung mit SDS (Natriumdodecylsulfat) in einer Polyacrylamidmatrix unter Einwirkung eines äußeren elektrischen Feldes gemäß ihrer Molekulargröße separiert und anschließend mit Antikörpern markiert und angefärbt werden. Das Polyacrylamidgel kann je nach Anwendungszweck in Dicke, Größe, Vernetzungsgrad bzw. Porengröße variiert werden.

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung des nukleären Extraktes wird ein 7,5 %-iges kontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet.

**Vorbereitung der Gele:** Die gereinigten Elektrophoreseplatten werden mit Methanol entfettet, mit Spacern (1 cm) versehen und mit dem Gasket abgedichtet. Die Trenngellösung wird vorbereitet, durch Hinzugabe von APS startet die Polymerisation. Nach dem Einfüllen des Trenngels wird der obere Gelrand mit 75 µl Propanol überschichtet. Die Polymerisation ist bei Zimmertemperatur nach etwa 35 Minuten abgeschlossen. Nach Abschütten der Überschichtung wird der Oberrand des durchpolymerisierten Gels mit 3x 1 ml Aqua dest. gewaschen,

danach wird das Sammelgel aufgetragen und mit dem Probenkamm versehen. Die Polymerisation des Sammelgels beträgt ca. 25 Minuten.

Anschließend kann der Kamm entfernt und die Elektrophorese zusammengebaut werden. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen am unteren Rand der Platten befinden, da diese den Stromfluss behindern könnten. Nun werden die Proben nach entsprechender Vorbereitung, der Positivkontrolle und der Marker aufgetragen.

### **Trenngel 7,5 %**

Acrylamid	3,3 ml
Trenngelpuffer	3,3 ml
Aqua dest.	6,4 ml
10 % SDS	130 µl
Temed	10 µl
APS	75 µl

Trenngelpuffer: 36,5 g Tris (1,5 M) werden in ca. 150 ml Aqua dest. gelöst; nachdem der pH mit konzentrierter Salzsäure auf 8,8 eingestellt wurde, wird auf 200 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

10 % SDS Lösung: 10 g Natriumdodecylsulfat werden in 100 ml Aqua dest. gelöst; um eine schnelle Lösung der Substanz zu erzielen, empfiehlt sich eine leichte Wärmezufuhr.

**Sammelgel 4 %**

Acrylamid	1,34 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqua dest.	6 ml
10 % SDS	100 µl
Temed	10 µl
APS	75 µl

Sammelgelpuffer: 3 g Tris (0,5 M) werden in ca. 40 ml Aqua dest. gelöst; nachdem der pH mit konzentrierter Salzsäure auf 6,8 eingestellt wurde, wird auf 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

**Vorbereitung der Proben:** Die Proben werden zu 8 µl PBS, das mit Bromphenolblau gefärbt ist, und 2 µl 10x Laemmli-Puffer (als Endkonzentration resultiert 1x) pipettiert. Nach 5 Minuten denaturieren bei 95 °C kommen die Proben direkt auf Eis. Das anschließende Beladen des Gels erfolgt mit einer Hamiltonpipette.

**Trennung:** Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 100 V. Die Spannung bleibt nach Durchlaufen des Sammelgels unverändert. Die Auftrennung ist nach 75 Minute beendet.

### 3.9.4 Western Blot

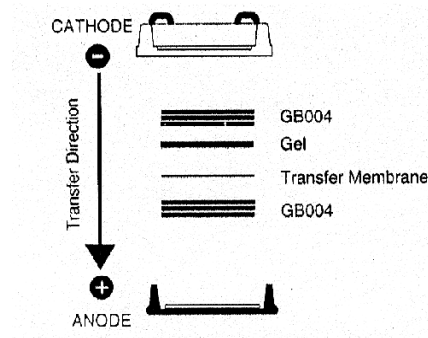
Die Bezeichnung Western Blot geht auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik namens Edwin Southern zurück, der die Methode 1971 für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als Southern Blotting eingeführt hat. In Anlehnung an seinen Namen wurde die entsprechende Auftrennung von Proteinen als Western Blotting bezeichnet. Beim Western Blot werden in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran aus Nitrocellulose/ PVDF transferiert. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Transfermembran gebunden. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteine können von Antikörpern erkannt werden, da sie renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiär-, nicht jedoch ihre Quartärstruktur einnehmen. Für diesen elektrophoretischen Transfer sind zwei unterschiedliche Systeme im Einsatz, das von uns verwendete Semidry-Blot-System und das Tank-Blot-System. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran müssen zuerst die freien Bindungsstellen blockiert werden, da sich sonst die Antikörper an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würden. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgt mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein. Dafür eignen sich sowohl BSA (bovine serum albumin) oder auch Milchpulver. Um die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachzuweisen, wird ein spezies-spezifischer sekundärer Antikörper verwendet, der mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase = HRP) gekoppelt ist. HRP kann verschiedene Substrate umsetzen, darunter Diaminobenzidin. Die Produkte bilden ein sichtbares Präzipitat um den Antigen-Antikörper-Komplex.

Mit der Western Blot Technik ist es möglich, Proteine aus SDS-Page-Gelen auf Nitrocellulose- oder Nylon-Membranen zu übertragen und später mit einem spezifischen Antikörper zu detektieren. Die Gele werden nach Entnahme aus der Elektrophoreseapparatur für fünf Minuten in Blot Puffer äquilibriert. Dieser Schritt ist nötig, um einer Größenveränderung des Gels während des Transfers vorzubeugen, da das Gel durch das enthaltene Methanol etwas schrumpft. Tritt

diese Größenveränderung während des Transfers auf, ergeben sich diffuse und verzerrte Banden.

Bei der PVDF-Membran erfolgt die Äquilibration durch sukzessives Tauchen in 100 % Methanol (bis die Membran transparent ist, jedoch max. fünf Sekunden), danach wird dreimal fünf Minuten in Blot Puffer gewaschen.

**Transfer der separierten Proteine auf die PVDF-Membran:** Bei einer Semi-dry-Vorrichtung erfolgt der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran zwischen zwei horizontal angeordneten Plattenelektroden. Hierfür werden das Gel und die PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen 2x 3 Lagen in Blot Puffer getränktes Filterpapier gelegt. Das „Sandwich“ wird dann zwischen die Kohleplattenelektroden (unten: Anode, oben: Kathode) der Blotting Apparatur platziert. Auch hier ist es wichtig, dass keine Luftblasen vorhanden sind, da diese den Stromfluss und damit den Transfer stören würden. Bei all diesen Schritten wurde fettfrei mit Gummihandschuhen gearbeitet. Anschließend erfolgt das Blotting mit einer Stromstärke von  $1,25\text{mA}/\text{cm}^2$  Gel über einen Zeitraum von 60 Minuten.



**Abb. 12 Schema eines Semidry- Blot- Sandwiches**

**Blockieren der freien Bindungsstellen:** Die Membran wird nach dem Blot für 60 Minuten in PBS mit 0,5 % Tween 20 inkubiert. Dadurch werden unspezifische Bindungsstellen blockiert

**Inkubation mit Antikörpern:** Nach Blockieren der freien Bindungsstellen wird die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Nach

der Inkubation wird 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen, anschließend folgt die Detektion der Membran mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper gegen den konstanten Erstantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss wiederum dreimaliges Waschen der Membran mit PBS.

**Detektion der Proteinbanden:** Meerrettich-Peroxidase katalysiert in Gegenwart eines Oxidationsmittels ( $H_2O_2$ ) die Reaktion von Diaminbenzidin (DAB) zu einem farbigen, immobilisierten Endprodukt. Dazu werden 60 mg DAB in 90 ml PBS gelöst, hinzu kommt noch 10 ml 0,3%igen  $NiCl_3$ -Lösung, dies führt zu einer weiteren Steigerung der Empfindlichkeit. Gibt man diesem Gemisch 100  $\mu$ l  $H_2O_2$  hinzu, dann startet die Reaktion. Die Membran wird mit der Substratlösung bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach ausreichender Visualisierung der Proteinbanden wird die Reaktion durch Entfernen des Wasserstoffperoxid mittels Spülen mit PBS abgebrochen, bevor der Membranhintergrund verfärbt wird.

### 3.9.5 Bestimmung der optischen Dichte

Nach Visualisierung der Proteinbanden wurden die PVDF-Membranen eingescannt, so dass eine Messung der optischen Dichte der Banden mit Hilfe eines Programms (TINA) stattfinden konnte.

## 3.10 HIF-Reporter-Gen-Assay

Die Aktivierung der HIF-abhängigen Gene wurde mit einem Reporter-Gen-Assay analysiert. Hierfür wurde der Duale-Reporter-Gen-Assay (Promega) mit Firefly- und Renilla-Luciferase als Reporter-Gene eingesetzt. Dabei stehen die Firefly-Luciferase-Reporter-Gene unter der Kontrolle des Hypoxie-sensitiven VEGF-Promoters und die Renilla-Luciferase-Reporter-Gene unter der Kontrolle des nicht Hypoxie-sensitiven Herpes-Simplex Thymidin-Kinase-Promoters. Die Reporter-Gen-Vektoren wurden mit Hilfe von kationischen Lipiden in die Zellen transfiziert.

Der Erfolg wurde durch parallele Transfektion mit einem Plasmid, welches das Green-Fluorescence-Protein als Markergen trägt, kontrolliert. Nach der Transfektion wurden die Zellen den Versuchsbedingungen, z.B. Hypoxie, ausgesetzt. Bei Versuchsende wurden die Zellen in 4° C kaltem Luciferase Lysepuffer (Promega) lysiert. Im Zellysat wurden sodann mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Verfahrens in einem Bioluminometer (Berthold) die jeweiligen Reportergergen-Aktivitäten, die unter der Kontrolle des Hypoxie-abhängigen und unabhängigen Promotors stehen, gemessen.

### **3.11 Transiente Transfektion**

Die transiente Transfektion wurde mit dem Lipofektamin™ 2000 Reagent entsprechend dem Protokoll der Firma GIBCO BRL, Invitrogen (California, USA) durchgeführt. Der Erfolg wurde durch parallele Transfektion mit einem Plasmid, welches das Green-Fluorescence-Protein als Markergen trägt, kontrolliert.

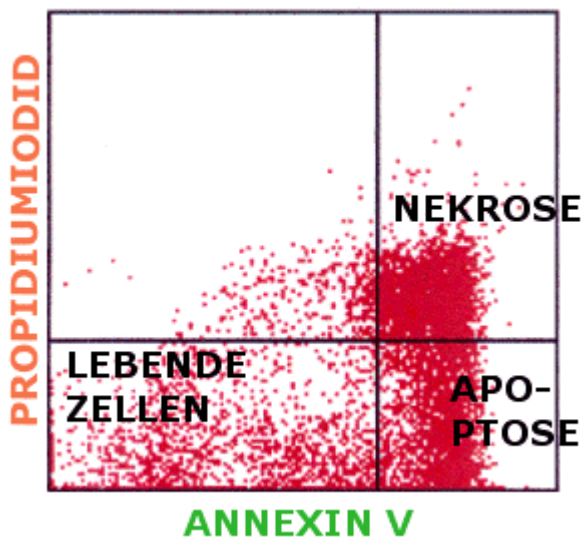
### **3.12 Stabile Transfektion**

Die stabile Transfektion der H23-Zellen wurde durch einen weiteren Doktoranten in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Jörg Hänze im Labor für Molekulargenetik im Institut für Biochemie durchgeführt.

### **3.13 Messung der Apoptose mit dem Annexin Assay**

Phosphatidylserin (PS) findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin V bindet sich an PS. Durch Markierung von Zellen mit FITC-Annexin V kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen. Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann FITC-Annexin V in die Zellen eindringen und sich an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen

mit FITC-Annexin V apoptotische nicht von nekrotischen unterschieden werden. Man kombiniert daher die FITC-Annexin V-Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung. Das Propidiumiodid (PI) dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen, ein. Lebende Zellen sind daher Annexin-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv (siehe Abbildung).



**Abb.13: Darstellung der Verteilung lebender, nekrotischer und apoptotischer Zellen**

Lösungen:

Inkubationspuffer: Herstellung einer Lösung, die 10 mM HEPES / NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl und 5 mM CaCl<sub>2</sub> enthält

Propidium-Iodid-Lösung: Stammlösung mit 50 µg/ ml

Annexin-V-Fluos-Markierungslösung: 20 µl Annexin-Stammlösung + 1000 µl HEPES-Puffer + 20 µl PJ

Färbeprozedur:

Nachdem die Zellen mit Trypsin von den Kulturplatten gelöst worden sind, werden sie zum Wiederherstellen der Membran-Integrität für 15 min in 50 % FCS inkubiert und anschließend für 5 min bei 1200 g zentrifugiert. Zur Messung der Apoptionsrate werden nun die Zellen mit PBS gewaschen und bei 200 g fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird für 10 – 15 Minuten in 100 µl Annexin-V-Fluos-Markierungslösung nach Resuspendieren inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren für fünf Minuten bei 200 g wird das Pellet in 0,4 ml Inkubationspuffer aufgenommen. Die Analyse findet am Durchflusszytometer (488 nm Excitation, 515

nm Bandpass Filter für Fluorescein-Detektion, Filter > 560 nm für PJ-Detektion) statt.

### **3.14 Statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse**

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM). Die Daten wurden mittels t-Test auf ihre Signifikanz überprüft. Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsgruppen wurden durch eine einfaktorielle Anova Varianzanalyse ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Übersicht

Im Mittelpunkt der Dissertationsschrift steht die Charakterisierung der humanen, pulmonalen kleinzelligen (H69) und nicht kleinzelligen Tumorzelllinien (A549 und H23), bezüglich der Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ ; des angiogenetischen Faktors VEGF, des zentralen Enzyms der Glykolyse PGK, des Tumorsuppressorgens PTEN und des Tumoronkogens HER2(neu) und der Apoptoserate unter Normoxie und Hypoxie.

Besonderes Interesse galt hierbei dem Einfluss von Hypoxie auf HIF-1 $\alpha$  auf Protein- und m-RNA-Ebene und dessen Effekt auf das Zielgen VEGF und Apoptose.

Auf dieser Grundlage aufbauend sollte untersucht werden, welche Rolle eine Überexpression von HIF-1 $\alpha$ , welches in einigen Tumoren überexprimiert vorliegt [67, 185], in transfizierten H23-Zellen auf die Induzierbarkeit der HRE-Aktivität von HIF, der m-RNA- und / oder Proteinexpression von VEGF spielt.

Des Weiteren folgten, basierend auf der Arbeit von Zundel et al. 2000 [122] und Semenza et al. 2001 [164], weiterführende Untersuchungen zu „alternativen Regulationsmechanismen“ von HIF-1 $\alpha$  am Beispiel des Tumorsuppressorgens PTEN [122] und des Tumoronkogens HER2(neu). [164].

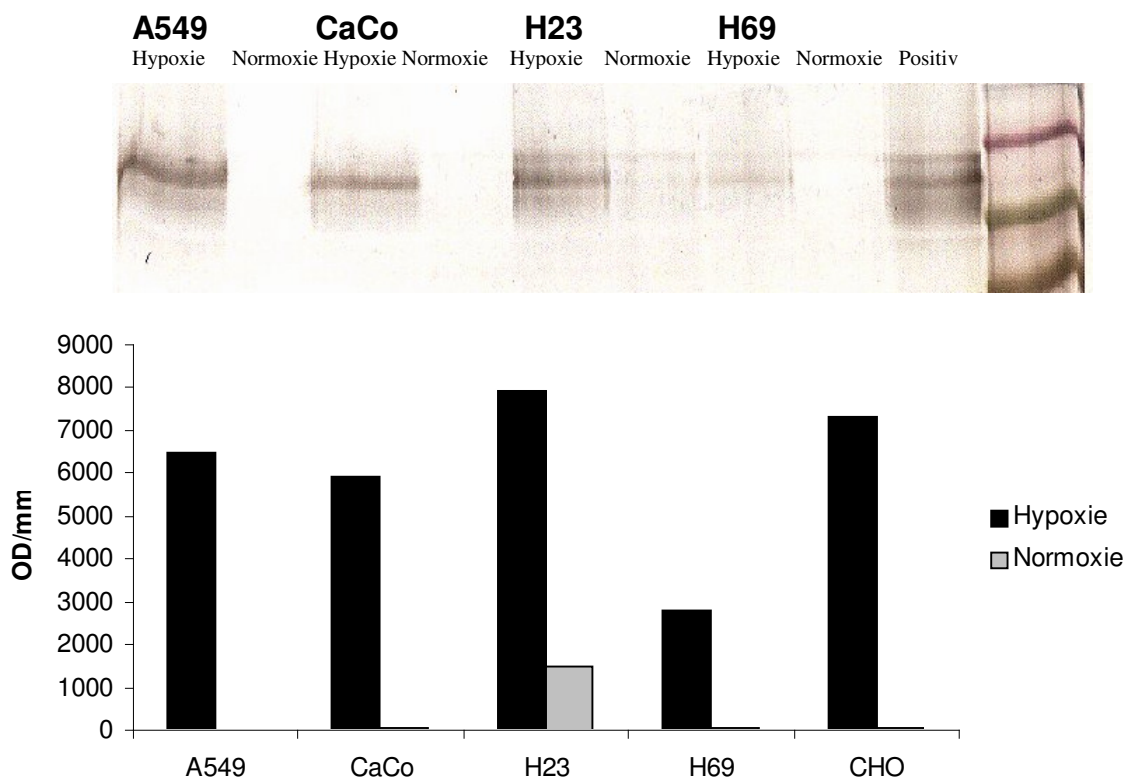
## 4.2 Charakterisierung der humanen, pulmonalen Tumorzelllinien A549, H23 (NSCLC) und H69 (SCLC)

### 4.2.1 Hypoxie induziert die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$ in A549, H23, H69 und weiteren Tumorzellen

In dieser Dissertationsschrift sollte zunächst untersucht werden, welchen Einfluss die Hypoxie auf die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  in Tumorzellen hat. Dafür wurden die Zellen für 4 h in Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) und Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) kultiviert. Anschließend erfolgte nach Präparation des nukleären Extraktes im Westernblot-Verfahren eine Darstellung von HIF-1 $\alpha$ .

