

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Michael Flentje

**Einfluß des Tumormikromilieus auf die Akkumulation des Hypoxia-  
inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in humanen Tumorzellen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Peter Kraft

aus Karlstadt

Würzburg, Februar 2006

Referent: Prof. Dr. med. Michael Flentje

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2008

Der Promovend ist Arzt

**Meiner Familie gewidmet**



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1. 1. Bedeutung des Tumormikromilieus in der Strahlen- therapie .....	1
1. 1. 1. Oxygenierung solider Tumoren	1
1. 1. 2. Der pH-Wert solider Tumoren	4
1. 1. 2. 1. Meßmethoden	4
1. 1. 2. 2. Meßwerte	5
1. 1. 3. Verfügbarkeit von Nährstoffen und Energiestatus von Tumoren	6
1. 2. Der Sauerstoffeffekt .....	8
1. 3. Messung der Tumorhypoxie .....	10
1. 4. Der Transkriptionsfaktor HIF .....	12
1. 4. 1. Struktur von HIF und HIF-1 $\alpha$	12
1. 4. 2. Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität	13
1. 4. 3. HIF-1-regulierte Gene und deren Genprodukte	18
1. 4. 4. Die Bedeutung von HIF-1 bei der physiologischen und pathophysiologischen Antwort des Organismus auf Hypoxie	20
1. 5. Fragestellung der Arbeit .....	23

2. Material und Methoden .....	24
2. 1. Verwendete Materialien und Geräte .....	24
2. 1. 1. Chemische und Biologische Materialien	24
2. 1. 1. 1. Zellkultur	24
2. 1. 1. 2. Kernextrakte/Proteinbestimmung/Immunoblot	25
2. 1. 1. 3. Durchflußzytometrie	26
2. 1. 1. 4. Sonstiges	26
2. 1. 2. Geräte	27
2. 1. 3. Zubehör	29
2. 1. 4. Selbsthergestellte Medien und Puffer	31
2. 1. 4. 1. Medien	31
2. 1. 4. 2. Puffer	33
2. 1. 5. Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien	35
2. 2. Zellkultur .....	37
2. 3. Versuche mit anschließendem Westernblot .....	39
2. 3. 1. Aussaat und Medienwechsel	39
2. 3. 1. 1. Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration und Kombinationen dieser Bedingungen auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation	39
2. 3. 1. 2. Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation	40
2. 3. 2. Kernextrakte	41
2. 3. 3. Proteinbestimmung	42
2. 3. 3. 1. Prinzip	42
2. 3. 3. 2. Durchführung	42
2. 3. 4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2. 3. 4. 1. Prinzip	45
2. 3. 4. 2. Durchführung	46

2. 3. 5. Westernblot	47
2. 3. 5. 1. Prinzip	47
2. 3. 5. 2. Durchführung	47
2. 3. 6. Immunologischer Nachweis von HIF-1 $\alpha$ und $\beta$ -Tubulin	48
2. 3. 6. 1. Prinzip	48
2. 3. 6. 2. Durchführung	49
2. 3. 7. Auswertung der Westernblots	51
2. 4. Versuche mit durchflußzytometrischer Auswertung .....	52
2. 4. 1. Aussaat und Medienwechsel	52
2. 4. 1. 1. Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration und Kombinationen dieser Bedingungen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression	52
2. 4. 1. 2. Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression	54
2. 4. 2. Weiterbehandlung der Zellen für die durchfluß- zytometrische Messung	54
2. 4. 3. Durchflußzytometrische Messung	55
2. 4. 3. 1. Prinzip	55
2. 4. 3. 2. Durchführung	57
2. 4. 4. Anmerkungen zur weiteren Auswertung	58
2. 5. Statistik .....	59
3. Ergebnisse _____	60
3. 1. Auswertung der Westernblots .....	60
3. 1. 1. Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration, Sauerstoffpartialdruck und Kombinationen dieser Bedingungen auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation	60

3. 1. 1. 1. HT1080	61
3. 1. 1. 2. FaDu	63
3. 1. 2. Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation	65
3. 1. 2. 1. HT1080	65
3. 1. 2. 2. FaDu	67
 3. 2. Auswertung der Versuche am Durchflußzytometer .....	 69
3. 2. 1. Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration, Sauerstoffpartialdruck und Kombinationen dieser Bedingungen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression von HT1080-5HRE- und HT1080-CMV-Zellen	69
3. 2. 2. Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression	74
 4. Diskussion _____	 76
4. 1. Bedeutung des Tumormikromilieus für die zelluläre HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation .....	76
4. 1. 1. Sauerstoff	76
4. 1. 2. Glukose	77
4. 1. 3. Wachstumsfaktoren	82
4. 1. 4. pH-Wert	83
 4. 2. Klinische Bedeutung der Tumorhypoxie .....	 85
4. 2. 1. Bestrahlung und Tumorhypoxie	85
4. 2. 2. Gründe für die Prognoseverschlechterung hypoxischer Tumoren – Pathophysiologie der Hypoxie	86
4. 2. 3. Therapieschemata bei Tumorhypoxie	88
4. 2. 3. 1. Verbesserung der Tumoroxygenierung	88

4. 2. 3. 2. Ausnutzen der Hypoxie für die Therapie	89
4. 3. Einsatz von Hypoxiemarkern zur Selektion von Patienten für hypoxiespezifische Therapieformen .....	90
4. 3. 1. HIF-1 $\alpha$ im Vergleich mit exogenen Hypoxiemarkern	90
4. 3. 2. HIF-1 $\alpha$ im Vergleich mit anderen endogenen Hypoxie- markern	94
4. 3. 3. Gemeinsame Bewertung der verschiedenen endogenen Hypoxiemarker	96
4. 4. HIF-1 $\alpha$ – ein möglicher Angriffspunkt in der Tumor- therapie .....	97
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	103
6. Abkürzungsverzeichnis .....	105
7. Literaturverzeichnis .....	107



# 1. Einleitung

## 1. 1. Bedeutung des Tumormikromilieus in der Strahlentherapie

Der strahlentherapeutische Ansatz ist seit Jahren ein entscheidendes Verfahren im Rahmen einer multimodalen und modernen Tumorthherapie. Oftmals ist die Strahlentherapie eine Alternative zur Operation. Ein großer Vorteil ist z.B. die Tatsache, daß die Funktion von Organen durch die Bestrahlung im Gegensatz zur radikalen Operation häufig erhalten bleibt. Nachteile entstehen beispielsweise durch die lange Therapiedauer. Indikationen für strahlentherapeutische Behandlungsmaßnahmen erstrecken sich vom primär kurativen Ansatz bis hin zu palliativen Maßnahmen.

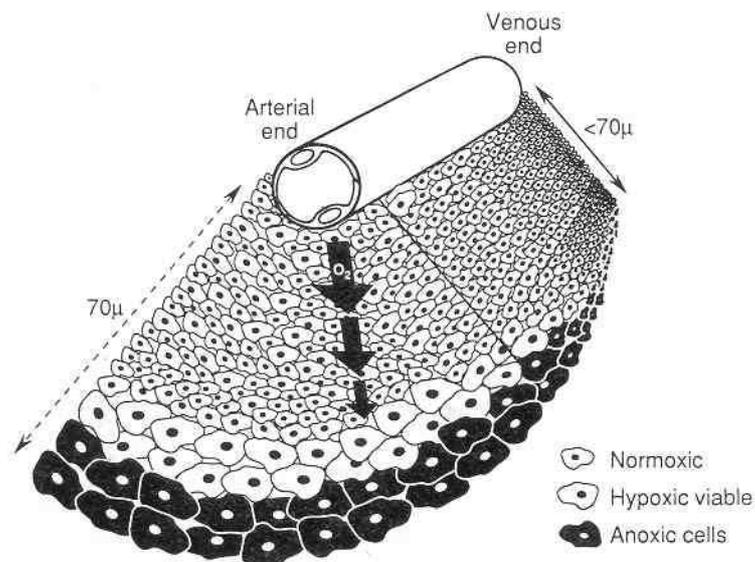
Der Erfolg einer strahlentherapeutischen Behandlung hängt in großem Maße von der Zusammensetzung des Tumormikromilieus ab. Umgekehrt wird das Mikromilieu durch Bestrahlungen beeinflusst. Wegen der großen Relevanz muß daher zunächst auf das Tumormikromilieu näher eingegangen werden. Die Konzentration liegt hierbei auf dem pH-Wert solider Tumoren, der Verfügbarkeit von Nährstoffen bzw. dem energetischen Status von Tumoren und schließlich auf der Oxygenierung solider Malignome. Letztgenanntem soll das Hauptaugenmerk gewidmet werden, da das Bestrahlungsergebnis zum größten Teil von der Gewebeoxygenierung abhängig ist.

### 1. 1. 1. Oxygenierung solider Tumoren

Die Tumoroxygenierung ist abhängig vom Sauerstoffverbrauch und von der Sauerstoffaufnahme des Gewebes. Für die Sauerstoffaufnahme ist ein mit Blut perfundiertes Gefäß- bzw. Kapillarnetz im Tumor nötig. Ist der Blutfluß in den Tumorkapillaren temporär unterbrochen, kommt es zur perfusionslimitierten Hypoxie, die auch akute oder intermittierende Hypoxie genannt wird [12].

Ist die Diffusion zwischen Kapillaren und Tumorgewebe insuffizient, die Kapillare etwa zu weit vom Gewebe, das Sauerstoff benötigt, entfernt, entsteht

eine diffusionslimitierte Hypoxie, d.h. eine chronische Hypoxie. HALL rechnet mit einem Diffusionsvermögen von Sauerstoff durch Gewebe von etwa 70µm Dicke [34]. Im Verlauf der Diffusion des Sauerstoffs durchs Gewebe wird zunächst eine Normoxie der Zellen, dann eine Hypoxie und sobald überhaupt kein Sauerstoff mehr zur Verfügung steht, eine Anoxie entstehen, was schließlich zur Nekrose führt. (vgl. *Abb. 1.1.*)



*Abbildung 1.1.: Pathomechanismus der chronischen, diffusionslimitierten Hypoxie [34]*

Anämische Abfälle der Hämoglobinkonzentration sind ebenfalls als möglicher Pathomechanismus für die Hypoxieentstehung zu nennen. Der Tumor selbst oder aber auch therapeutische Maßnahmen können eine Anämie induzieren [115].

Hypoxische Zellen sind meist diffus im Tumor verteilt und oft neben normoxischen Arealen lokalisiert [113].

Verschiedene Tumorentitäten wurden bezüglich der Gewebeoxygenierung untersucht. Es soll hier nur auf wenige exemplarisch eingegangen werden (vgl. *Abb. 1.2.*):

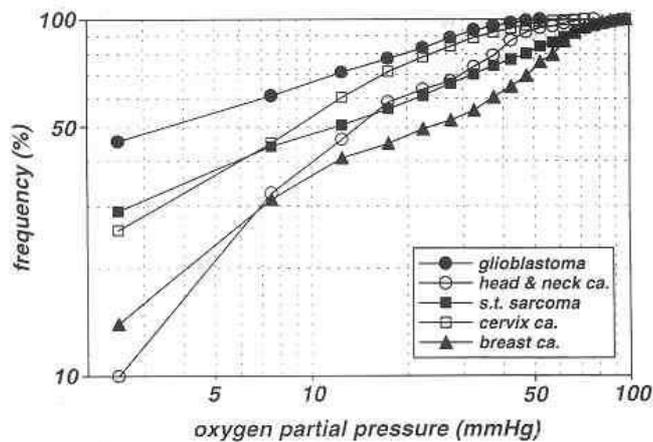


Abbildung 1.2.: Sauerstoffpartialdrücke solider Tumoren [113]

RUNKEL et al. beschrieben bei Mammakarzinomen durch eine anisotrope und gestörte Mikrozirkulation entstehende hypoxische Areale [93]. Der Sauerstoffpartialdruck von normalem Brustgewebe ergab einen Mittelwert von etwa 65 mmHg ( $\approx 9,1\% \text{ O}_2$ ), während er in Brusttumoren bei etwa 30 mmHg lag ( $\approx 4,2\% \text{ O}_2$ ). Tumoren der Ausdehnung pT1 oder pT2 unterschieden sich hierbei nicht signifikant von Tumoren der Ausdehnung pT3 oder pT4. Ferner korrelierten Differenzierungsgrad, Nekroseausmaß, Hämoglobinkonzentration, Tumorphistologie und andere Faktoren nicht mit der Gewebeoxygenierung [114]. HÖCKEL et al. berichteten über ähnliche Ergebnisse bei Zervixkarzinomen. Der Mittelwert der Sauerstoffpartialdrücke in den Zervices gesunder nulliparer Frauen betrug 48 mmHg ( $\approx 6,7\% \text{ O}_2$ ), während er bei Tumoren des Gebärmutterhalses zwischen 11 und 14 mmHg lag ( $\approx 1,5\%$  bis  $2\% \text{ O}_2$ ) lag. Ebenfalls beeinflussten Faktoren wie Tumorstadium, Tumorgröße, Nekroseausmaß und Differenzierungsgrad die Gewebeoxygenierung nicht. Die Hämoglobinkonzentration bildet beim Zervixkarzinom eine Ausnahme. Sie ist positiv mit der Tumoroxygenierung korreliert [40].

Das gleiche Bild ergibt sich bei der Beurteilung von Kopf- und Halstumoren: Der Mittelwert der Sauerstoffpartialdrücke in diesen Tumoren liegt bei 15 mmHg ( $\approx 2,1\% \text{ O}_2$ ), im Normalgewebe bei 47 mmHg ( $\approx 6,6\% \text{ O}_2$ ) [28].

NORDSMARK et al. fanden bei Weichteilsarkomen Sauerstoffpartialdrücke von 1 mmHg ( $\approx 0,1\% \text{ O}_2$ ) bis 58 mmHg ( $\approx 8,1\% \text{ O}_2$ ) vor, der Mittelwert der Sauerstoffpartialdrücke aller Weichteilsarkome lag bei 18 mmHg ( $\approx 2,5\% \text{ O}_2$ ). Interessanterweise fanden sich in den Arealen mit den tiefsten Sauerstoffpartialdrücken die Tumorzellen, die am schnellsten proliferierten [78]. In Glioblastomen liegen die durchschnittlichen Sauerstoffpartialdrücke lediglich bei etwa 7 mmHg ( $\approx 1\% \text{ O}_2$ ) [87].

Manche Autoren ersparen sich eine Organspezifität und definieren Normoxie als  $p\text{O}_2 > 10\% \text{ O}_2$  ( $\approx 71 \text{ mmHg}$ ), Hypoxie darunter. Schwere Hypoxie wird bei Werten um  $0,1\% \text{ O}_2$  ( $\approx 0,7 \text{ mmHg}$ ) erreicht [27].

Tumorgewebe in Metastasen ist noch sauerstoffärmer als das Gewebe des Primärtumors ohnehin schon ist. Dies konnte an mehreren Tumorentitäten gezeigt werden [113].

Nach einer Bestrahlung steigt der Sauerstoffpartialdruck im Tumor an, da durch den Tod vieler hauptsächlich normoxischer Zellen der  $\text{O}_2$ -Verbrauch sinkt. Außerdem führt ein sinkendes Tumolvolumen zu einer Abnahme des hydrostatischen Drucks und somit zu einer verbesserten Kapillarperfusion also einem steigenden  $\text{O}_2$ -Angebot [14] (vgl. auch *Kapitel 1.2.*).

## **1. 1. 2. Der pH-Wert solider Tumoren**

### 1. 1. 2. 1. Meßmethoden

WARBURG beschrieb bereits 1930, daß Tumorzellen Glukose hauptsächlich und viel schneller als „normale“ Zellen zu Laktat metabolisieren – selbst wenn ihnen Sauerstoff zur Genüge zu Verfügung steht. Daher postulierte man, das Zellinnere müsse relativ sauer sein. Die erste Möglichkeit der pH-Messung im Tumorgewebe ergab sich mit der Entwicklung von pH-sensitiven Meßelektroden. Hierbei wird die Aktivität der Protonen im Tumor auf potentiometrischem Weg gemessen. Nachteil ist die Invasivität des Verfahrens und die Tatsache, daß man lange nicht wußte ob man den pH-Wert des Intra- oder Extrazellularraumes maß. Mittlerweile ist klar, daß mit dieser Meßmethode

größtenteils der pH-Wert des Interstitiums ( $pH_e$ ) wiedergegeben wird, da dieses in Tumoren von 20%-25% auf über 50% anwächst [10].

Seit Anfang der 80er Jahre steht ein neues Verfahren zur pH-Messung zur Verfügung: Die  $^{31}\text{P}$ -Magnetresonanzspektroskopie (MRS). Vorteil ist die Nichtinvasivität, so daß auch Verlaufskontrollen kein Problem mehr darstellen. Mittlerweile ist gesichert, daß die durch MRS ermittelten pH-Werte das Zytoplasma repräsentieren ( $pH_i$ ). Andere Methoden der pH-Bestimmung sind Fluoreszenz-pH-Indikatoren für Kryoschnitte (Umbelliferon), für Durchflußzytometrie (SNARF-1) oder die Darstellung mittels der Positronenemissionstomographie [105].

### 1. 1. 2. 2. Meßwerte

STUBBS faßt in [104] zahlreiche Veröffentlichungen zusammen, die sich mit der Bestimmung des pH-Werts in Tumoren und Normalgewebe des Menschen beschäftigen. Einige dieser Ergebnisse möchte ich in *Tabelle 1.1.* auführen:

Gewebe	$pH_i$	$pH_e$
<b>Normalgewebe</b>		
Gehirn	7,0	7,0
Skelettmuskel	7,1	7,35
<b>Tumorgewebe</b>		
Meningeom	7,14	6,6
Sarkom	7,14	6,7

*Tabelle 1.1.: pH-Werte in Tumor- und Normalgewebe [104]*

Stets wurde  $pH_i$  mit der Magnetresonanzspektroskopie,  $pH_e$  mit Meßelektroden gemessen. Es zeigt sich, daß im Normalgewebe  $pH_i < pH_e$ , im Tumorgewebe  $pH_i > pH_e$ . Hirngewebe stellt eine Ausnahme dar. Um diesen, verglichen mit dem sehr niedrigen pH-Wert des Extrazellularraums, erstaunlich hohen

intrazellulären pH-Wert zu generieren und aufrechtzuerhalten, besitzen Tumorzellen über zahlreiche Ionentransportsysteme in ihrer Plasmamembran [104].

Interessanterweise stammt die Azidität des Interstitiums nicht ausschließlich vom Laktat, das über die Plasmamembran nach außen transportiert worden ist, was Glykolyse-defiziente Zelllinien zeigen. Auch bei ihnen ist ein verhältnismäßig tiefer extrazellulärer pH-Wert gegeben [104], vermutlich, da die von einer Carboanhydrase katalysierte Reaktion von  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  zu  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  auch Protonen liefert [47].

### **1. 1. 3. Verfügbarkeit von Nährstoffen und Energiestatus von Tumoren**

Wie auch bei der pH-Bestimmung liefern  $^{31}\text{P}$ -MRS-Spektren wertvolle Daten über den Tumormetabolismus. Im Gegensatz zu Normalgewebe sind die Konzentrationen von Phosphomonoestern, Phosphodiestern und anorganischen Phosphaten im Tumorgewebe relativ hoch, die von Kreatinphosphat relativ niedrig. Beim Gehirn läßt sich kein Unterschied zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe feststellen [74]. Mit Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographien konnte gezeigt werden, daß sich die ATP-Spiegel in Tumoren auf einem weitgehend konstanten Niveau bewegen, solange die Tumormassen 1% des Körpergewichts nicht überschreiten [61]. Außerdem fand man in diesen Fällen mittlere Gewebeoxygenierungen vergleichbar denen von normalen Organen ( $\text{pO}_2 \geq 10$  mmHg, d.h.  $\geq 1,32\%$   $\text{O}_2$ ), mittlere Glukosekonzentrationen von bis zu 2 mM ( $\approx 0,36$  g/l) und mittlere Laktatkonzentrationen unter 10 mM ( $\approx 0,9$  g/l) [74].

Bei steigender Tumormasse lassen sich eine gesteigerte ATP-Hydrolyse und dadurch entstehende Purin-Katabolite wie Xanthin, Hypoxanthin oder Harnsäure finden. In den meisten Tumoren beträgt die mittlere ATP-Konzentration je nach Tumorgroße 0,4 – 2,0 mM ( $\approx 0,2$  – 1 g/l). Allerdings dürfte eine große intratumoröse Heterogenität vorliegen [74].

MÜLLER-KLIESER et al. entwickelten 1988 eine Methode, mit der Kryoschnitte bis hinab auf zelluläre Ebene auf ATP-, Laktat- und Glukosekonzentrationen untersucht werden können [75].

Dadurch konnte man erstmals die Verteilung verschiedener Metaboliten mit der histologischen Struktur des Tumors vergleichen. Versuche mit Melanomzellen zeigten, daß ATP- und Glukosekonzentrationen signifikant niedriger, die Laktatkonzentration jedoch signifikant höher als in Normalgewebe waren [73]. Bei der Untersuchung von 10 Zervixkarzinomen ergaben sich folgende Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung [74]:

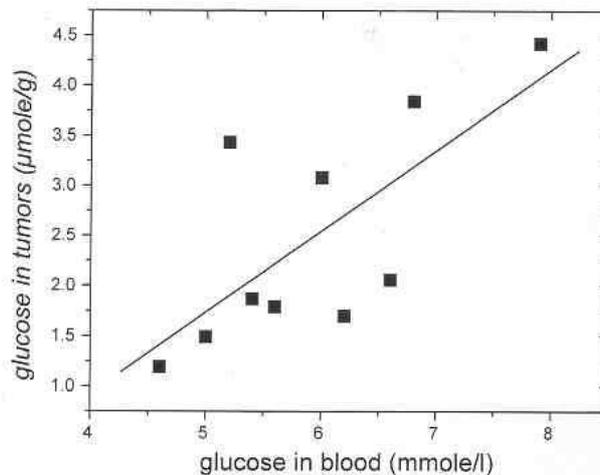
ATP:	$1,42 \pm 1,04 \mu\text{mol/g}$
Glukose:	$1,88 \pm 0,74 \mu\text{mol/g}$
Laktat:	$6,65 \pm 4,33 \mu\text{mol/g}$

Die ATP- und Laktatkonzentration war v.a. in aktiven, d.h. nicht nekrotischen Tumorarealen erhöht, während Glukose v.a. in entzündlich veränderten Tumorgebieten vermehrt vorlag [74].

WALENTA et al. zeigten, daß die Serum-Laktatkonzentration beim Vorliegen von Metastasen eines Kopf- und Halstumors signifikant höher war als beim Fehlen von Filiae. Hohe Serum-Laktatkonzentrationen können somit als negativ prognostischer Faktor gewertet werden [123].

Die Glukosekonzentration von Zervixtumoren korreliert in großem Maße mit der Blutglukosekonzentration, wie *Abb. 1.3.* deutlich macht.

Die Glukoseaufnahme in Mammakarzinomen bei Ratten lag zwischen  $0,26 \mu\text{mol/g/min}$  (Plattenepithelkarzinom) und  $0,37 \mu\text{mol/g/min}$  (medulläres Karzinom). Allerdings machen die Autoren darauf aufmerksam, daß die Werte in großem Maße von der Perfusion des Organs bzw. Tumors und der generellen Verfügbarkeit von Glukose abhängen (vgl. *Abb. 1.3.*) [53].



*Abbildung 1.3.: Abhängigkeit des Glukosegehalts von Tumoren vom Blutzuckerspiegel [74]*

Versuche mit der FDG-Methode (2-Fluordesoxyglukose) zeigten bei Mäusen mit konstanten Blutglukosewerten von 110-120 mg/dl eine charakteristische FDG-Aufnahme in verschiedene Körperkompartimente. In Tumorgewebe wurde gegenüber Muskel- oder Lebergewebe das 2,4- bis 4-fache an FDG aufgenommen [19].

Nach intravenöser Glukoseinfusion ist in Ratten, in die ein humaner Tumor transplantiert worden ist, ein etwa vierfach höherer Anstieg der Tumorglukosekonzentration verglichen mit der ebenfalls ansteigenden Muskelglukosekonzentration zu verzeichnen [61].

## 1. 2. Der Sauerstoffeffekt

Bereits 1909 entdeckte SCHWARZ in Deutschland, daß die durch Radium induzierten Hauterscheinungen auf seinem Vorderarm geringer ausfielen, wenn er den Radiumapplikator fester auf die Haut drückte. Er schrieb dies mangelndem Blutfluss zu [21].

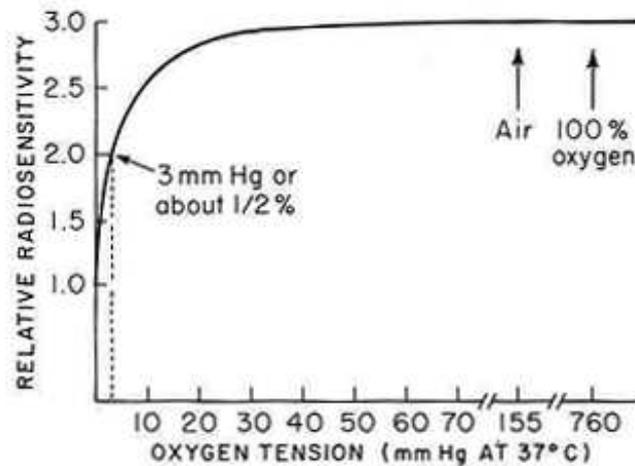
HOLTHUSEN fand 1921 heraus, daß Ascari-Eier in hypoxischem Milieu relativ resistent auf Bestrahlung reagierten. In den 30er Jahren häuften sich

Beschreibungen dieser Art, bis Anfang der 50er schließlich GRAY und READ den Sauerstoffeffekt quantitativ maßen [34].

Beim Vorliegen von Sauerstoff sind Zellen um den Faktor 2,5 bis 3 mal sensibler auf Röntgenstrahlung als unter Hypoxiebedingungen. Dieser Faktor wird auch oxygen enhancement ratio (OER) genannt. Bei dichter ionisierender Strahlung sinkt der OER ab. Bei Neutronen beträgt er 1,6 bei  $\alpha$ -Strahlen ist er 1,0. Bei einer Bestrahlung mit  $\alpha$ -Strahlen ist demnach kein Sauerstoffeffekt zu erwarten. Um einen Sauerstoffeffekt auszulösen, muß der Sauerstoff während oder unmittelbar nach der Bestrahlung im Gewebe vorhanden sein.

Man unterscheidet direkte und indirekte Strahlenwirkungen. Bei Strahlungsarten mit hohem linearem Energietransfer (LET), wie Protonen oder  $\alpha$ -Strahlen überwiegt bei weitem die direkte Strahlenwirkung, bei Strahlungsarten mit niedrigem LET (z.B. Röntgenstrahlen) überwiegen die indirekten Strahlenschäden, wie beispielsweise DNA-Schädigung durch freie Radikale. Der Mechanismus des Sauerstoffeffekts ist nicht vollständig geklärt, jedoch erscheint folgender wahrscheinlich: Die auftreffende Strahlung erzeugt freie Radikale (R) mit einer Lebenszeit von etwa  $10^{-5}$  s die sich bei vorhandenem Sauerstoff mit diesem zu Peroxiden ( $RO_2$ ) wie z.B.  $HO_2$  oder  $H_2O_2$  verbinden können. Es findet also eine Art chemische Neuformation statt, der biologische Schaden wird fixiert. Ist dagegen kein Sauerstoff vorhanden, können die freien Radikale durch Reparaturvorgänge wieder in ihren molekularen Ausgangszustand zurückversetzt werden, der biologische Schaden fällt geringer aus. Allerdings können auch die Radikale selbst Schäden in zellulären Makromolekülen setzen [34].