Es zeigt sich eine deutliche Induktion der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression unter Hypoxie in allen Tumorzellen. Bei den H23-Zellen war überraschenderweise HIF-1 $\alpha$  auch unter Normoxie nachweisbar.

**Abb. 14a**



**Abb.14b**

**Abb.14: Induktion der Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  in den Tumorzellen A549, CaCo, H23, H69 und CHO.**

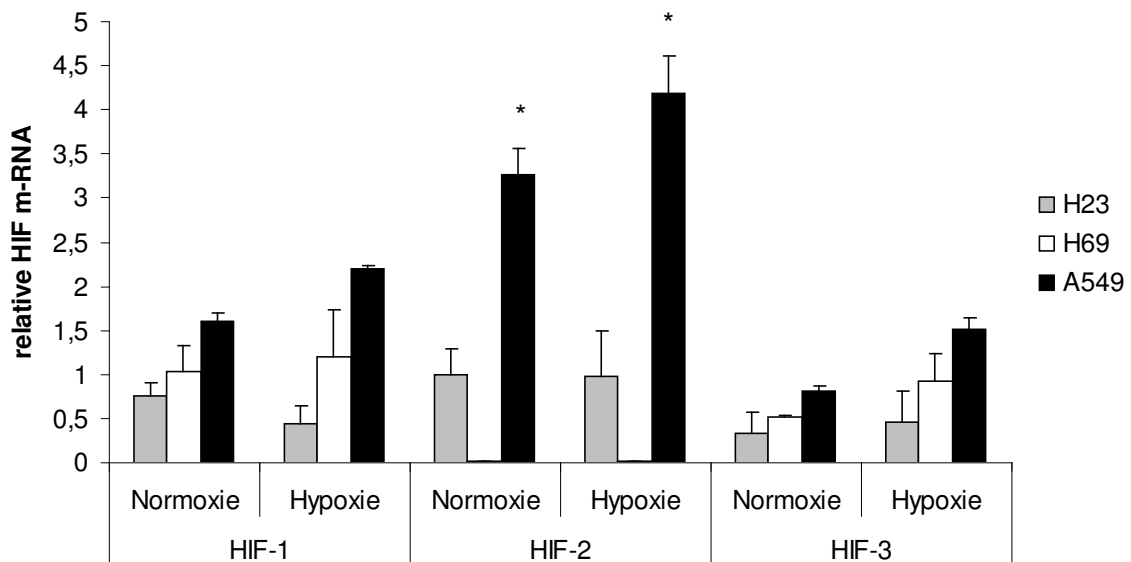
Abb. 14a zeigt einen repräsentativen Western-blot der Tumorzellen A549, CaCo, H23 und H69-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.

In der Abb. 14b ist die densitometrische Analyse der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression dargestellt. OD/mm<sup>2</sup> steht für die optische Dichte, was der Färbung der Blotmembran entspricht.

Die CaCo-Zellen stammen von einem humanen Kolonkarzinom. CHO ist eine Tumorzelllinie vom Ovarialkarzinom des Hamsters.

#### 4.2.2 HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ werden auf m-RNA Ebene nicht reguliert

Es sollte untersucht werden, ob die Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  auf m-RNA Ebene reguliert werden bzw. ob Hypoxie zu einer Induktion der m-RNA Expression führt. Dazu wurden die Zelllinien für 24 h unter normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) und hypoxischen (1 % O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Dann erfolgte nach Extraktion der RNA mit der Phenol-Guanidinium-Thiocyanat-Methode (RNAzol) die c-DNA Synthese und im Anschluss die Quantitative PCR (Taqman-PCR).



**Abb.15: Darstellung der m-RNA Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  der Tumorzellen H23, H69 und A549 unter 24 h Normoxie bzw. Hypoxie**

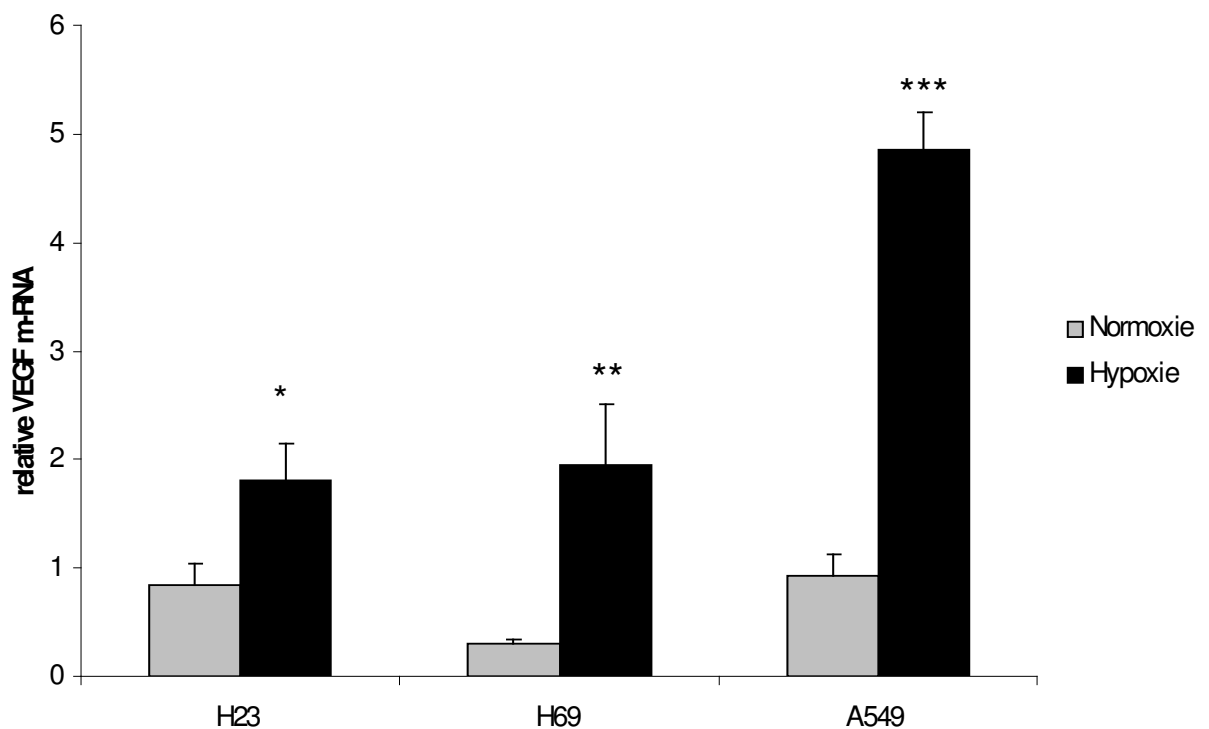
Die Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  werden auf m-RNA-Ebene nicht reguliert, d.h. unter Hypoxie konnte keine signifikante Induktion der m-RNA gezeigt werden. Bei A549-Zellen ist die HIF-2 $\alpha$  m-RNA-Expression sowohl in Normoxie als auch unter Hypoxie signifikant höher als bei H23- und H69-Zellen.

Die Mittelwerte stammen von vier unabhängigen Experimenten ( $\pm$  SEM) mit \* $p < 0,05$ .

### 4.2.3 Hypoxie induziert die m-RNA-Expression des Zielgens VEGF

VEGF ist das wichtigste Zielgen von HIF-1 $\alpha$ , es spielt eine entscheidende Rolle in der Angiogenese, ist daher für die Adaptation an Hypoxie und somit für die Tumorprogression von entscheidender Bedeutung.

Wir untersuchten die VEGF m-RNA-Expression unter Normoxie und Hypoxie auf deren Induzierbarkeit unter Hypoxie.



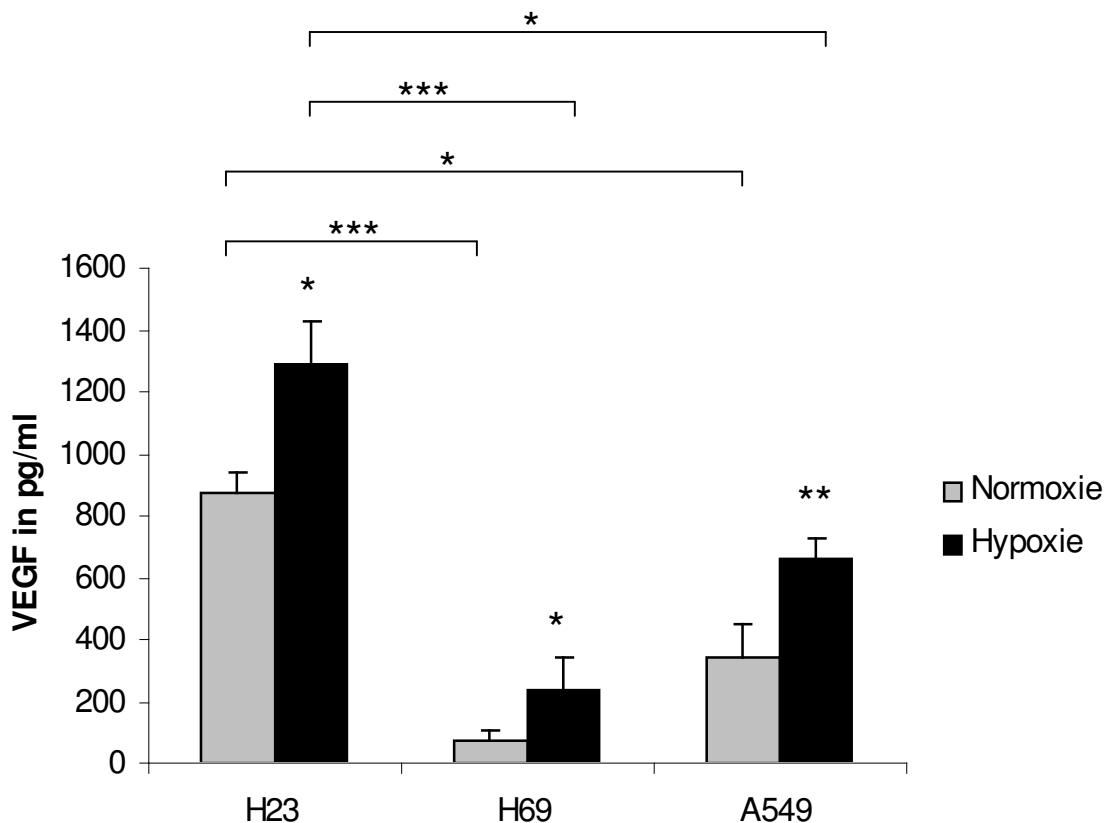
**Abb.16: Darstellung der Induzierbarkeit der VEGF m-RNA-Expression unter Hypoxie bei H23, H69 und A549**

Dargestellt ist die m-RNA-Expression von VEGF unter 24 h Normoxie bzw. Hypoxie bei H23, H69 und A549-Zellen. Die Mittelwerte stammen von vier unabhängigen Experimenten ( $\pm$  SEM) mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

Bei A549 ist eine Induktion der m-RNA-Expression unter Hypoxie hochsignifikant bei H23 und signifikant bei H69 nachweisbar.

#### 4.2.4 Hypoxie induziert die Proteinexpression von VEGF

Als Nächstes untersuchten wir die Proteinexpression von VEGF unter Normoxie und Hypoxie. Hier wurden die Tumorzellen in 24 h Normoxie und Hypoxie kultiviert und anschließend das VEGF-Peptid im Zellüberstand immunologisch mittels ELISA gemessen. Auch hier sollte gezeigt werden, ob die Proteinexpression unter Hypoxie induzierbar ist und ob Unterschiede zwischen den Zellen bestehen.



**Abb.17: Messung der Proteinexpression von VEGF unter Normoxie und Hypoxie bei H23, H69 und A549**

Dargestellt ist die Proteinexpression von VEGF unter 24 h Normoxie bzw. Hypoxie. Das Peptid wurde im Zellüberstand im humanen VEGF-ELISA immunologisch nachgewiesen und in pg/ml gemessen.

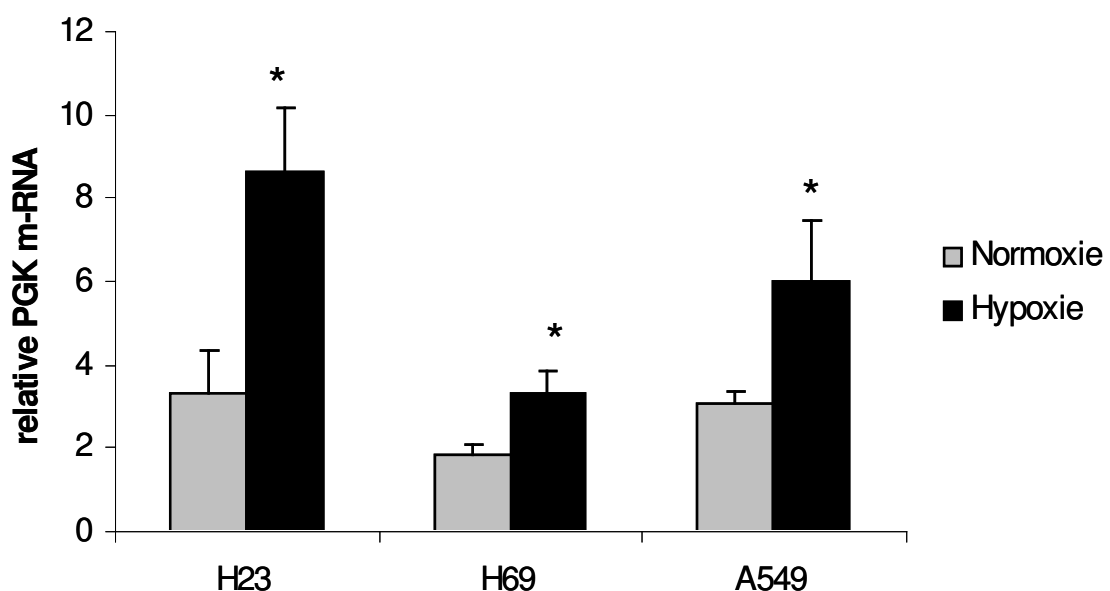
Die Mittelwerte stammen von acht unabhängigen Experimenten ( $\pm$  SEM) mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

Die Proteinexpression von VEGF war bei H23-Zellen bereits in Normoxie um den Faktor 7 mit \*\*\* $p < 0,001$  höher als bei den H69- und um den Faktor 2,5 mit \* $p < 0,05$

höher als bei den A549-Zellen. H23-Zellen zeigten die geringste, aber noch signifikante Induktion der VEGF-Proteinexpression unter Hypoxie. A549 zeigte eine signifikante Steigerung der Proteinexpression (ca. Faktor 2) unter Hypoxie. Bei H69 war im Vergleich nur wenig VEGF nachweisbar, zeigte aber mit  $p < 0,01$  ebenfalls eine signifikante Steigerung (ca. Faktor 3) unter Hypoxie. H23-Zellen zeigten aber insgesamt eine signifikant höhere VEGF-Proteinexpression unter Hypoxie im Vergleich zu H69 und A549.

#### 4.2.5 Hypoxie induziert die m-RNA Expression von PGK, einem Zielgen der Glykolyse

Ein weiteres Zielgen von HIF-1 $\alpha$  ist PGK, dessen Peptid ein entscheidendes Enzym der Glykolyse darstellt und für die metabolische Adaptation an Hypoxie mitverantwortlich ist. Aufgrund dieser Tatsache müsste die m-RNA Expression von PGK unter Hypoxie induzierbar sein, was wir in der folgenden Untersuchung zeigen konnten.