Schon geringe Sauerstoffpartialdrücke reichen aus, um den Sauerstoffeffekt auszulösen (vgl. *Abb. 1.4.*). Etwa 2,63%  $O_2$  bis 3,95%  $O_2$  (20 bis 30 mmHg) bewirken einen maximalen Effekt, der bis zu 760 mmHg, d.h. 100% Sauerstoff kaum noch ansteigt [70, 34].



*Abbildung 1.4.: Der Sauerstoffeffekt im Verhältnis zum Sauerstoffpartialdruck [34] (21% O<sub>2</sub> entsprechen 150 mmHg)*

Nach einer Bestrahlung bleibt der Prozentsatz der hypoxischen Zellen im Tumor relativ konstant, obwohl durch den Sauerstoffeffekt normoxische Zellen verstärkt abgetötet werden. VAN PUTTEN et al. fanden heraus, daß dies durch Reoxygenierung ursprünglich hypoxischer Zellen zu erklären ist [111].

### 1. 3. Messung der Tumorhypoxie

Es gibt Therapieverfahren, die der Tumorhypoxie Rechnung tragen und versuchen, sie entweder zu beseitigen oder sie auszunutzen. Da gängige onkologische Parameter wie Staging, Grading, Hämoglobinkonzentration u.a. regelmäßig keine Auskünfte über den Oxygenierungsstatus von Tumoren bringen [113], muß dieser durch andere Methoden bestimmt werden, um dem Patienten eine optimale Therapie zu ermöglichen. Zudem stellt Tumorhypoxie einen wissenswerten prognostischen Faktor dar [11, 39, 41, 80].

Anfang der 80er Jahre maß man noch die HbO<sub>2</sub>-Sättigung von Erythrozyten in Tumorkapillaren. Dies hatte den Nachteil, daß man keine Information über den Sauerstoffgehalt des Gewebes per se erhält. Dieser mußte noch aus den Rohdaten extrapoliert werden. Magnetresonanzspektroskopische Methoden

lieferten wegen mangelnder Auflösung ebenso keine hinreichend genauen Daten [14].

CHAPMAN initiierte eine nuklearmedizinische Methode, die indirekt die Tumoroxygenierung mittels  $^{123}\text{I}$ -Iodoazomycin-Arabinosid und anderen Tracern bestimmte [17]. Heute existieren weiter verfeinerte Assays zur nuklearmedizinischen Bestimmung der Tumoroxygenierung. Eine aktuellere Veröffentlichung geht von einer sehr hohen Sensitivität dieser Methoden aus und schließt den Einsatz der nuklearmedizinischen Hypoxiebildgebung als Validierungssystem für exogene Hypoxiemarker nicht aus [125].

Der Goldstandard der  $\text{pO}_2$ -Messung ist die intratumoröse Messung mit computerisierten polarographischen Nadel-Elektroden-Systemen wie z.B. der Firma Eppendorf. Dieses Verfahren konnte in den 90er Jahren standardisiert werden und erscheint mittlerweile sehr zuverlässig [113]. Die höchste Sensitivität wird bei Sauerstoffkonzentrationen über 2% erreicht [27].

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, die Tumoroxygenierung mit injizierbaren, also exogenen Hypoxiemarkern zu bestimmen. Hierzu wird dem Patienten vor der Biopsieentnahme eine geeignete Substanz intravenös appliziert, die sich in hypoxischen Arealen anreichert. Unter dem Mikroskop läßt sich an den erstellten Tumorschnitten dann immunhistochemisch das Vorhandensein und die Verteilung des Markers beurteilen. Klinisch relevante exogene Hypoxiemarker sind das 2-Nitroimidazol Pimonidazol und EF5. Insbesondere Pimonidazol verfügt über eine hohe räumliche Auflösung [14], v.a. bei Sauerstoffkonzentrationen von 0,02-2% [27].

Die jüngste Methode zur Detektion hypoxischer Tumoreale ist die Benutzung von endogenen Hypoxiemarkern. Diese sind Gene oder Genprodukte, die bei Sauerstoffmangel verstärkt exprimiert werden. Endogene Hypoxiemarker lassen sich wie auch die exogenen Marker an Gewebeschnitten immunhistochemisch darstellen. Es wurden einige solche Marker in der Literatur beschrieben, etwa VEGF [109], Glukosetransporter (GLUT) 1 und 3 [2], Carboanhydrase 9 (CA9) [81], Laktatdehydrogenase 5 (LDH-5) [59] oder Hypoxia-Inducible-Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). Auf letztgenannten soll im nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

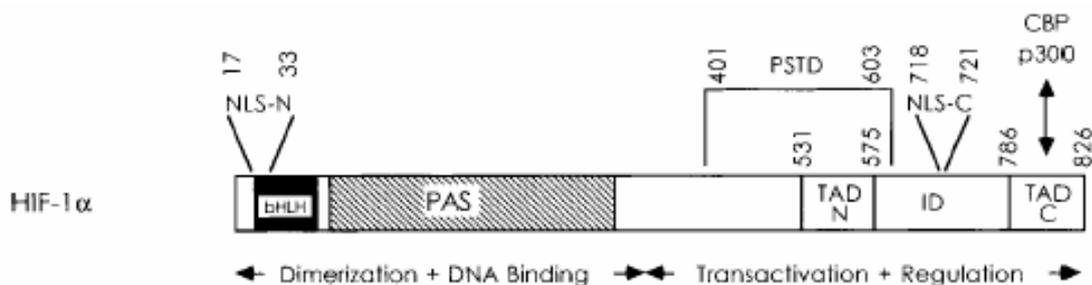
## 1. 4. Der Transkriptionsfaktor HIF

Zur Tumorprogression müssen verschiedene Voraussetzungen gegeben sein. Zum einen muß zur adäquaten Sauerstoffversorgung ein geeignetes Tumorgefäßsystem heranwachsen, zum anderen müssen sich die Tumorzellen auf einen weitgehend anaeroben Metabolismus vorbereiten. Dies klingt zunächst paradox, erklärt sich aber durch die Heterogenität der Tumorperfusion. Um ein verändertes Tumormikromilieu und auch etwaige Therapieversuche zu überleben, verschieben Tumorzellen außerdem das Gleichgewicht von apoptotischen auf anti-apoptotische Faktoren. Zellen reagieren auf diese veränderten Bedürfnisse mit einer entsprechenden Genexpression unter Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren [101]. Dabei wären beispielsweise MTF-1 (metal transcription factor 1), NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) oder c-Fos und c-Jun zu nennen [76]. Der Transkriptionsfaktor HIF (Hypoxia inducible factor) spielt hierbei jedoch die Schlüsselrolle. Die erste Erwähnung in der Literatur findet HIF 1991 von SEMENZA et al., die ihn als ein Protein identifizierten, das an das EPO-Gen bindet [96].

### 1. 4. 1. Struktur von HIF und HIF-1 $\alpha$

HIF besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Es sind drei verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten bekannt: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  bzw. der HIF-1-Komplex besitzt die größte Rolle von allen HIF-Molekülen und ist außerdem auch am besten erforscht. HIF-1 ist ein Heterodimer und besteht aus einer HIF-1 $\alpha$ - und einer HIF-1 $\beta$ -Untereinheit. Während HIF-1 $\beta$  eine Untereinheit in verschiedenen Transkriptionsfaktoren bildet, ist HIF-1 $\alpha$  ausschließlich beim HIF-1-Komplex zu finden. Die aminoternale Seite von HIF-1 $\alpha$  besteht aus basic-Helix-Loop-Helix (bHLH)- und PER-ARNT-SIM (PAS)-Domänen. Diese werden für die Dimerisierung mit HIF-1 $\beta$  und zur Anlagerung an die DNA benötigt. Die carboxyterminale Hälfte von HIF-1 $\alpha$  determiniert die

Transkriptionsaktivität und die sauerstoffregulierte Stabilität des Proteins. (Abb. 1.5.) [42, 46]. Das HIF-1 $\alpha$ -Protein wiegt etwa 120 kD [69].



*Abbildung 1.5.: Aufbau des HIF-1 $\alpha$ -Proteins [98]*

HIF-1 $\alpha$  wird beim Menschen durch das HIF-1A-Gen kodiert, das sich auf Chromosom 14 befindet (14q21-q24). Es besteht aus 15 Exons mit einer Länge von 85-1321 bp. Es konnten beim Menschen verschiedene HIF-1 $\alpha$ -cDNAs isoliert werden, die alle 826 Aminosäuren kodierten [46].

HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  sind weitere bHLH-PAS-Proteine. HIF-2 $\alpha$  besitzt zu 48% die gleichen Aminosäuren wie HIF-1 $\alpha$  [46, 98]. HIF-2 $\alpha$  besteht aus 874 Aminosäuren, die längste Isoform von HIF-3 $\alpha$  aus 668 [69].

Interessanterweise besitzen Sherpas, deren Familien schon seit Generationen auf Höhen über 3500m leben, im Vergleich zu Bewohnern tieferer Gegenden, signifikant häufiger Veränderungen in HIF-1 $\alpha$ -Intronsequenzen, was zur Höhenadaptation dienen könnte [107].

## 1. 4. 2. Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität

HIF-1 $\alpha$  wird ubiquitär und schwach exprimiert [69], unter normoxischen Bedingungen jedoch sofort wieder abgebaut. Dies geschieht durch eine Hydroxylierung von Prolinresten an Position 402 und 564 durch Proteine mit Prolylhydroxylase-haltiger Domäne. Diese gehören zur Superfamilie der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, die als Kofaktoren Sauerstoff, Eisen, Ascorbinsäure und 2-Oxoglutarat benötigen [42, 64]. Durch diese Hydroxylierung kann das VON-HIPPEL-LINDAU-Tumorsuppressor-Protein (pVHL)

an HIF-1 $\alpha$  binden. Ein E3 Ubiquitin-Ligase-Komplex, bestehend aus Elongin B und C, Cullin 2 und Rbx1 [69], erkennt pVHL und führt zum Abbau des HIF-1 $\alpha$  durch ein 26S Proteasom [42]. Ferner rekrutieren pVHL und FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) Histondeacetylasen (HDAC), die die HIF-1 $\alpha$ -Transkriptionsaktivität bei Normoxie senken [102]. Ein weiterer Mechanismus zum Abbau des HIF-1 $\alpha$  ist die sauerstoffabhängige Hydroxylierung von Asparagin an der Position 803, die eine Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  und dem Koaktivator p300 verhindert. *Abb. 1.6.* und *Abb. 1.7.* schematisiert genannte Vorgänge:

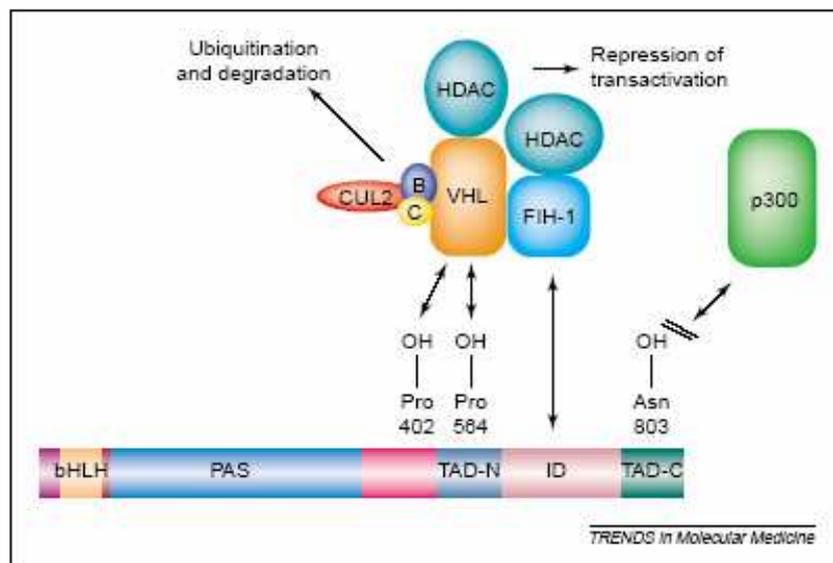
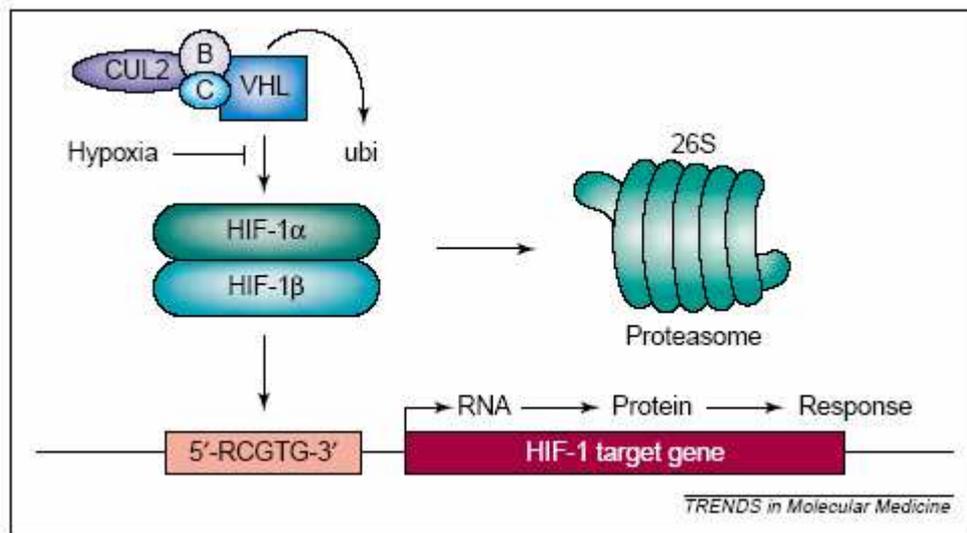


Abbildung 1.6.: HIF-1 $\alpha$ -Regulation I [101]

Liegen dagegen hypoxische Bedingungen vor, wird das translatierte HIF-1 $\alpha$  nicht abgebaut. Es transloziert aufgrund zweier nuclear localization signals (NLSs) [69] in den Zellkern und dimerisiert dort mit dem konstitutiv exprimierten HIF-1 $\beta$ . Dieser Komplex bindet nun bei der Erkennungssequenz 5'-RCGTG-3' an Hypoxia Response Elements (HREs), die in der Promoter- oder Enhancerregion von hypoxieinduzierbaren Genen lokalisiert sind [42, 101].



*Abbildung 1.7.: HIF-1 $\alpha$ -Regulation II [100]*

HIF-1 wird demnach durch ein Signaltransduktionssystem reguliert, das auf sauerstoffabhängigen posttranslationalen Modifikationen basiert [102]. Sauerstoffsensoren sind hierbei genannte Prolylhydroxylasen. Während man früher dachte, spezialisierte Chemorezeptoren der Arteria carotis tätigten O<sub>2</sub>-Messungen des Körpers, kann man nun mit einiger Sicherheit davon ausgehen, daß jede kernhaltige Zelle mit Prolylhydroxylasen über ihre eigenen Sauerstoffsensoren verfügt [97].

Sicherlich ist die hypoxische Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  die wichtigste Form der Aktivierung, doch gibt es auch andere Formen der Signaltransduktion hin zu HIF-1 $\alpha$ : SEMENZA faßt in [102] einige Zytokine und Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF), Insulin, Insulin-like Growth Factor 1 und 2 (IGF), Interleukin-1 $\beta$  und auch Fibroblast Growth Factor (FGF) zusammen, die über einen gemeinsamen Mechanismus auch bei normoxischen Bedingungen die HIF-1 $\alpha$ -Expression steigern, die HIF-1-DNA-Bindung induzieren und somit die Expression von HIF-1-regulierten Genen stimulieren (vgl. *Abb. 1.8.*).

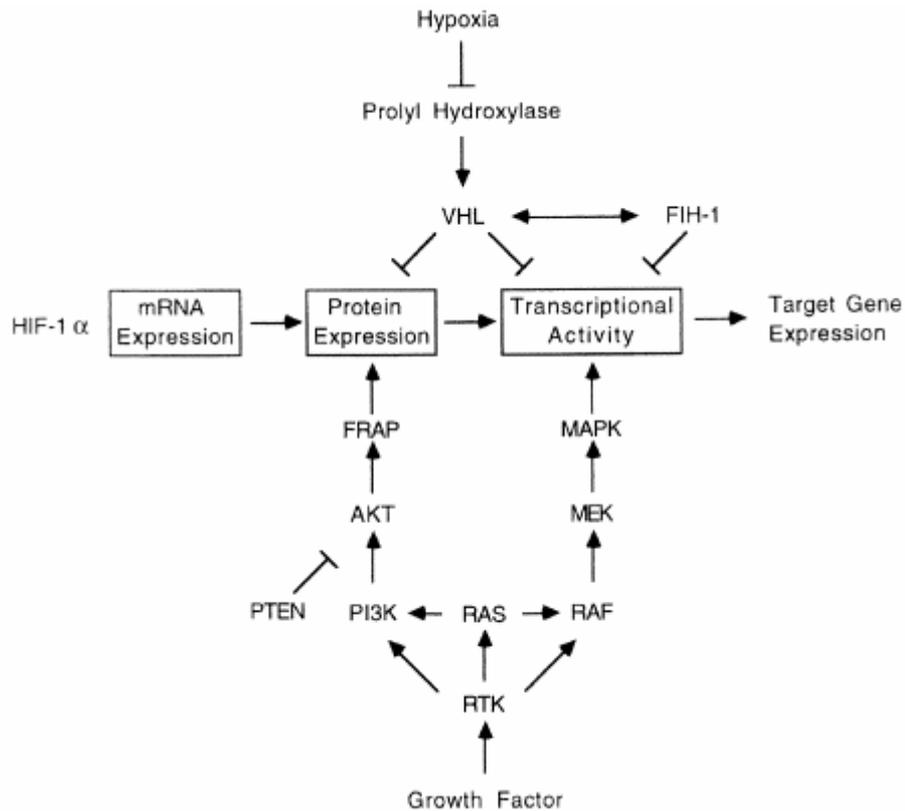


Abbildung 1.8.: HIF-1 $\alpha$ -Regulation III [102]

Alle genannten Proteine binden an eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) wie z.B. HER2<sup>neu</sup>. Die Signaltransduktion wird weitergeführt über Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) zu Serin-Threonin-Kinasen (Proteinkinase B, PKB, AKT), dem FKBP-Rapamycin-associated-Protein (FRAP) und schließlich am Endpunkt zu einer p70 s6 Kinase und einem eIF-4E-Protein, welche als Translationsregulatoren dienen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, in diese Transduktionskaskade einzugreifen [101, 102]. Ferner führt eine Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität auch über den MAP-Kinase-Weg über verschiedene Zwischenschritte zu einer HIF-1 $\alpha$ -Regulation. Beide Signaltransduktionswege werden durch das in der Zellmembran verankerte Protoonkogen RAS induziert, so daß je nach Zelllinie entweder der Weg über PI3K-PKB-FRAP oder über RAF-MEK-MAP-Kinase eingeschlagen wird [102].

Während Wachstumsfaktoren die HIF-1 $\alpha$ -Aktivität über eine Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Synthese steuern, greifen Normoxie bzw. Hypoxie bei der HIF-1 $\alpha$ -Stabilität ein.

Interessanterweise zeigten MÖLLER et al. an Xenografttumoren, daß Bestrahlungen eine HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung zur Folge hatten, mit nachfolgender VEGF- und FGF-Expression und sich daraus entwickelnder Strahlenresistenz. Die Autoren machen Sauerstoffradikale für die HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung verantwortlich. In genannter Studie führten also durch Bestrahlung gesteigerte HIF-1 $\alpha$ -Spiegel unabhängig von der Tumoroxygenierung zu erhöhter Strahlenresistenz [72].

SCHMID et al. zeigten kürzlich ein Modell zur Interaktion zwischen p53 und HIF-1 $\alpha$  auf. p53 wird demnach bei starker Hypoxie nahe der Anoxie vermehrt exprimiert. Bei steigender Aktivität hemmt es über zwei Mechanismen die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation: einerseits teilen sich beide Proteine den nur limitiert vorhandenen Koaktivator p300, andererseits kommt es zur Aktivierung von Mdm2, einer E3 Ligase, wodurch es zum Abbau von HIF-1 $\alpha$  kommt. Dies bedeutet, daß bei milder Hypoxie HIF-1 $\alpha$  die Zellen gleichsam vor Apoptose schützt, bei strenger Hypoxie allerdings durch das Übergewicht von p53 apoptotische Vorgänge eingeleitet werden [95].

HIF-2 $\alpha$  konnte in Gefäßendothelien während der Embryonalentwicklung, in Hepatozyten, Fibroblasten, Myozyten und vielen anderen Zellen gefunden werden. Die meisten Zelllinien exprimieren auch in vitro HIF-2 $\alpha$  [42].

HIF-3 $\alpha$  wird hauptsächlich im Gewebe von Herz, Plazenta, Lunge und Skelettmuskel exprimiert [69].

Auch unter normoxischen Konditionen können HIF-1 $\alpha$ -, HIF-1 $\beta$ -, HIF-2 $\alpha$ - und HIF-3 $\alpha$ -Spiegel in charakteristischer Verteilung im Gewebe gefunden werden. Dies deutet auf eine konstitutive Expression hin, um eine basale Zielgenexpression zur O<sub>2</sub>-Homöostase aufrechtzuerhalten. Größere Mengen

aller HIF-mRNAs befanden sich v.a. im Gehirn und in der Lunge, was sich durch die besondere Hypoxiesensibilität dieser Gewebe erklären läßt. Interessanterweise ließ sich bei moderater oder kurzer Hypoxie lediglich HIF-3 $\alpha$  nachweisen, was Hinweis dafür sein könnte, daß diese Untereinheit eine schneller reagierende Komponente der Antwort auf Hypoxie darstellt, oder daß HIF-3 $\alpha$  sensitiver als HIF-1 $\alpha$  auf Hypoxie reagiert. Die genaue Signaltransduktion zu HIF-3 $\alpha$  und seine Bedeutung müssen aber noch geklärt werden [37].

### **1. 4. 3. HIF-1-regulierte Gene und deren Genprodukte**

Über 70 HIF-1 $\alpha$ -regulierte Gene konnten bisher identifiziert werden [55], deren Genprodukte Schlüsselrollen bei verschiedenen Mechanismen, wie Angiogenese, Energiemetabolismus, Erythropoese, Zellproliferation, Apoptosesteuerung, Gefäßremodellierung und vasomotorischer Steuerung spielen [98].

HU et al. zeigten in ihrer Studie, daß HIF-1 $\alpha$  – außer weniger zellspezifischer Gene - die Expression aller Gene steuert, die auch HIF-2 $\alpha$  reguliert. HIF-2 $\alpha$  ist auch in der Lage, die meisten Gene zu regulieren, die HIF-1 $\alpha$  steuert (z. B. VEGF), allerdings hat HIF-2 $\alpha$  keinen Einfluß auf die Expression von Genen des Glukosemetabolismus. Nur HIF-1 $\alpha$  induziert die Expression glykolytischer Gene wie Aldolase, Enolase oder Hexokinase [42].

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-3 $\alpha$  auf hypoxisch-regulierte Gene scheint eher schwach zu sein [69].

*Tabelle 1.2.* zeigt eine Auflistung einiger Genprodukte mit ihrer Funktion:

<b>Genprodukt</b>	<b>Funktion</b>	<b>Genprodukt</b>	<b>Funktion</b>
Adenylatkinase 3	Nukleotid-metabolismus	IGF-binding protein 3	Zellproliferation und Überleben
$\alpha_{1B}$ -adenerger Rezeptor	Gefäßtonus	Intestinal trefoil factor	
Adrenomedullin	Gefäßtonus	Laktatdehydrogenase A	Glukose-metabolismus
Aldolase A	Glukose-metabolismus	LDL receptor-related protein 1	
Aldolase C	Glukose-metabolismus	Nitric oxide synthase II (NOS-2)	Gefäßtonus, Zellüberleben
Carboanhydrase 9 und 12	pH-Regulation	NIP-1, -3	Apoptose
Coeruloplasmin	Kupfer-metabolismus	NIX	Proliferation, Differenzierung
Cyclin G2	Zellproliferation	p21	Zellproliferation
Kollagen Typ V $\alpha 1$	Kollagen-metabolismus	p35srj	Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität
Differentiated embryo chondrocyte 1 (DCE-1)	Zellproliferation, Zelldifferenzierung	Phosphofruktokinase L	Glukose-metabolismus
Endothelin 1	Gefäßtonus und Remodeling	Phosphoglyceratkinase 1	Glukose-metabolismus
Enolase 1	Glukose-metabolismus	Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)	Angiogenese
Erythropoetin	Erythropoese	Prolyl-4-hydroxylase $\alpha(I)$	Kollagen-metabolismus
GLUT1	Glukose-metabolismus	Pyruvatkinase M	Glukose-metabolismus
GLUT3	Glukose-metabolismus	Transferrin	Eisenmetabolismus
Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase	Glukose-metabolismus	Transferrin receptor	Eisenmetabolismus
Heme oxygenase1 (HO-1)	Gefäßtonus	Transforming growth factor (TGF)- $\alpha$ , - $\beta 3$	Angiogenese, Zellproliferation
Hexokinase 1	Glukose-metabolismus	Transglutaminase 2	
Hexokinase 2	Glukose-metabolismus	Triosephosphatisomerase	Glukose-metabolismus
Insulin-like growth factor 2 (IGF2)	Zellproliferation und Überleben	Tyrosinhydroxylase (TH)	Katecholaminbiosynthese
IGF-binding protein 1	Zellproliferation und Überleben	VEGF	Angiogenese, Zellüberleben
IGF-binding protein 2	Zellproliferation und Überleben	VEGF receptor	Angiogenese

*Tabelle 1.2.: HIF-1-regulierte Gene [69, 100, 102]*

#### **1. 4. 4. Die Bedeutung von HIF-1 bei der physiologischen und pathophysiologischen Antwort des Organismus auf Hypoxie**

Aufgrund seiner hypoxischen Akkumulation und der Induktion vieler Gene, die der O<sub>2</sub>-Homöostase bzw. der Anpassung des Metabolismus an hypoxische Bedingungen dienen, ist HIF-1 $\alpha$  der wichtigste Regulator zur Hypoxieantwort des Organismus auf Hypoxie.

An Mäusen konnte gezeigt werden, daß HIF-1 $\alpha$  wichtig ist für die physiologische embryonale Entwicklung. HIF-1 $\alpha$ -Knock-out-Mäuse zeigten schon nach wenigen Gestationstagen schwere kardiovaskuläre Schäden und Neuralrohrdefekte. Heterozygote Mäuse entwickelten sich normal, allerdings waren Adaptationsvorgänge auf Hypoxie – wie steigender Hämatokrit oder Rechtsherzhypertrophie - bei den adulten Mäusen deutlich gestört [98, 99].

HIF-1 $\alpha$  ist essentiell für die Angiogenese in hypoxischem oder ischämischem Gewebe. Eine Neovaskularisation ist in manchen Fällen günstig, wie etwa bei der Koronaren Herzkrankheit (KHK) oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK). Leider ist die induzierte Neoangiogenese bei Patienten mit KHK oft nicht ausreichend, um einen Myokardinfarkt zu verhindern. Dies liegt wenigstens zu einem Teil an der - durch das in der Regel höhere Patientenalter - verminderten HIF-1-Bindungsaktivität an die DNA und die damit verbundene reduzierte VEGF-Expression [99, 100]. Es gibt jedoch auch Organe, die auf eine Neovaskularisation äußerst empfindlich reagieren. So spielt die HIF-1 induzierte VEGF-Expression die Hauptrolle bei der Retinopathia praematurorum und anderen ischämischen Retinaerkrankungen, wie die diabetische Retinopathie [99].

Auch bei zerebraler Ischämie scheint HIF-1 eine Rolle zu spielen. Hypoxie und andere Substanzen, die zur HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation führen, wie etwa Deferoxamin, scheinen den Neuronen als protektiver Faktor zu dienen. So waren Neurone nach hypoxischer Präkonditionierung weit weniger vulnerabel

gegenüber nachfolgender Anoxie oder schwerer Hypoxie als Neurone ohne diese Vorbereitung. Die genaue Art und Weise dieses schützenden Effektes ist weitgehend unklar, doch denkt man an die Wirkung von Genprodukten wie EPO oder VEGF. In der Penumbra (vitale hypoxische Randzone des Infarkts) findet man eine Umstellung auf anaerobe Glykolyse, was sicherlich auch einen schützenden Effekt ausübt. Paradox klingt in diesem Zusammenhang allerdings die hypoxische p53-Induktion durch HIF-1, was nämlich zur Apoptose führt [99].

Hypoxieversuche mit Mäusen, die heterozygot defizient bezüglich HIF-1 $\alpha$  waren (Hif1a $^{+/-}$ ), und Wildtypmäusen (Hif1a $^{+/+}$ ) zeigten, daß die Muskulatur der Pulmonalarteriolen bei den Wildtypmäusen stärker ausgeprägt war. Man folgert daraus, daß chronische Hypoxie über Endothelin-1 und andere HIF-1-Genprodukte zur Remodellierung und Konstriktion pulmonaler Gefäße führt [98, 100]. Chronisch hypoxische Lungenerkrankungen können daher über HIF-1-Wirkungen zur hypoxischen pulmonalen Hypertension und weiter zu Rechtsherzhypertrophie und Cor pulmonale führen.

Studien zeigen, daß HIF-1 $\alpha$  auch bei der Entstehung der Präeklampsie und einer fetalen Wachstumsverzögerung eine wichtige Rolle spielt [99, 100].

HIF-1 $\alpha$  ist entscheidend für eine Tumorprogression nötig. Auch wenn temporär keine Hypoxie vorliegt, kann durch Loss-of-Function-Mutationen von Tumorsuppressorgenen (p53, PTEN, VHL), Gain-of-Function-Mutationen von Onkogenen (PKB, FRAP, PI3K, MAPK, RAS) oder Stimulation durch autokrine Wachstumsfaktoren (Fibroblast Growth Factor FGF2, IGF, EGF) über Rezeptortyrosinkinasen die HIF-1-Aktivität in Tumoren erhöht werden [99, 130]. Hypoxie bewirkt eine gesteigerte genetische Instabilität, die zu genannten Mutationen führen kann. Ein p53-Ausfall erscheint mir hier ein besonders nennenswerter Punkt zu sein, da dadurch nicht nur die Apoptose hypoxischer Zellen gestört wird, sondern hieraus auch eine gesteigerte HIF-1 $\alpha$ -Expression resultiert. Der Ausfall von pVHL (etwa beim VON-HIPPEL-LINDAU-Syndrom) führt zur konstitutiven Expression von HIF-1 $\alpha$ . Daraus resultiert die Entstehung der gefäßreichsten Tumoren beim Menschen [69, 99]. Gesteigerte Expression HIF-

1-regulierter Gene führt wegen VEGF-induzierter Angiogenese, Umstellung des Metabolismus auf Hypoxie (WARBURG-Effekt) und anderen Mechanismen zu einer Tumorprogression.

ZHONG et al. berichten von einer HIF-1 $\alpha$ -Überexpression in 13 von 19 getesteten Tumorentitäten verglichen mit dem Normalgewebe, darunter Kolon-, Magen-, Mamma-, Bronchial-, Haut-, Ovarial-, Pankreas-, Prostata- und Nierentumoren. Prämaligne Läsionen, wie Kolonadenome oder duktile Mammakarzinome in situ, zeigten ebenfalls eine HIF-1 $\alpha$ -Überexpression, während benigne Tumoren, wie Fibroadenome der Mamma oder Uterusleiomyome, keine Überexpression zeigen. Es liegt daher der Schluß nahe, daß eine HIF-1 $\alpha$ -Überexpression schon sehr früh in der Karzinogenese einsetzen kann, bevor überhaupt ein histologischer Hinweis auf Invasivität vorliegt. Es bleibt zu prüfen, ob HIF-1 $\alpha$  als Marker für prämaligne Läsionen sinnvoll einsetzbar ist. Bei einigen Tumoren, wie dem Hämangioblastom, ließ sich eine HIF-1 $\alpha$ -Überexpression durch Tumorphypoxie nicht erklären, da entsprechende Tumorzellen direkt neben intakten Kapillaren lokalisiert waren. Als Erklärung können hier alternative Wege der HIF-1 $\alpha$ -Aktivation herangezogen werden (siehe oben). Einige Tumoren zeigten keine Anfärbarkeit von HIF-1 $\alpha$ . Die Autoren geben als mögliche Erklärung an, daß andere bHLH-PAS-Transkriptionsfaktoren wie HIF-2 $\alpha$  oder HIF-3 $\alpha$  HIF-1 $\alpha$  ersetzt haben könnten [137].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  von überragender Bedeutung für die Entwicklungsphysiologie des Menschen und der Pathophysiologie vieler Krankheiten ist, an denen etwa 75% der Bevölkerung in Industrieländern versterben.

## 1. 5. Fragestellung der Arbeit

Zahlreiche Studien belegen, daß Tumorphoxie das rezidivfreie Intervall und auch die Überlebenszeit per se in vielen Fällen verkürzt [11, 39, 41, 80]. Ebenfalls erscheint klar, daß die intrazelluläre Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  auch meist mit einer schlechten Prognose korreliert ist [1, 5]. Bei immunhistochemischen Untersuchungen von Tumorschnitten zeigte sich, daß der injizierbare Hypoxiemarker Pimonidazol vor allem Areale fern von versorgenden Kapillaren anfärbte, während HIF-1 $\alpha$  eher diffus verteilt anzufinden war [117]. Den Grund hierfür könnte man in - von Hypoxie unabhängigen - „alternativen“ Formen der HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung suchen.

Ziel meiner Arbeit war es daher, zu klären, inwieweit eine Tumorphoxie mit der intrazellulären HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation korreliert und welchen Einfluß andere Faktoren des Tumormikromilieus auf die HIF-1 $\alpha$ -Regulation haben. Zwei humane Tumorzelllinien wurden hierbei auf den Effekt von pH-Wert, Glukosekonzentration, Tumoroxygenierung und Vorhandensein von Wachstumsfaktoren im Serum auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation untersucht. Die Ergebnisse könnten hilfreich sein, um die Anwendbarkeit von HIF-1 $\alpha$  als endogenen Hypoxiemarker in der Klinik abzuschätzen.

## 2. Material und Methoden

### 2. 1. Verwendete Materialien und Geräte

#### 2. 1. 1. Chemische und Biologische Materialien

##### 2. 1. 1. 1. Zellkultur

FaDu-Zelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
HT1080WT-Zelllinie	
HT1080-5HRE-Zelllinie	Freundlicherweise von JM Brown, Stanford University, California, USA, zur Verfügung gestellt
HT1080-CMV-Zelllinie	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D5879, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Base) (DMEM BASIS)	D5030, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	D6046, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	D8537, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline x10 (PBSx10)	D1408, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (mit 0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA und 4 Na/l HBSS)	T3924, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetal Bovine Serum (FBS)	CH 30160.03, Perbio Science, Bürstadt
Penicillin (10000 units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)	P4333, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deferoxamin-Mesylat (DFO) (= Desferrioxamin-Mesylat)	D9533, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## 2. 1. 1. 2. Kernextrakte/Proteinbestimmung/Immunoblot

Igepal CA-630	I3021, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) – Dinatriumsalz	E5134, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	S5886, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-2-Hydroxyethyl-Piperazin- -N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	H3375, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	L3771, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trishydroxymethylamino- methan-Hydrochlorid (TRIS-HCl)	T3253, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trishydroxymethylamino- methan-Base (TRIS-Base)	T1503, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin (from Bovine Lung)	A1153, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	L2023, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	P7626, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DL-Dithiothreitol (DDT)	D0632, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DC Protein Assay Kit 2 (Proteinstandard 2mg/ml, Reagenz A, S und B)	5000112, Bio-Rad Laboratories, München
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	NP0004, Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Antioxidant	NP0005, Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MOPS Running Buffer (10x)	NP0001, Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	NP0006, Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Sample Buffer LDS (4x)	NP0007, Invitrogen, Karlsruhe
Marker Precision Plus All Blue	1610373, Bio-Rad Laboratories, München
PonceauS – Lösung 0,1%	P7170, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	T859.1, Carl Roth, Karlsruhe

### Antikörper (AK):

Primär-AK: Anti-HIF-1 $\alpha$ -AK	610958, Becton Dickinson, Heidelberg
Anti- $\beta$ -Tubulin-AK	T4026, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sekundär-AK: Goat-Anti-Mouse-AK (Horseradish-Peroxidase-konjugiert)	P0447, Dako Cytomation, Hamburg

Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (TWEEN)	P7949, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL Plus Western Blotting Lumigen <sup>TM</sup> PS-3 Detection Reagens	RPN 2133, Amersham Biosciences, Freiburg

### 2. 1. 1. 3. Durchflußzytometrie

FACSFlow	342003, Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	340346, Becton Dickinson, Heidelberg
Cellwash	349524, Becton Dickinson, Heidelberg
CaliBRITE <sup>TM</sup> FITC Beads (Fluoresceinisothiocyanat)	349502, Becton Dickinson, Heidelberg

### 2. 1. 1. 4. Sonstiges

2-Mercaptoethanol	M7154, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Morpholinoethansulfonsäure (MES)	M8250, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D(+)-Glukose-Monohydrat	1.08342, Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	S5761, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natronlauge (NaOH) 1 M	K021.1, Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidplättchen	S8045, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Salzsäure (HCl) 1 M	A1434, Applichem, Darmstadt
Salzsäure (HCl) 25%	A0658, Applichem, Darmstadt
Methanol	A0688, Applichem, Darmstadt
Destilliertes Wasser (Ampuwa für Spülzwecke 10 l)	PI 6064, Fresenius, Bad Homburg
Stickstoff 5.0	Messer, Frankfurt/Main
Kohlendioxid 4.5	Messer, Frankfurt/Main
Aer medicalis	Messer, Frankfurt/Main

## 2. 1. 2. Geräte

Sterilbank	HeraSafe HS12, Heraeus, Hanau
Brutschrank (37°C, 5% CO <sub>2</sub> )	BB5060, Heraeus, Hanau
Brutschrank (37°C, 5% CO <sub>2</sub> )	BB6220, Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Biofuge 13R, Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau
Wasserbad	WB14, Memmert, Schwabach
Wasserbad	WB7, Memmert, Schwabach
Wasserbad	1083, Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
Eismaschine	AF80, Scotsman, Mailand, Italien
Kühlschrank	ProfiLine ES, Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank -20°C	Premium no frost, Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank -80°C	Modell ECU-5085-5, Nacional Lab, Möllen
Stickstoffbehälter	Arpege 110, Air Liquide Kryotechnik, Düsseldorf
Zählkammer	Neubauer-Improved, Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Absaugpumpe	N022AN.18, KNF-Neuberger, Freiburg
Abflamngerät	Flammy S, Schütt Labortechnik, Göttingen

Autoklav	Typ 23, Melag Medizintechnik, Berlin
Mikroskop	DMIL, Leica Microsystems, Wetzlar
Feinwaage	SBA 32, Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Grobwaage	CB 3K0.5N, Kern&Sohn, Balingen- Frommern
Spektralphotometer	UV/VIS Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Rüttler	L-40, Hartenstein
Einschweißgerät	Vacu Fix Electronic FS 500 A, Petra Electronic, Burgau
Magnetrührer	MR 2002, Heidolph Elektro, Kelheim
Magnetrührer	Ikamag Reo, IKA-Werke, Staufen
pH-Meter	pH 525, Wissenschaftlich-Technische- Werkstätten (WTW), Weilheim
Hand-pH-meter	Chek-mite 15, Corning, USA
Hypoxiewerkbank (mit Gasmixer)	invivo <sub>2</sub> , IUL Instruments, Königswinter
Durchflußzytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg Mit: Power PC, Apple Macintosh Software: CELLQuest 3.1 f, Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoresekammer	EI002, XCell SureLock Electrophoresis Cell (mit Blot Modul), Invitrogen, Karlsruhe
Spannungsquelle	Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories, München
Röntgenkassette 18x24 cm	Hypercassette Blue, RPN13642, Amersham Biosciences, Freiburg
Entwicklermaschine	Kodak, Rochester, NY, USA

Personalcomputer	MaxData, Marl
Scanner	HP Scanjet 4470C, Hewlett Packard, Böblingen
Densitometriesoftware	Kodak 1D 3.5, Kodak Scientific Imaging Systems, New Haven, USA
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel 2000, Microsoft Corporation
Textverarbeitung	Microsoft Word 2000, Microsoft Corporation
Pipetten	Pipetman (P2, P20, P100, P200, P1000), Gilson, Bad Camberg
Dispenserpipette	Distribiman, Gilson, Bad Camberg
Elektrische Pipettierhilfe	Accu-Jet, Brand, Wertheim

### **2. 1. 3. Zubehör**

Petrischalen 80x20 K 609.1 (Duran-Glas), Carl Roth, Karlsruhe

Das Unterteil jeder einzelnen Petrischale wurde zum besseren Gasaustausch seitlich an mehreren Stellen dankenswerterweise von Herrn Ralf Schmitt eingedellt.

Sterilisierbehälter für Petrischalen C 846.1, Carl Roth, Karlsruhe  
 Sonstiges Glasmaterial Schott Glas, Mainz

Bottle-Top-Filter 500 ml 291-4520, Nalge Nunc International, Rochester, USA

Kryoröhrchen 2 ml 5000-0020, Nalge Nunc International, Rochester, USA

Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> Falcon 3136, Becton Dickinson, Heidelberg  
 Zellschaber 24 cm ZS23, Hartenstein, Würzburg

Zentrifugenröhrchen 15 ml	Falcon 2096, Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon 2073, Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäß mit anhängendem Deckel (Caps) 1,5 ml	bio-one, 616201, Greiner
Küvetten	Halbmikroküvetten, 67.742, Sarstedt, Nümbrecht
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	NP 0322, Invitrogen, Karlsruhe
Westernblotmembran	Nitrocellulose membrane (0.2 µm), LC 200, Invitrogen, Karlsruhe
Röntgenfilm 18x24 cm	Hyperfilm ECL, RPN3103K, Amersham Biosciences, Freiburg
Röntgenfilm 5x7 inch	Hyperfilm ECL, RPN1674K, Amersham Biosciences, Freiburg
FACS-Röhrchen	Falcon 2054, Becton Dickinson, Heidelberg
Dispenserpipetten 1250 µl	DistriTip Mini, 02G01, Gilson, Bad Camberg
Dispenserpipetten 12,5 ml	DistriTip Maxi, 02D77, Gilson, Bad Camberg
Pipettenspitzen blau (1000 µl)	PSBI, Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen gelb (200 µl)	PSGI, Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen Kristall (2 µl)	PSMI, Hartenstein, Würzburg
Gelloader-Spitzen	GS21, Hartenstein, Würzburg
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Handschuhe (Latex puderfrei)	Kimberly-Clark, Roswell, USA

## 2. 1. 4. Selbsthergestellte Medien und Puffer

### 2. 1. 4. 1. Medien

#### ▶ Standardmedium

500 ml DMEM (Fertiglösung) mit

- 1 g/l D-Glukose
  - 0,584 g/l L-Glutamin
  - 0,015 g/l Phenolrot
  - 0,11 g/l Natriumpyruvat
- + 10% FBS  
+ 1% Penicillin/Streptomycin

Zur Herstellung wurden 50 ml FBS und 5 ml Penicillin/Streptomycin (gelagert bei -20°C) aufgetaut und unter der Steril bank zum DMEM pipettiert. Die Einstellung auf einen bestimmten pH-Wert erfolgte nicht.

#### ▶ Spezialmedien

- **DMEM 6,7 G 1**

500 ml DMEM BASIS (ohne L-Glutamin, Glukose, Phenolrot,  
NaHCO<sub>3</sub>)

pH-Wert 6,7

- + 1 g/l D-Glukose
- + 20 mM TRIS Base (2,422 g/l)
- + 20 mM MES (3,904 g /l)
- + 0,52 g/l NaHCO<sub>3</sub>

- **DMEM 6,7**

500 ml DMEM BASIS (ohne L-Glutamin, Glukose, Phenolrot,  
NaHCO<sub>3</sub>)

pH-Wert 6,7

- + 20 mM TRIS Base (2,422 g/l)
- + 20 mM MES (3,904 g /l)

+ 0,52 g/l NaHCO<sub>3</sub>

- **DMEM 7,4 G 1**

500 ml DMEM BASIS (ohne L-Glutamin, Glukose, Phenolrot,  
NaHCO<sub>3</sub>)

pH-Wert 7,4

+ 1 g/l Glukose

+ 20 mM TRIS Base (2,422 g/l)

+ 20 mM MES (3,904 g /l)

+ 1,14 g/l NaHCO<sub>3</sub>

- **DMEM 7,4**

500 ml DMEM BASIS (ohne L-Glutamin, Glukose, Phenolrot,  
NaHCO<sub>3</sub>)

pH-Wert 7,4

+ 20 mM TRIS Base (2,422 g/l)

+ 20 mM MES (3,904 g /l)

+ 1,14 g/l NaHCO<sub>3</sub>

Zur Herstellung wurden in ein Gefäß sowohl das DMEM-BASIS-Trockenpulver als auch die anderen genannten Chemikalien gegeben. Man goß einen Liter destilliertes Wasser hinzu und vermischte alles auf dem Magnetrührer. Der pH-Wert wurde mittels Titration mit NaOH (5-molare oder verdünnte Lösung) beziehungsweise HCl (25%ige oder verdünnte Lösung) auf 7,4 beziehungsweise 6,7 eingestellt. Anschließend wurde das Medium unter der Sterilbank in autoklavierte und beschriftete Glasflaschen durch einen Bottle-Top-Filter steril filtriert.

- Für Versuche mit verschiedenen Glukosekonzentrationen wurde folgendes Medium mit den Glukosekonzentrationen 0 g/l, 0,001 g/l, 0,01 g/l, 0,1 g/l und 1 g/l hergestellt:

500 ml DMEM BASIS (ohne L-Glutamin, Glukose, Phenolrot, NaHCO<sub>3</sub>)

pH-Wert 7,4

- + 20 mM TRIS Base (2,422 g/l)
- + 20 mM MES (3,904 g /l)
- + 1,14 g/l NaHCO<sub>3</sub>

Man stellte zunächst 1 l Medium mit 1 g Glukose/l und 2 l Medium ohne Glukose her. Dazu gab man in einen Meßzylinder die entsprechenden Chemikalien und das Trockenmedium und rührte bis sich alle Bestandteile gelöst hatten. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mischte man beide Lösungen im Sinne einer Verdünnungsreihe, so daß Medien mit oben genannten Glukosekonzentrationen entstanden. Diese mußten unter der Sterilbank noch steril durch einen Bottle-Top-Filter in autoklavierte Flaschen filtriert werden.

#### 2. 1. 4. 2. Puffer

LB1-Puffer (für 50 ml)

1 M TRIS (pH 7,4)	500 µl
500 mM EDTA	100 µl
5 M NaCl	1,5 ml
10% Igepal CA630	2,5 ml
destilliertes Wasser	45,4 ml

Proteaseinhibitoren direkt vor Gebrauch zugeben (für 50 ml):

Aprotinin	500 µl
Leupeptin	500 µl
PMSF	500 µl

LB2-Puffer (für 50 ml)

1 mM HEPES	2,5 ml
5 M NaCl	4,0 ml
500 mM EDTA	100 µl

destilliertes Wasser 43,4 ml

Proteaseinhibitoren direkt vor Gebrauch zugeben (für 1 ml):

Aprotinin 10 µl

Leupeptin 10 µl

PMSF 10 µl

1 M DTT 1 µl

Stripping Buffer (für 50 ml)

Mercaptoethanol 352 µl

SDS 10% 10 ml

1 M TRIS (pH 6,7) 3,125 ml

Destilliertes Wasser 36,52 ml

PBS-TWEEN (für 2 l 0,05%ige PBS-TWEEN-Lösung)

PBS (x10) 200 ml

TWEEN 1 ml

Destilliertes Wasser auf 2 l aufgießen

Elektrophoresepuffer

Lower Buffer:

Destilliertes Wasser 950 ml

NuPAGE MOPS 50 ml

Upper Buffer:

Lower Buffer 200 ml

NuPAGE Antioxidant 500 µl

### Transfer Buffer

Destilliertes Wasser	300 ml
Methanol	80 ml
NuPAGE Transferbuffer (20x)	20 ml
NuPAGE Antioxidant	400 µl

Milch (für 100 ml)

TWEEN (0,05%)	100 ml
Milchpulver	4 g

## **2. 1. 5. Charakterisierung der verwendeten Tumorzelllinien**

Für die Versuche, deren Auswertung mittels Westernblot erfolgte, wurden zwei humane Tumorzelllinien verwendet. Bei der einen Zelllinie (FaDu) handelt es sich um ein Plattenepithelkarzinom des Pharynx. Diese Zellen wurde 1968 im Rahmen einer Biopsie einem Hindu entnommen und 1972 von RANGAN beschrieben [88]. Optimales Kulturmedium ist DMEM mit einem Anteil von 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Die andere Zelllinie besteht aus Fibrosarkomzellen (HT1080 WT), die 1972 von der Biopsie eines 35-jährigen Kaukasiers gewonnen und 1974 von RASHEED et al. charakterisiert wurden [90]. Zur Kultur eignet sich hier besonders  $\alpha$ -MEM mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin. Leider verfügt keine Firma über eine  $\alpha$ -MEM-Modifikation ohne Glukosezusatz, welche bei den Versuchen vonnöten war, so daß auch bei den Fibrosarkomzellen DMEM mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin benutzt wurde, was auch von der ATCC (American Type Culture Collection) vorgeschlagen wird und in anderen Labors Verwendung findet [9].

Für die Versuche am Durchflußzytometer wurden spezielle HT1080-Zellen verwendet. Um die Genexpression hypoxieabhängiger Gene zu bestimmen, benutzte man ein Gen der Qualle *Aequorea victoria*. Genprodukt ist das Green Fluorescent Protein (GFP). 1996 entwickelten ZHANG et al. [134] eine verbesserte Form des GFP, das Enhanced GFP (EGFP). Dieses hat gegenüber seinem Vorgänger den Vorteil einer lichtstärkeren Fluoreszenz, also einer größeren Sensitivität. Daneben konnte auch die Halbwertszeit verlängert werden. In der Praxis transfizierte man die Tumorzellen daher mit einem destabilisierten EGFP-Vektor. Man benutzte hierbei ein d2EGFP-Fragment, das eine Variante des Wildtyp-GFP kodiert, die folgende Eigenschaften besitzt:

Exzitationsmaximum	488nm
Emissionsmaximum	507nm
Halbwertszeit	etwa zwei Stunden

Dieses d2EGFP-Fragment enthält entweder den hypoxiesensiblen 5HRE-hCMVmp-Promotor oder als Positivkontrolle den stark konstitutiven CMV-Promotor. Dementsprechend wurden die Zellen HT1080-5HRE beziehungsweise HT1080-CMV genannt. Der 5HRE-hCMVmp-Promotor besteht aus fünf Kopien eines 35-bp-Fragmentes des HRE (Hypoxia Responsive Element) des humanen VEGF-Gens und aus einem Minimal Promotor des humanen Zytomegalievirus [120].

Das heißt, bei Hypoxiebedingungen wird das d2EGFP-Gen über die Aktivierung am 5HRE-hCMVmp-Promotor „angeschaltet“ und es kommt zur EGFP-Fluoreszenz, welche durchflußzytometrisch bestimmt werden kann.

Die maximale Fluoreszenz wird beim EGFP aufgrund seiner Eigenschaften rund vier Stunden nach der Hypoxiebehandlung erreicht (etwa 68% von der maximalen Fluoreszenz der aeroben CMV-d2EGFP-Positivkontrolle) [120]. Daher wurden die durchflußzytometrischen Messungen immer nach vier Stunden Reoxygenierung durchgeführt.

## 2. 2. Zellkultur

Aufgrund der optimalen Haltbarkeit werden die Tumorzellen in flüssigem Stickstoff langfristig gelagert. Üblicherweise wurden 1 Million Tumorzellen in 1 – 1,5 ml eines Einfriermediums aus 70% Medium, 20% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Kryoröhrchen langsam eingefroren. DMSO verhindert hierbei die Kristallbildung. Je nach Bedarf konnte man nun jederzeit Zellen auftauen: Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C solange belassen, bis die Konsistenz der Zellsuspension sorbetartig war, Desinfektion des Röhrchens, Pipettieren der Suspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen und Versetzen mit 10 ml Standardmedium. Nun wurde bei 1200 U/min und 20°C fünf Minuten lang zentrifugiert. Die Zellen setzen sich am Boden ab und bilden das so genannte Pellet, welches nach Absaugen des Überstandes wieder mit 10 ml Standardmedium resuspendiert wurde. Die Zellsuspension inkubierte man mehrere Tage in einer Kulturflasche im Brutschrank.

Nach Anwachsen und Konfluenz der Zellen - nach 3-5 Tagen - wurden sie je nach Zeitplanung im Verhältnis 1:4 bis 1:10 auf neue Kulturflaschen aufgeteilt („gesplittet“). Dazu wurde das Medium mit den toten Zellen abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml 37°C warmem PBS zur vollständigen Eliminierung des fetalen Kälberserums (FBS) gewaschen, da dieses die Wirkung des Trypsins beeinträchtigt, das PBS anschließend sofort wieder abgesaugt. Man gab in jede Kulturflasche 1 ml 37°C-warmes Trypsin-EDTA. Trypsin ist eine Protease, die Adhäsionsproteine der Tumorzellen angreift und somit die Lösung der Zellen vom Flaschenboden bewirkt. Der sechszählige Chelatbildner EDTA komplexiert Magnesium- und Calciumionen, destabilisiert so die Adhäsionsproteine und unterstützt daher den Prozeß der Ablösung. Für etwa fünf Minuten inkubierte man die Kulturflaschen nun im Brutschrank. Danach stoppte man die Wirkung des Trypsins ab, damit die Zellen keinen Schaden davontrugen, da Trypsin potentiell zytotoxisch wirkt. Dazu verdünnte man es mindestens mit dem Doppelten der Trypsinmenge mit Standardmedium. Jetzt konnte die vorliegende Zellsuspension in der entsprechenden Verdünnung auf neue mit 10 ml Standardmedium gefüllte Kulturflaschen aufgeteilt werden.

Sobald man so über eine ausreichend große Anzahl von Zellen verfügte, konnte man sie für den eigentlichen Versuch „aussäen“.

Bei der Aussaat der Tumorzellen in die Petrischalen wurde das Standardmedium aus den Kulturflaschen abgesaugt, die angewachsenen Zellen mit 10 ml warmem PBS pro Kulturflasche ein mal gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA pro Kulturflasche versetzt. Dieses mußte fünf Minuten im Brutschrank wirken, bis dann die Wirkung mit 4 ml Standardmedium pro Flasche aufgehoben wurde. Zusätzlich kann durch Klopfen der Kulturflasche in die offene Handfläche die Ablösung der Zellen vom Boden verbessert werden. Man pipettierte die Zellsuspension mehrerer Kulturflaschen in ein 50 ml-Röhrchen, entnahm davon etwa 50 µl und bestimmte in der Neubauer-Improved-Zählkammer unter dem Mikroskop die Anzahl der Zellen in allen 4x16 Zählfeldern, wodurch man die Gesamtzahl der Zellen im 50 ml-Röhrchen berechnen konnte. Zeitgleich zentrifugierte man das Röhrchen bei 1200 U/min für fünf Minuten. Dann saugte man den Überstand ab, resuspendierte das Pellet mit 0,1 ml Standardmedium pro Million Zellen und konnte so in jede bereits beschriftete und mit 10 ml Standardmedium gefüllte Petrischale 0,1 ml der Suspension geben, d.h. eine Million Zellen aussäen. Bei den Versuchen mit Westernblotauswertung brauchte man pro Bedingung fünf Petrischalen bei den Versuchen für die durchflußzytometrische Messung lediglich eine. Die Petrischalen wurden über Nacht (für etwa 24 Stunden) im Brutschrank inkubiert, damit die Zellen anwachsen und sich vermehren konnten. Am folgenden Tag saugte man das Medium ab und ersetzte es durch Spezialmedien, die je nach Fragestellung des Versuchs variierten.