**Abb. 18: Der Effekt von Hypoxie auf die Induktion der m-RNA Expression von PGK in H23, H69 und A549-Zellen**

Hier ist die m-RNA-Expression von PGK unter Normoxie und Hypoxie bei H23-, H69-, und A549-Zellen dargestellt. Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen

Versuchen ( $\pm$  SEM) mit \*  $p < 0,05$ .

Unter Hypoxie ist bei diesen Zellen eine signifikante Steigerung der m-RNA-Expression von PGK zu erkennen.

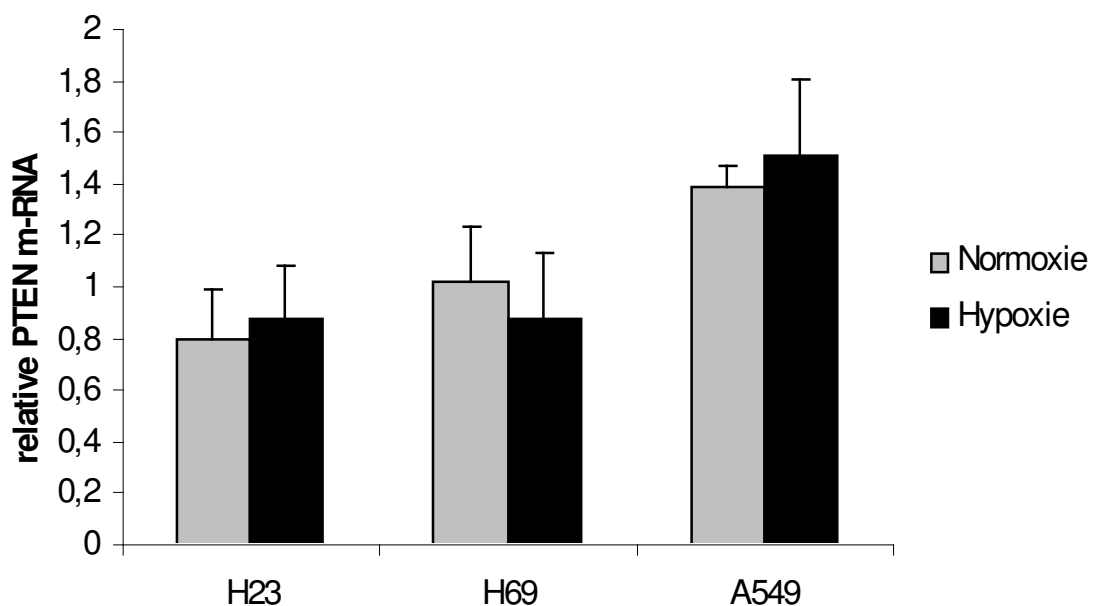
#### 4.2.6 Die m-RNA des Tumorsuppressorgens PTEN ist in H23-, H69- und A549-Zellen nachweisbar, wird aber nicht reguliert

Der Funktionsverlust oder die Mutation von Tumorsuppressorgenen spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese.

Die Rolle von PTEN als Tumorsuppressorgen (TSG) ist mehrfach belegt. Des Weiteren ist eine Mutation bzw. ein Funktionsverlust von PTEN in einigen Tumoren nachweisbar [125, 126, 127].

Studien von Zundel et al. und anderen zeigten eine Supprimierung von HIF-1 $\alpha$  und VEGF durch das „intakte“ PTEN und deren Induktion bei Funktionsverlust von PTEN in Tumorzellen [122, 123, 124]. PTEN und die weitere Signalkaskade stellen somit einen „alternativen Regulationsmechanismus“ von HIF-1 $\alpha$  dar.

Zunächst untersuchten wir, ob PTEN auf m-RNA Ebene nachweisbar ist und ob eine Regulation der m-RNA-Expression dieses Tumorsuppressorgens in den drei Tumorzelllinien vorliegt.



**Abb. 19: Darstellung der m-RNA-Expression von PTEN unter Normoxie und Hypoxie in H23-, H69- und A549-Zellen**

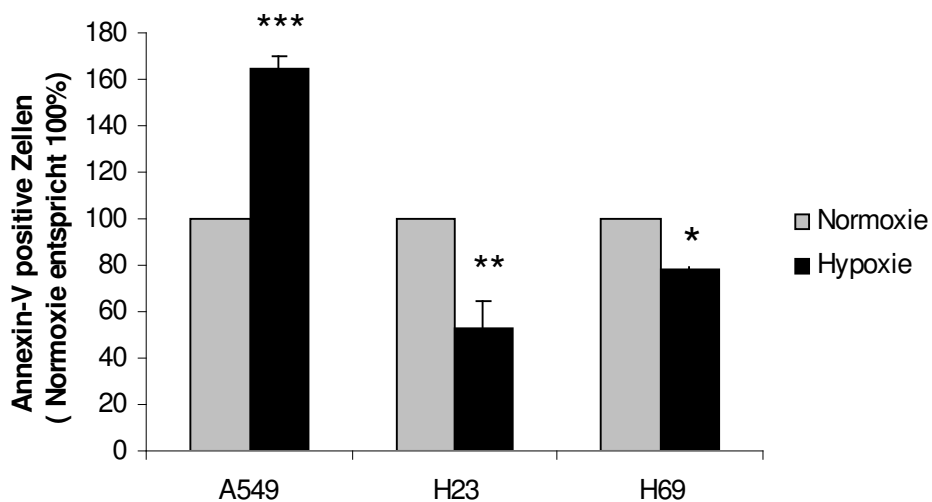
Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen Experimenten ( $\pm$  SEM).

Die Zellen wurden für 24 h in Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert. Dann erfolgte nach Extraktion der RNA mit der Phenol-Guanidinium-Thiocyanat-Methode (RNAzol) die c-DNA Synthese und im Anschluss die quantitative PCR (Taqman-PCR).

PTEN zeigte keine signifikante Induktion der m-RNA-Expression unter Hypoxie in allen drei Tumorzelllinien, das heißt PTEN wird auf m-RNA-Ebene nicht reguliert.

#### 4.2.7 Hypoxie hat bei A549- einen pro- und bei H23- und H69-Zellen einen anti-apoptotischen Effekt

Zur Ergänzung der Charakterisierung dieser Tumorzellen sollte in dieser Dissertationsschrift der Effekt der Hypoxie auf die Apoptoserate in H23-, H69- und A549-Zellen untersucht werden.



#### Abb. 20: Darstellung der Apoptoserate unter Normoxie und Hypoxie in A549, H23- und H69-Zellen

Die Zellen wurden 24 h in Normoxie und Hypoxie kultiviert, mit der Annexin-V-Fluos-Markierungslösung inkubiert und anschließend die Apoptose im FACS gemessen. Die Normoxie-Gruppe entspricht stets 100%.

Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM) mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

Entzog man den A549-Zellen den Sauerstoff, kam es zu einer hochsignifikanten Erhöhung der Apoptose-Rate von ca. 60 % mit \*\*\* $p < 0,001$ .

Im Vergleich zeigten H23-Zellen eine signifikante Reduktion der Apoptoserate von 50 % mit  $**p < 0,01$  und H69 von 20 % mit  $*p < 0,05$  unter Hypoxie.

Hypoxie hat in A549-Zellen einen pro- und in H23- und H69-Zellen einen anti-apoptotischen Effekt.

### **4.3 Die Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN hat keinen Einfluß auf die HRE-Aktivität von HIF-1 in „*transient*“ transfizierten H23-Zellen**

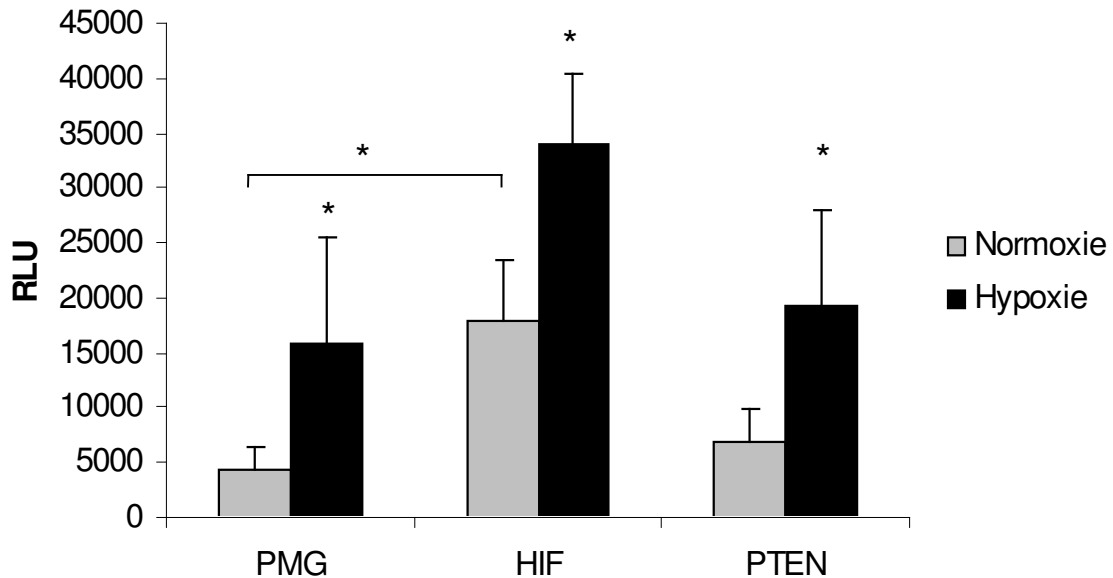
In dieser Dissertationsschrift sollte gezeigt werden, welche Rolle eine Überexpression von HIF-1 $\alpha$ , welches in einigen Tumoren überexprimiert vorliegt [67, 185], in „*transient*“ transfizierten H23-Zellen auf die Induzierbarkeit der HRE-Aktivität von HIF-1 spielt, was zur Aktivierung der Zielgene von HIF-1 führt.

Die Rolle von PTEN als Tumorsuppressorgen (TSG) ist mehrfach belegt. Des Weiteren ist eine Mutation bzw. ein Funktionsverlust von PTEN in einigen Tumoren nachweisbar [125, 126, 127].

Basierend auf der Arbeit von Zundel et al. 2000 sollte gezeigt werden, ob eine Überexpression des „intakten“ PTEN in „*transient*“ transfizierten H23-Zellen zu einer Inhibition der HRE-Aktivität von HIF-1 führt.

Hierfür wurden die Plasmide mit Hilfe von kationischen Lipiden, der Lipofektion, entsprechend dem Protokoll, mit Lipofectamin 2000™ in die H23-Zellen transfiziert (*transiente Transfektion*). Danach wurden sie entsprechend den Versuchsbedingungen für 24 h in Normoxie und Hypoxie kultiviert. Anschließend erfolgte im Reportergen Assay eine Messung der HRE-Aktivität (RLU= relative light units).

Die Überexpression sowohl von HIF-1 $\alpha$  als auch des Tumorsuppressorgens PTEN zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle PMG, einem promoterlosen Plasmid, bezüglich der Induktion / Reduktion der HRE-Aktivität unter Hypoxie.



**Abb. 21: Darstellung der HRE-Aktivität von HIF-1 bei Überexpression von HIF-1 $\alpha$  und PTEN in H23-Zellen durch „transiente“ Transfektion**  
 Die Reporter-Gen-Vektoren wurden mit Hilfe von kationischen Lipiden in die H23-Zellen transfiziert und 24 h in Normoxie und Hypoxie kultiviert. Als Kontrolle diente das promoterlose Plasmid PMG. Die Mittelwerte stammen aus fünf unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM) mit  $*p < 0,05$ .

Betrachtet man die Kontrolle PMG (ein promoterloses Plasmid), zeigt sich eine signifikante Steigerung der HRE-Aktivität in Hypoxie um ca. Faktor 3. Die mit HIF-1 $\alpha$  transfizierten Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe einen Anstieg in Normoxie um ca. Faktor 4. Der Faktor der Hypoxie-Induktion der HIF-1 $\alpha$ -Gruppe beträgt ca. 2, wie der des Tumorsuppressorgens PTEN.

Die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  zeigt, bis auf in Normoxie, keinen signifikanten Unterschied in der Steigerung der HRE-Aktivität zur Kontrolle PMG. PTEN zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Die vermutete inhibitorische Wirkung auf die HRE-Aktivität insbesondere durch PTEN (nach Zundel et al. 2000) hatte sich nicht bestätigt.

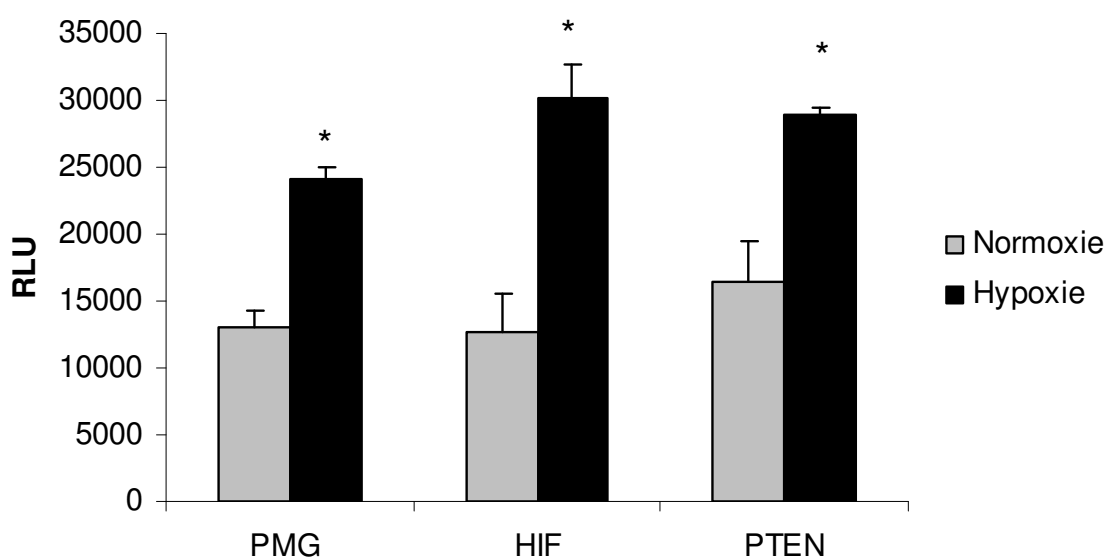
## 4.4 Betrachtung der mit HIF-1 $\alpha$ und PTEN „stabil“ transfizierten H23-Zellen

Die stabile Transfektion der H23-Zellen wurde durch einen weiteren Doktoranten in Zusammenarbeit mit Herrn PD. Dr. Jörg Hänze im Labor für Molekulargenetik im Institut für Biochemie durchgeführt.

Auch hier sollte untersucht werden, ob die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  einen steigernden bzw. PTEN, basierend auf der Arbeit von Zundel et al. 2000, einen hemmenden Einfluss auf die HRE-Aktivität sowie „downstream“ auf die m-RNA- oder Protein-Expression von VEGF hat.

### 4.4.1 Die Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN hat keinen Effekt auf die HRE-Aktivität von HIF-1 in „stabil“ transfizierten H23-Zellen

Bei den transient transfizierten H23-Zellen zeigten die Überexpression sowohl von HIF-1 $\alpha$  als auch des Tumorsuppressorgens PTEN keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (PMG) bezüglich der Induktion der HRE-Aktivität unter Hypoxie. Die Versuchsreihe wurde noch einmal mit „stabil“ transfizierten H23-Zellen wiederholt.



**Abb.22: Der Effekt der Überexpression von HIF-1 $\alpha$  und PTEN auf die HRE-Aktivität von HIF in „stabil“ transfizierten H23-Zellen**

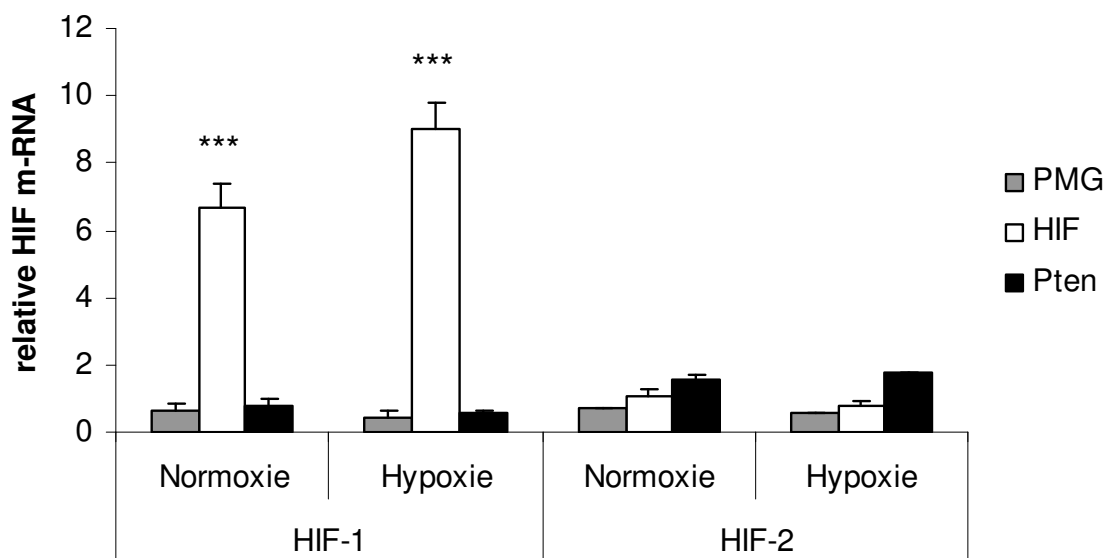
Die H23-Zellen wurden mit PMG, HIF-1 $\alpha$  und PTEN stabil transfiziert und 24 h in Normoxie und Hypoxie kultiviert.  
Als Kontrolle diente das promoterlose Plasmid PMG.  
Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM) mit  $*p < 0,05$ .

Im Vergleich zur Kontrolle PMG zeigte sich eine signifikante Steigerung der HRE-Aktivität mit  $*p < 0,05$  unter Hypoxie um ca. Faktor 2. Der Faktor der Hypoxie-Induktion der HIF-1 $\alpha$ -Gruppe betrug ebenfalls ca. 2, wie der des Tumorsuppressorgens PTEN. Im direkten Vergleich mit der Kontrolle PMG zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Das heißt die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  zeigte erneut keine signifikante Steigerung der HRE-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle PMG. PTEN zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Die vermutete inhibitorische Wirkung auf die HRE-Aktivität insbesondere durch PTEN hatte sich erneut nicht bestätigt.

#### 4.4.2 Auswirkungen der Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN auf die mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ und PTEN in „stabil“ transfizierten H23-Zellen



#### Abb. 23: Darstellung der m-RNA-Expression von HIF-1 $\alpha$ und HIF-2 $\alpha$ in H23 Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$ und PTEN „stabil“ transfiziert wurden

Die H23-Zellen wurden mit PMG, HIF-1 $\alpha$  und PTEN stabil transfiziert und 24 h in Normoxie und Hypoxie kultiviert.

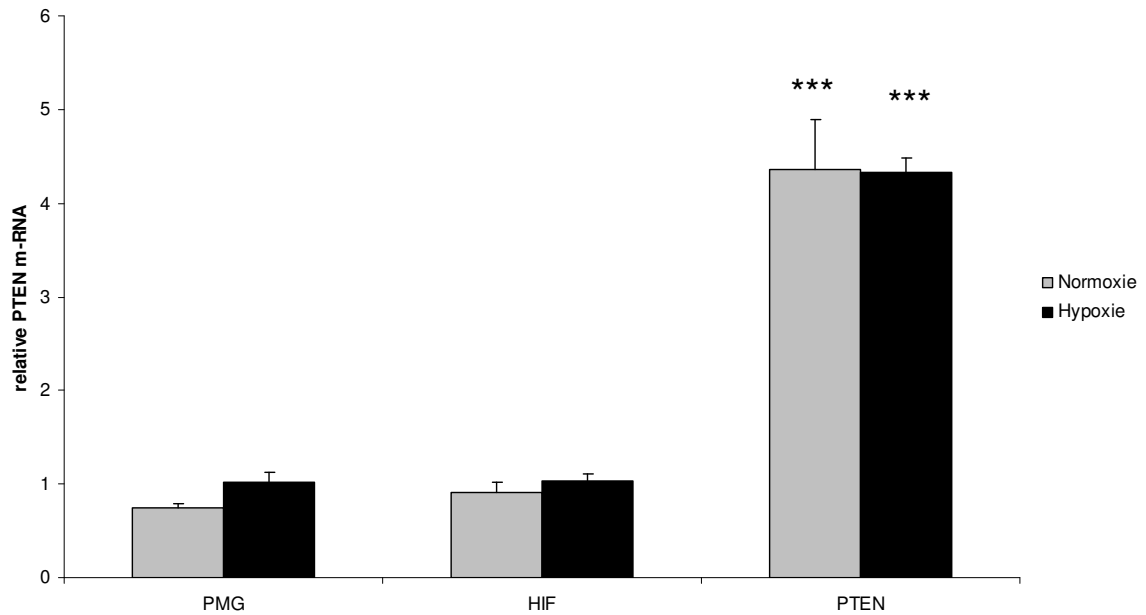
Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM) mit \*\*\* $p < 0,001$ .

PMG ist ein promoterloses Plasmid und diente als Kontrolle.

Bei den H23-Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$  „stabil“ transfiziert wurden, war die Überexpression der m-RNA sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie mit \*\*\* $p < 0,001$  hochsignifikant nachweisbar. Wie erwartet, waren HIF-1 $\alpha$  wie auch die weiteren Transkriptionsfaktoren nicht auf m-RNA-Ebene reguliert.

PTEN zeigte keinen Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren. Übersichtshalber ist HIF-3 nicht dargestellt, aber auch hier zeigte sich erneut keine Regulation auf m-RNA-Ebene.

Die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  konnte auf m-RNA-Ebene bestätigt werden.



**Abb. 24: Darstellung der m-RNA-Expression von PTEN in H23 Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$  und PTEN „stabil“ transfiziert wurden**

Die H23-Zellen wurden mit PMG, HIF-1 $\alpha$  und PTEN stabil transfiziert und 24 h in Normoxie und Hypoxie kultiviert.

Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM) mit \*\*\* $p < 0,001$ .

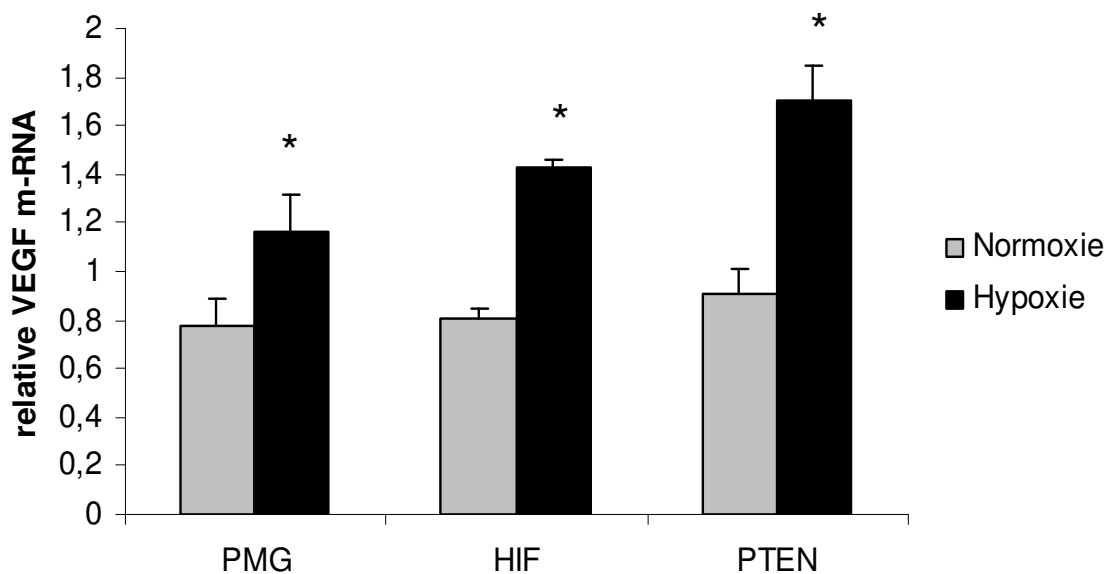
PMG ist ein promoterloses Plasmid und diente daher als Kontrolle.

Bei den H23-Zellen, die mit PTEN „stabil“ transfiziert wurden, war die Überexpression der PTEN m-RNA sowohl in Normoxie, als auch in Hypoxie hochsignifikant nachweisbar. Wie erwartet, waren diese auf m-RNA-Ebene nicht reguliert.

Die Überexpression von PTEN konnte auf m-RNA-Ebene bestätigt werden.

#### 4.4.3 Die Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN hat keinen Einfluß auf die m-RNA-Expression bei den Zielgenen VEGF und PGK in „stabil“ transfizierten H23-Zellen

Da bereits eine Hypoxie-induktion der m-RNA Expression von VEGF in H23-Zellen gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob eine Überexpression von HIF-1 $\alpha$  eine zusätzliche Steigerung und PTEN eine Reduktion der m-RNA Expression von VEGF zur Folge haben (Zundel et al. 2000).



**Abb. 25: Darstellung der m-RNA-Expression von VEGF in H23-Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$  und PTEN „stabil“ transfiziert wurden**

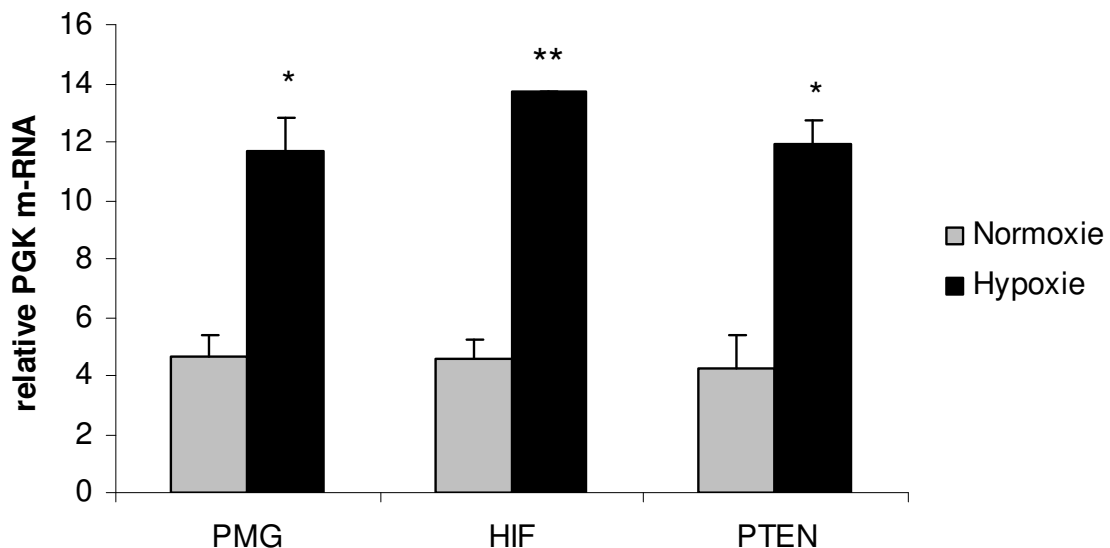
Die H23-Zellen wurden mit HIF-1 $\alpha$  und PTEN stabil transfiziert und 24 h in Normoxie und Hypoxie kultiviert. Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM) mit  $*p < 0,05$ .

PMG ist ein promoterloses Plasmid und diente daher als Kontrolle.

Alle transfizierten Zellreihen zeigten mit  $*p < 0,05$  eine Induktion der VEGF m-RNA-Expression unter Hypoxie.

Vergleicht man sie jedoch mit der Kontrolle PMG, zeigt sich kein signifikanter Unterschied unter den Versuchsgruppen, d. h. die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  führt zu keinem Anstieg und PTEN zu keiner Reduktion der m-RNA-Expression, weder unter Normoxie noch unter Hypoxie.

Da eine Hypoxie-Induktion der m-RNA-Expression von PGK in H23-Zellen gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob auch hier eine Überexpression von HIF-1 $\alpha$  eine Steigerung und PTEN eine Reduktion der m-RNA-Expression von PGK zur Folge haben.



**Abb. 26: Darstellung der m-RNA-Expression von PGK in H23-Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$  und PTEN „stabil“ transfiziert wurden**

Die H23-Zellen wurden mit HIF-1 $\alpha$  und PTEN stabil transfiziert und 24 h in Normoxie und Hypoxie kultiviert.

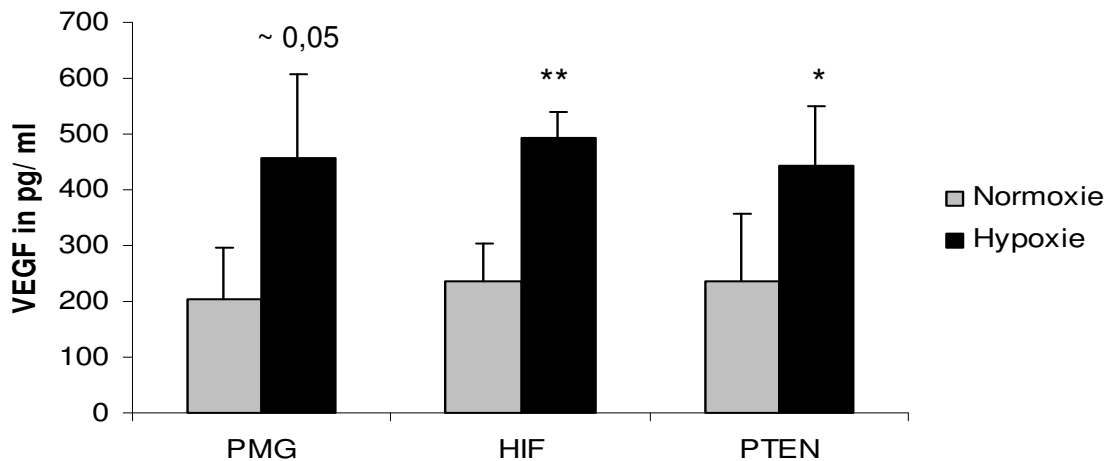
Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM) mit \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$ .

PMG ist ein promoterloses Plasmid und diente daher als Kontrolle.

Alle transfizierten Zellreihen zeigten eine signifikante Induktion der PGK m-RNA-Expression unter Hypoxie.

Vergleicht man sie mit der Kontrolle PMG, zeigt sich kein signifikanter Unterschied unter den Versuchsgruppen, d. h. die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  führt zu keinem Anstieg und PTEN zu keiner Reduktion der m-RNA-Expression von PGK, weder unter Normoxie noch unter Hypoxie.

#### 4.4.4 Die Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und PTEN hat keinen Effekt auf die Protein-Expression des Zielgens VEGF in „stabil“ transfizierten H23-Zellen



**Abb. 27: Darstellung der Protein-Expression von VEGF in H23-Zellen, die mit HIF-1 $\alpha$  und PTEN „stabil“ transfiziert wurden**

Die H23-Zellen wurden mit HIF-1 $\alpha$  und PTEN „stabil“ transfiziert und 24 h in Normoxie und Hypoxie kultiviert.

Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SEM) mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

PMG ist ein promoterloses Plasmid und diente als Kontrolle.

Alle transfizierten Zellreihen zeigten eine signifikante Induktion der Protein-Expression von VEGF unter Hypoxie.

Vergleicht man sie jedoch untereinander mit der Kontrolle PMG, zeigt sich kein Unterschied unter den Versuchsgruppen, d. h. die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  führt zu keinem Anstieg und PTEN zu keiner Reduktion der VEGF Proteinexpression, weder unter Normoxie noch unter Hypoxie.

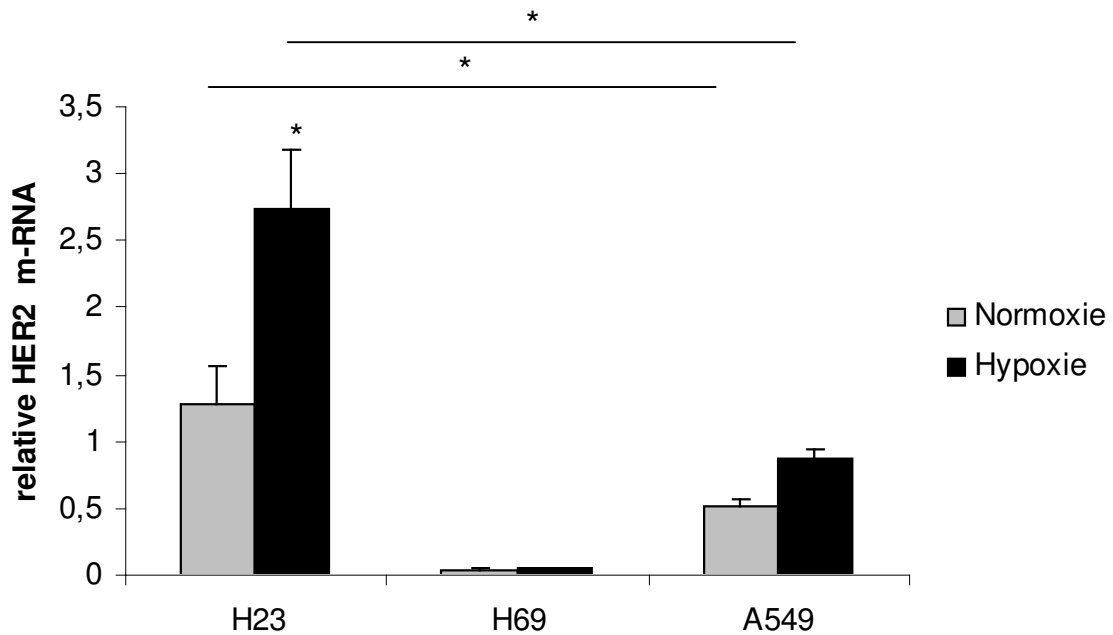
#### **4.5 Der Effekt von Hypoxie auf das Onkogen HER2(neu) in H23-, H69- und A549-Zellen**

Neben den Tumorsuppressorgenen spielt auch die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen eine wesentliche Rolle in der Tumorgenese.