## 2. 3. Versuche mit anschließendem Westernblot

### 2. 3. 1. Aussaat und Medienwechsel

#### 2. 3. 1. 1. Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration und Kombinationen dieser Bedingungen auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation

Aus folgender Tabelle geht hervor, welche Medien nun Verwendung fanden und wie mit den Petrischalen der verschiedenen Bedingungen weiter verfahren wurde:

<b>Bedingung</b>	<b>pH-Wert</b>	<b>Brutschrank/ Hypoxie</b>	<b>Glukose- konzentration</b>	<b>FBS- Zusatz</b>	<b>Anzahl Petrischalen</b>
7,4 B	7,4	Brutschrank	0 g/l	0%	5
7,4 H	7,4	Hypoxie	0 g/l	0%	5
7,4 BS	7,4	Brutschrank	0 g/l	10%	5
7,4 HS	7,4	Hypoxie	0 g/l	10%	5
7,4 BG	7,4	Brutschrank	1 g/l	0%	5
7,4 HG	7,4	Hypoxie	1 g/l	0%	5
7,4 BGS	7,4	Brutschrank	1 g/l	10%	5
7,4 HGS	7,4	Hypoxie	1 g/l	10%	5
6,7 B	6,7	Brutschrank	0 g/l	0%	5
6,7 H	6,7	Hypoxie	0 g/l	0%	5
6,7 BS	6,7	Brutschrank	0 g/l	10%	5
6,7 HS	6,7	Hypoxie	0 g/l	10%	5
6,7 BG	6,7	Brutschrank	1 g/l	0%	5
6,7 HG	6,7	Hypoxie	1 g/l	0%	5
6,7 BGS	6,7	Brutschrank	1 g/l	10%	5
6,7 HGS	6,7	Hypoxie	1 g/l	10%	5
DFO	~ 7,4	Brutschrank	1 g/l	10%	5

*Tabelle 2.1.: Versuchsbedingungen /*

Das fetale bovine Serum wurde hier bei den Bedingungen mit Serum eigens beim Mediumwechsel in die Petrischalen hinzugegeben (9 ml Medium + 1 ml FBS) und befand sich nicht wie beim Standardmedium bereits im Medium. Deferoxamin (DFO) ist ein Chelatbildner. Durch die Komplexbildung mit Eisen wird eine HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation auch ohne Hypoxie ermöglicht, da abbauende Enzyme des HIF-1 $\alpha$ , die Prolylhydroxylasen, Eisen als Kofaktor benötigen. Deferoxamin diene daher als versuchsinterne Positivkontrolle. Bei der DFO-Bedingung wurden statt eines Mediumwechsels in jede der fünf Petrischalen 100  $\mu$ l DFO pipettiert. Alle 85 Petrischalen wurden für 24 Stunden im Brutschrank beziehungsweise in der Hypoxiebox bei 0,1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Die verwendeten Medien wurden in Vorversuchen auf ihre pH-Stabilität über 24 Stunden unter Hypoxie- und Brutschrankbedingungen sowohl mit als auch ohne Zellen überprüft.

### 2. 3. 1. 2. Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation

Bedingung	pH-Wert	Brutschrank/ Hypoxie	Glukose- konzentration	FBS-Zusatz	Anzahl Petrischalen
B 0	7,4	Brutschrank	0 g/l	0%	5
B 0,001	7,4	Brutschrank	0,001 g/l	0%	5
B 0,01	7,4	Brutschrank	0,01 g/l	0%	5
B 0,1	7,4	Brutschrank	0,1 g/l	0%	5
B 1	7,4	Brutschrank	1 g/l	0%	5
H 0	7,4	Hypoxie	0 g/l	0%	5
H 0,001	7,4	Hypoxie	0,001 g/l	0%	5
H 0,01	7,4	Hypoxie	0,01 g/l	0%	5
H 0,1	7,4	Hypoxie	0,1 g/l	0%	5
H 1	7,4	Hypoxie	1 g/l	0%	5
DFO	~7,4	Brutschrank	1 g/l	10%	5

Tabelle 2.2.: Versuchsbedingungen II

Die gefüllten 55 Petrischalen wurden dann entsprechend der obenstehenden Tabelle auf Brutschrank beziehungsweise Hypoxiebox (0,1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) aufgeteilt und dort 24 Stunden lang inkubiert .

### **2. 3. 2. Kernextrakte**

Die Petrischalen mußten unmittelbar, nachdem sie aus Brutschrank entnommen beziehungsweise aus Hypoxiebox ausgeschleust worden waren, auf Eis gestellt werden, damit der Zellmetabolismus vollständig zum Erliegen kam und so der bekannt schnelle Abbau von HIF-1 $\alpha$  [117] verhindert wurde. Zunächst wurde das Medium abgekippt, anschließend die Zellen mit etwa 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Dieses wurde abgekippt, die Reste mit jeweils neuen Pipetten für verschiedene Bedingungen abgesaugt. Nun gab man in jede Petrischale 1,5 ml kalten LB1-Puffer mit Proteaseinhibitoren. Mit dem Zellschaber wurden die Zellen durch vorsichtiges Kratzen vom Boden gelöst. Nach jeder Bedingung war hierbei der Schaber zu wechseln. Die entstandene LB1-Zell-Suspension pipettierte man in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen und lagerte dieses auf Eis, bis die Zellen aus allen Petrischalen abgelöst worden waren. Dann zentrifugierte man sämtliche Röhrchen bei 3000 U/min und 4°C für 5 Minuten.

Auch bei folgenden Schritten mußte die Kühlkette stets gewahrt bleiben, d.h. Lagerung auf Eis und Verwendung kalter Chemikalien. Man saugte den Überstand ab, resuspendierte das Pellet je nach Größe mit 30 bis 50  $\mu$ l LB2-Puffer mit Proteaseinhibitoren und pipettierte die Suspension in Caps. Diese wurden bei 4°C für 5 Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die Kernproteine. Man pipettierte den Überstand in Caps und frore diese bei -20°C ein. Das Pellet wurde verworfen.

## 2. 3. 3. Proteinbestimmung

### 2. 3. 3. 1. Prinzip

Die Messung des Proteingehaltes der einzelnen Kernextrakte wurde mit der Biuretmethode durchgeführt, das durch die Addition von Harnstoff und Isocyansäure entsteht. Hierbei lassen sich die Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren spezifisch anfärben. Die Proteine reagieren mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu einem blauen Farbkomplex, dessen Intensität proportional zur Menge der Peptidbindungen ist. Spektrometrisch läßt sich die Extinktion, die mit der Proteinmenge steigt, leicht ermitteln.

### 2. 3. 3. 2. Durchführung

Es wurden dazu die BioRad-Reagenzien A, S und B benutzt. Zunächst stellte man sich A´ her, indem man für jeden ml A 20 µl S in ein Röhrchen zusammenpipettierte. Für die Untersuchung im Photometer benötigte man für jede Bedingung eine Küvette, eine für die Positivkontrolle und acht für die Ermittlung der Eichgerade. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um übergeordnete, versuchsunabhängige DFO-Kernextrakte, die in einem vorherigen Arbeitsgang hergestellt, die Proteinmengen bestimmt, passend aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren worden waren. Diese Positivkontrolle ließ man bei jedem Westernblot mitlaufen, wodurch die Versuche auch untereinander vergleichbar wurden, da man die Ergebnisse auf die Positivkontrolle normieren konnte.

In jede Küvette gab man 100 µl A´. Dann pipettierte man LB2-Puffer mit Proteaseinhibitoren (LB2), Proteinstandard mit 2 mg/ml Protein in LB2-Puffer (Standard), Kernextrakte (Probe) der einzelnen Bedingungen (1, 2, ..., n-1,n) wie in *Tabelle 2.3.* von links nach rechts dargestellt in der entsprechenden Menge in die Küvetten. Zum Schluß gab man Reagenz B (B) hinzu. Es war darauf zu achten, daß alle verwendeten Chemikalien und Proben frisch

aufgetaut, während des Pipettierens auf Eis gelagert und anschließend wieder bei -20°C eingefroren beziehungsweise verworfen wurden.

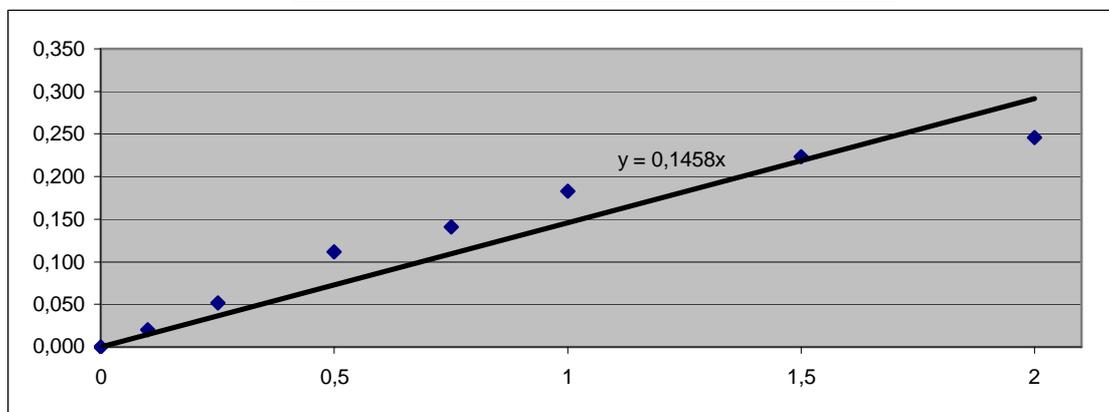
Küvetten- bezeichnung	1. A <sup>-</sup> [µl]	2. LB2 [µl]	3. Standard [µl]	4. Probe [µl]	5. B [µl]
Standard 0	100	20	0	0	800
Standard 1	100	19	1	0	800
Standard 2,5	100	17,5	2,5	0	800
Standard 5	100	15	5	0	800
Standard 7,5	100	12,5	7,5	0	800
Standard 10	100	10	10	0	800
Standard 15	100	5	15	0	800
Standard 20	100	0	20	0	800
Probe 1	100	15	0	5	800
Probe 2	100	15	0	5	800
...	...	...	...	...	...
Probe n-1	100	15	0	5	800
Probe n	100	15	0	5	800
Positivkontrolle	100	15	0	5	800

*Tabelle 2.3.: Pipettierschema zur Proteinbestimmung*

Die gefüllten Küvetten inkubiert man nun bei Raumtemperatur für 15 bis 60 Minuten, der Zeit, in der die Biuretreaktion linear verläuft. Anschließend wurde die Extinktion bei 750 nm im Photometer bestimmt. Zuerst maß man die Küvette mit 0 mg Standardprotein (Leerwert) und kalibrierte danach unabhängig vom Meßwert die Extinktion auf 0. Anschließend konnten alle anderen Küvetten gemessen werden. Gewöhnlich wurden die Proben also 1:4 mit LB2 verdünnt. Falls aus einer sehr großen Proteinmenge gelegentlich eine sehr hohe Extinktion resultierte, wurde der Genauigkeit wegen zusätzlich noch eine 1:10-Verdünnung durchgeführt und erneut gemessen.

In Microsoft Excel wurde anhand der Extinktionen der Proteinstandards die Eichgerade erstellt und mit den Extinktionen der Proben, der Positivkontrolle und der Steigung der Eichgerade die Proteinkonzentration (mg/ml) und die Menge an Probe ( $\mu\text{l}$ ) beziehungsweise LB2-Puffer mit Proteaseinhibitoren ( $\mu\text{l}$ ) bestimmt, die man für die Auftragung von 10 oder  $5\mu\text{g}$  Protein bei der Elektrophorese benötigte, wie etwa folgend:

Bestimmung der Eichkurve (Standard in LB2)	
mg/ml	Extinktion
0	0,000
0,1	0,020
0,25	0,052
0,5	0,112
0,75	0,141
1	0,183
1,5	0,223
2	0,246



Proben	Extinktion A	Konzentration mg/ml	für 10 $\mu\text{g}$ Protein		für 5 $\mu\text{g}$ Protein	
			Probe in $\mu\text{l}$	Menge LB2 in $\mu\text{l}$	Probe in $\mu\text{l}$	Menge LB2 in $\mu\text{l}$
DFO	0,172	4,72	2,32	12,68	1,17	13,83
7,4 BGS	0,173	4,75	2,31	12,69	1,16	13,84
7,4 HGS	0,160	4,39	2,49	12,51	1,26	13,74

7,4 BG	0,125	3,43	3,19	11,81	1,61	13,39
7,4 HG	0,114	3,13	3,50	11,50	1,76	13,24
7,4 BS	0,145	3,98	2,75	12,25	1,39	13,61
7,4 HS	0,128	3,51	3,12	11,88	1,57	13,43
7,4 B	0,140	3,84	2,85	12,15	1,44	13,56
7,4 H	0,082	2,25	4,87	10,13	2,45	12,55
6,7 BGS	0,182	4,99	2,19	12,81	1,10	13,90
6,7 HGS	0,173	4,75	2,31	12,69	1,16	13,84
6,7 BG	0,205	5,62	1,95	13,05	0,98	14,02
6,7 HG	0,145	3,98	2,75	12,25	1,39	13,61
6,7 BS	0,182	4,99	2,19	12,81	1,10	13,90
6,7 HS	0,166	4,55	2,40	12,60	1,21	13,79
6,7 B	0,198	5,43	2,02	12,98	1,01	13,99
6,7 H	0,110	3,02	3,63	11,37	1,83	13,17
Positiv- kontrolle	0,094	2,58	4,25	10,75	2,14	12,86

*Tabelle 2.4.: Beispiel zum Erstellen der Eichgerade einer Proteinbestimmung*

## **2. 3. 4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

### 2. 3. 4. 1. Prinzip

Elektrophorese bedeutet die Wanderung eines Ions (z.B. ein Protein) in einem elektrischen Feld. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens: Ladung  $q$ , Feldstärke  $E$ , Reibungskoeffizient  $f$  (abhängig unter anderem von Form und Größe eines Ions). Daher lassen sich geladene Makromoleküle oder Nukleinsäuren durch dieses Verfahren sehr gut trennen.

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) befinden sich im Gel molekulare Poren, die eine Trennung der Proteine bewirken, d.h. es wird nach Ladung und Größe der Teilchen getrennt.

Die SDS-PAGE ist eine spezielle Form der PAGE. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein negativ geladenes Detergens mit hoher Affinität zu Proteinen, das durch seine Eigenladung die Nettoladung der Proteine maskiert. Dadurch haben alle Proteine die annähernd gleiche Ladung und Form. Die Proteine sind nun ausnahmslos Anionen und laufen demzufolge im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Trennung erfolgt daher ausschließlich nach der molekularen Masse der Teilchen. SDS zerstört zudem auch die nichtkovalenten Bindungen der Polypeptide untereinander und hebt so die Quartärstruktur komplexer Proteine auf. Durch die Behandlung mit Mercaptoethanol werden die Proteine reduziert und damit vorhandene Disulfidbrücken zerstört. Man ermittelt also die molaren Massen der Proteinuntereinheiten.

#### 2. 3. 4. 2. Durchführung

Je nach erzielter Proteinmenge in den Kernextrakten wurden die Westernblots mit 5 oder 10 µg Protein pro Bedingung durchgeführt. Man beschriftete Caps und lagerte sie während des Pipettierens auf Eis. In jedes Cap wurden nacheinander die berechneten Mengen an LB2-Puffer mit Proteaseinhibitoren und Probe gegeben (zusammen 15 µl). Anschließend pipettierte man pro Cap noch 5 µl Sample Buffer und 2 µl Reducing Agent dazu, so daß sich in jedem Cap nun 22 µl befanden. Sämtliche Caps wurden nun für 10 Minuten im 70°C warmen Wasserbad erhitzt und anschließend kurz anzentrifugiert. Zwischenzeitlich wurden die zwei Gele vorbereitet und in die Elektrophoresekammer gesetzt. Den Upper Buffer gab man zwischen die Gele, den Lower Buffer außerhalb der Gele in die Elektrophoresekammer. Jetzt konnten pro Bedingung 20 µl der Probe in die jeweilige Lane pipettiert werden. Außerdem wurden die Taschen der beiden äußersten Lanes mit je 5 µl eines Proteinmarkers gefüllt, der auf Westernblotmembran und Röntgenfilm die Molekularmassen 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa markierte. Die Elektrophorese wurde bei 200 V 50 Minuten lang durchgeführt. Die Stromquelle ist in der Lage, die Stromstärke je nach Widerstand im Gel zu

verändern, so daß beste Ergebnisse durch ein konstantes elektrisches Feld erzielt werden können.

## **2. 3. 5. Westernblot**

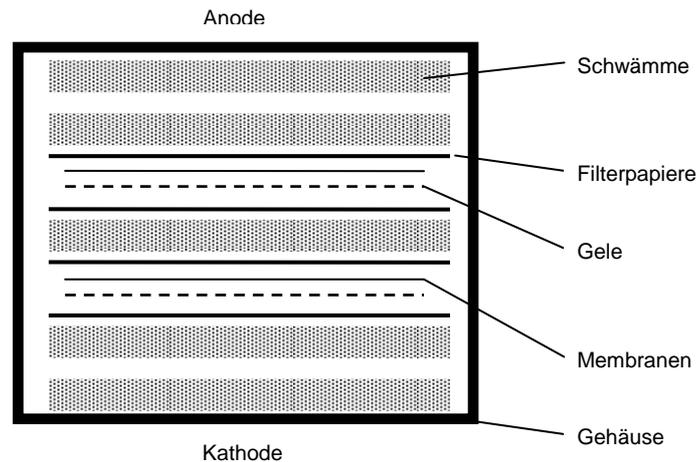
### 2. 3. 5. 1. Prinzip

Blotting ist eine Möglichkeit, das Bandenbild einer Gelelektrophorese zu konservieren. Es handelt sich um eine Art zweiten Elektrophoreseschritt, in dem die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran übertragen werden. Somit sind die Proteine immobilisiert und zugänglich für Antikörper jeglicher Art. Färbe- oder Waschvorgänge führen nicht zu einem Herunterwaschen der Proteine.

### 2. 3. 5. 2. Durchführung

Man weichte fünf Schwämme, vier Filterpapiere und zwei Nitrozellulose-Membranen in dem vorbereiteten Transfer Buffer gründlich ein. Ist die Elektrophorese beendet, wurden die Gelkassetten vorsichtig aufgebrochen und die Gele entnommen. Wichtig war, daß weder die Gele noch die Membranen mit den Fingern berührt werden durften, sondern ausschließlich mit Pinzetten. Man fügte Schwämme, Filterpapiere, Membranen und Gele mit Druck sandwichartig in der Blotting-Einheit zusammen (vgl. *Abb. 2.1.*).

Die Blotting-Einheit wurde in einer Elektrophoresekammer platziert und mit dem Transfer Buffer gefüllt. Außerhalb der Einheit füllte man die Kammer mit destilliertem Wasser. Es wurde jetzt bei 30 V für 90 Minuten geblottet. Wiederum hielt die Stromquelle das elektrische Feld konstant.



*Abbildung 2.1.: Aufbau des Westernblotsystems*

Nach dieser Zeit entnahm man mit einer Pinzette die Membranen und färbte sie auf dem Rüttler 10 Minuten mit 0,2%iger PonceauS-Lösung an. Anschließend entfärbte man sie durch etwa fünfminütiges Waschen mit destilliertem Wasser wieder, so daß nur noch die Lanes koloriert waren. PonceauS färbt die auf der Membran gebundenen Proteine an und zeigt so, ob sich in jeder Lane etwa die gleiche Proteinmenge befand. Zur Dokumentation scannte man die Membranen ein. Damit unspezifische Bindungsstellen für Antikörper abgesättigt wurden, legte man die Membranen über Nacht in den Kühlschrank bei 4°C in Milch.

## **2. 3. 6. Immunologischer Nachweis von HIF-1 $\alpha$ und $\beta$ -Tubulin**

### 2. 3. 6. 1. Prinzip

Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, verwendete man das System „ECL Plus Western Blotting Detection Reagents“. Es basiert auf der Oxidation von Acridan zu Acridiniumestern, die mit Peroxid unter alkalischen Bedingungen reagieren wodurch eine intensive Chemilumineszenz mit maximaler Emission bei einer Wellenlänge von 430nm generiert wird. Die Oxidation wird von Peroxid

und von der Meerrettichperoxidase des Sekundärantikörpers katalysiert. (vgl. Abb. 2.2.)

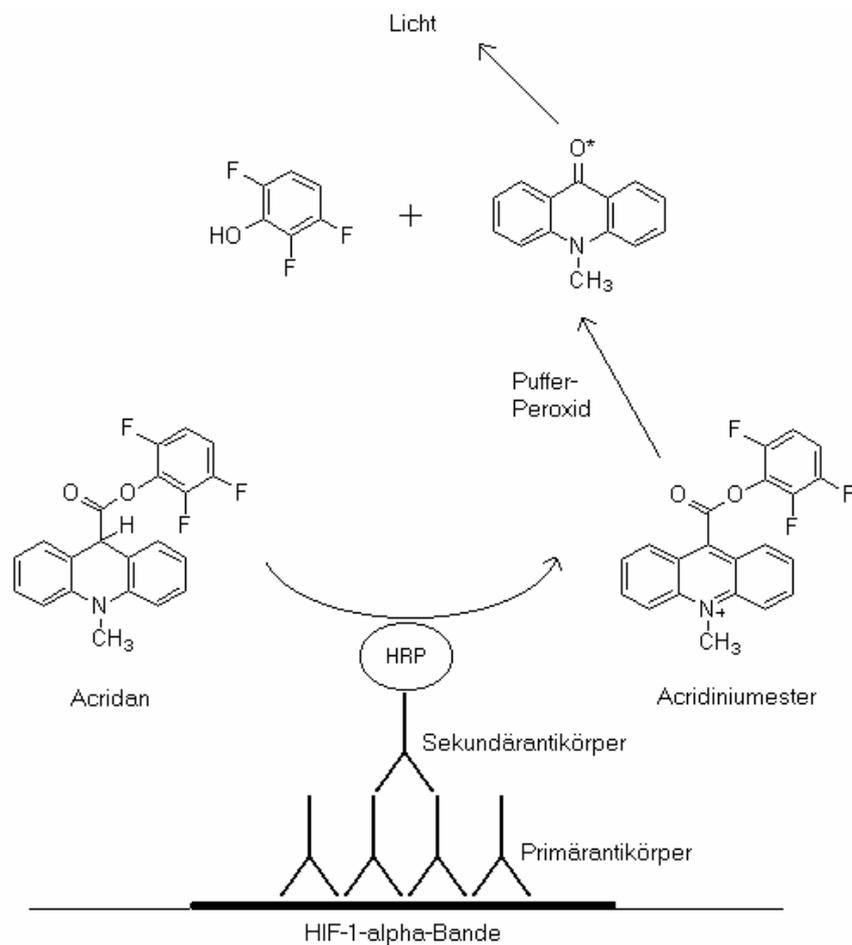


Abbildung 2.2.: Prinzip der Antikörperwirkung

### 2. 3. 6. 2. Durchführung

Um den Primärantikörper binden zu lassen, nahm man die Membranen und schweißte sie zusammen mit einer Lösung aus 4 µl des Anti-HIF-1α-Mausantikörpers und 2 ml Milch (1:500) in Plastikfolien ein, um Antikörperlösung zu sparen. Diese legte man in den Kühlschrank und beließ sie dort für zwei Stunden bei 4°C. Anschließend wusch man die Membranen in Plastikbehältern bei Raumtemperatur 30 Minuten lang in PBS-TWEEN (0,05%)

auf dem Rüttler, wobei das PBS-TWEEN alle zehn Minuten erneuert wurde. Als Sekundärantikörper verwendete man einen mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Ziege-Anti-Maus-Antikörper, der im Verhältnis 1:2000 mit Milch gemischt wurde. Die Membranen wurden abermals mitsamt dieses Milch-Antikörper-Gemisches in Plastikfolien eingeschweißt. Diesmal deponierte man sie für eine Stunde im Kühlschrank bei 4°C. Anschließend wurden sie wieder für 30 Minuten mit PBS-TWEEN (0,05%) auf dem Rüttler bei Raumtemperatur gewaschen und alle 10 Minuten das PBS-TWEEN ersetzt.

In der Dunkelkammer kippte man die restliche Spülflüssigkeit ab und inkubierte die Membranen in den Plastikbehältern fünf Minuten lang mit einer frisch angesetzten Mischung aus 5 ml ECL-Lösung A und 125 µl ECL-Lösung B. Nun konnte man die Membranen aus den Behältern entnehmen und mit ihnen die Röntgenfilme belichten. Die Entwicklungsdauer richtete sich nach der HIF-1 $\alpha$ -Bandenintensität (gewöhnlich 1 bis 3 Minuten). Die Filme wurden in der Entwicklermaschine automatisch entwickelt. Zur Darstellung des  $\beta$ -Tubulins mußten die Membranen von den an ihnen haftenden Antikörpern befreit werden („Stripping“). Dazu legte man die Membranen in Plastikschrälchen und gab soviel Strippingpuffer hinzu, daß sie vollständig bedeckt waren. Die Schrälchen ließ man für 30 Minuten im 60°C warmen Wasserbad schwimmen. Danach mußten die Membranen 60 Minuten lang mit PBS-TWEEN (0,05%) auf dem Rüttler gewaschen werden, wobei das PBS-TWEEN alle 15 Minuten erneuert wurde. Nun legte man die Nitrozellulosemembranen zum Blockieren über Nacht wieder bei 4°C in Milch, so daß am nächsten Tag mit der gleichen Vorgehensweise, wie oben beschrieben, die  $\beta$ -Tubulin-Banden dargestellt werden konnten. Lediglich die Verdünnung des Anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörpers mit der Milch war unterschiedlich, nämlich 2 µl Antikörper auf 4 ml Milch (1:2000). Je nach Bandenintensität lag die Entwicklungsdauer der  $\beta$ -Tubulin-Bilder bei etwa 30 Sekunden.

Zur Langzeitlagerung konnte man die Membranen in Plastikfolie einschweißen und im Kühlschrank deponieren.

## 2. 3. 7. Auswertung der Westernblots

Zur Quantifizierung der Proteinbanden (Densitometrie) von HIF-1 $\alpha$  und  $\beta$ -Tubulin wurde die „Kodak-1D Image Analysis Software“ benutzt. Das Programm ermittelte neben der Bandenintensität (Band Int) auch die Nettointensität der Banden unter Berücksichtigung des Hintergrundes (Net Int). Für jede Bedingung wurde ein Quotient zwischen HIF-1 $\alpha$  und  $\beta$ -Tubulin ermittelt, wodurch z.B. auch Lanes mit schwächerer Tubulinbande, d.h. geringerer Proteinbeladung als in den anderen Lanes, auswertbar waren. Ferner wurde bei jedem Versuch der HIF-1 $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin-Quotient der Positivkontrolle als 100% normiert, den Quotienten der anderen Bedingungen dieses Versuchs wurden dementsprechend ebenfalls Prozentwerte zugeordnet. Dadurch wurden die Versuche untereinander vergleichbar. Durchaus konnten bei einzelnen Bedingungen Werte von weit über 100% erreicht werden. Zur Berechnung statistischer Parameter und zur Erstellung von Graphiken wurde ausschließlich die Nettointensität der Banden berücksichtigt.

Von allen Bedingungen wurde der Mittelwert aller Versuche und der Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean, SEM) berechnet. Dieser Fehler berechnet sich aus der Standardabweichung der Einzelwerte der jeweiligen Bedingung geteilt durch die Quadratwurzel der Anzahl der Versuche.

## 2. 4. Versuche mit durchflußzytometrischer Auswertung

### 2. 4. 1. Aussaat und Medienwechsel

#### 2. 4. 1. 1. Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration und Kombinationen dieser Bedingungen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression

Folgende Tabelle zeigt, welche Zellen ausgesät, welche Voraussetzungen an die Medien gestellt wurden und wie nach der Aussaat mit den Petrischalen weiterverfahren wurde:

Bedingung	pH-Wert	Brut-schrank (B)/ Hypoxie (H)	Glukose-konzentration	FBS-Anteil	Zelllinie	Petri-schalen
HRE 7,4 B	7,4	B	0 g/l	0%	HT1080-5HRE	1
HRE 7,4 H	7,4	H	0 g/l	0%	HT1080-5HRE	1
HRE 7,4 BS	7,4	B	0 g/l	10%	HT1080-5HRE	1
HRE 7,4 HS	7,4	H	0 g/l	10%	HT1080-5HRE	1
HRE 7,4 BG	7,4	B	1 g/l	0%	HT1080-5HRE	1
HRE 7,4 HG	7,4	H	1 g/l	0%	HT1080-5HRE	1
HRE 7,4 BGS	7,4	B	1 g/l	10%	HT1080-5HRE	1
HRE 7,4 HGS	7,4	H	1 g/l	10%	HT1080-5HRE	1
HRE 6,7 B	6,7	B	0 g/l	0%	HT1080-5HRE	1
HRE 6,7 H	6,7	H	0 g/l	0%	HT1080-5HRE	1
HRE 6,7 BS	6,7	B	0 g/l	10%	HT1080-5HRE	1
HRE 6,7 HS	6,7	H	0 g/l	10%	HT1080-5HRE	1
HRE 6,7 BG	6,7	B	1 g/l	0%	HT1080-5HRE	1
HRE 6,7 HG	6,7	H	1 g/l	0%	HT1080-5HRE	1
HRE 6,7 BGS	6,7	B	1 g/l	10%	HT1080-5HRE	1
HRE 6,7 HGS	6,7	H	1 g/l	10%	HT1080-5HRE	1

HRE DFO	~7,4	B	1 g/l	10%	HT1080-5HRE	1
CMV 7,4 B	7,4	B	0 g/l	0%	HT1080-CMV	1
CMV 7,4 H	7,4	H	0 g/l	0%	HT1080-CMV	1
CMV 7,4 BS	7,4	B	0 g/l	10%	HT1080-CMV	1
CMV 7,4 HS	7,4	H	0 g/l	10%	HT1080-CMV	1
CMV 7,4 BG	7,4	B	1 g/l	0%	HT1080-CMV	1
CMV 7,4 HG	7,4	H	1 g/l	0%	HT1080-CMV	1
CMV 7,4 BGS	7,4	B	1 g/l	10%	HT1080-CMV	1
CMV 7,4 HGS	7,4	H	1 g/l	10%	HT1080-CMV	1
CMV 6,7 B	6,7	B	0 g/l	0%	HT1080-CMV	1
CMV 6,7 H	6,7	H	0 g/l	0%	HT1080-CMV	1
CMV 6,7 BS	6,7	B	0 g/l	10%	HT1080-CMV	1
CMV 6,7 HS	6,7	H	0 g/l	10%	HT1080-CMV	1
CMV 6,7 BG	6,7	B	1 g/l	0%	HT1080-CMV	1
CMV 6,7 HG	6,7	H	1 g/l	0%	HT1080-CMV	1
CMV 6,7 BGS	6,7	B	1 g/l	10%	HT1080-CMV	1
CMV 6,7 HGS	6,7	H	1 g/l	10%	HT1080-CMV	1
CMV DFO	~7,4	B	1 g/l	10%	HT1080-CMV	1

*Tabelle 2.5.: FACS-Versuchsbedingungen I*

Das fetale bovine Serum wurde - wie auch bei den Versuchen mit Westernblotauswertung - eigens beim Mediumwechsel in die Petrischalen mit Serumbedingungen im Verhältnis 9 ml Medium und 1 ml FBS (entspricht 10% FBS) hinzupipettiert. Deferoxamin diente auch hier als versuchsinterne Positivkontrolle. Es fand bei den DFO-Petrischalen kein Mediumwechsel statt, sondern es wurden in jede 100 µl DFO gegeben. Nun inkubierte man alle 34 Petrischalen für 24 Stunden im Brutschrank beziehungsweise in der Hypoxiebox bei 0,1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 37°C.

## 2. 4. 1. 2. Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression

HT1080-5HRE-Zellen wurden bei folgenden Bedingungen ausgesät:

Bedingung	pH	Brut- schrank (B)/ Hypoxie (H)	Glukose- konzent- ration	FBS	Petri- scha- len
7,4 HRE 0 B	7,4	B	0 g/l	0%	1
7,4 HRE 0,001 B	7,4	B	0,001 g/l	0%	1
7,4 HRE 0,01 B	7,4	B	0,01 g/l	0%	1
7,4 HRE 0,1 B	7,4	B	0,1 g/l	0%	1
7,4 HRE 1 B	7,4	B	1 g/l	0%	1
7,4 HRE 0 H	7,4	H	0 g/l	0%	1
7,4 HRE 0,001 H	7,4	H	0,001 g/l	0%	1
7,4 HRE 0,01 H	7,4	H	0,01 g/l	0%	1
7,4 HRE 0,1 H	7,4	H	0,1 g/l	0%	1
7,4 HRE 1 H	7,4	H	1 g/l	0%	1
DFO	~7,4	B	1 g/l	10%	1

*Tabelle 2.6.: FACS-Versuchsbedingungen II*

Die gefüllten 11 Petrischalen wurden dann entsprechend der obenstehenden Tabelle auf Brutschrank beziehungsweise Hypoxiebox (0,1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) aufgeteilt und dort 24 Stunden lang inkubiert .

## **2. 4. 2. Weiterbehandlung der Zellen für die durchfluß-zytometrische Messung**

Die Petrischalen aus der Hypoxiewerkbank wurden zunächst noch für etwa zwei Stunden zu den anderen Petrischalen in den Brutschrank gestellt. Eine

Kühlung der Zellen bzw. der Proben ist in diesem Fall nicht nötig, da EGFP seine maximale Fluoreszenz erst nach vier Stunden Reoxygenierung erreicht. Anschließend bereitete man die Zellen aller Bedingungen auf die Messung im Durchflußzytometer vor, so daß nach vier Stunden gemessen werden konnte. Dazu wurde das Medium aus den Petrischalen abgesaugt und die Zellen mit warmem PBS gewaschen. Man trypsinierte jede Petrischale mit 1 ml Trypsin-EDTA und wartete etwa fünf Minuten, bis sich die Zellen vom Boden abgelöst hatten. Das Trypsin wurde durch 4 ml Standardmedium pro Petrischale abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Röhrchen aller Bedingungen zentrifugierte man dann bei 1200 U/min für fünf Minuten. Anschließend saugte man den Überstand ab und resuspendierte das Pellet mit etwa 4 ml PBS, damit keine Medium- oder Serumreste zurückblieben. Diese Suspension zentrifugierte man erneut bei 1200 U/min für fünf Minuten und saugte auch diesen Überstand wieder ab. Das Pellet wurde nun mit 300 µl PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Sobald mit allen Proben so verfahren wurde, konnte man die Messung am Durchflußzytometer beginnen.

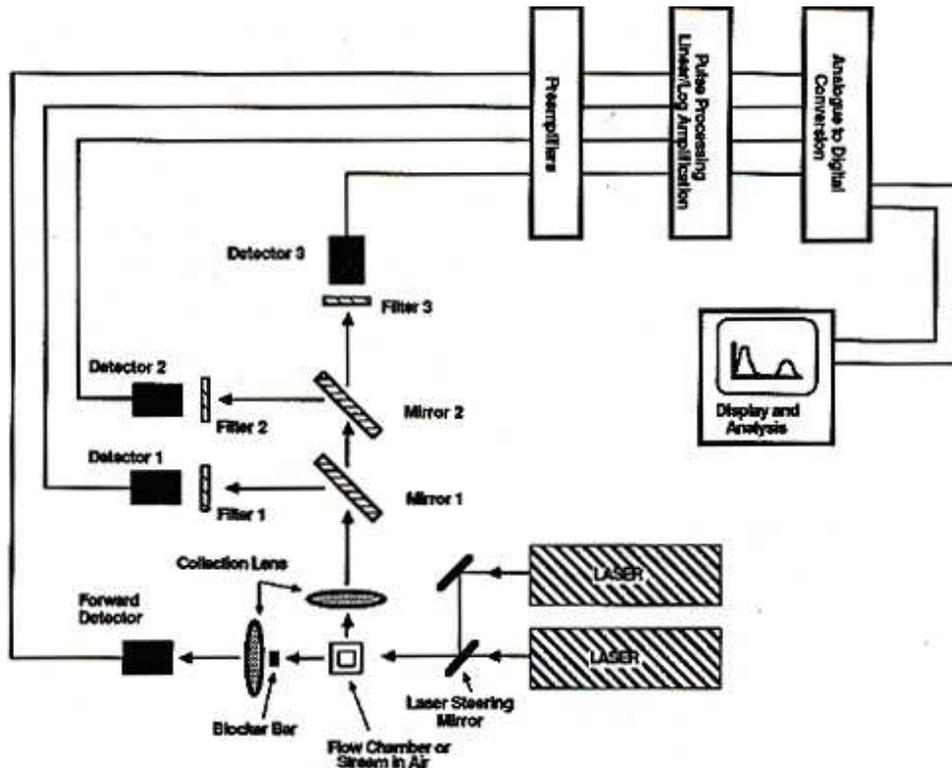
## **2. 4. 3. Durchflußzytometrische Messung**

### 2. 4. 3. 1. Prinzip

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode, mit der man schnelle Messungen von Partikeln oder Zellen durchführen kann, die sich in einem Flüssigkeitsstrom bewegen. Es handelt sich um Einzelmessungen der Zellen und nicht um Durchschnittswerte der Gesamtpopulation. Die Vielfalt der Untersuchungsmöglichkeiten, zum Beispiel Bestimmung von der Enzymaktivität, des Calciumflusses oder des Membranpotentials, haben sie zu einer wichtigen Methode in der Biologie und Medizin gemacht. Eine umfassende Einführung findet sich in [82].

Zunächst werden wenige  $\mu\text{l}$  der zu messenden Zellsuspension vom Gerät in die Flußkammer („Flow Chamber“) gesaugt, die ständig mit FACSTFlow gespült wird. Das Einströmen beider Flüssigkeiten ist druckgesteuert.

Zur Messung verwendet man einen LASER (light amplification by stimulated emission of radiation). Im vorhandenen Zytometer befand sich ein luftgekühlter 15 mW Argonionenlaser, der einen blauen, kohärenten, polarisierten und sehr intensiven Lichtstrahl der Wellenlänge 488 nm produzierte. Dieser trifft in der Flußkammer nacheinander auf jede einzelne Zelle und wird durch diese gestreut. Die Streustrahlen werden durch Linsen gebündelt und durch Detektoren aufgefangen. Es gibt einen Detektor, der die Streustrahlen mit maximal  $20^\circ$  Abweichung von der Laserachse (Forward Scatter = FSC = Frontalstreuung) und einen, der die Streuung von über  $20^\circ$  von der Laserachse erfaßt (Right Angle Scatter = Sideward-Scatter = SSC = Rechtwinklige Streuung). Ungestreutes Laserlicht wird eliminiert und somit nicht gemessen. Zusätzlich sind Spiegelsysteme im Gerät installiert, die das Licht, das von der bestrahlten Zelle ausgeht, nach ihrer Wellenlänge auftrennen und so die Unterscheidung zwischen Streulicht, das heißt ausgehend vom Laser, und Fluoreszenz, also ausgehend von der durch den Laser angeregten Zelle selbst, ermöglichen. Durchaus kann auch zwischen Fluoreszenzen verschiedener Wellenlänge unterschieden werden ( $\text{FL}_1 \dots \text{FL}_n$ ). Das Licht, das auf die Detektoren auftrifft, erzeugt eine Spannung zwischen 0 und 10 V. Sie ist proportional zur Zahl der Photonen, die auftreffen. Die Signale werden von den Detektoren zum Vorverstärker weitergeleitet, wo lästiges „Hintergrundrauschen“ herausgefiltert wird, indem man einen gewissen Schwellenwert einrichtet (Treshold). Im Verstärker werden neben der erneuten Amplifikation der Impulse analoge Spannungsangaben in binäre Zahlenwerte für die computergestützte Auswertung konvertiert. Am Computer hat man nun vielfältige Möglichkeiten zur Darstellung und Analyse, wie etwa das „Gating“, bei dem eine bestimmte Subpopulation im FSC-SSC-Diagramm ausgesucht und näher untersucht werden kann.



*Abbildung 2.3.: Prinzip eines Durchflußzytometers [16]*

### 2. 4. 3. 2. Durchführung

Stets wurden zunächst die gleichen Einstellungen geladen:

Detectors/Amplifiers:

Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E-1	4,99	Log
P2	SSC	350	1,00	Lin
P3	FL <sub>1</sub>	480	1,00	Log

*Tabelle 2.7.: Einstellungen des Durchflußzytometers*

Treshold:

- FSC 52

Nun wurde das Zytometer für den aktuellen Versuch geeicht. Hierzu maß man die Fluoreszenz von Partikeln, die in PBS gelöst waren (CaliBRITE™ FITC Beads, vgl. Abb. 2.4.), und veränderte die FL<sub>1</sub>-Voltage-Einstellung so, daß die Fluoreszenz dieser Beads vor jedem Versuch den gleichen Wert anzeigte.

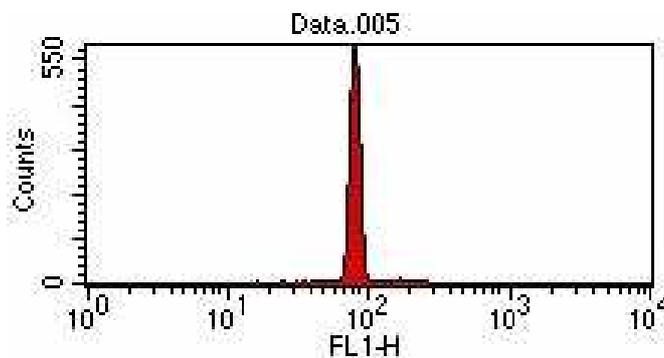


Abbildung 2.4.: Bead-Messung

Anschließend wurden von jeder Probe nacheinander 10.000 Zellen gemessen. Sämtliche ermittelten Werte speicherte der Computer automatisch. Mit Hilfe des oben genannten Gating wurden mittels Markierung im FSC-SSC-Diagramm immer nur Zellen einer homogenen Subpopulation der 10.000 Gesamtzellen ausgewertet, und so tote Zellen und Zelltrümmer nicht beachtet.

#### **2. 4. 4. Anmerkungen zur weiteren Auswertung**

Der Computer erstellte ein Diagramm mit der Ordinate Häufigkeit und der Abszisse Fluoreszenz. Manuell wurde der Hauptbereich der Verteilung markiert (M1) und somit Ausreißer nach oben und unten ausgeschlossen. Zunächst berechnete der Computer nun den Mittelwert der Fluoreszenzintensität des

markierten Bereichs, dann ermittelte man mit Excel Mittelwert und SEM der einzelnen Bedingungen.

HT1080-CMV-Zellen dienten als positive Kontrolle der EGFP-Fluoreszenz zur Erfassung HRE-unabhängiger Effekte. Es wurde anhand der Fluoreszenz der HT1080-CMV-Zellen ein Faktor ermittelt, mit dem die Fluoreszenz der HT1080-5HRE-Zellen multipliziert wurde. Als Basiswert bei den HT1080-CMV-Zellen wurde die Fluoreszenz bei pH 7,4, einem FBS-Anteil von 10% und einer Glukosekonzentration von 1 g/l angesehen. Hatte nun eine andere Bedingung der CMV-Zellen beispielsweise die doppelte Fluoreszenz dieses Basiswerts, so wurde die Fluoreszenz der gleichen Bedingung bei den HT1080-5HRE-Zellen halbiert. Daher erscheint im Ergebnisteil neben Diagrammen für die Auswertung der HT1080-5HRE- und HT1080-CMV-Zellen noch eines, in dem dieser Faktor mit eingerechnet ist.

## 2. 5. Statistik

Zur statistischen Aufarbeitung der gewonnenen Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, ein nicht-parametrischer statistischer Test. Man beurteilt immer die Werte zweier Bedingungen (allgemein x und y) eines Versuches miteinander auf deren Unterschied. Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, falls eine Sicherheitswahrscheinlichkeit über 95% vorlag ( $p < 0,05$ ). Falls nicht konnte die Nullhypothese „Bedingung x ergibt keinen signifikanten Unterschied zu Bedingung y“ nicht abgelehnt werden, so daß die beiden Bedingungen keine signifikant unterschiedlichen Werte ergaben.

## 3. Ergebnisse

### 3. 1. Auswertung der Westernblots

#### **3. 1. 1. Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration, Sauerstoffpartialdruck und Kombinationen dieser Bedingungen auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation**

In beiden Zelllinien konnte unabhängig von der Zusammensetzung des Mediums, d.h. unabhängig von Parametern des Tumormikromilieus, unter normoxischen Bedingungen keine nennenswerte HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation festgestellt werden. Allerdings wird deutlich, daß das Tumormikromilieu die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation bei Hypoxie in großem Maße moduliert (vgl. hierzu *Abb. 3.1.* bis *Abb. 3.4.*). Glukosezusatz bei Hypoxie bewirkt gegenüber Hypoxie ohne Glukosezusatz bei den HT1080WT- und bei den FaDu-Zellen eine etwa zwölffache Bandenintensität. Zusätzliches Vorhandensein von FBS hebt die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation auf Werte des 20- (HT1080WT) bzw. 40-fachen (FaDu) der HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation bei Hypoxie ohne Glukose und ohne FBS an. FBS-Zusatz bei Hypoxie ohne Glukosezusatz bewirkt bei den HT1080WT-Zellen eine Verdreifachung der Bandenintensität im Vergleich zur Hypoxie ohne FBS-Zusatz. Bei den FaDu-Zellen scheint FBS und Hypoxie zusammen ohne Glukosezusatz keinen Effekt auszulösen. Der pH-Wert (6,7 oder 7,4) scheint keine Rolle bei der HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation zu spielen. Bei der HT1080WT-Zelllinie führt pH 7,4 zu geringgradig höherer Akkumulation bei den Bedingungen HG und HGS, bei den FaDu-Zellen führt pH 6,7 zu leicht erhöhter HIF-1 $\alpha$ -Anreicherung bei den Bedingungen HS, HG und HGS, die allerdings nicht signifikant ist.

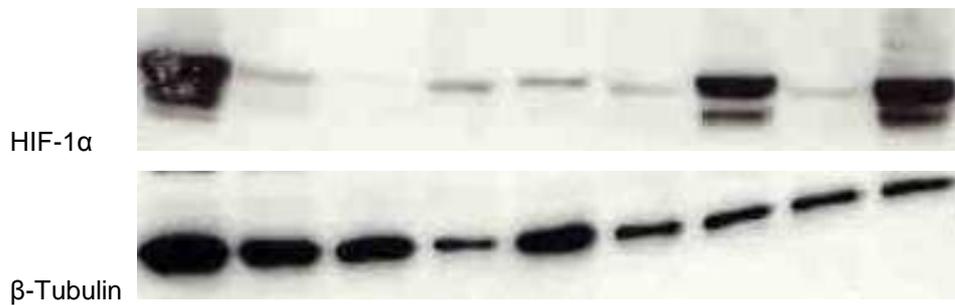
Interessanterweise konnten verschiedene Isoformen von HIF-1 $\alpha$  dargestellt werden, vor allem unter der Hauptbande bei etwa 105 kD. Auch andere Autoren berichteten bereits über diese Beobachtung [50].

### 3. 1. 1. 1. HT1080

#### **pH 6,7**

pO <sub>2</sub>	Air	Hypox	Air	Hypox	Air	Hypox	Air	Hypox
Serum	-	-	+	+	-	-	+	+
Glukose	-	-	-	-	+	+	+	+

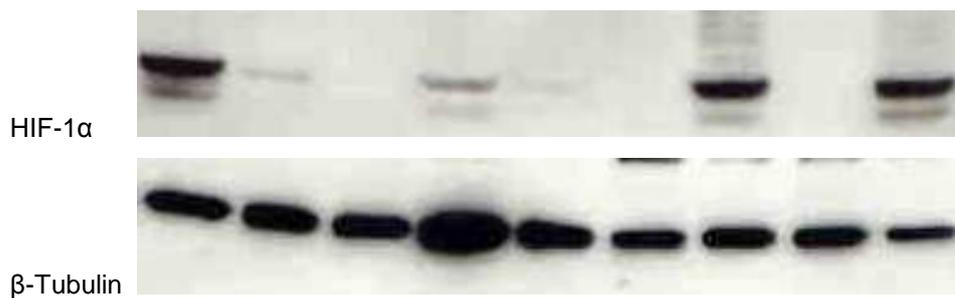
DFO



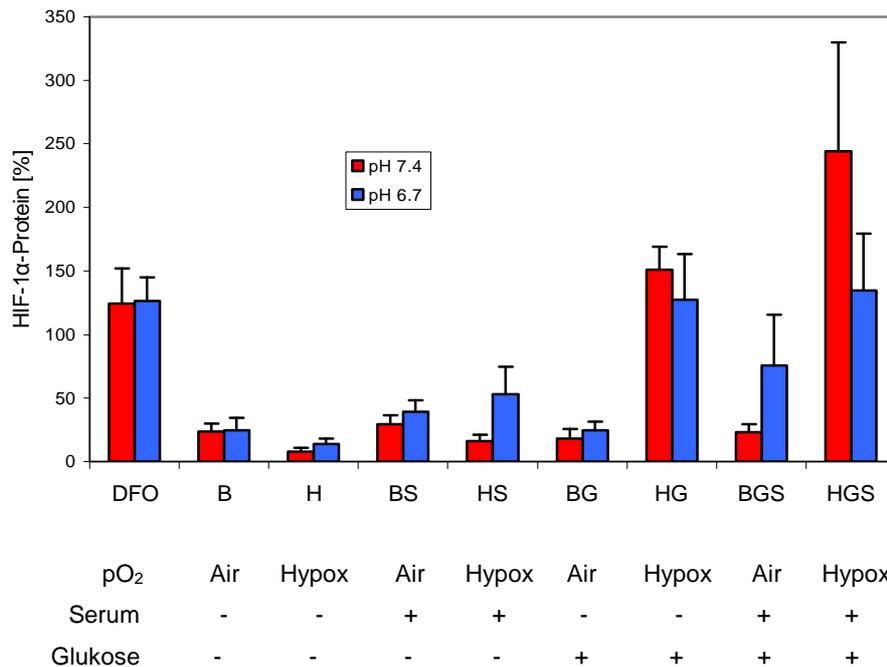
#### **pH 7,4**

pO <sub>2</sub>	Air	Hypox	Air	Hypox	Air	Hypox	Air	Hypox
Serum	-	-	+	+	-	-	+	+
Glukose	-	-	-	-	+	+	+	+

DFO



*Abbildung 3.1.: Exemplarisches Bandenmuster eines Immunoblots mit HT1080-Zellen*



*Abbildung 3.2.: Auswertung aller Versuche mit HT1080-Zellen (Mittelwert und SEM, n=4), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.1.*

Der Vergleich verschiedener Bedingungen bezüglich der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge ergab folgende Unterschiede im Vergleich mit der Referenzbedingung 7,4 HGS (Mann-Whitney-U-Test):

Bedingung x	Bedingung y	p-Wert
7,4 HGS	7,4 H	0,021
7,4 HGS	7,4 HS	0,021
7,4 HGS	7,4 HG	0,25
7,4 HGS	6,7 H	0,021
7,4 HGS	6,7 HS	0,083
7,4 HGS	6,7 HG	0,15
7,4 HGS	6,7 HGS	0,39

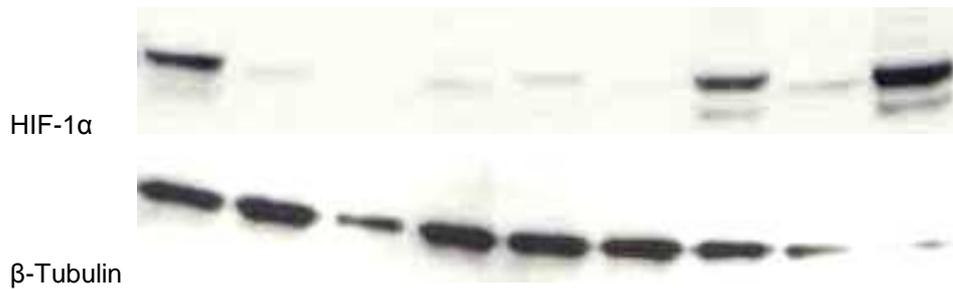
*Tabelle 3.1.: p-Werte I (pH 6,7 oder 7,4, H=0,1% O<sub>2</sub> über 24 h, B=Brutschrank über 24 h, G=1 g/l Glukose, S=10% FBS-Zusatz), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.1.*

### 3. 1. 1. 2. FaDu

#### **pH 6,7**

pO <sub>2</sub>	Air	Hypox	Air	Hypox	Air	Hypox	Air	Hypox
Serum	-	-	+	+	-	-	+	+
Glukose	-	-	-	-	+	+	+	+

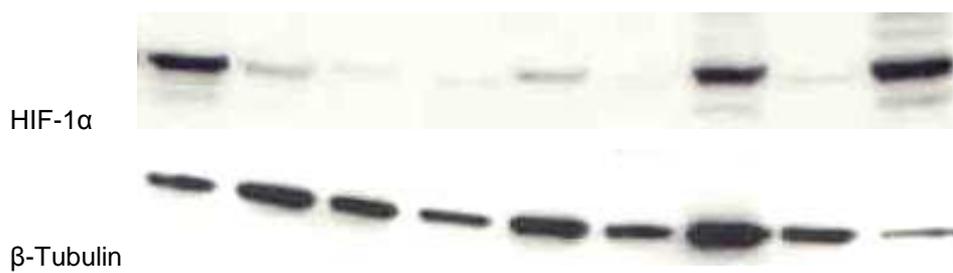
DFO



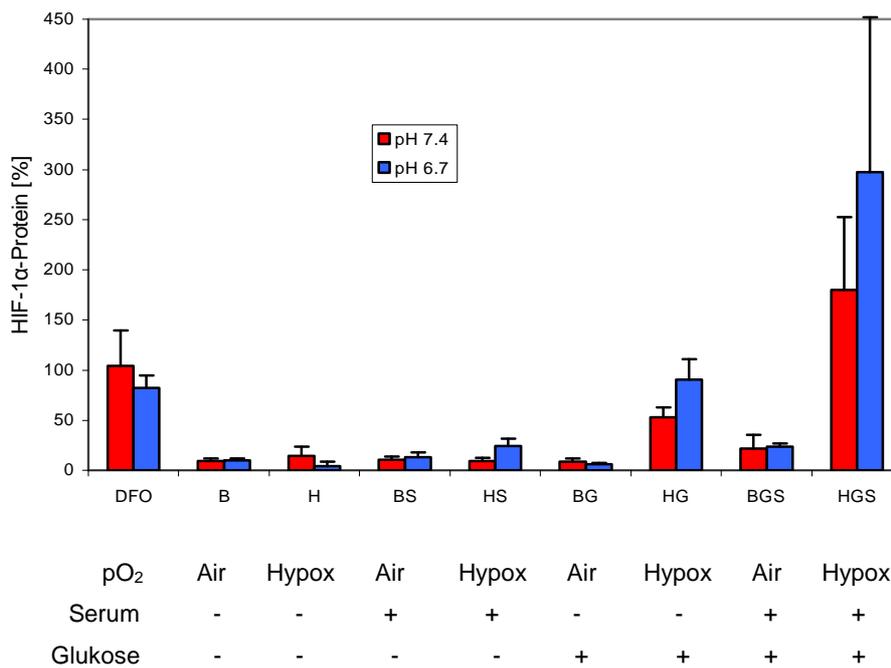
#### **pH 7,4**

pO <sub>2</sub>	Air	Hypox	Air	Hypox	Air	Hypox	Air	Hypox
Serum	-	-	+	+	-	-	+	+
Glukose	-	-	-	-	+	+	+	+

DFO



*Abbildung 3.3.: Exemplarisches Bandenmuster eines Immunoblots mit FaDu-Zellen*



**Abbildung 3.4.:** Auswertung aller Versuche mit FaDu-Zellen (Mittelwert und SEM, n=5), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.1.