Das Onkogen HER2(neu) ist in vielen humanen Adenokarzinomen amplifiziert bzw. überexprimiert, insbesondere im Mammakarzinom [164], in Magen-[178] und Lungentumoren (NSCLC) [195].

Die Arbeit von Semenza et al. 2001 belegte einen weiteren „alternativen Regulationsmechanismus“ durch HER2(neu), ein Onkogen, das ebenfalls über die PI3-Kinase-Kaskade downstream über AKT und FRAP zu einer Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression und der VEGF-Expression führt [164]. Die Arbeitsgruppe von Yan M. Li et al. konnte 2005 ebenfalls eine Steigerung der Translationsaktivität HIFs via der PI3-Kinase und AKT in HER2(neu) überexprimierten Mammakarzinom-Zelllinien unabhängig von Hypoxie zeigen, was zu einer O<sub>2</sub>-unabhängigen Induktion der VEGF-Expression führte [163].

Zunächst untersuchten wir, ob HER2(neu) auf m-RNA-Ebene nachweisbar ist und ob eine Regulation der m-RNA-Expression dieses Onkogens in den drei Tumorzelllinien unter Hypoxie vorliegt.



**Abb. 28: Darstellung der relativen HER2(neu) m-RNA-Induktion in H23-, H69- und A549-Zellen unter Einfluss von Hypoxie**

Die Zellen wurden 24 h unter Normoxie und Hypoxie kultiviert.

Dann erfolgte nach Extraktion der RNA mit der Phenol-Guanidinium-Thiocyanat-Methode (RNAzol), die c-DNA-Synthese und im Anschluss die Quantitative PCR (Taqman-PCR).

Die Mittelwerte stammen aus vier unabhängigen Experimenten ( $\pm$  SEM) mit  $*p < 0,05$ .

Die H23-Zellen zeigten eine signifikante Induktion der m-RNA-Expression unter Hypoxie, die in H69- und A549-Zellen nicht nachweisbar war. HER2(neu) war bei H69-Zellen (SCLC) nur minimal exprimiert.

Die HER2(neu) m-RNA-Expression war bei H23- signifikant höher als bei A549- und hochsignifikant höher als bei H69-Zellen.

## 5. Diskussion

Grundlage dieser Studie war die Charakterisierung der humanen, pulmonalen Tumorzelllinien A549 und H23 (NSCLC) sowie H69 (SCLC) bezüglich der Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ , des angiogenetischen Faktors VEGF, des zentralen Enzyms der Glykolyse PGK, des Tumorsuppressorgens PTEN und des Tumoronkogens HER2(neu) und der Apoptoserate unter Normoxie und Hypoxie. Im Mittelpunkt der Arbeit stand HIF-1 $\alpha$  und dessen Einfluss auf das Zielgen VEGF, das eine entscheidende Schlüsselrolle in der Angiogenese und somit Adaptation an Tumorphypoxie spielt.

Die Entstehung der Tumorphypoxie liegt vor allem in der schnellen Proliferation des Tumorgewebes begründet. Die Tatsache, dass Tumore nur bis zu einer Größe von 100-200  $\mu\text{m}$  allein durch Diffusion versorgt werden können, macht deutlich, dass das Wachstum solider Tumoren von einer ausreichenden Angiogenese abhängig ist [89]. Ein niedriger O<sub>2</sub>-Partialdruck (pO<sub>2</sub>) ist daher ein typisches Charakteristikum beinahe aller Formen solider Tumoren, einschließlich des Gehirns, Colons, Brust, Cervix, Prostata, Kopfes und Halses [6]. Gut erforscht ist der Zusammenhang, dass fast alle Tumore einen niedrigeren medianen pO<sub>2</sub> haben als das ursprüngliche Gewebe. Messungen der Oxygenierung mittels Mikroelektroden ergaben einen durchschnittliche Sauerstoffpartialdruck von etwa 40-50 mmHg in „normalem“ Gewebe im Vergleich zu Werten um 5-10 mmHg und weniger, die in Tumorzellen gemessen wurden [156, 157]. Zusätzlich zeigten klinische Studien, dass in einigen Fällen das invasive Wachstum und die metastatische Streuung mit dem Grad der Tumorphypoxie assoziiert sind [158, 159]. Dies macht deutlich, dass eine Adaptation an Hypoxie für die weitere Tumorprogression von entscheidender Bedeutung und klinisch-therapeutischer Relevanz ist.

Die Identifizierung von HIF-1 als Hauptregulator der O<sub>2</sub>-abhängigen Genexpression war ein erster großer Schritt in der Analyse des Mechanismus, welcher der Adaptation an hypoxische Bedingungen zu Grunde liegt.

Mehr als 100 Zielgene wurden bisher identifiziert und die Anzahl scheint weiter zu steigen [206]. Die Bindung von HIF-1 an das HRE führt zur gezielten Überexpression von verschiedenen Genen und deren Proteinen, welche die Antwort des Organismus auf systemischer, lokaler und zellulärer Ebene, insbesondere unter hypoxischen Bedingungen, regulieren [5, 7]. Diese Zielgene spielen insbesondere in der Tumorgenese und Tumorprogression eine entscheidende Rolle, da deren Proteine einen Einfluss auf die Erythropoese [67], Angiogenese [68], das Zellwachstum und Proliferation [142], Glykolyse zur anaeroben Energiegewinnung [69], Glukose-Transporter [70, 71], Eisen- und Energie-Metabolismus und die Apoptose haben [67].

Es ist bereits mehrfach belegt, dass die HIF-1 $\alpha$ -Induktion in Hypoxie entscheidend durch intrazelluläre Stabilisierung entsteht. Dies erfolgt aufgrund einer Blockade der O<sub>2</sub>-abhängigen Hydroxylierung via PHD (Prolylhydroxylase) und dem damit ausbleibenden Abbau über das Ubiquitin-Proteosom-System via pVHL (Genprodukt des von Hippel-Lindau), was zur Kumulation der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit führt [12, 13, 14]. Danach transloziert die phosphorylierte  $\alpha$ -Untereinheit, unabhängig von der  $\beta$ -Untereinheit, in den Zellkern, dimerisiert mit HIF-1 $\beta$  und der daraus resultierende HIF-1-Komplex bindet an eine spezifische Basensequenz, das hypoxia responsive element (HRE) [15, 23], welches bei vielen hypoxie-adaptiven Genen in der Promoterregion vorhanden ist. Dies führt zur transkriptionellen Aktivierung zahlreicher Zielgene und damit zu einer Adaptation an die Hypoxie.

### **Der Einfluss von Hypoxie auf HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ und HIF-3 $\alpha$**

Vor dem Hintergrund der gegenwärtigen Forschung sollte zunächst untersucht werden, welchen Einfluss die Hypoxie auf die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  in den Tumorzelllinien A549, H23 (NSCLC) und H69 (SCLC) hat. Auch ich konnte eine deutliche Induktion der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression unter Hypoxie in allen Tumorzelllinien im Western Blot zeigen.

Untersuchungen in dieser Arbeit zur m-RNA-Expression in Normoxie und Hypoxie in A549, H23 und H69-Zellen zeigten jedoch, dass die Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  auf m-RNA-Ebene nicht reguliert werden, was erneut belegt, dass die HIF-1 $\alpha$ -Induktion in Hypoxie entscheidend durch intrazelluläre

Stabilisierung und damit einhergehender Kumulation und nicht durch gesteigerte Transkriptionsraten entsteht. Dass die Transkriptionsfaktoren auf m-RNA-Ebene nicht reguliert werden, konnte unter anderem durch Huang et al. 1996 und viele andere bestätigt werden [11, 7, 161]. Es gibt jedoch eine Arbeitsgruppe, die eine gesteigerte m-RNA bei HIF-3 $\alpha$  nach zwei Stunden postuliert – wie ist bisher nicht bekannt und bedarf weiterer Analysen [39]. Weitere Untersuchungen durch Ushida et al. 2004 beschreiben eine HIF-1 $\alpha$  m-RNA-Regulation unter prolongierter Hypoxie. Diese wird vermutlich durch eine anti-sense m-RNA vermittelt [205]. Des Weiteren haben Hänze und Rose et al. 2003 ein Modell zur differentiellen Regulation der HIF-1 $\alpha$  m-RNA etabliert. Durch Transfektion einer si-RNA konnte eine Inhibition der m-RNA in A549-Zellen gezeigt [204] werden. Dieser Mechanismus der HIF-1 $\alpha$  m-RNA-Regulation bedarf aber weiterer Analysen.

Bei H23-Zellen war das HIF-1 $\alpha$ -Protein bereits in Normoxie im Western Blot nachweisbar, welches normalerweise unter Normoxie nicht nachweisbar ist [14], da es nach Hydroxylierung zweier Prolin-Reste durch die Prolylhydroxylase (PHD) (und Acetylierung durch ARD1 [44] ) innerhalb der ODD-Domäne [16, 17] und anschließend über eine E3-Ubiquitin-Ligase (E3-UL) mit dem von Hippel Lindau Protein (pVHL) als Erkennungskomponente gebunden und durch Ubiquitinierung und nachfolgende proteosomale Lyse abgebaut wird [13, 11, 15].

Dies lässt darauf schließen, dass es „alternative Regulationsmechanismen“ zur Stabilisierung und / oder Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  in H23-Zellen in Normoxie geben muss.

Beispiele für „alternative Signaltransduktionswege“, die zur Stabilisierung und / oder Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  in Normoxie führen, sind:

1. **Wachstumsfaktoren** (growth factors/ GF): epidermal growth factor (EGF) [49], der platelet-derived growth factor (PDGF) [50], der transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) [50] IGF1 und IGF2 (insulin-like growth factors) [52] und Insulin [52]
2. **Zytokine**: TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor) [53], Interleukin-1 $\beta$  (Il-1 $\beta$ ) [51], sowie NO [162]
3. **Mutation/ Funktionsverlust von Tumorsuppressogenen**: z.B. PTEN [122, 123, 124]

#### 4. **Aktivierung von Onkogenen:** z.B. Her2(neu) [164] und Ras [160].

Der Regulationsmechanismus ist im Einzelnen nicht komplett verstanden und bedarf weiterer Untersuchungen. Man geht davon aus, dass diese Faktoren sich an ihrem zellgebundenen Rezeptor (receptor tyrosin kinases / RTK) binden, was eine Phosphorylisationskaskade in Gang setzt. Es existieren hauptsächlich zwei phosphorylierende Kaskaden die zu einer Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  führen, die MAPK und die PI3-K-Kaskade [49, 54, 55, 56].

#### **Der Effekt von Hypoxie / HIF-1 auf den angiogenetischen Faktor VEGF**

Weiterer Gegenstand dieser Arbeit war der Effekt der Hypoxie und HIF-1 $\alpha$  auf das Zielgen VEGF. Hier konnte ich eine signifikante Hypoxie-Induktion der m-RNA- und Protein-Expression von VEGF in allen drei Tumorzelllinien darstellen. Das Zielgen VEGF wird auf m-RNA- und Protein-Ebene unter Hypoxie hochreguliert. Im Vergleich der Zelllinien untereinander zeigte sich eine signifikant höhere Proteinexpression in Normoxie bei H23-Zellen, um den Faktor 2 höher als bei A549 und um den Faktor 7 höher als bei H69-Zellen. Dies ist vermutlich auf die erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Expression in Normoxie zurückzuführen, die im Western Blot nachzuweisen war. Im direkten Vergleich der Tumorzelllinien gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Induktion der VEGF-Proteinexpression unter Hypoxie. Vermutlich ist aufgrund der hohen Basalrate von VEGF in Normoxie bei H23 keine weitere signifikante Steigerung der Proteinexpression unter Hypoxie, als Zeichen eines „steady states“, möglich.

Vergangene korrespondierende Untersuchungen zeigten, dass Hypoxie die VEGF m-RNA-Expression induziert, zum einen durch erhöhte Transkription, zum anderen durch verminderte m-RNA-Degradation [104, 105, 106]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor VEGFR-1 ebenfalls hypoxie-induzierbar ist, so dass das Endothel maximal rezeptiv auf die VEGF-Stimulation unter Hypoxie reagieren kann [83].

VEGF ist das meistuntersuchte und wichtigste Zielgen von HIF-1; es rekrutiert Endothelzellen in hypoxisches oder avaskuläres Gewebe und stimuliert deren Proliferation, es steigert die Permeabilität insbesondere tumor-assoziiertes Gefäße, es ist das potenteste endothelspezifische Mitogen, der wichtigste

Promoter der Angiogenese und spielt eine Rolle in der Regulation der Vaskulogenese und Neoangiogenese [73, 74, 75].

### **Der Einfluss von Hypoxie / HIF-1 auf das Zielgen der Glykolyse PGK**

Des Weiteren wurde der Einfluss von Hypoxie auf das Zielgen der Glykolyse PGK, ein wichtiges Enzym, das der O<sub>2</sub>-unabhängigen Energiegewinnung dient und damit für die metabolische Adaptation unter Hypoxie in Tumorzellen mitverantwortlich ist, untersucht.

Auch hier konnte eine signifikante Induktion der PGK m-RNA-Expression unter Hypoxie in allen drei Tumorzelllinien gezeigt werden. Signifikante Unterschiede in der m-RNA-Expression zwischen den Zellen waren nicht zu beobachten.

Semenza et al. und andere konnten beweisen, dass nahezu alle Enzyme der Glykolyse sowie die Glukose-Transporter durch HIF-1 reguliert werden [70, 71, 67].

### **Hypoxie, HIF-1 und Apoptose**

Da HIF durch Aktivierung seiner Zielgene eine überwiegend protektive Wirkung hat und daher zum Überleben der (Tumor-)Zellen beiträgt, wurde HIF eine anti-apoptotische Wirkung zugesprochen. Dem gegenüber steht, dass Hypoxie und noch stärker HIF-1 $\alpha$  nach dem heutigen Kenntnisstand pro- und anti-apoptotische Effekte ausüben, die nach wie vor kontrovers diskutiert werden [183]. Im Fokus des Interesses ist das Zusammenspiel zwischen HIF-1 und dem Tumorsuppressorgen p53, einem pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor und wichtigen Regulator des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose, der ebenfalls durch Hypoxie und / oder DNA-Schädigung induziert und aktiviert wird [154].

Eine vorangegangene Arbeit von Krick und Rose et al. konnte in A549 eine signifikante Steigerung der Apoptose unter Hypoxie und eine pro-apoptotische Wirkung von HIF-1 $\alpha$  belegen [192]. Eine Induktion der Apoptose unter Hypoxie konnte auch in anderen Zelltypen beschrieben werden [152, 183]. Eine signifikante Korrelation konnten auch Volm et al. 2000 zwischen HIF-1-Expression und der Induktion der Apoptose in nichtkleinzelligen Lungentumoren (NSCLC) belegen [187].

Auf dieser Basis folgten weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Hypoxieeffektes auf die Apoptoserate in H23-, A549- und H69-Zellen.

Während in der vorliegenden Arbeit A549-Zellen in Korrespondenz zur Arbeit von Krick, Rose et al. eine hochsignifikante Steigerung der Apoptose um 60% unter Hypoxie zeigten, führte der Sauerstoffentzug bei H23-Zellen zu einer signifikanten Inhibition der Apoptoserate um 50% und in H69-Zellen zu einer signifikanten Inhibition um 20%. Das bedeutet, dass Hypoxie / HIF-1 bei A549 eine pro- und bei H23 und H69 eine anti-apoptotische Wirkung zeigte. Auch hier stellte sich erneut die Frage, ob Hypoxie bzw. HIF nun einen pro- oder einen anti-apoptotischen Faktor darstellt.

Es konnten bisher zwei Abläufe gezeigt werden, die ein Induzieren der Apoptose durch HIF-1 $\alpha$  nachweisen. Zum einen konnten Bruick et al. und ergänzend Sowter et al. zeigen, dass Hypoxie einen Anstieg von Nip3 und NIX, beides pro-apoptotische Proteine aus der Bcl-2-Familie, verursacht. Des Weiteren konnte in HIF-1 $\alpha$  defizienten Zellen Nip3 nicht nachgewiesen werden. Außerdem konnten Bruick et al. eine aktive HRE-Region im Nip3-Promotor zeigen, die in Hypoxie die Bildung von HIF-1 $\alpha$  erzeugt [152, 153]. Zum anderen wird in Hypoxie das Tumorsuppressorprotein p53 stabilisiert [154]. p53 ist ein hochaktiver pro-apoptotischer Transkriptionsfaktor, dessen Zielgene Apoptose verursachen, und zwar durch Transaktivierung pro-apoptotischer Proteine des mitochondrialen Signalapparates z.B. die Bcl-2 Proteine, Bax, Bak, Puma, Noxa oder Caspase-9 und Apaf-1 oder Proliferationsstopp sowie durch Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren wie p21 [142].