Der Vergleich verschiedener Bedingungen bezüglich der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge ergab folgende Unterschiede im Vergleich mit der Referenzbedingung 7,4 HGS (Mann-Whitney-U-Test):

Bedingung x	Bedingung y	p-Wert
7,4 HGS	7,4 H	0,025
7,4 HGS	7,4 HS	0,009
7,4 HGS	7,4 HG	0,22
7,4 HGS	6,7 H	0,053
7,4 HGS	6,7 HS	0,016
7,4 HGS	6,7 HG	0,46
7,4 HGS	6,7 HGS	0,46

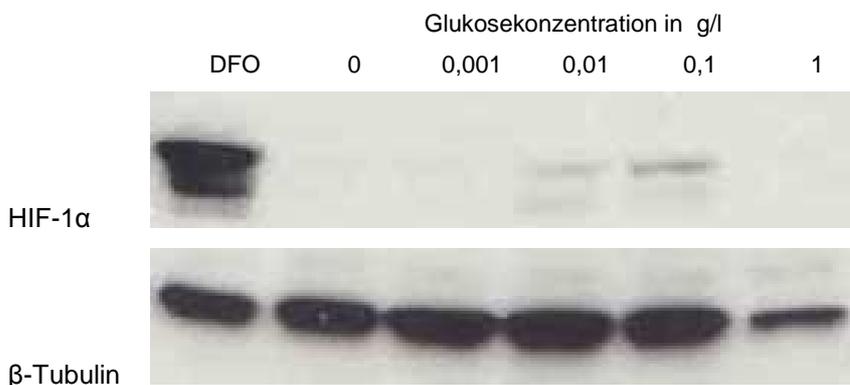
**Tabelle 3.2.:** p-Werte II (pH 6,7 oder 7,4, H=0,1% O<sub>2</sub> über 24 h, B=Brutschrank über 24 h, G=1 g/l Glukose, S=10% FBS-Zusatz), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.1.

### 3. 1. 2. Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation

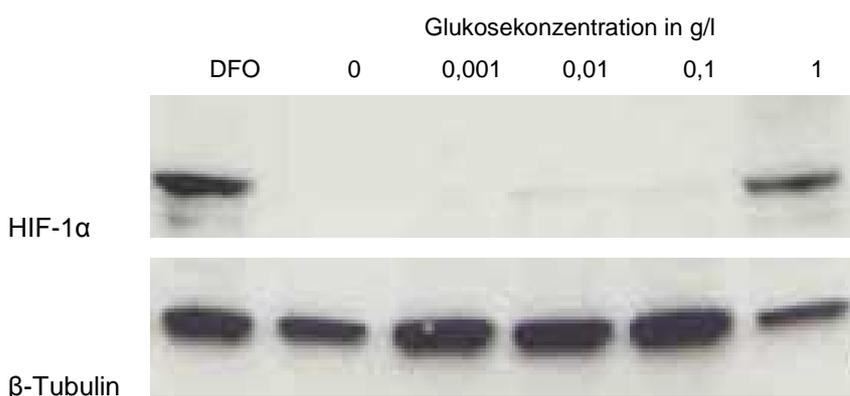
Bei beiden Zelllinien ist ein Glukosezusatz von 1 g/l für eine maximale hypoxische HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation erforderlich (Abb. 3.5. bis Abb. 3.8.). Diese ist etwa acht mal größer als bei Hypoxie ohne bzw. mit geringerem Glukosezusatz. Hypoxie mit Glukosezusatz weniger als 1 g/l oder Glukosezusatz von 1 g/l ohne Hypoxie bewirkt lediglich eine sehr schwache HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation.

#### 3. 1. 2. 1. HT1080

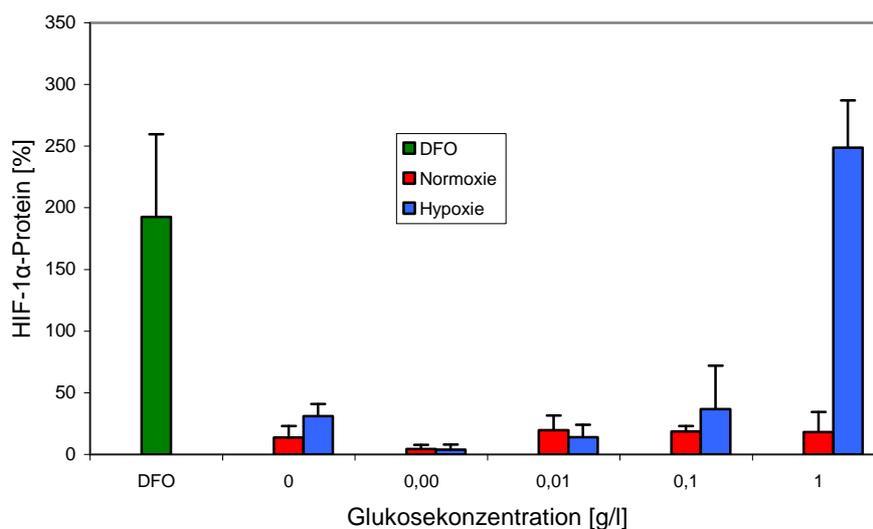
##### Normoxie



##### Hypoxie



*Abbildung 3.5.: Exemplarisches Bandenmuster eines Versuchs zur glukoseabhängigen HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation mit HT1080-Zellen*



*Abbildung 3.6.: Auswertung aller Versuche mit HT1080-Zellen zur glukose-abhängigen HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation (Mittelwert mit SEM, n=3), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.2.*

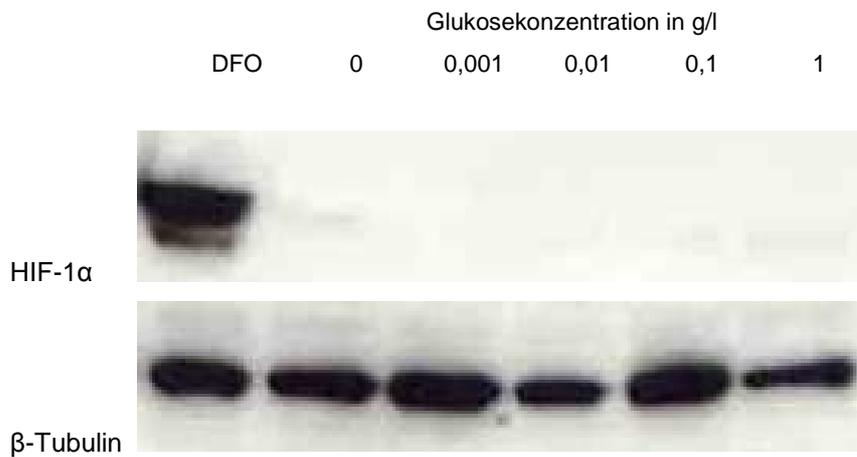
Der Vergleich verschiedener Bedingungen bezüglich der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge ergab folgende Unterschiede im Vergleich mit der Referenzbedingung H 1 g/l Glukose (Mann-Whitney-U-Test):

Bedingung x	Bedingung y	p-Wert
H 1 g/l Glukose	H 0,1 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	H 0,01 g/l Glukose	0,046
H 1 g/l Glukose	H 0,001 g/l Glukose	0,046
H 1 g/l Glukose	H 0 g/l Glukose	0,083
H 1 g/l Glukose	B 1 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	B 0,1 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	B 0,01 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	B 0,001 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	B 0 g/l Glukose	0,049

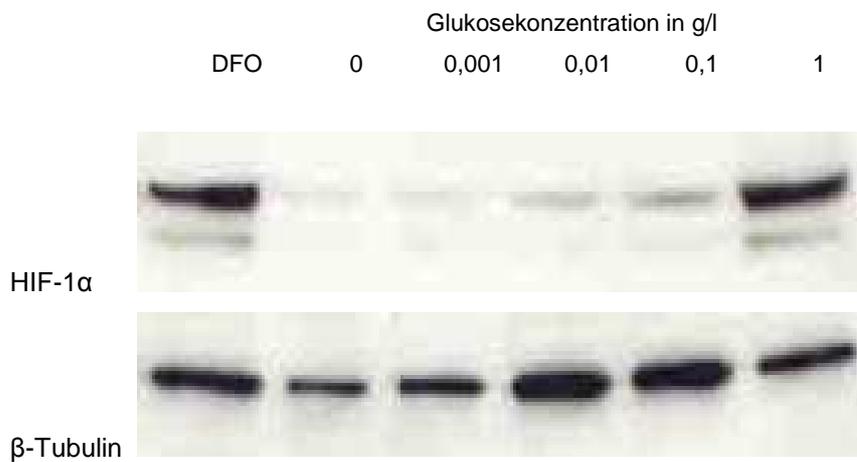
*Tabelle 3.3.: p-Werte III (H=0,1% O<sub>2</sub> über 24 h, B=Brutschrank über 24 h), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.2.*

### 3. 1. 2. 2. FaDu

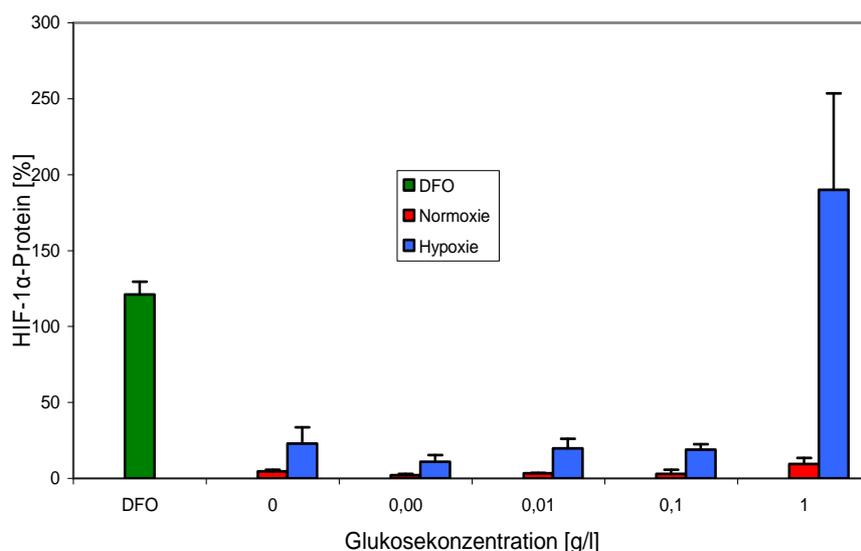
#### **Normoxie**



#### **Hypoxie**



*Abbildung 3.7.: Exemplarisches Bandenmuster eines Versuchs zur glukoseabhängigen HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation mit FaDu-Zellen*



*Abbildung 3.8.: Auswertung aller Versuche mit FaDu-Zellen zur glukose-abhängigen HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation (Mittelwert mit SEM, n=3), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.2.*

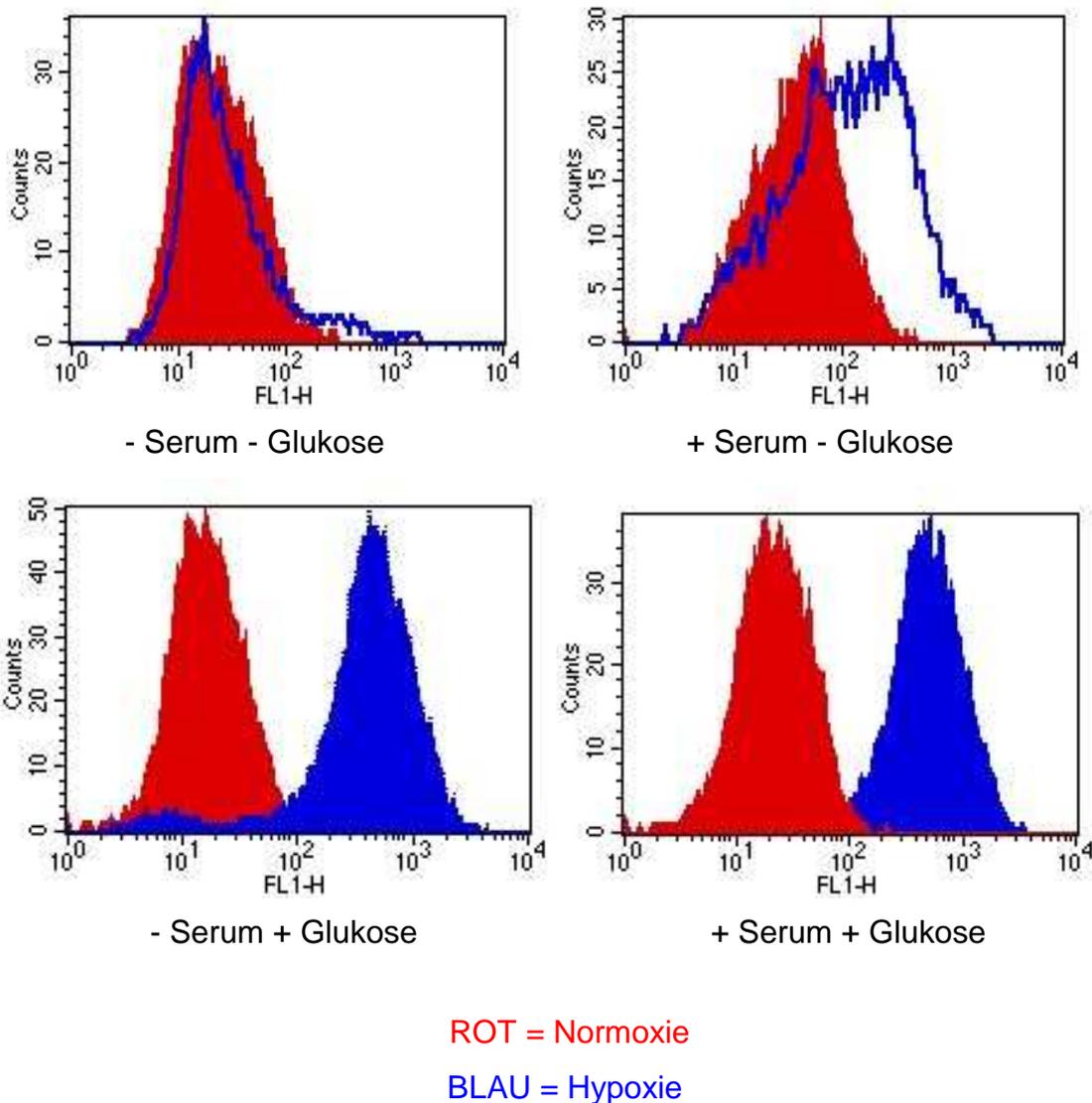
Der Vergleich verschiedener Bedingungen bezüglich der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge ergab folgende Unterschiede im Vergleich mit der Referenzbedingung H 1 g/l Glukose (Mann-Whitney-U-Test):

Bedingung x	Bedingung y	p-Wert
H 1 g/l Glukose	H 0,1 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	H 0,01 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	H 0,001 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	H 0 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	B 1 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	B 0,1 g/l Glukose	0,049
H 1 g/l Glukose	B 0,01 g/l Glukose	0,046
H 1 g/l Glukose	B 0,001 g/l Glukose	0,046
H 1 g/l Glukose	B 0 g/l Glukose	0,049

*Tabelle 3.4.: p-Werte IV (H=0,1% O<sub>2</sub> über 24 h, B=Brutschrank über 24 h), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.2.*

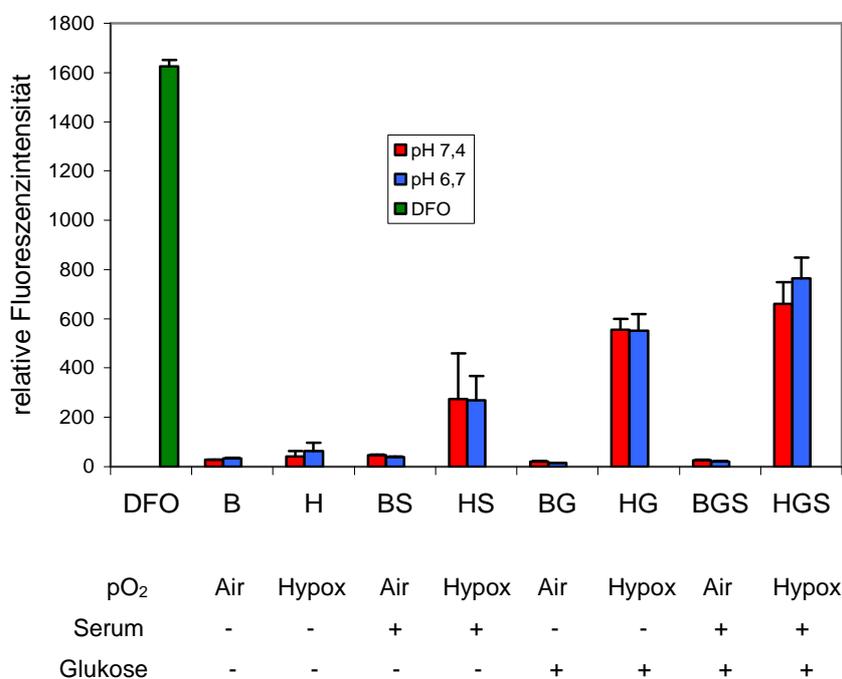
### 3. 2. Auswertung der Versuche am Durchflußzytometer

#### 3. 2. 1. Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration, Sauerstoffpartialdruck und Kombinationen dieser Bedingungen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression von HT1080-5HRE- und HT1080-CMV-Zellen



*Abbildung 3.9.: Exemplarische Darstellung des Einflusses verschiedener Kombinationen von Parametern des Tumormikromilieus auf die EGFP- Fluoreszenz bei HT1080-5HRE und pH 7,4*

Es zeigt sich bei den HT1080-5HRE-Zellen (vgl. *Abb. 3.10.*) mit geringer Fehlergröße konstant über alle vier Versuche, daß bei Normoxie unabhängig von Parametern des Tumormikromilieus lediglich eine marginale EGFP-vermittelte Fluoreszenz gemessen wird. Die relative Fluoreszenzintensität aller Bedingungen unter Normoxie liegt bei etwa 25. Hypoxie ohne FBS und Glukose führt etwa zu einer sechs mal, Hypoxie mit FBS ohne Glukose zu einer 18 mal, Hypoxie mit Glukose ohne FBS zu einer 46 mal und Hypoxie mit FBS und Glukose zu einer etwa 42 mal höheren Fluoreszenzintensität. Der pH-Wert hat keinen Einfluß auf die EGFP-Fluoreszenz.



*Abbildung 3.10.: Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration, Sauerstoffpartialdruck und Kombinationen dieser Bedingungen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression bei HT1080-5HRE-Zellen (Mittelwert und SEM, n=4), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.5.*

Der Vergleich verschiedener Bedingungen bezüglich der relativen Fluoreszenzintensität ergab folgende Unterschiede im Vergleich mit der Referenzbedingung 7,4 HGS (Mann-Whitney-U-Test):

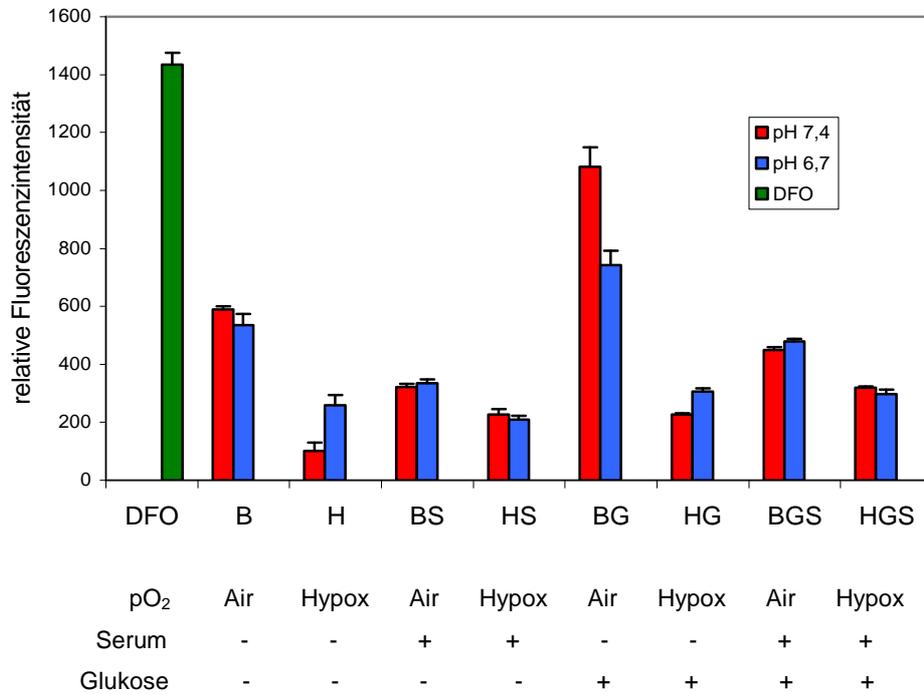
Bedingung x	Bedingung y	p-Wert
7,4 HGS	6,7 B	0,021
7,4 HGS	6,7 H	0,021
7,4 HGS	6,7 BG	0,020
7,4 HGS	6,7 HG	0,386
7,4 HGS	6,7 BS	0,021
7,4 HGS	6,7 HS	0,059
7,4 HGS	6,7 BGS	0,021
7,4 HGS	6,7 HGS	0,564
7,4 HGS	7,4 B	0,021
7,4 HGS	7,4 H	0,021
7,4 HGS	7,4 BG	0,021
7,4 HGS	7,4 HG	0,663
7,4 HGS	7,4 BS	0,021
7,4 HGS	7,4 HS	0,148
7,4 HGS	7,4 BGS	0,021

*Tabelle 3.5.: p-Werte V (pH 6,7 oder 7,4, H=0,1% O<sub>2</sub> über 24 h, B=Brutschrank über 24 h, G=1 g/l Glukose, S=10% FBS-Zusatz), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.5.*

Während unter Hypoxie im Medium mit Glukose (HG) der Maximalwert des voll supplementierten Mediums (HGS) erreicht wird, ist der Hypoxieeffekt mit Serum und ohne Glukose (HS) halbmaximal und ohne beide Faktoren (H) stark supprimiert. Bei allen Bedingungen mit Normoxie besteht nur minimale Fluoreszenz. Der pH-Wert bewirkt in keiner Bedingung eine signifikante Fluoreszenzänderung.

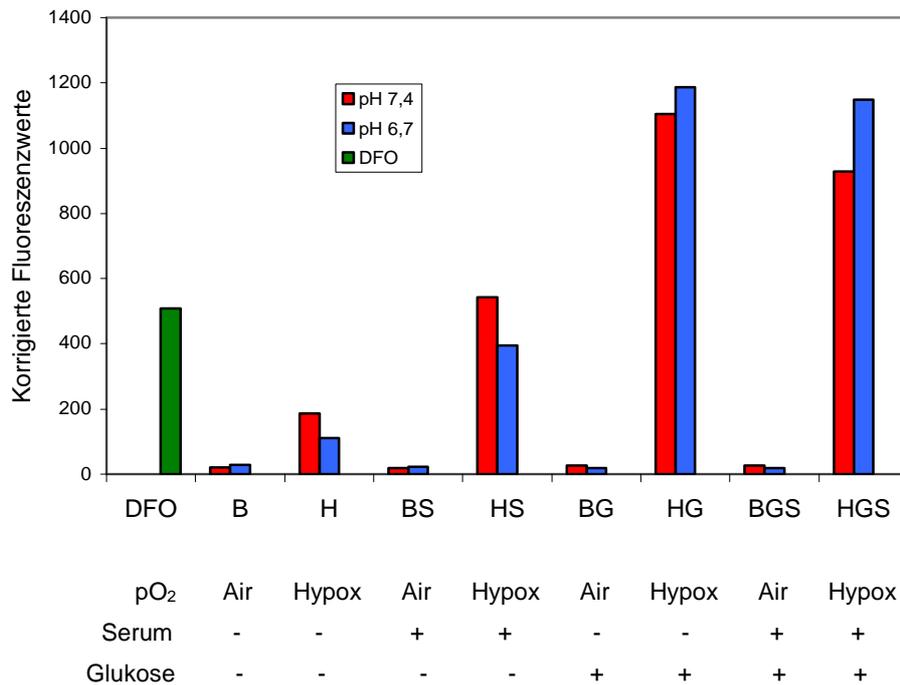
Bei den HT1080-CMV-Zellen, die als Kontrolle ohne Einfluß von HIF/HREs auf die EGFP-Fluoreszenz dienten, schwankte die Fluoreszenz unter

verschiedenen Bedingungen des Mikromilieus zwischen Faktor 0,3 und 2,2, bezogen auf die Normalbedingung 7,4 BGS (Abb. 3.11.)



*Abbildung 3.11.: Einfluß von pH-Wert, FBS-Anteil, Glukosekonzentration, Sauerstoffpartialdruck und Kombinationen dieser Bedingungen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression bei HT1080-CMV-Zellen (Mittelwert und SEM, n=4), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.5.*

Korrigiert man die Fluoreszenzwerte der HT1080-5HRE-Zellen (Abb. 3.10.) mit dem so berechneten Korrekturfaktor, unter Annahme direkter Effekte des Mikromilieus auf EGFP, bleibt das Ergebnis im Kern unverändert (Abb. 3.12.):



*Abbildung 3.12.: Darstellung der HT1080-5HRE-Ergebnisse unter Berücksichtigung des CMV-Faktors (HT1080-5HRE-Mittelwerte \* „CMV-Faktor“), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.5.*

Der Vergleich verschiedener Bedingungen bezüglich der korrigierten HT1080-5HRE-Werte ergab folgende Unterschiede im Vergleich mit der Referenzbedingung 7,4 HGS (Mann-Whitney-U-Test):

Bedingung x	Bedingung y	p-Wert
7,4 HGS	6,7 B	0,021
7,4 HGS	6,7 H	0,021
7,4 HGS	6,7 BG	0,020
7,4 HGS	6,7 HG	0,248
7,4 HGS	6,7 BS	0,021
7,4 HGS	6,7 HS	0,083
7,4 HGS	6,7 BGS	0,020
7,4 HGS	6,7 HGS	0,149
7,4 HGS	7,4 B	0,021

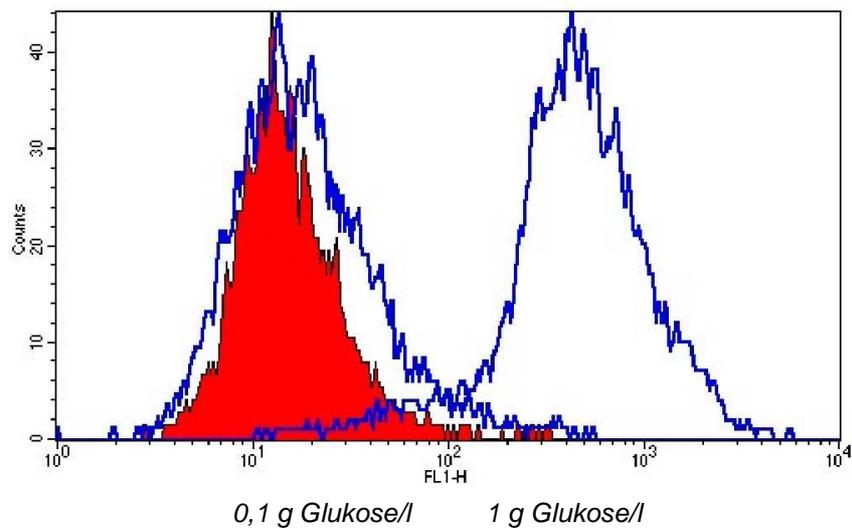
7,4 HGS	7,4 H	0,021
7,4 HGS	7,4 BG	0,021
7,4 HGS	7,4 HG	0,248
7,4 HGS	7,4 BS	0,021
7,4 HGS	7,4 HS	0,248
7,4 HGS	7,4 BGS	0,021

*Tabelle 3.6.: p-Werte VI „CMV-korrigiert“ (pH 6,7 oder 7,4, H=0,1% O<sub>2</sub> über 24 h, B=Brutschrank über 24 h, G=1 g/l Glukose, S=10% FBS-Zusatz), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.5.*

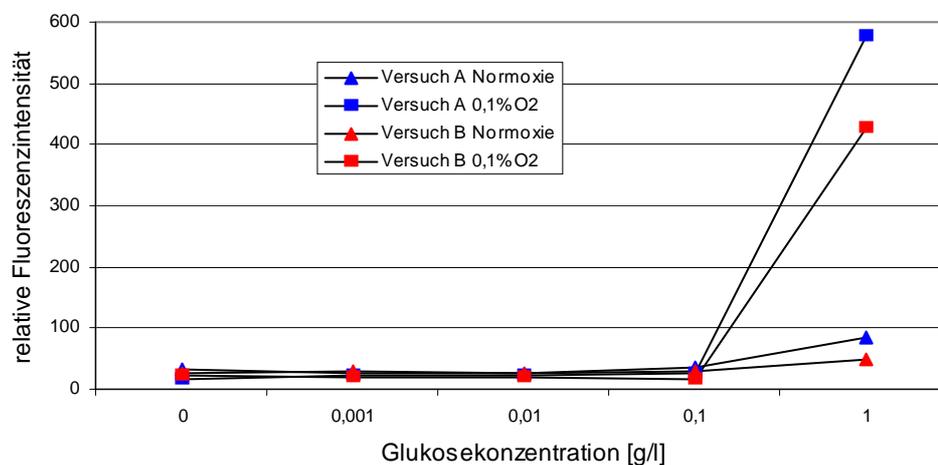
Die Korrektur blieb ohne Einfluß auf die Signifikanz der Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen (vgl. Tab. 3.5).

### **3. 2. 2. Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression**

*Abbildung 3.13.* zeigt eine exemplarische Darstellung des Einflusses verschiedener Glukosekonzentrationen auf EGFP-Fluoreszenz. Man sieht in *Abbildung 3.14.*, daß lediglich eine Glukosekonzentration von 1 g/l eine Auswirkung auf die hypoxieabhängige EGFP-Expression hat (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen). Unter Hypoxiebedingungen und bei Glukosekonzentration von 1g/l liegt die Expression etwa um den Faktor 15 höher als bei allen Bedingungen mit geringerer Glukosekonzentration.



*Abbildung 3.13.: Exemplarische Darstellung des Einflusses verschiedener Glukosekonzentrationen auf die EGFP- Fluoreszenz bei HT1080-5HRE und pH 7,4 (rot = Normoxie, blau = Hypoxie), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.6.*



*Abbildung 3.14.: Glukose- und hypoxieabhängige EGFP-Expression bei HT1080-5HRE-Zellen (Mittelwerte von Doppelbestimmungen, n=2), für Details zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 2.6.*

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation in der Zelle von verschiedenen Faktoren abhängt. Glukose (1 g/l) im Medium ist für eine nennenswerte hypoxische HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation erforderlich. Dagegen sind andere Faktoren des Tumormikromilieus, wie pH-Wert des Extrazellularraums oder Wachstumsfaktoren, nicht in der Lage, signifikante Veränderungen der hypoxischen HIF-1 $\alpha$ -Anreicherung im Zellkern hervorzurufen.

In diesem Kapitel sollen diese Ergebnisse nun mit bestehenden Erkenntnissen vorhergehender Studien verglichen und mögliche Mechanismen zur Erklärung der Ergebnisse genannt werden.

Ferner soll die Bedeutung der Tumorphoxie für die Strahlentherapie genauer beleuchtet, und sollen mögliche therapeutische Strategien, die auf Ebene der Hypoxie angreifen, aufgeführt werden.

Als nächstes muß auf HIF-1 $\alpha$  direkt eingegangen werden. Wichtig ist die Klärung der Frage der Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Vergleich mit anderen exogenen und endogenen Hypoxiemarkern. Ist eine Verwendung von HIF-1 $\alpha$  als klinischer Hypoxiemarker sinnvoll oder nicht?

Zuletzt sollen mögliche Therapieansätze der Tumorthherapie genannt werden, die auf einer Inhibition von HIF-1 $\alpha$  beruhen.

### 4. 1. Bedeutung des Tumormikromilieus für die zelluläre HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation

#### 4. 1. 1. Sauerstoff

Sauerstoffmangel ist zweifellos der entscheidende Faktor für die Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  in der Zelle. Struktur, Regulation, assoziierte Gene und physiologische wie pathophysiologische Bedeutung von HIF-1 $\alpha$  sind der Einleitung zu entnehmen. (Kapitel 1.4.)

Obwohl auch sauerstoffunabhängige Wege der HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation existieren, berichten nur wenige Studien über eine Modulation der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel durch andere Faktoren des Tumormikromilieus. Jedoch ist für alle diese Faktoren Hypoxie stets eine obligate Voraussetzung [67]. Wenige Zelllinien bilden die Ausnahme [135].

#### **4. 1. 2. Glukose**

MÜLLER-KLIESER et al. zeigten, daß Zervixkarzinome eine mittlere Glukosekonzentration von etwa 0,36 g/l ( $\approx$  2mM) besitzen [73]. KALLINOWSKI et al. sprechen im Rattenmodell bei Mammakarzinomen von einer Glukoseaufnahme von etwa 0,3  $\mu$ mol/g/min [53]. Allerdings sind generelle Aussagen über die Glukosekonzentration in soliden Tumoren schwer zu treffen, da sie in hohem Maße von der Blutglukosekonzentration abhängt [53, 74].

HIF-1 $\alpha$  wirkt für Tumorzellen protektiv im Falle eines Mangels an Sauerstoff oder Nährstoffen wie Glukose. Daher sollte man annehmen, daß gerade bei niedrigen Glukosekonzentrationen der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel steigt. Ungeachtet der Definition einer „niedrigen Glukosekonzentration“ finden sich hierzu in der Literatur verschiedene Ansatzpunkte, die belegen, daß der Glukosestoffwechsel großen Einfluß auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation in der Zelle hat.

Schon lange ist bekannt, daß der Glukosemetabolismus durch Hypoxie und HIF-1-abhängige Gene beeinflusst wird (siehe auch Kapitel 1.4.3.): JUNGERMANN et al. beobachteten beispielsweise, daß in einem Leberazinus die Enzymverteilung der Hepatozyten je nach Sauerstoffpartialdruck variiert. Im stärker oxygenierten Periportalbereich werden hauptsächlich Enzyme zur Glykogenolyse und Glukoneogenese synthetisiert, beispielsweise Phosphoenolpyruvatcarboxykinase 1. Im sauerstoffärmeren perivenösen Teil des Azinus finden sich vor allem Schlüsselenzyme der Glykolyse, wie etwa Glukokinase und Pyruvatkinase [51]. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch HIF-1 neben Genen für die Neoangiogenese (VEGF, VEGF-Rezeptor,

Transforming growth factor  $\beta$ 3 usw.), für die Erythropoese (Erythropoetin, Transferrin, Coeruloplasmin usw.) und zur Regulation des Zellzyklus (z.B. p21) vor allem auch Gene des Glukosemetabolismus (Glukosetransporter, Enzyme zur anaeroben Glykolyse usw.) vermehrt transkribiert werden [133].

Umgekehrt werden HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$ -abhängige Genprodukte durch den Glukosestoffwechsel beeinflusst:

RAFAJOVÁ et al. machten die Beobachtung, daß die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Carboanhydrase 9 (CA IX) maximal bei extrazellulärer Glukosekonzentration von 1 g/l (verglichen mit dem Normalmedium der verwendeten Zellen mit 4,5 g/l Glukose) und gleichzeitig bestehender Hypoxie exprimiert wird. Auf den ersten Blick scheint also eine Senkung der Glukosekonzentration zu einer gesteigerten Akkumulation eines HIF-1 $\alpha$ -abhängigen Genes zu führen, doch muß dies aufgrund der Tatsache, daß die minimale Glukosekonzentration bei RAFAJOVÁ et al. der maximalen Konzentration in den vorliegenden Versuchen mit HT1080- und FaDu-Zellen entspricht, nicht in Widerspruch zu den in Kapitel 3 gezeigten Ergebnissen stehen [86].

Eine andere Studie trifft eine Aussage zur GLUT1-Expression in Abhängigkeit von der extrazellulären Glukosekonzentration. Man fand eine höhere GLUT1-Akkumulation bei Hypoxiebedingungen und einer Glukosekonzentration von 0,05 g/l als bei einer Glukosekonzentration von 1 g/l. Der Autor postuliert, daß die GLUT1-Expression bei Hypoxie und Glukosedepriuation aufgrund eines gemeinsamen Mechanismus induziert wird: Ein cis-acting regulatory element (CAE), bestehend aus 10 Nukleotiden (GLUT1 CAE<sub>2181-2190</sub>), ist im phylogenetisch hochkonservierten GLUT1-Gen lokalisiert. Es bindet an einen Trans-acting factor (TAF) und stabilisiert so die GLUT1-mRNA [8].

Bei Rattenkardiomyozyten konnte gezeigt werden, daß die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation bei Glukosekonzentrationen im Medium von 3 g/l (normal für die Anzucht von Kardiomyozyten) um etwa 50% niedriger liegt als die HIF-1 $\alpha$ -Menge bei 0 g/l Glukose. Begründet wurde dies durch proteasomalen Abbau von HIF-1 $\alpha$  bei höheren Glukosekonzentrationen. Möglicherweise stellt die Abnahme der HIF-1 $\alpha$ -Spiegel bei höheren Glukosekonzentrationen einen

neuartigen Feedback-Mechanismus zur glukoseabhängigen Protektion von Kardiomyozyten bei Hypoxie dar [67].

MARFELLA et al. berichten von einer Steigerung der basalen HIF-1-Expression in Rattenherzen bei Erhöhung der Glukosekonzentration des Mediums. Sie erklären dies mit der hyperglykämieinduzierten Veränderung des Quotients von zytosolischem  $\text{NADH/NAD}^+$  in vielen Geweben, was schließlich eine „Pseudohypoxie“ bewirkt. Diese Imbalance des Quotienten entsteht durch eine reduzierte mitochondriale Oxidation von  $\text{NADH}$  zu  $\text{NAD}^+$  aufgrund des verminderten Sauerstoffpartialdrucks [68, 126]. Weiterhin bewirkt eine hyperglykämische Pseudohypoxie eine gesteigerte NO-Synthese, die ihrerseits die HIF-1 $\alpha$ -Expression induziert [57].

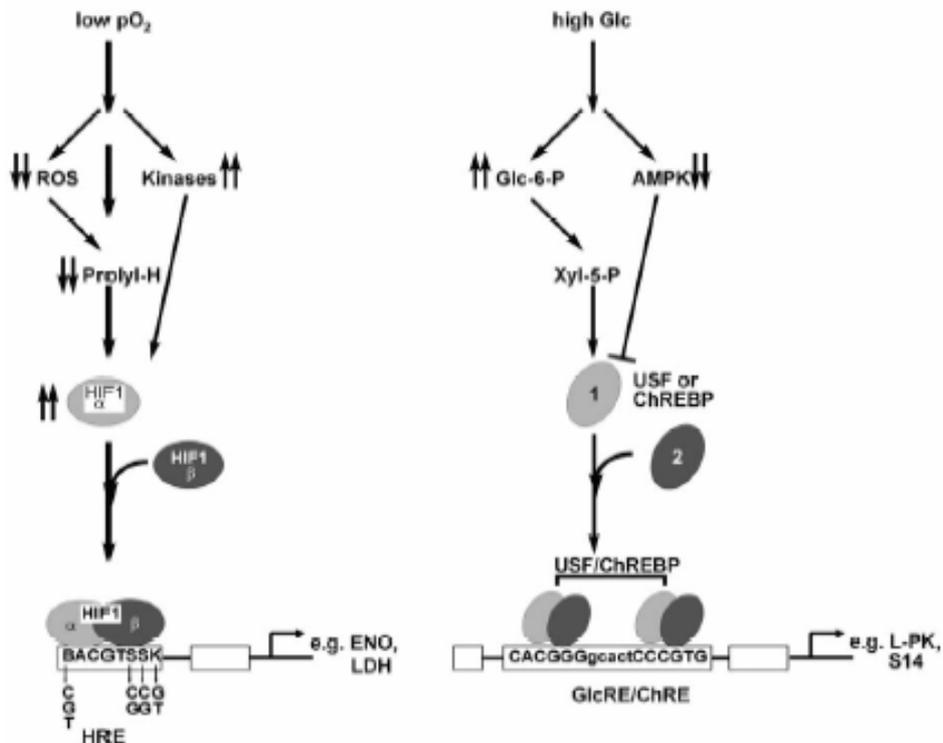
Ein weiteres Beispiel soll die enge Interaktion zwischen Glukosemetabolismus und Antwort des Organismus auf Hypoxie aufzeigen: Die Phosphorylierung des Protoonkogens c-Jun an dessen N-terminaler Region in hypoxischem Milieu ist abhängig vom Vorhandensein von HIF-1 $\alpha$ . Versuche zeigten, daß dafür auch ausreichend Glukose vorhanden sein muß. Dies konnten die Zellen in glukosehaltigem Medium leisten, indem sie HIF-1 $\alpha$ -abhängig GLUT1 (Glukosetransporter 1) exprimierten und Glukose so in ausreichendem Maße ins Zellinnere gelangen konnte. Wurde jedoch glukosefreies Medium eingesetzt, wurde die Phosphorylierung von c-Jun massiv supprimiert. Es scheint also so, als wäre die Aktivität der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) abhängig von erhöhter intrazellulärer Glukoseaufnahme, reguliert durch das HIF-1-System [62].

LU et al. berichten über eine normoxische Stimulation der HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation in verschiedenen humanen Tumorzelllinien bei einer Glukosekonzentration von 1 g/l in KREBS-HENSELEIT-Puffer nach vorhergehender 4-tägiger Anzucht in DMEM ebenfalls mit 1 g/l Glukose. Doch nicht nur Glukose, sondern auch die Glykolyseprodukte Laktat und vor allem Pyruvat (reichlich vorhanden durch den WARBURG-Effekt, d.h. durch die gesteigerte und beschleunigte anaerobe Glykolyse in Tumorzellen) hatten diesen Einfluß und induzierten die HIF-1-abhängige Genexpression. Die Studie beschreibt eine maximale HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation bei 1 g/l, jedoch waren die HIF-1 $\alpha$ -Spiegel auch bei niedrigeren

Glukosekonzentrationen (auch unter 0,1 g/l) im Vergleich zu vollständigem Fehlen von Glukose durchweg erhöht. Metaboliten des Zitronensäurezyklus hatten keinen Einfluß auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation. Um wie oben beschrieben eine mögliche NADH/NAD<sup>+</sup>-Imbalance auszugleichen, gab man entweder NADH oder NAD<sup>+</sup> hinzu. Keines von beiden veränderte den HIF-1 $\alpha$ -Spiegel, was Ausdruck dafür ist, daß Redox-Veränderungen in diesem Fall nicht die Ursache für die gesteigerte HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation ist. Die Autoren der Studie schätzen folgenden Mechanismus als denkbar und wahrscheinlich ein: Die HIF-Prolylhydroxylasen brauchen für die Degradation von HIF-1 $\alpha$  Sauerstoff, Eisen, Ascorbinsäure und 2-Oxoglutarat. Pyruvat könnte letzteres ersetzen, die Aktivität der Prolylhydroxylasen würde gesenkt und HIF-1 $\alpha$  analog zur Hypoxie stabilisiert [64]. Im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Daten, trat eine maximale HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation in meinen Versuchen jedoch nur bei Hypoxie und ausreichender Glukose auf, niemals ohne hypoxische Bedingungen.

KIETZMANN et al. entwickelten schließlich ein System zur Erklärung der Interaktion zwischen Glukose und Hypoxie (vgl. hierzu *Abb. 4.1.*): Aufgrund des Vorhandenseins von Glukose werden intrazelluläre Mediatoren aktiviert (beginnend mit Glukose-6-Phosphat), deren Kette schließlich am Zielgen (z.B. Pyruvatkinase PK) endet. Dieses wird über glukoseabhängige Transkriptionsfaktoren (upstream stimulating factors USF oder auch carbohydrate responsive element binding protein ChREBP), die an ein glucose responsive element (ein Promotor) des Zielgens binden, aktiviert. Dieser Promotor besteht aus zwei palindromischen E-Boxes. Die DNA-Bindungsstelle für HIF-1 $\alpha$  hat große Ähnlichkeit mit den genannten E-Boxes. Daher könnte es eventuell sein, daß sowohl HIF-1 $\alpha$  an glukoseabhängige E-Boxes, aber auch glukoseabhängige Transkriptionsfaktoren an hypoxia responsive elements (HRE) der DNA binden. Dadurch könnte die sauerstoffabhängige differenzierte Expression hepatischer Enzyme erklärt werden. Ebenfalls könnte man sich eventuell eine Überexpression HIF-1-abhängiger Gene vorstellen, wenn Glukose an HREs binden würde. Auch eine gesteigerte EGFP-Fluoreszenz in den Versuchen mit den transfizierten HT1080-5HRE-Zellen am Durchflußzytometer wäre erklärbar. Allerdings läßt sich mit dieser Theorie nicht

das Ergebnis der vorliegenden Westernblotversuche, nämlich eine gesteigerte Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ -Protein, erklären [56].



*Abbildung 4.1.: Verbindung von Glukosemetabolismus mit der Antwort des Körpers auf Hypoxie [56]*

Genexpression durch Glukose und Hypoxie wird jedoch nicht ausschließlich durch Regulation der Transkription gesteuert, auch durch posttranskriptionelle Modifikation kann dies geschehen. Beispiel hierfür ist die Expression des Insulinrezeptors vorzugsweise im perivenösen Areal des Azinus [56].

Eine zusätzliche Möglichkeit, in vivo die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation zu stimulieren, geschieht durch Insulin. Es wirkt über einen Phosphatidylinositol-3-Kinase- (PI3K) und einen Target of Rapamycin- (TOR) abhängigen Weg. Hierbei wird die Veränderung der HIF-1 $\alpha$ -Menge nicht durch Modifikation der Transkription des HIF-1 $\alpha$ -Gens, sondern durch Einfluß auf die Translation der HIF-1 $\alpha$ -mRNA hervorgerufen [108].

Sicher ist, daß extrazelluläre Glukose großen Einfluß auf die intrazelluläre HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation und die Stabilität von HIF-1 $\alpha$ -assoziierten Proteinen hat. Es

wären verschiedene Mechanismen denkbar, von denen einige genannt wurden. Interessanterweise finden sich in der Literatur bezüglich optimaler Glukosekonzentrationen zur maximalen Expression HIF-1-abhängiger Proteine und auch von HIF-1 $\alpha$  selbst sehr unterschiedliche Angaben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch erstmals in verschiedenen in-vitro-Modellen, daß eine annähernd normale Glukosekonzentration für die volle hypoxische HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation erforderlich ist.

#### **4. 1. 3. Wachstumsfaktoren**

Es ist bekannt, daß es neben der hypoxischen Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  auch einen alternativen Weg über Wachstumsfaktoren und intrazelluläre second-messenger-Systeme gibt (siehe Kapitel 1.4.2.). Im Serum von Menschen und Tieren gibt es zahlreiche Wachstumsfaktoren. Es handelt sich um körpereigene Substanzen, die das Zell- bzw. Körperwachstum stimulieren. Neben den Hormonen (z.B. somatotropes Hormon STH) werden auch die Zytokine (z.B. Interleukine, Interferone, Immunglobulinsuperfamilie, Tumornekrosefaktor-Familie) und andere „growth factors“, wie etwa die epidermalen (EGF), Plättchen- (PDGF), Insulin-ähnlichen (IGF), Fibroblasten- (FGF), Nerven- (NGF) und transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF), zur Übergruppe der Wachstumsfaktoren gezählt. Durch die Bindung der Faktoren an verschiedene membranständige Rezeptoren (bevorzugt Rezeptortyrosinkinasen) wird die zelluläre Reaktion ausgelöst [25, 85]. Für die Steigerung der normoxischen Expression von HIF-1 $\alpha$  sind v.a. der epidermal growth factor (EGF), Insulin, der Insulin-like growth factor (IGF) 1 und 2, Interleukin-1 $\beta$  und auch der fibroblast growth factor (FGF) relevant [102].

Bezüglich des Einflusses von Wachstumsfaktoren auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation scheint die Art der Zelllinie ausschlaggebend zu sein. Bei den verwendeten Tumorzellen (HT1080 und FaDu) trat weder eine normoxische Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  noch eine wesentliche Steigerung der hypoxischen HIF-1 $\alpha$ -Spiegel durch Wachstumsfaktoren auf (vgl. *Abb. 3.1.* bis *Abb. 3.4.*). Ebenso scheinen

HeLa-Zellen zu reagieren [136]. HIF-1 $\alpha$  scheint in genannten Zellen nicht abhängig von extrazellulären Signalen, wie Wachstumsfaktoren zu sein. Prostatakarzinomzellen hingegen zeigen durch Serum induzierbare HIF-1 $\alpha$ -Spiegel [135].

RICHARD et al. berichten bei Versuchen mit glatten Gefäßmyozyten gar über eine normoxische HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation durch Serum, die gleich stark wie diejenige unter hypoxischen Bedingungen ist. Man differenzierte weiter und erkannte Angiotensin II, Thrombin, Serotonin und Platelet derived growth factor (PDGF) als Agonisten an Wachstumsfaktorrezeptoren. Als Hauptinduktor der HIF-1 $\alpha$ -Expression stellte sich Angiotensin II heraus. Interessanterweise konnte Losartan, ein Antihypertonikum, das den Subtyp 1 des Angiotensin-II-Rezeptors blockiert, die HIF-1 $\alpha$ -Stimulation komplett inhibieren. Hypoxie hatte in dem Versuch einen additiven Effekt zu der Serumwirkung [92].

#### **4. 1. 4. pH-Wert**

Wie aus den vorliegenden Daten zu den Zelllinien HT1080 und FaDu hervorgeht, hat das Vorhandensein eines pH-Wertes von 6,7 – wie er in soliden Tumoren vorkommt – verglichen mit pH 7,4 im Normalgewebe [60, 104] (vgl. auch Kapitel 1.1.2.2.) keinen signifikanten Einfluß auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation (vgl. *Abb. 3.1.* bis *Abb. 3.4.*). Andere Studien belegten bereits, daß pH-Unterschiede (pH 6,6 oder pH 7,3) ohne Hypoxie keine HIF-1 $\alpha$ -Expression stimulieren konnten [129]. Nichtsdestotrotz bewirkt eine Tumorzidose Veränderungen auf molekularer Ebene: FUKUMURA et al. berichten, daß die Menge von VEGF-mRNA sowohl bei Hypoxie als auch bei Azidose steigt. Bei Hypoxie geschieht dies über den beschriebenen HIF-1 $\alpha$ -Mechanismus. Da bei Azidose keine erhöhten HIF-1 $\alpha$ -Spiegel gemessen werden können, muß die VEGF-Promotor-Aktivierung allerdings unabhängig von der hypoxischen Aktivierung vonstatten gehen [29]. Studien nennen den nukleären Faktor  $\kappa$ B als Aktivator der VEGF-Gen-Transkription [103]. Dieser Mechanismus ist schon deshalb für das Wachstum des Tumors nötig, weil die räumliche Verteilung von

hypoxischen und sauren Arealen im Tumor keine Korrelation aufweist [38]. Sowohl Hypoxie, als auch Tumorzidität steigert somit die Aggressivität. Interessanterweise entsteht durch Kombination von Hypoxie und saurem pH kein synergistischer Effekt bezüglich der VEGF-Promotor-Aktivierung [29].

Die Angiogenese per se wird in vitro durch saures Mikromilieu empfindlich supprimiert. In vivo kompensieren jedoch VEGF und bFGF (basic fibroblast growth factor) diese Suppression [13].

Die Zytotoxizität platinhaltiger Zytostatika steigt mit niedrigem intrazellulärem pH-Wert [3]. Weiterhin wird die zytotoxische Wirkung von einigen Alkylantien, insbesondere Lomustin, einer Harnstoff-Lost-Verbindung, verstärkt. Die Wirkung von Vincristin und Gemcitabin sinkt im sauren Milieu [91].

VAN DEN BERG et al. berichten von einer Abnahme der Radiosensitivität von Tumorzellen mit sinkenden pH-Werten [110], allerdings finden sich auch Quellen, die von einer Abnahme der Überlebensrate bestrahlter Zellen bei sinkendem pH-Wert berichten, also einer Zunahme der Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung [138]. REICHERT et al. berichten über keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Radiosensitivität dreier Glioblastomzelllinien bei pH 6,6, pH 7,0 und pH 7,4 [91].

Im Rattenmodell bewirkte eine intravenöse Applikation von Glukose bei allen untersuchten humanen Tumoren einen Abfall des Tumor-pHs von durchschnittlich 6,83 auf 6,43. Dies entspricht einer Verzehnfachung der H<sup>+</sup>-Ionen-Aktivität. Gleichzeitig fiel der pH-Wert in Organen der Ratte lediglich minimal ab [116]. Diese Beobachtung ließe sich durch den WARBURG-Effekt – eine gesteigerte und beschleunigte anaerobe Glykolyse speziell in Tumorzellen auch bei ausreichender Sauerstoffzufuhr – erklären.

Daher versucht man in die pH-Regulierung der Tumorzellen einzugreifen indem man z.B. Ionenaustauscher medikamentös blockiert. Ziel der Anstrengungen könnte eine tumorselektive Therapie sein [104].

Der pH<sub>i</sub> steigt durch Radiotherapie an. Im Rahmen einer fraktionierten Bestrahlung klettern die pH-Werte bei verschiedenen Meßzeitpunkten bis auf Werte von 8,0 [77].