Die Hypothese, dass sowohl extreme Hypoxie bis hin zur Anoxie ( $pO_2 < 1\%$ ) als auch eine prolongierte Hypoxie ( $> 24$  h) eine entscheidende Rolle in der Interaktion zwischen HIF und p53 zu spielen scheinen und zur gesteigerten Apoptose führen, stellt in den vorliegenden Versuchen kein Erklärungsmodell dar, da stets identische Parameter (Hypoxie mit  $pO_2 1\%$  und  $t = 24$  h) in allen Versuchsreihen herrschten und stets kontrolliert wurden.

Aufgrund unserer Ergebnisse bestand eine plausible Erklärung, nämlich dass p53 in A549 intakt und in H23- und H69-Zellen mutiert bzw. funktionslos vorliegt. Dies konnte später durch die Arbeit von Yokota und Kollegen 2004 belegt werden [184].

### **Auswirkung einer HIF-1 $\alpha$ -Überexpression in H23-Zellen**

Da in einigen Tumoren HIF-1 $\alpha$  überexprimiert vorliegt [67, 185], folgten zusätzlich Untersuchungen zur Auswirkung einer Überexpression von HIF-1 $\alpha$  auf die HRE-Aktivität und das Zielgen VEGF durch transient, aber auch stabil transfizierte H23-Zellen. Hierzu folgten Gentransferversuche mit Hilfe von kationischen Lipiden, in denen H23-Zellen mit HIF-1 $\alpha$  transient transfiziert wurden. Ebenso wurden stabile Transfektionen von H23-Zellen mit HIF-1 $\alpha$  durchgeführt. Ein weiterer direkter Vergleich zwischen den nichtkleinzelligen H23 (NSCLC) und den kleinzelligen pulmonalen Tumorzellen H69 (SCLC) war aufgrund insuffizienter Transfektionsergebnisse der H69-Zellen nicht mehr möglich.

Die Überexpression der HIF-1 $\alpha$  m-RNA war hochsignifikant nachweisbar, zeigte aber keine signifikante Steigerung der HRE-Aktivität unter Hypoxie im Reporter-gen-Assay, sowohl bei transient als auch stabil transfizierten H23-Zellen. Es gab keinen signifikant steigernden Effekt auf die VEGF m-RNA-, PGK m-RNA- und VEGF-Proteinexpression in stabil transfizierten H23-Zellen.

Da HIF-1 $\alpha$  bereits in Normoxie bei H23 nachweisbar war und offensichtlich bereits überexprimiert vorlag, schien trotz weiterer Expressionssteigerung durch Transfektion (Überexpression) keine weitere Induktionssteigerung der HRE-Aktivität und der Zielgene VEGF und PGK, als Zeichen eines „steady states“, möglich.

### **PTEN - ein „alternativer Regulationsmechanismus“ von HIF-1 $\alpha$ ?**

Neben den oben genannten Wachstumsfaktoren und Zytokinen führen insbesondere auch die Aktivierung von Tumoronkogenen und die Mutation bzw. der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen zu einer alternativen Regulation, die zu einer Stabilisierung bzw. Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  in Normoxie führt, durch Aktivierung der MAPK und / oder PI3-K-Kaskade, welches einen weiteren Faktor der Tumorprogression darstellt [5, 7, 49, 142].

Insbesondere die Studien von Zundel et al. in 2000 zeigten, dass PTEN, ein Tumorsuppressorgen, eine Supprimierung von HIF-1 $\alpha$  und VEGF in Tumorzellen durch indirekte Inaktivierung von AKT „downstream“ der PI3-Kinase bewirkt [122]. PTEN inhibiert die Signalkaskade der PI3-Kinase, während Mutation oder Funktionsverlust zur Steigerung von HIF-1 $\alpha$  führt [122, 123, 124].

PTEN wurde 1997 von zwei wissenschaftlichen Arbeitsgruppen gleichzeitig als Tumorsuppressorgen identifiziert und ist am langen Arm des Chromosom 10 (10q23) lokalisiert [108, 109]. Eine Mutation bzw. ein Funktionsverlust von PTEN ist in einigen Tumoren nachweisbar [125, 126, 127]. PTEN und die weitere Signalkaskade stellen somit einen „alternativen Regulationsmechanismus“ von HIF-1 $\alpha$  dar.

Auf dieser Basis folgte in der vorliegenden Arbeit eine weitere Charakterisierung der A549-, H23- (NSCLC) und H69-Zellen (SCLC) bezüglich des Tumorsuppressorgens PTEN, wobei die auf der Arbeit von Zundel et al. basierende Inhibition der PI3-K-Kaskade von besonderem Interesse war.

Es konnte die m-RNA von PTEN in allen drei Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Hypoxie führte nicht zur Induktion der m-RNA-Expression, das heißt das Tumorsuppressorgen PTEN wird auf m-RNA-Ebene nicht reguliert. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumorzelllinien.

Unsere Hypothese, dass PTEN möglicherweise „nicht“ intakt bzw. funktionslos in H23-Zellen vorliegen könnte, was zur Steigerung von HIF-1 $\alpha$  und VEGF via PI3-Kinase-Weg in Normoxie führt, (Zundel et al.) stellte eine mögliche Erklärung für den Nachweis des HIF-1 $\alpha$ -Proteins in Normoxie im Western Blot dar. Sollte diese Hypothese stimmen, müsste die Transfektion des „intakten“ PTENs in H23-Zellen zu einer Supprimierung von HIF-1 $\alpha$ , der HRE-Aktivität und der VEGF-Expression führen.

Es folgten Gentransferversuche mit Hilfe von kationischen Lipiden, in denen H23-Zellen mit PTEN transient transfiziert wurden. Ebenso wurden stabile Transfektionen von H23-Zellen mit PTEN durchgeführt.

Ein weiterer direkter Vergleich zwischen den nichtkleinzelligen H23 (NSCLC) und den kleinzelligen pulmonalen Tumorzellen H69 (SCLC) war aufgrund insuffizienter Transfektionsergebnisse der H69-Zellen nicht mehr möglich.

Die Ergebnisse der Gentransferversuche mit PTEN in H23-Zellen zeigten, dass die auf der Arbeit von Zundel et al. 2000 basierende Inhibition HIFs durch indirekte Inhibition der PI3-K-Kaskade durch PTEN zumindest in H23-Zellen keine Rolle zu spielen scheint, da keine signifikante Inhibition der HRE-Aktivität unter Hypoxie im Reporteragen-Assay, sowohl bei transient als auch stabil transfizierten H23-Zellen, nachweisbar war.

Weiterführend gab es „downstream“ keinen inhibitorischen Effekt auf die VEGF m-RNA-, PGK m-RNA- und VEGF-Proteinexpression in stabil transfizierten H23-Zellen. Die Überexpression von PTEN war auf m-RNA-Ebene hochsignifikant nachweisbar und konnte somit bestätigt werden. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass PTEN in H23-Zellen „intakt“ vorliegt, welches durch die Arbeit von Yokota und Kollegen 2004 belegt wurde [184].

### **HER2(neu) - ein „alternativer Regulationsmechanismus“ von HIF-1 $\alpha$ ?**

Die Arbeit von Semenza et al. belegte 2001 einen weiteren „alternativen Regulationsmechanismus“ durch HER2(neu), ein Onkogen, das ebenfalls über die PI3-Kinase-Kaskade downstream über AKT und FRAP zu einer Steigerung von HIF-1 $\alpha$  und der VEGF-Expression führt. Diese Arbeit konnte zeigen, dass HER2(neu) zu einer Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinsynthese (bei unveränderter Transkription) führt und keine Blockade der O<sub>2</sub>-abhängigen Hydroxylierung via PHD (Prolylhydroxylase), was zum Abbau über das Ubiquitin-Proteosom-System via pVHL (Genprodukt des von Hippiel-Lindau) führt, bewirkt [164].

Die Arbeitsgruppe von Yan M. Li. et al. konnte 2005 ebenfalls eine Induktion der Proteinexpression von HIF, durch Steigerung der Translationsaktivität via der PI3-Kinase und AKT in HER2(neu) überexprimierten Mammakarzinom-Zelllinien unabhängig von Hypoxie, zeigen, was zu einer O<sub>2</sub>-unabhängigen Induktion der VEGF Expression führte [163].

HER2(neu), aber auch EGFR, Genamplifikation und Proteinüberexpression finden sich in unterschiedlicher Frequenz auch in zahlreichen anderen epithelialen Tumoren und spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und Tumorprogression [163, 164, 165], wobei unterschiedliche Autoren zu den verschiedenen Tumoren unterschiedliche Amplifikationsfrequenzen beschreiben.

Während in den letzten Jahren zahlreiche Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass zumindest für das Mammakarzinom eine HER2(neu)-Überexpression bzw. eine HER2-Amplifikation mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [164, 173, 174, 172], wird dieser Zusammenhang in nicht kleinzelligen Lungentumoren bzw. im Adenokarzinom der Lunge noch kontrovers diskutiert und bedarf weiterer Untersuchungen [166].

Hierauf stützend folgten Untersuchungen zur HER2(neu) m-RNA-Expression unter Normoxie und Hypoxie in A549-, H23- und H69-Zellen.

H69-Zellen (SCLC) zeigten im Vergleich zu H23- und A549-Zellen (NSCLC) eine sehr geringe m-RNA-Expression. Während HER2(neu) in A549 und H69 auf m-RNA-Ebene nicht reguliert wird, konnte eine signifikante Induktion der m-RNA-Expression unter Hypoxie in H23 bestätigt werden. Zudem zeigten H23-Zellen, sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie, eine signifikant höhere m-RNA-Expression als A549 und sogar eine hochsignifikant höhere m-RNA-Expression als H69. Eine Überexpression von HER2(neu) könnte Hypoxie unabhängig über die PI3-Kinase „downstream“ zu einer Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinsynthese (bei unveränderter Transkription) in H23-Zellen führen (Semenza et al. 2001 und Yan M. Li. et al. 2005), was aber durch weitere Untersuchungen bestätigt werden muss.

In dieser Dissertationsschrift konnte dargestellt werden, dass HIF-1, als Hauptregulator der O<sub>2</sub>-abhängigen Genexpression, durch Aktivierung seiner Zielgene, eine Schlüsselrolle in der Angiogenese und der O<sub>2</sub>-unabhängigen Energiegewinnung (Glykolyse) spielt, was zur Adaptation an Tumorphypoxie führt und einen wesentlichen Faktor in der Tumorprogression darstellt.

Zudem liegt HIF-1 $\alpha$  in verschiedenen humanen Tumorarten überexprimiert vor, was dessen Rolle in der Tumorgenese und Tumorprogression unterstreicht [67, 185]. Immunhistochemische Analysen humaner Tumorbiopsien zeigten eine deutliche Überexpression von HIF-1 [98] und waren zudem assoziiert mit VEGF-Expression und Vaskularisation [99, 100]. Untersuchungen konnten die Vermutung unterstreichen, dass der Verlust der HIF-1-Aktivität negativ mit Tumorwachstum und Angiogenese und umgekehrt korreliert [101, 99]. VEGF-Überexpression in verschiedenen Tumoren korreliert mit hoher Vaskularität, Lymphknoten-Metastasen, Lebermetastasen sowie ungünstigerer Prognose als VEGF-negative Tumore und zeigt des Weiteren einen direkten Zusammenhang zwischen Angiogenese und Metastasierung in verschiedenen Tumorarten, wie Melanome, Gliome, Lungen-Ca, Blasen und Prostata-Ca [102, 103, 185, 67].

Darüber hinaus schreiben Volm et al. der HIF- $\alpha$ -Überexpression eine prognostische Relevanz in nicht kleinzelligen Lungentumorzellen (NSCLC) [187] zu.

Sowohl diese Daten als auch die Tatsache, dass HIF-1 $\alpha$  in der Resistenzentwicklung verschiedener Chemo- und Strahlentherapien beteiligt zu sein scheint [188, 189], macht HIF-1 zu einer wichtigen Zielscheibe künftiger Therapieansätze.

Eine Inhibition von HIF, z.B. durch HIF-1 $\alpha$ -antisense-Therapie, könnte eine Verbesserung der Chemo- oder Strahlentherapie bewirken. Sun et al. 2001 konnten in vivo im Rahmen einer HIF-1 $\alpha$ -antisense-Therapie durch direkte intratumorale Injektion eine Inhibition des Tumorwachstums nachweisen [191].

Hinsichtlich des komplexen Regulationsmechanismus von HIF und dessen unzähligen Interaktionen mit verschiedensten Zielgenen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteinkinasen, Tumorsuppressorgenen und Onkogenen bietet dieser Transkriptionsfaktor mehrere Interventionsmöglichkeiten, die zu verschiedenen zielgerichteten Therapiansätzen führen könnten.

Eine dieser Interventionsmöglichkeiten konnte durch genetische Inhibierung der Interaktion zwischen der Transaktivationsdomäne HIFs (TAD) und dessen co-Transaktivator CBP / p300 durch Kung et al. 2000 im xenograft-Mäusemodell gezeigt werden, was zur Reduktion der hypoxieabhängigen Genexpression und damit zur Hemmung des Tumorwachstums führte [190]. Dies konnte weiterführend durch die Arbeit von Freedmann und Kollegen 2002 untermauert werden [182].

Ein weiterer gentherapeutischer Ansatz stellt das kürzlich entdeckte YC-1 dar, welches, wenn auch bisher noch nicht vollständig verstanden, zur Reduktion des HIF-1 $\alpha$ -Spiegels führt [67].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und bereits vorhandene Daten machen deutlich, dass HIF eine Zielscheibe der künftigen molekulargenetischen Antikrebstherapie darstellen wird. Daher sind weitere Untersuchungen zum besseren Verständnis der Regulationsmechanismen HIF-1 $\alpha$  von immenser Bedeutung, um diese neuen Therapieansätze („targeted therapy“) zu verwirklichen und zu etablieren.

Ein monoklonaler Antikörper gegen das Zielgen VEGF namens Bevacizumab (Avastin®) ist bereits Gegenstand mehrerer klinischer Studien (ECOG und AVAIL 2008), in denen der Angiogenese-Hemmer bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC mit üblichen Standard-Chemotherapien kombiniert wird [200].

## 6. Zusammenfassung

Die Karzinogenese ist ein multi-komplexer Prozess, der durch DNA-Schädigung bzw. Mutation, Überexpression von Onkogenen und / oder Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen zu einer dysregulierten Zellproliferation führt. Aus dieser schnellen, dysregulierten Proliferation des Tumorgewebes resultiert Tumorchypoxie. Die Tatsache, dass Tumore nur bis zu einer Größe von 100-200  $\mu\text{m}$  allein durch Diffusion versorgt werden können, macht deutlich, dass das Wachstum solider Tumoren von einer ausreichenden Angiogenese abhängig ist. Der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1), ein Heterodimer bestehend aus HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ , wird bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck induziert und wirkt als Hauptregulator durch Aktivierung seiner Zielgene für die Anpassung von Tumorzellen an Hypoxie, was ihm eine Schlüsselrolle in der Tumorprogression zuschreibt.

Grundlage dieser Dissertation war die Charakterisierung des Hypoxieeffektes in humanen, pulmonalen Tumorzelllinien A549 und H23 (NSCLC) sowie H69 (SCLC) bezüglich der Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ , des Zielgens der Angiogenese VEGF, des Zielgens der Glykolyse PGK und der Apoptose.

Die Zelllinien A549 und H23 (NSCLC) und H69 (SCLC) lassen sich zusammenfassend wie folgt charakterisieren:

Hypoxie führt zu einer Induktion der Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  im Western Blot in allen drei Zelllinien. HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  werden auf m-RNA-Ebene nicht reguliert. Der angiogenetische Faktor VEGF und das Enzym der Glykolyse PGK werden unter Hypoxie signifikant induziert. Hypoxie hat in A549-Zellen einen pro-apoptotischen Effekt, da das Tumorsuppressorgen P53, ein hochaktiver Transkriptionsfaktor, dessen Zielgene Apoptose durch Transaktivierung pro-apoptotischer Proteine des mitochondrialen Signalapparates aktivieren, in A549-Zellen intakt vorliegt [184]. In H23- und H69-Zellen hat Hypoxie einen anti-apoptotischen Effekt, da P53 mutiert vorliegt [184]. Die Tatsache, dass das HIF-1 $\alpha$ -Protein nur bei H23-Zellen in Normoxie nachweisbar war und signifikant höhere VEGF-Proteinspiegel im Vergleich zu H69- und A549-Zellen unter Normoxie und Hypoxie im ELISA messbar waren, führte zu Untersuchungen von

möglichen „alternativen Regulationsmechanismen“ von HIF-1 $\alpha$  am Beispiel des Tumorsuppressorgens PTEN und dem Onkogen HER2(neu).

PTEN war in allen drei Zelllinien auf m-RNA nachweisbar, wird aber unter Hypoxie nicht reguliert. Da Tumorsuppressorgene in Tumorzellen häufig mutiert oder funktionslos vorliegen, erfolgten im Anschluss Gentransferversuche, in denen das „intakte“ PTEN transient und stabil in H23-Zellen transfiziert wurde.

PTEN zeigte keine signifikante Inhibition der HRE-Aktivität von HIF im Reporter-gen Assay in transient transfizierten H23-Zellen, ebenso keinen Effekt auf die VEGF- und PGK-Expression in stabil transfizierten H23-Zellen. Dies ließ vermuten, dass beide Tumorsuppressorgene in H23-Zellen bereits intakt vorliegen, welches später durch Yokota et al. 2004 bestätigt wurde.

Während das Onkogen HER2(neu) in A549 und H69 auf m-RNA-Ebene nicht reguliert wird, konnte eine signifikante Induktion der m-RNA-Expression unter Hypoxie in H23 bestätigt werden. H23-Zellen zeigten eine signifikant höhere m-RNA-Expression als A549 und eine hochsignifikant höhere Expression als H69-Zellen. Eine Überexpression von HER2(neu) könnte Hypoxie unabhängig über die PI3-Kinase „downstream“ zu einer Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinsynthese in H23-Zellen führen, was aber durch weitere Untersuchungen bestätigt werden muss.

In dieser Dissertationsschrift konnte dargestellt werden, dass der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1), als Hauptregulator der O<sub>2</sub>-abhängigen Genexpression, durch Aktivierung seiner Zielgene (z.B. VEGF) eine Schlüsselrolle in der Angiogenese und der O<sub>2</sub>-unabhängigen Energiegewinnung (Glykolyse) spielt, was zur Adaptation an Tumorphypoxie führt und einen wesentlichen Faktor in der Tumorprogression darstellt. Zudem liegt HIF-1 $\alpha$  in verschiedenen humanen Tumorarten überexprimiert vor, was dessen Rolle in der Tumorgenese und Tumorprogression unterstreicht. Sowohl diese Ergebnisse als auch die Erkenntnis, dass HIF-1 $\alpha$  in der Resistenzentwicklung verschiedener Chemo- und Strahlentherapien beteiligt zu sein scheint, macht HIF-1 zur Zielscheibe künftiger molekulargenetischer Therapieansätze.

## 7. SUMMARY

Carcinogenesis is a complex process leading to abnormal regulation of cell proliferation through DNA-damage and respectively -mutation, overexpression of oncogenes and/ or loss of function of tumor suppressor genes.

As a result tumor-hypoxia evolves from a fast and impaired proliferation of tumor tissue. It is an established fact that tumors are only fed through diffusion up to a size of 100-200  $\mu\text{m}$ , which reveals that growth of solid tumors depends on sufficient angiogenesis.

The hypoxia-inducible-factor 1 (HIF-1), a hetero-dimer, consisting of two subunits HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$  is induced in low oxygen pressure and mediates activation of target genes for adaption of tumor cells to hypoxia, giving HIF-1 a key role in tumor progression.

The background of this dissertation was the characterization of hypoxic effects in human pulmonal tumor cell lines A549, H23 (NSCLC) and H69 (SCLC) regarding the transcription factors HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  and its target genes of angiogenesis (VEGF), glycolysis (PGK) and apoptosis.

As result the cell lines A549, H23 (NSCLC) and H69 (SCLC) can be characterized as follows:

Hypoxia induces protein expression of HIF-1 $\alpha$  in all three cell lines, as shown by western-blot analysis. HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  are not regulated at m-RNA-level. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and PGK are significantly induced in hypoxia. Hypoxia has a pro-apoptotic effect in A549-cells due to the fact that tumor suppressor gene P53, a highly active transcription factor, whose target genes activate apoptosis by transactivation of pro-apoptotic proteins of the mitochondrial signal pathway, exists intact in A549-cells [184].

In H23- and H69-cells hypoxia has an anti-apoptotic effect, since P53 is present in a mutated condition [184]. The fact that HIF-1 $\alpha$ -protein was only detectable in H23-cells in normoxia and VEGF-protein levels were significantly higher in ELISA studies compared to H69- and A549-cells under normoxic und hypoxic conditions, resulted in further studies of possible „alternative regulation mechanisms“ of HIF-1 $\alpha$  using tumor suppressor gene PTEN and oncogen HER2(neu).

PTEN was detectable at m-RNA level in all three cell lines, but is not regulated under hypoxic conditions. Due to the fact that tumor suppressor genes often occur mutated or inoperable in tumor cells, further gene transfer experiments with transient and stabile transfection of the "intact" PTEN in H23 cells were accomplished.

PTEN showed no significant inhibition of HRE-activity of HIF in reporter gene assays with transient transfected H23-cells and likewise no effect on VEGF- and PGK- expression in stabile transfected H23 cells, assuming that both tumor suppressor genes are already present in intact condition in H23- cells. This conjecture was confirmed later by Yokota et al. in 2004.

While oncogene HER2(neu) was not regulated in A549 und H69 at m-RNA-level, a significant induction of m-RNA-expression under hypoxia was confirmed in H23 cells. H23-cells showed highly significant expression of m-RNA than A549- and H69-cells. Further investigations will have to confirm in what extent overexpression of HER2(neu) could lead via PI3-kinase „downstream“ to enhancement of HIF-1 $\alpha$ -proteinsynthesis in H23-cells in non-hypoxic conditions.

This studie illustrates that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), plays a key role as central regulator of oxygen dependent gene expression in angiogenesis and anaerobic energy generation (glycolysis) through activation of it's target genes (e.g. VEGF), leading to adaption to tumor hypoxia and therefore representing an essential element in tumor progression.

Furthermore HIF-1 $\alpha$  is overexpressed in different types of human tumors, emphasizing it's role in tumorigenesis and tumorprogression.

These findings as well as the insight that HIF-1 $\alpha$  seems to be involved in development of tumor resistances in chemo- und nuclear therapies make HIF-1 an important target for future moleculargenetic therapy approaches.

## 8. Literatur

1. Guillemin, K. und Krasnow, M.A. 1997. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 89:9-12.
2. Wenger, R.H. 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydrolases, hypoxia inducible transcription factor, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB j.* 16: 1151-1162.
3. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C. Marti HH.1996. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol* ; 271:C1172-C1180.
4. Lopez-Barneo, J. Und Weir, E.K. 1998. Oxygen Regulation of Ion Channels and Gene Expression. New York: Futura.
5. Semza, G.L. 1998. Transkription Factors and Human Disease. New York: Oxford University Press.
6. Brown JM and Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and Problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 58: 1408-1416, 1998.
7. Semenza, G.L. 1999. Expression of Hypoxia inducible Factor 1: Mechanisms and Consequences.
8. Jiang, B.-H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R. und Semenza, G.L. 1996. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia inducible factor1. *J Biol Chem* 271: 17771-8.
9. Epstein AC, Gleadle JM, McNeil LA, et al.: *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107 (2001) 43-54.
10. Soitamo AJ, Rabergh CM, Gassmann M, Sistonen L, Nikinmaa M: Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1a) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. *J Biol Chem* 276 (2001) 19699-19705.
11. Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M. und Bunn, H.F. 1996. Activation of hypoxia inducible transcription factor depends primarily upon redox sensitive stabilization of its  $\alpha$ -subunit. *J Biol Chem* 271:32253-32259.
12. Semenza, G.L. 2000. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res*; 1 (3):159-162.
13. Salceda, S. und Caro, J. 1997. Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic.

14. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M: Induction of HIF-1a in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15 (2001) 1312-1314.
15. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L.: Activation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:5667-72.
16. Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A.V., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472.
17. Bruick, R.K., McKnight, S.L. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294:1337-1340.
18. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schonfield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuert DI, Jones EY. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 by pVHL. *Nature* 2002; 417:975-8.
19. Min JH, et al. Structure of an HIF-1 a-pVHL-complex: Hydroxyproline recognition in signalling. *Science* 2002; 296:1886-9.
20. M.A., Bunn, H.F. und Livingston, D.M. 1996. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12969-12973.
21. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML. Asparagine Hydroxylation of the HIF transactivation domain. *Science* 2002;295:858-61.
22. Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J. Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia inducible factor 1 is governed by a VHL protein independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol* 2002; 22:2984-92.
23. Semenza, G.L., Jiang, B.-H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.-P., Maire, P. und Giallongo, A. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia inducible factor 1. *J Biol Chem* 271 : 32529-32537.
24. Tian H, McKnight SL, Russel DW. Endothelial PAS domain protein 1, a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; 1: 72-82.
25. Gothie E, Richard DE, Berra E, Pages G. Identification of alternative spliced variants of human hypoxic-inducible factor-1 alpha. *The journal of biological chemistry* 2000; 275: 6922-7.

26. Chun YS, et al: A new HIF 1-alpha variant induced by zinc ion supresses HIF-1-mediated hypoxic resposes. J Cell Science 2001; 114:4051-61.
27. Chun et al: A dominant-negative isoform lacking exon11 and 12 of the human hypoxic-inducible factor-1 a gene. Biochem J. 2002; 362:7-9.
28. Chun et al: Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible factor 1a isoform: implications for tumor promotion. Cancer res. 2003; 63: 8700-7.
29. Ruas et al: Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and / or interaction with CREB-binding protein. J Biol. Chem. 2002; 277:38723-30.
30. Hewitson KS et al.: Hypoxia inducible factor asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cubin structural family. J Bio. Chem. 2002; 277:26351-5.
31. Semenza, G. L. and Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoetin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol. Cel. Biol. 12 (12): 5447-54.
32. Wang, G. L. and Semenza, G. L. (1993). Characterisation of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. J. Biol. Chem. 268(29); 21513-8.
33. Richard et al. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 alpha and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J. Biol. Chem. 274 (46): 32631-7.
34. Jeong et al. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 alpha by ARD1-mediated acetylation. Cell 111(5): 709-20.
35. Hirsila et al. (2003). Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor HIF. J. Biol. Chem. 278 (33): 30772-80.
36. Kageyama et al. (2004). Leu-574 of human HIF-1alpha is molecular determant of prolyl hydroxylation. FASEB J. 18(9): 1028-30.
37. Maxwell P. et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 1999; 399: 271-5.
38. Maynard MA. et al. Multiple splice variants of human HIF-3 alpha locus are targets of the VHL E3 ubiquitin ligase complex. J. Biol. Chem. 2003; 278: 11032-40.

39. Heidbreder M. et al. Hypoxia rapidly activates HIF-3 $\alpha$  m-RNA-expression. *FASEB J.* 2003; 17: 1541-3.
40. Kondo K. et al. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel Lindau protein. *Cancer Cell* 2002; 1: 237-46.
41. Blancher C. et al. Relationship of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 2002; 60: 7106-13.
42. Huang J., Zhao Q., Mooney SM., and Lee FS. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J. Biol. Chem.* 277: 39792-39800, 2002.
43. Metzzen E. et al. Intracellular localisation of human HIF-1 $\alpha$ -hydroxylases: implication for oxygen sensing. *J. Cell. Sci.* 116: 1319-1326, 2003.
44. Jeong JW. et al. Regulation and destabilisation of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 111: 709-720, 2002.
45. Iyer, N. V., Leung, S. W. and Semenza, G. L. (1998b). The human hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene: HIF1 $\alpha$  structure and evolutionary conservation. *Genomics* 52(2): 159-65.
46. Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y. and Imura, N. (2001). Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3 $\alpha$  in human kidney: suppression of HIF-mediated Res. *Commun.* 287(4): 808-13.
47. Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A. and Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414(6863): 550-4.
48. Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W. J., Tanaka, H. and Poellinger, L. (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  locus. *J. Biol. Chem.* 277(36): 32405-8.
49. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., Simons, J. W. and Semenza, G. L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 60(6): 1541-5.
50. Gorlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V. B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R. P., Kietzmann, T. and Busse, R. (2001). Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular

- smooth muscle cells: Role of the p22 (phox)-containing NADPH oxidase. *Circ. Res.* 89(1): 47-54.
51. Thornton, R. D., Lane, P., Borghaei, R. C., Pease, E. A., Caro, J. and Mochan, E. (2000). Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem. J.* 350 (Pt 1): 307-12.
52. Feldser, D., Agani, F., Iyer, N. V., Pak, B., Ferreira, G. and Semenza, G. L. (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 59(16): 3915-8.
53. Zhou, J., Schmid, T. and Brune, B. (2003b). Tumor necrosis factor- $\alpha$  causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  through a nuclear factor- $\kappa$ B-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell.* 14(6): 2216-25.
54. Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A. R., Ryan, H. E., Johnson, R. S., Jefferson, A. B., Stokoe, D. and Giaccia, A. J. (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 14(4): 391-6.
55. Fukuda R. Insulin like growth factor 1 induces HIF-1-mediated VEGF expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 38205-11.
56. Fukuda, R., Kelly, B. and Semenza, G. L. (2003). Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 63(9): 2330-4.
57. Alfranca A. et al. c-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 22: 12-22, 2002.
58. Gao N. et al. P38 signaling-mediated hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cell. *J. Biol. Chem.* 277: 45041-45048, 2002.
59. Richard DE. et al. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Bio. Chem.* 274: 32631-32637, 1999.
60. Hur, E., Chang, K. Y., Lee, E., Lee, S. K. and Park, H. (2001). Mitogen-activated protein kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Mol. Pharmacol.* 59(5): 1216-24.
61. Hofer, T., Desbaillets, I., Hopfl, G., Gassmann, M. and Wenger, R. H. (2001). Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1 $\alpha$  activation cascade: implications for HIF-1 $\alpha$  gene therapy. *FASEB J.* 15(14): 2715-7.

62. Mottet, D., Dumont, V., Deccache, Y., Demazy, C., Ninane, N., Raes, M. and Michiels, C. (2003). Regulation of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  Protein Level during Hypoxic Conditions by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Pathway in HepG2 Cells. *J. Biol. Chem.* 278(33): 31277-31285.
63. Cantley, L. C. and Neel, B. G. 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase / AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 4240-4245.
64. Brown EJ. et al. Control of p70s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 377: 441-446, 1995.
65. Schmelzle T. and Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 103: 253-262, 2000.
66. Raught B., Gingras AC. and Sonenberg N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 7037-7044, 2001.
67. Semenza, G.L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.
68. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1358-C1366, 2001.
69. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 68-72.
70. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 203: 1253-1263, 2000.
71. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 9519-25.
72. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000; 60: 7075-83.
73. Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 139-45.
74. Harris AL. von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *Oncologist* 2000; 5 Suppl 1: 32-6.
75. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 16: 49: 507-21.

76. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham JA: The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor – Multiple Protein Forms Are Encoded Through Alternative Exon Splicing. *J Biol Chem* 266(18): 11947-54, 1991.
77. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M and Persico MG: Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3. *Circulation* 93(8): 1493-95, 1996.
78. Plouët J, Schilling J and Gospodarowicz D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *The Embo J* 8(12): 3801-06, 1989.
79. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J and Dvorak HF: Purification and NH<sub>2</sub>-Terminal Amino Acid Sequence of Guinea Pig Tumor-secreted Vascular Permeability Factor. *Cancer Research* 50: 1774-78, 1990.
80. Ferrara, N., and T. Davis-Smyth. 1997. The biology of VEGF. *Endocrine Reviews* 18: 4-25.
81. Carmeliet, P. et al. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439.
82. Harris AL. von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *Oncologist* 2000; 5 Suppl 1: 32-6.
83. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.
84. Fong, G. H., et al. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-70.
85. Carmeliet, P et al. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Review Nature Med.* 6: 389-395.
86. Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
87. Folkman J and Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16): 10931-34, 1992.
88. Hanahan D., Folkman J, Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis, *Cell* 1996. 12.
89. Carmeliet P and Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257, 2000.
90. Giordano FJ and Johnson RS. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Opin. Genet. Dev*, 2001.

91. Semenza GL. HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev* 19: 59-65, 2000.
92. Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1: 27-31.
93. Risau W., Flamme I. 1995 Vaskulogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 73-91.
94. Gale NW., Yancopoulos GD. 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 13: 1055-66.
95. Yancopoulos GD. Et al. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.
96. Lindahl P. et al. 1997. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277: 242-45.
97. Semenza, G.L. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu. Rev. Med.* 2003. 54: 17-28.
98. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2 alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157: 411-421.
99. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Walle E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 309-314.
100. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumors and survival. *Br J Cancer* 2001; 85: 881-890.
101. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vitoria-Petit A, Filmus J, Mansour SJ, Ahn NG, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis: Differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 2000; 60: 490-498.
102. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW. Angiogenesis in bladder-cancer-relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1603-1612.
103. Jaeger TM, Weidner N, Chew K, Moore DH, Kerschmann RL, Waldman FM, Carroll PR. Tumor angiogenesis correlates with lymph-node metastases in invasive bladder-cancer. *J Urol* 1995; 154: 69-71.

104. Levy A.P., Levy N.S., Wenger S., and Goldberg M.A. 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J.Biol. Chem.* 270: 13333-13340.
105. Fang J, Yan L, Shing Y, and Moses MA. HIF-1 $\alpha$ -mediated upregulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. *Cancer Res* 61: 5731-5735, 2001.
106. Levy A.P., Levy N.S., and Goldberg M.A. 1996. Post-translational regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J.Biol. Chem.* 271: 2746-2753.
107. Linnemann, M., Kuhl, M.: *Biochemie für Mediziner*. Wiesbaden, Verlag Vieweg, 1995. S.452-453.
108. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K et al: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 1997; 275: 1943–47.
109. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA et al: Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 1997; 15: 356-62.
110. Li DM, Sun H: TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res*, 1997; 57: 2124–29.
111. Haynie DT, Ponting CP: The N-terminal domains of tensin and auxilin are phosphatase homologues. *Protein Sci*, 1996; 5: 2643–46.
112. Lee JO, Yang H, Georgescu MM et al: Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*, 1999; 99: 323–34.
113. Tsugawa K, Jones MK, Sugimachi K et al: Biological role of phosphatase PTEN in cancer and tissue injury healing. *Front Biosci*, 2002; 7: e245–51.
114. Maehama T, Dixon JE: The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 1998; 273: 13375–78.
115. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL et al: Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 1998; 95: 29–39.
116. Sun H, Lesche R, Li DM et al: PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-

- trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 6199–204.
117. Wu X, Senechal K, Neshat MS et al: The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 15587–91.
118. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: Cellular survival: a play in three acts. [oder war das (Akts) ein Wortspiel?] *Genes Dev*, 1999; 13: 2905–27.
119. Mahimainathan L, Choudhury GG: Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel mechanism of action of the phosphatase. *J Biol Chem*, 2004; 279: 15258–68.
120. Tamura M, Gu J, Matsumoto K et al: Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*, 1998; 280: 1614–17.
121. Tamura M, Gu J, Danen EH et al: PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*, 1999; 274: 20693–703 RA240.
122. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D et al: Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*, 2000; 14: 391–96.
123. Gomez-Manzano C, Fueyo J, Jiang H et al: Mechanisms underlying PTEN regulation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Ann Neurol*, 2003; 53: 109–17.
124. Huang J, Kontos CD: PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem*, 2002; 277: 10760–66.
125. Cairns P, Okami K, Halachmi S et al: Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res*, 1997; 57: 4997–5000.
126. Wang SI, Parsons R, Ittmann M: Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 1998; 4: 811–15.
127. Teng DH, Hu R, Lin H et al: MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res*, 1997; 57: 5221–25.
128. Rhei E, Kang L, Bogomolny F et al: Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res*, 1997; 57: 3657–59.

129. Halachmi N, Halachmi S, Evron E et al: Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998; 23: 239-43.
130. Shao X, Tandon R, Samara G et al: Mutational analysis of the PTEN gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 1998; 77: 684-88.
131. Kohno T, Takahashi M, Manda R, Yokota J: Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEP1 gene in human lung cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998; 22: 152-56.
132. Yokomizo A, Tindall DJ, Drabkin H et al: PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene*, 1998; 17: 475-79.
133. Nakahara Y, Nagai H, Kinoshita T et al: Mutational analysis of the PTEN/MMAC1 gene in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, 1998; 12: 1277-80.
134. Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL et al: Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet*, 1998; 7: 507-15.
135. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
136. Piret, J.-P., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C. 2002. Is HIF-1 $\alpha$  a pro- or anti-apoptotic protein? *Biochem. Pharm.* 64: 889-892.
137. Igney, F.H., Krammer, P.H. 2002. Death and anti-death: Tumor resistance to apoptosis. *Nat.Rev.Cancer* 2: 277-288.
138. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P.: Blood flow, oxygen, and nutrient supply, metabolic environment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 49, 6449-6465,1989.
139. Vaupel P.: Tumoroxygenierung: Pathogenese, Charakterisierung und Einfluss auf die Tumorthherapie. *Onkologie* 2001; 24(suppl 3): 1-16.
140. Vaupel P., Kelleher DK, Höckel M.: Oxygenation status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol.* 2001 Apr; 28 (2 suppl 8):29-35.
141. Wang, G.L., Jiang, B.-H., Rue, E.A. und Semenza, G.L. 1995. Hypoxia inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510-5514.

142. Semenza G. L.: Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Review Bio. Chem. and Mol. Biol.*, 35(2): 71-103. 2000.
143. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K: The human FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site in renal carcinoma associated translocation breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84 (1996): 587-597.
144. Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM: The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu Rev Genet* 32 (1998a): 7-31 59.
145. Lima CD, Klein MG, Hendrickson WA: Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. *Science (Washington DC)* 278 (1997): 286-290.
146. Barnes LD, Garrison PN, Siprashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingna SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K: Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5', 5''-P<sub>1</sub>, P<sub>3</sub>-triphosphate hydrolases. *Biochemistry* 35 (1996): 11529-11535.
147. Chaudhuri AR, Khan IA, Prasad V, Robinson AK, Ludueña RF, Barnes LD: The tumor suppressor protein Fhit. *J Biol Chem* 274 (1999): 24378-24382.
148. Huebner K, Druck T, Siprashvili Z, Croce CM, Kovatich A, McCue PA: The role of deletions at the FRA3B/FHIT locus in carcinogenesis. *Cancer Res* 154 (1998b): 200-215.
149. Nelson HH, Wiencke JK, Gunn L, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT: Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: Evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos. *Cancer Res* 58 (1998): 1804 -1807.
150. Druck T, Hadaczek P, Fu T-B, Ohta M, Siprashvili Z, Baffa R, Negrini M, Kastury K, Veronese ML, Rosen D, Rothstein J, McCue P, Cotticelli MG, Inoue H, Croce CM, Huebner K: Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res* 57 (1997): 504 -512.
151. Noguchi T, Müller W, Wirtz HC, Willers R, Gabbert HE: FHIT gene in gastric cancer: Association with tumor progression and prognosis. *J Pathol* 188 (1999): 378-381.
152. Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H., Harris, A.L. 2001. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res.* 61: 6669-6673.
153. Bruick, R.K. 2000. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97: 9082-9087.

154. Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Formace, A.J., Giaccia, A.J. 1994. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol.Cell.Biol.* 14: 6264-6277.
155. An, W.G., Kanekal, M., Simon, M.C., Maltepe, E., Blagosklonny, M.V., Neckers, L.M. 1989. Stabilization of wild-type [mit 'e'?] p53 by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Nature* 392: 405-408.
156. Kayama T., Yoshimoto T., Fujimoto S. and Sakurai Y. Intratumoral oxygen pressure in malignant brain tumor. *J Neurosurg* 74: 55-59, 1991.
157. Hockel M., Schlenger K., Knoop C. and Vaupel P. Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O<sup>2</sup> tension measurements. *Cancer Res.* 51: 6098-6102, 1991.
158. Hockel M., Schlenger K., Aral B., Mitzew M., Schaffer U. and Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.*: 4509-4515, 1996.
159. Gisele Höpfel, Omolara Ogunshola, and Max Gassmann. HIFs and tumors-causes and consequences. *AJP-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286: R608-R623, 2004.
160. Chen C., Pore N., Behrooz A., Ismail-Beigi F., and Maity A. Regulation of glut 1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276: 9519-9525, 2001.
161. Gradin K., McGuire J., Wenger RH., Kvietikova I., Whitelaw ML., Toftgard R., Tora L., Gassmann M. and Poellinger L. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 16: 5221-5231, 1996.
162. Zhou, J., Fandrey, J., Schumann, J., Tiegs, G. and Brune, B. (2003). NO and TNF-alpha released from activated macrophages stabilize HIF-1alpha in resting tubular LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 284(2): C439-46.
163. Li, Y.M., Zhou, B.P., Deng, J., Pan, Y., Hay, N., and Hung, M.C. A Hypoxia-Independent Hypoxia-Inducible Factor-1 Activation Pathway Induced by Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt in HER2 Overexpressing Cells. *Cancer Res* 2005; 65: (8). April 15, 2005.
164. Semenza, G.L. et al HER2(neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1a ( HIF-1a) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, p.3995-4004, Vol.21, No12.

165. Hisayuki Shigematsu, Takao Takahashi, Masaharu Nomura, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2005; 65: (5). March 1, 2005
166. A-P Meert, B Martin, M Paesmans, T Berghmans, C Mascaux, J-M Verdebout, P Delmotte, J-J Lafitte and J-P Sculier. Review. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *British Journal of Cancer* (2003) 89, 959-965 & 2003 *Cancer Research*.
167. C. Shih, L.C. Padhy, M.Murray, R.A. Weinberg. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts *Nature*; 290(5803): 261-264(1981).
168. AL Schechter, DF Stern, L Vaidyanathan, SJ Decker, JA Drebin, MI Greene and RA Weinberg: The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a185,000-Mr tumor antigen. *Nature* 312 (1984): 513-516.
169. S Fukushige et al. Localization of a novel v-erbB-related gene c-erbB2, on human chromosome-17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol* 6(1986) 955-958.
170. Y. Yarden. Biology of HER2 and its importance in breast cancer *Oncol*; 61(suppl2):1-13(2001).
171. C. Bargmann, M.-C. Hung, R. Weinberg. The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*; 316: 226-230(1986).
172. D. Reese, D. Slamon HER2(*neu*) signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem*;15(1):1-8,(1997).
173. DJ Slamon, GM Clark, SG Wong, WJ Levin, A Ullrich and WL McGuire. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (1987): 177-182.
174. B. Gusterson, R. Gelber, A. Goldhirsch et. al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer *J. Clin. Oncol.*;10(7): 1049-1056 (1992).
175. C. Vogel, M. Cobleigh, D. Tshipathy. Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of Her2-overexpressing metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.*;20: 719-726(2002).
176. T Cooke, J Reeves, A Lanigan and P Stanton: HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001): S.23-28.
177. MD Pegram, A Lipton, DF Hayes, BL Weber, JM Baselga, D Tripathy, D Baly, SA Baughman, T Twaddell, JA Glaspy and DJ Slamon: Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant

- humanized anti185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 16 (1998): 2659-2671.
178. Y. Yonemura, I. Ninomiya, A. Yamaguchi, S. Fushida, H. Kimura, S. Ohoyama, I. Kiyazaki, Y. Endou, M. Tanaka, T. Sasaki. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker or poor short term prognosis in gastric cancer *Canc.Res.*; 51:1034-1038(1991).
179. R. Jimenez, M. Hussain, F. Bianco, U. Vaishampayan, P. Tabazcka, W. Sakr. E. Pontes, D. Wood, D. Grignon. HER-2/*neu* overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis of primary and metastatic tumors *Clin.Canc.Res.*; 7(8); 2440-2447(2001).
180. M. Press, M. Pike, G. Hung, J. Zhou, Y. Ma, J. George, J. Dietz-Band, W. James, D. Slamon, J. Batsakis, A. El-Naggar. Amplification and overexpression of Her-2/*neu* in carcinomas of the salivary gland: Correlation with poor prognosis *Canc.Res.*; 54: 5675-5682(1994).
181. Hammond, E. M., Dorie, M. J. and Giaccia, A. J. (2003). ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *J. Biol. Chem.* 278(14): 12207-13.
182. Freedman, S. J., Sun, Z.-Y. J., Poy, F., Kung, A. L., Livingston, D. M., Wagner, G. and Eck, M. J. (2002). Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(8): 5367-5372.
183. Piret J-P, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1a pro- or an antiapoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2004; 64: 889-892.
184. Yokota, J. and Kohno, T. Review. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Science*. 2004, vol.95, no.3, 197-204.
185. Zhong, H., Semenza, G. L., Simons, J. W. and De Marzo, A. M. (2004). Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is an early event in prostate carcinogenesis. *Cancer Detect. Prev.* 28(2): 88-93.
186. Koshikawa N, Iyozumi A, Gassmann M, and Takenaga K. Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene* 22: 6717-6724, 2003.
187. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 1527-33.
188. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, and Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ : a novel

- predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 61: 2911-2916, 2001.
189. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003; 22: 3213-20.
190. Kung AL, Wang S, Klco JM, Kaelin WG, Livingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med* 2000; 6: 1335-40.
191. Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther* 2001; 8: 638-45.
192. Stefanie Krick, Bastian G. Eul, Jörg Hänze, Rajkumar Savai, Friedrich Grimminger, Werner Seeger, and Frank Rose. Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Hypoxia-Induced Apoptosis of Primary Alveolar Epithelial Type II Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 32. pp 395–403, 2005 Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2004-0314OC on February 4, 2005.
193. S Kapitanovic, S Radosevic, M Kapitanovic, S Andelinovic, Z Ferencic, M Tavassoli, D Primorac, Z Sonicki, S Spaventi, K Pavelic and R Spaventi: The expression of p185(HER-2/neu) correlates with the stage of disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 112 (1997): 1103-1113.
194. MC Dugan, ST Dergham, R Kucway, K Singh, L Biernat, W Du, VK Vaitkevicius, JD Crissman and FH Sarkar: HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival. *Pancreas* 14 (1997): 229-236.
195. J. Kern, R. Slebos, B. Top, S. Rodenhuis, D. Lager, R. Robinson, D. Weiner, D. Schwartz. *C-erbB-2* expression and codon 12 *K-ras* mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J.Clin.Invest.*; 93: 516-520(1994).
196. Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST, Rassool FV, Zimmermann PV, Giaccone G, Gazdar AF & Minna JD(1997). FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 57: 2256-2267.
197. Huebner K, Druck T, Siprashvili Z, Croce CM, Kovatich A, McCue PA: The role of deletions at the FRA3B/FHIT locus in carcinogenesis. *Cancer Res* 154 (1998): 200-215.
198. Shepherd, F. et al.: Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *New England Journal* 2005; 353: 123-132.

199. Cunningham D, et al.: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *New England Journal* 2004; 351: 337-345.
200. Wakelee, H. Antibodies to vascular endothelial growth factor in non-small cell lung cancer. *J.Thorac Oncol.* 2008 Jun; 3(6 Suppl 2):S113-8.
201. Hitchon and El-Gabalawy *Arthritis. Res Ther* 2004 6: 265: 10.1186/ar1447.
202. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem* 72: 248-254.
203. Lottspeich, F. und Zorbas, H. 1998. *Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.* Ref Type: Serial (Book, Monograph).
204. J Hänze, BG Eul, R Savai, S Krick, P Goyal, F Grimminger, W Seeger and F Rose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312: 571-577. 2003 – Elsevier.
205. Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M. A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E. and Clerici, C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J. Biol. Chem.* 279(15): 14871-8.
206. Semenza GL. Development of novel therapeutic strategies that target HIF-1. *Expert Opin Ther Targets.* 2006 Apr;10(2):267-80. Review.

# Danksagung

Allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, sei an dieser Stelle ganz herzlich gedankt.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger für die freundliche Überlassung des Themas und Herrn Prof. Dr. F. Rose für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit. Des Weiteren danke ich Ihm, dass er die Tätigkeit des Erstgutachters übernommen hat.

Meinen weiteren Dank gilt Herrn PD Dr. Jörg Hänze für die stetige Kooperation, das Überlassen der Plasmide, der stabilen Transfektion der H23-Zellen in Zusammenarbeit mit Bernd Reichmann sowie der geduldigen Anleitung und Einweisung in die Arbeit mit Nukleinsäuren.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich Gabi Dahlem, Annette Tschuschner und Christiane Hild danken. Ihre stetige Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Anleitung und Einweisung in die Labortechniken schufen ein angenehmes Arbeitsklima und ermöglichten ein produktives Arbeiten.

Meinen Freunden und Kollegen Toffer und Jutta danke ich sehr für ihre Unterstützung und fortwährenden Ermutigung während der gesamten Arbeit.

Außerdem danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Großmutter, meinem Sohn Leon und meinen Freunden. Ihre Geduld und moralische Unterstützung ermöglichten es mir, diese Arbeit fertig zu stellen.

Rebecca, mein Schatz: Dir danke ich von ganzem Herzen, für deine stetige Rückendeckung, deine Geduld, dein Verständnis, deine Zuversicht und für die wertvollen, wunderbaren „Augenblicke“ in unserem gemeinsamen Leben. Ich trage Dein Herz. Ich trage es in meinem Herzen.

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine Akademischen Lehrer in Giessen waren die Damen und Herren:

Alzen, Baumann, Beckmann, Bödeker, Breithaupt, Dreyer, Dudeck, Dunker, Gallhofer, Giese, Glanz, Gordner, Grimminger, Heckers, Hempelmann, Kaps, Katz, Kaufmann, Kirschbaum, Kreuder, Kummer, Künzel, Lindemann, Neubauer, Nöll, Padberg, Piper, Pralle, Preissner, Rau, Reimer, Reiter, Roelcke, Rose, Snipes, Schill, Schiefer, Schmidt, Schnettler, Schranz, Schulz, Schütz, Schwemmle, Seeger, Stürz, Sziegoleit, Teschemacher, Tillmanns, Valerius, Weidner, Weiler, Willems, Woitowitz und Wudy.