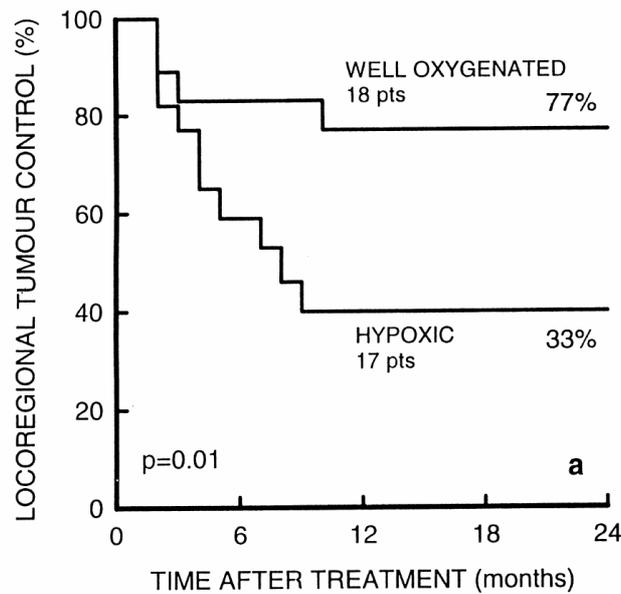
## 4. 2. Klinische Bedeutung der Tumorhypoxie

### 4. 2. 1. Bestrahlung und Tumorhypoxie

Zahlreiche Studien wurden zu diesem Thema veröffentlicht, die überwiegend einen Zusammenhang von Tumorhypoxie und ungünstiger Prognose zeigten: BRIZEL et al. untersuchten 22 Patienten mit nicht-metastasierten Weichteilsarkomen. 18 Monate nach Bestrahlung und Hyperthermiebehandlung waren noch 70% der Patienten mit mittlerem Sauerstoffpartialdruck im Tumor  $>10$  mmHg ( $>1,32\%$  O<sub>2</sub>) ohne Rezidiv, jedoch nur 35% der Patienten mit mittleren Sauerstoffpartialdrücken  $<10$  mmHg ( $<1,32\%$  O<sub>2</sub>) [11].

HÖCKEL et al. veröffentlichten 1996 eine prospektive Studie, die sie von 1989 bis 1995 durchgeführt hatten und die 103 Patientinnen mit Zervixkarzinom beinhaltete. 50% der Tumoren hatten Sauerstoffpartialdrücke  $< 10$  mmHg ( $<1,32\%$  O<sub>2</sub>). Diese Patientinnen hatten sowohl nach Operation als auch nach Bestrahlung signifikant schlechtere Aussichten auf ein rezidivfreies Überleben (lokale Rezidive und Metastasen) und auch die Überlebenschancen per se war signifikant niedriger als bei Tumoren mit  $pO_2 > 10$  mmHg ( $> 1,32\%$  O<sub>2</sub>). Man ermittelte das Tumorstadium und die Tumoroxygenierung als die beiden wichtigsten prognostischen Faktoren. Ferner stellte man fest, daß hypoxische Tumoren größer waren als normoxische Tumoren des gleichen Tumorstadiums [39].

NORDSMARK et al. untersuchten 31 Patienten mit fortgeschrittenem Kopf- und Halstumor auf den Zusammenhang von Tumoroxygenierung und Ergebnis nach Bestrahlung. Nach zwei Jahren waren noch 77% der Patienten mit normoxischen Tumoren ohne lokales Rezidiv, während es bei den Patienten mit hypoxischen Tumoren lediglich noch 33% waren (*Abbildung 4.2.*) [80].



*Abbildung 4.2.: Verschlechterung der Prognose für lokale Rezidivfreiheit in Abhängigkeit von der Tumoroxygenierung bei Kopf- und Halstumoren [80]*

#### 4. 2. 2. Gründe für die Prognoseverschlechterung hypoxischer Tumoren - Pathophysiologie der Hypoxie

Zum einen ist hier das Versagen von konventionellen Therapien zu nennen. Radiotherapie wird aufgrund des fehlenden Sauerstoffeffektes (vgl. Kapitel 1.2.) ineffizienter, aber auch viele Chemotherapeutika büßen durch Hypoxie an Zytotoxizität ein. Unter anderem inhibiert Hypoxie die Zellproliferation, wodurch einige Zytostatika, die hauptsächlich schnell-proliferierende Zellen angreifen, versagen [127].

Zum anderen muß hier die gesteigerte Aggressivität hypoxischer Tumoren angesprochen werden. Hypoxische Tumorzellen besitzen ein gesteigertes metastatisches Potential [132]. Zum einen werden nämlich Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) verstärkt exprimiert und bewirken durch Abbau der Extrazellulärmatrix eine gesteigerte Tumorinvasivität [22]. Zum anderen entdeckte man, daß unter hypoxischen Bedingungen Adhäsionsmoleküle

vermindert gebildet werden, wodurch ebenfalls die Tumorausbreitung begünstigt wird [35]. Außerdem zeigen hypoxische Tumoren hohe Interleukin-8-Spiegel, was durch erhöhte MMP-Expression ebenso die Aggressivität steigert [65].

Ferner führt Hypoxie zu genetischer Instabilität. So zeigten Versuche, daß in hypoxischen Arealen vermehrt p53-Mutationen zu finden waren, weshalb die Apoptoserate hypoxischer Zellen sank. Dadurch fand eine Selektion hin zu Zellen mit geringer apoptotischer Potenz statt [31]. Ein entscheidender Faktor der hypoxischen Tumorprogression ist zweifellos die VEGF-vermittelte Angiogenese. VEGF wird in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert und korreliert sowohl mit der Angiogenese, dem Wachstum, der invasiven Potenz und dem Metastasierungsverhalten, als auch mit der Prognose [15].

Um eben genannte Mechanismen ausführen zu können, bedarf es einer Genexpression, die der Hypoxie Rechnung trägt. So werden zwecks der Optimierung der Sauerstoffversorgung vermehrt Gene wie VEGF (Vascular endothelial growth factor) oder EPO (Erythropoetin) exprimiert. Da Tumorzellen den Hauptteil ihrer Energie durch anaerobe Glykose gewinnen, müssen entsprechende Enzyme, wie Pyruvatkinase oder Phosphoglyzeratkinase, zur Genüge vorhanden sein. Auch die Expression von Glukosetransportern (GLUTs) steigt, um die Glukoseaufnahme in die Zellen zu erhöhen.

Zellen in hypoxischen Arealen proliferieren, wenn überhaupt, langsamer als Zellen in normoxischem Milieu. Versuche zeigten, daß die Zellen in Gewebeschnitten, die mit Pimonidazol als Hypoxiemarker angefärbt worden waren, gewöhnlich andere waren als die, die mit Bromodeoxyuridin (BrdUrd) als Proliferationsmarker angefärbt worden waren. Lediglich in Tumorarealen mit vorübergehenden Perfusionsveränderungen fand man Zellen, die sich mit beiden Markern anfärben ließen [26]. Allerdings gibt es auch eine gewisse Anzahl proliferierender Zellen in hypoxischen Arealen [14, 26].

#### **4. 2. 3. Therapieschemata bei Tumorhypoxie**

Um dem aggressiven Potential hypoxischer Tumoren entgegenzuwirken, wurden verschiedene Therapieansätze entwickelt, deren Ziel es entweder ist, die Tumoroxygenierung auf physiologische Spiegel anzuheben und den Tumor somit zugänglicher für Chemo- und Strahlentherapie zu machen, oder aber die Tumorhypoxie gezielt für andere Therapieformen auszunutzen.

##### 4. 2. 3. 1. Verbesserung der Tumoroxygenierung

Verschiedene Möglichkeiten stehen hierfür zur Verfügung. Lange Zeit wurden in regelmäßigen Abständen Erythrozytenkonzentrate transfundiert, um die Hämoglobinkonzentration im Blut und somit auch den  $pO_2$  im Tumor zu erhöhen. Eine andere Möglichkeit dies zu erreichen, stellt die Therapie mit EPO dar, das mittlerweile auch gentechnisch hergestellt wird.

Das ARCON-Schema („accelerated radiotherapy carbogen and nicotinamide“) stellt eine weitere Alternative dar. Durch das Inhalieren von Carbogen (95%  $O_2$  und 5%  $CO_2$ ) wenige Minuten vor Beginn der Bestrahlung soll durch Erhöhung des  $pO_2$  im Gewebe die chronische Hypoxie, durch orale Applikation von Nikotinamid (Amid des Vitamin  $D_3$ ) 60-90 min vor Bestrahlungsbeginn die akute Hypoxie verbessert werden [127]. Die  $CO_2$ -Komponente des Carbogens führt dabei zu einer Atmungsstimulation und einer Rechtsverschiebung der  $O_2$ -Bindungskurve (BOHR-Effekt). KAANDERS et al. zeigten, daß bei fortgeschrittenen Kopf- und Halstumoren in fast allen Fällen eine Erhöhung der Tumoroxygenierung erreicht werden kann [52].

Ferner konnten Substanzen entwickelt werden, die den Sauerstoffeffekt in dessen Abwesenheit imitieren (Radiosensitizer). Es sei Nimorazol genannt, ein 5-Nitroimidazol, das ein geringes Spektrum an Nebenwirkungen besitzt und wegen seiner nachgewiesenen signifikanten Verlängerung des rezidivfreien Überlebens und der lokalen Rezidivfreiheit [83] beispielsweise in Dänemark schon zur Standardtherapie von Kopf- und Halstumoren eingesetzt wird.

#### 4. 2. 3. 2. Ausnutzen der Hypoxie für die Therapie

Verschiedene sogenannte bioreduktive Stoffe konnten entwickelt werden, die nur in hypoxischen Geweben enzymatisch zum aktiven zytotoxischen Metaboliten umgewandelt werden. Paradebeispiel ist hier das Tirapazamin, das in der Lage ist, verschiedene DNA-Schäden zu setzen. Aufgrund des Wirkmechanismus ergibt sich für normoxisches Gewebe lediglich ein minimal-toxischer Effekt. Meistens erfolgt ein Einsatz dieser Substanzen in Kombination mit herkömmlichen Therapiemethoden. Eine multizentrische Phase III-Studie zeigte, daß bei der Behandlung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome mit Cisplatin und Tirapazamin zwar die zytotoxische Wirksamkeit von Cisplatin durch Tirapazamin verstärkt wurde, nicht jedoch die unerwünschten Wirkungen. Die Autoren werten dies als Beweis für die Spezifität von Tirapazamin auf hypoxisches Tumorgewebe [112].

Auch gentherapeutisch versucht man in jüngerer Zeit hypoxische Tumorareale spezifisch anzugehen. Obligate Anaerobier wie z.B. Clostridien, aber auch andere geeignete Vektoren, suchen - intravenös verabreicht - im Körper gezielt hypoxische Regionen auf. Durch geeignete Gentherapie sind die rekombinanten Bakterien in der Lage, eben dort Proteine zu exprimieren [71]. Die Therapie kann jederzeit mit einem geeigneten Antibiotikum beendet werden. LIU et al. entwickelten beispielsweise als Vektor *Clostridium sporogenes*, der spezifisch in hypoxischen Tumorarealen das Enzym Cytosindeaminase exprimierte, welches in der Lage ist, das Prodrug 5-Fluorocytosin zum zytotoxischen 5-Fluorouracil zu metabolisieren [63].

Für ihre Sauerstoffversorgung brauchen Tumoren ab einer gewissen Größe unweigerlich ein intratumoröses Gefäßnetzwerk, das einen therapeutischen Angriffspunkt darstellen kann. So könnten z.B. MMP-Inhibitoren wie Marimastat die Extrazellulärmatrix erhalten und so eine Neoangiogenese verhindern. Endostatin und Angiostatin sind Angiogeneseinhibitoren, die die Proliferation endothelialer Zellen hemmen [131]. Auch Thalidomid besitzt eine solche

Eigenschaft [24]. Des weiteren existieren Medikamente, die in das VEGF-System eingreifen, indem sie etwa VEGF-Rezeptoren blockieren, oder die VEGF-mRNA zerstören. Eine detailliertere Abhandlung möglicher Anti-Angiogenesemaßnahmen befindet sich in dem Artikel von WOUTERS et al. [127]. Zur Zeit entwickelt man Medikamente, die in die Regulation der Genexpression bei Hypoxie einwirken können (vgl. Kapitel 4.4.).

### 4. 3. Einsatz von Hypoxiemarkern zur Selektion von Patienten für hypoxiespezifische Therapieformen

#### 4. 3. 1. HIF-1 $\alpha$ im Vergleich mit exogenen Hypoxiemarkern

Wie in Kapitel 1.3. bereits genannt, unterscheidet man zwischen exogenen und endogenen Hypoxiemarkern. Exogene Marker haben den Nachteil, daß sie intravenös verabreicht werden müssen, bevor eine Biopsie des Tumorgewebes durchgeführt werden kann. Dadurch wird eine Untersuchung von archiviertem Material unmöglich [14]. 1979 wurde erstmals Misonidazol erwähnt, der Prototyp der exogenen Hypoxiemarker. Heute sind vor allem die 2-Nitroimidazole Pimonidazol und EF5 klinisch relevant [14]. Sie werden durch Sauerstoffmangel reduziert und bilden kovalente Bindungen zu Makromolekülen aus. Durch Zugabe von passenden Antikörpern können so an histologischen Schnitten hypoxische Areale detektiert werden. Beide unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Pharmakokinetik und Stabilität in vivo. Die Plasmahalbwertszeit von Pimonidazol beträgt 5,1 Stunden, die von EF5 11,5 Stunden [27].

Pimonidazol bindet hauptsächlich in Bereichen, die über 80  $\mu$ m von Gefäßen entfernt sind, was nahelegt, daß der Marker vor allem eine chronische, diffusionslimitierte Hypoxie anzeigt [48]. Zahlreiche Studien zeigen, daß keine

signifikante Korrelation zwischen Pimonidazolfärbungen und Messungen mit Eppendorf-O<sub>2</sub>-Elektroden besteht [79]. Dies bedeutet jedoch nicht automatisch, daß Pimonidazol ein schlechter Hypoxiemarker ist. Vielmehr ist die Ursache für eine fehlende Korrelation vermutlich in der Tatsache zu suchen, daß Messungen mit Eppendorf-O<sub>2</sub>-Elektroden den Sauerstoffpartialdruck nicht nur in chronischen hypoxischen Arealen – wie Pimonidazol – sondern auch in akut hypoxischen Bereichen und Nekrosen anzeigen. Halbmaximale Färbung mit Pimonidazol erfolgt bei etwa 0,15% O<sub>2</sub> [32].

Die Verteilung von HIF-1 $\alpha$  ist grundlegend anders. Pimonidazol und HIF-1 $\alpha$  hatten laut JANSSEN et al. in den gleichen Tumoren auf Pixelebene lediglich eine mittlere Kollokalisierung von unter 5%. Die HIF-1 $\alpha$ -Färbung hat bezüglich der Entfernung zum nächsten Gefäß keinen eindeutigen Peak. Die Färbung ist eher diffus über das Gewebe verteilt, wobei ab 40  $\mu$ m Entfernung vom nächsten Gefäß die Färbung zunimmt, ab 60 – 80  $\mu$ m jedoch bereits wieder abnimmt [48]. Diese wichtige Beobachtung könnte den vorliegenden Ergebnissen bei in vitro Versuchen mit HT1080- und FaDu-Zellen entsprechen, bei denen die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation bei Glukosemangel stark supprimiert wurde. VUKOVIC et al. berichteten bei Zervixkarzinom-Xenograftumoren ebenfalls über eine nachlassende HIF-1 $\alpha$ -Färbung bei Entfernungen zu den nächsten Gefäßen von über 60  $\mu$ m. Ferner beobachteten die Autoren der Studie bei Auswertung auf Pixelebene eine signifikante räumliche und zeitliche Kollokalisierung von HIF-1 $\alpha$  und EF5 [121]. Eine weitere Studie beobachtete HIF-1 $\alpha$ -Peaks stets näher als 100  $\mu$ m vom nächsten Gefäß entfernt [36].

Die Kinetik von HIF-1 $\alpha$  wurde in unserer Arbeitsgruppe genau untersucht [119]. Nach 15 Minuten Sauerstoffmangel waren die HIF-1 $\alpha$ -Spiegel noch relativ niedrig. Bereits nach einer Hypoxiedauer von einer Stunde jedoch, konnte eine annähernd maximale HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation beobachtet werden, die sich auch bei einer Hypoxiedauer von 24 Stunden nicht änderte. Bei FaDu-Zellen waren HIF-1 $\alpha$ -Spiegel bei Sauerstoffkonzentrationen von 5% O<sub>2</sub> signifikant niedriger als bei 1% oder 0,1% O<sub>2</sub>. Bei HT1080-Zellen konnte kein Unterschied zwischen

starker und schwacher Hypoxie festgestellt werden. Eine eventuelle Wachstumsverzögerung der Zellen aufgrund der Hypoxie als Ursache der Ergebnisse konnte nicht nachgewiesen werden. HIF-1 $\alpha$  besitzt eine Halbwertszeit im Minutenbereich und kann bereits nach 15 Minuten Reoxygenierung nicht mehr nachgewiesen werden. Dies macht eine geeignete Probenaufbereitung zur HIF-1 $\alpha$ -Bestimmung in Tumorgewebe problematisch. Auch die Tatsache, daß HIF-1 $\alpha$  bei den HT1080-Zellen bereits bei 5% O<sub>2</sub> – ein nahezu physiologischer Wert im Gewebe – annähernd maximal gemessen wurde, macht den Einsatz von HIF-1 $\alpha$  als endogenen Hypoxiemarker fragwürdig. 2-Nitroimidazole binden erst bei O<sub>2</sub>-Konzentrationen unter 2% an hypoxisches Gewebe und erscheinen daher besser geeignet, eine strahlentherapeutisch relevante Hypoxie anzuzeigen. Bei den FaDu-Zellen ergab sich eine gute Korrelation zwischen HIF-1 $\alpha$ -Spiegel und gemessenen Überlebensraten der bestrahlten Zellen, also der hypoxischen Strahlenresistenz, was bei den HT1080-Zellen ebenfalls nicht der Fall war. Es zeigt sich, daß eine Assoziation zwischen HIF-1 $\alpha$ -Spiegeln und Hypoxie bzw. hypoxischer Strahlenresistenz abhängig vom Zelltyp ist.

JIANG et al. beschrieben bei in vitro Versuchen mit HeLa-Zervixkarzinomzellen eine ähnliche Kinetik von HIF-1 $\alpha$ : sie beobachteten einen leichten Anstieg zwischen 20% und 6% O<sub>2</sub>, einen steilen Anstieg unter 6% O<sub>2</sub>, halbmaximale Werte zwischen 1,5% und 2% O<sub>2</sub> und ein Maximum bei 0,5% O<sub>2</sub>. Bei totaler Anoxie stellten sie lediglich sehr geringe HIF-1 $\alpha$ -Spiegel fest und erklärten dies durch einen anoxischen Stopp der Transkription und Translation [50]. Offenbar verhalten sich verschiedene Zelllinien bezüglich der Kinetik der HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation ebenfalls etwas unterschiedlich.

Andere Studien beschreiben eine HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation bereits nach 2 Minuten, was darauf hindeutet, daß HIF-1 $\alpha$  sowohl chronische als auch akute Hypoxien anzuzeigen vermag [49].

Es stellt sich die Frage, warum in einem so geringen Teil des Tumorgewebes Kollokalisierungen zwischen HIF-1 $\alpha$  und Pimonidazol vorliegen. Zum einen ließe

sich eine untypische HIF-1 $\alpha$ -Expression durch eine Mutation des HIF-1 $\alpha$ -Gens selbst oder aber eines Gens eines regulierenden Faktors wie z.B. pVHL erklären. So könnte auch gut die relativ homogene Verteilung von HIF-1 $\alpha$  im Gewebeschnitt erklärt werden [48]. Auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase soll regelmäßig in Tumoren mutiert vorliegen. Andererseits wäre es möglich, daß – wie in meinen in vitro-Versuchen gezeigt – das Tumormikromilieu Einfluß auf die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation nimmt, was den Unterschied zur Pimonidazolfärbung erklären könnte. WALENTA et al. zeigten, daß hypoxische Tumoreale oft mit solchen, denen es an Nährstoffen wie Glukose fehlt, übereinstimmen [122]. Dies würde erklären, warum hohe HIF-1 $\alpha$ -Spiegel in intermediär hypoxischen Arealen relativ nahe an den Gefäßen gemessen werden, wo viele Nährstoffe (v.a. Glukose) vorhanden sind, und warum HIF-1 $\alpha$ -Level in Regionen, in denen Pimonidazol eine starke Färbung hervorruft, bereits wieder abgesunken sind und kaum mehr meßbar sind. Durchschnittswerte für Glukosekonzentrationen in Tumoren sind – wie in der Einleitung beschrieben – etwa 0,36 g/l (2 mM). Es ist also durchaus denkbar, daß in hypoxischen Arealen die Konzentration auf unter 0,1 g/l (0,55 mM) abfällt, was in meinen Versuchen eine stark abgeschwächte HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation bedeutete. Ein solcher Mechanismus wird durch bisher unveröffentlichte Daten einer Arbeitsgruppe aus Vancouver belegt. Man beschreibt, daß sich das Gewebe um ein Gefäß herum ab einer gewissen Entfernung mit Pimonidazol und HIF-1 $\alpha$  anfärben läßt, daß jedoch die HIF-1 $\alpha$ -Färbung bei noch größerer Entfernung im Gegensatz zur Pimonidazolfärbung wieder massiv nachläßt [P. OLIVE, Vancouver, Kanada, persönliche Mitteilung].

Es ist wahrscheinlich, daß beide Marker – HIF-1 $\alpha$  und Pimonidazol – einen unterschiedlichen prädiktiven Wert besitzen. Pimonidazol (Applikation 16 Stunden vor Materialentnahme) könnte vor allem eine chronische, HIF-1 $\alpha$  sowohl eine chronische, als auch eine akute Hypoxie anzeigen [2].

#### 4. 3. 2. HIF-1 $\alpha$ im Vergleich mit anderen endogenen Hypoxiemarkern

Im Folgenden soll auf andere endogene Hypoxiemarker eingegangen werden: CA IX gehört zur Gruppe der Carboanhydrasen, membranständige Enzyme, die die reversible Hydratation von Kohlendioxid zu Kohlensäure katalysieren. Dies ist unter anderem wichtig für den Säure-Base-Haushalt [14]. CA IX ist ein HIF-1-abhängiges Genprodukt. Wie auch HIF-1 $\alpha$ , ist CA IX mit einer ungünstigen Prognose für das Therapieergebnis assoziiert [58]. In vitro Versuche zeigten, daß die CA IX-Expression unter 2,8% O<sub>2</sub> beginnt [128]. OLIVE et al. fanden in Xenografttumoren von SiHa-Zervixkarzinomzellen und M006-Gliomzellen eine hohe Korrelation zwischen CA IX-Expression und Pimonidazolfärbung. Sie beschreiben die Kolo-kalisation gar als „exzellent“, obwohl sich etwa doppelt so viele Zellen mit CA IX anfärbten als mit Pimonidazol, was wohl daran liegt, daß der Beginn der CA IX-Expression unterhalb von 2,8% O<sub>2</sub> noch über der Wirkschwelle von Pimonidazol liegt. Die Auswertung der angefärbten histologischen Schnitte erfolgte auf Pixelbasis [81]. Eine andere Studie ermittelte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen CA IX-Expression und Pimonidazolfärbung. Zur Bildauswertung wurde hierbei ein semiquantitatives Punktesystem verwendet, bei dem die Färbung eines jeden Blickfelds im Mikroskop einer Zahl von 0 (0% Färbung) bis 4 (>30% Färbung) zugeordnet wurde [2]. Mögliche Ursache der Diskrepanz der zwei eben genannten Studien könnte das unterschiedliche Auswertesystem der histologischen Schnitte sein. Bei Kopf-Hals-Tumoren war der Durchschnitt der CA IX-positiven Regionen in einer Entfernung von 80 $\mu$ m vom nächsten Gefäß, was interpretiert wurde als Sauerstoffkonzentration von 1% O<sub>2</sub> [4].

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte das genaue Verhalten von CA IX bei Hypoxie und Reoxygenierung. CA IX akkumulierte in der ganzen Zelle ab einer Hypoxiedauer von 6 Stunden, was nahe legt, daß vor allem die chronische diffusionslimitierte Hypoxie gemessen wird. Im Gegensatz zu HIF-1 $\alpha$  ist CA IX über 96 Stunden hinaus stabil, was die Probenaufbereitung enorm vereinfacht

[118, im Druck]. RAFAJOVÁ et al. berichten von einer Halbwertszeit von 38,4 Stunden [86].

Glukosemangel bewirkt – ähnlich wie bei HIF-1 $\alpha$  - eine starke Verminderung der CA IX-Expression, was zeigt, daß auch CA IX nicht rein hypoxieabhängig exprimiert wird. Andere Faktoren des Tumormikromilieus hatten wie in meinen Versuchen kaum eine Wirkung auf die CA IX-Akkumulation. Anders als bei HIF-1 $\alpha$  zeigt sich bei CA IX, daß Zellkonfluenz in den Petrischalen unter normoxischen Bedingungen zu einer verstärkten CA IX-Stimulierung führt [118, im Druck]. Man erklärt es dadurch, daß durch die entstehende milde Hypoxie der Zellen die HIF-1 $\alpha$ -Spiegel (nicht meßbar) erhöht werden und gleichzeitig durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg (PI3K) eine Stimulierung erfolgt. KALUZ et al. gehen davon aus, daß bei Hypoxie die Aktivierung über HIF-1 überwiegt, bei Konfluenz der Zellen die Aktivierung über den PI3K-Weg [54].

Der Glukosetransporter 1 (GLUT1) ist ebenfalls ein HIF-1 $\alpha$ -abhängiges Genprodukt und wie auch CA IX als Hypoxiemarker im Gespräch. Aufgabe des GLUT1 ist es, dem Tumor bei Nährstoffmangel ausreichend Glukose nach intrazellulär zu transportieren. Auch die GLUT1-Expression geht mit einer Prognoseverschlechterung bezüglich der Überlebensdauer [33] und der Metastasenfreiheit einher [20]. Ähnlich wie bei HIF-1 $\alpha$  lag bei einigen Tumoren eine eher diffuse GLUT1-Färbung vor und nicht perinekrotisch betont, wie bei anderen histologischen Schnitten, die beurteilt wurden [20]. Trotzdem ergab sich eine starke Korrelation zwischen den Pimonidazol- und den GLUT1-Färbungen [2]. GLUT1-Spiegel sind nach einer Hypoxiedauer von einer Stunde halbmaximal und erst nach 16 Stunden Hypoxie maximal [86].

Weitere mögliche endogene Hypoxiemarker sind z.B. VEGF [109] oder LDH-5 [59].

#### **4. 3. 3. Gemeinsame Bewertung der verschiedenen endogenen Hypoxiemarker**

Jeder der genannten endogenen Hypoxiemarker hätte Vor- und Nachteile in der klinischen Routine. HIF-1 $\alpha$  beispielsweise ist in der Lage auch akute Veränderungen der Tumoroxygenierung zu erfassen, allerdings macht der schnelle Abbau von HIF-1 $\alpha$  bei Reoxygenierung das Anfertigen von HIF-1 $\alpha$ -Färbungen schwer. Außerdem wirft die mangelnde Kolo-kalisation von HIF-1 $\alpha$  mit Pimonidazol Zweifel auf, ob HIF-1 $\alpha$  ein geeigneter Hypoxiemarker ist. Bezüglich der Korrelation der CA IX-Expression mit Pimonidazolfärbungen gibt es konträre Studien. Eine wichtige Rolle bei der Beurteilung einer solchen Korrelation scheint die Technik der Bildauswertung der histologischen Schnitte zu sein. CA IX besitzt eine ausreichend lange Halbwertszeit, so daß problemlos histologische Schnitte angefärbt werden können. Allerdings werden akute Veränderungen der Tumoroxygenierung nicht erfaßt, da CA IX erst nach einer Hypoxie von mehreren Stunden exprimiert wird. Auch GLUT1 scheint eher eine chronische Hypoxie anzuzeigen, bei guter Korrelation mit vergleichenden Pimonidazolfärbungen.

Kein endogener Hypoxiemarker scheint hypoxiespezifisch zu sein. HIF-1 $\alpha$  wurde unter normoxischen Bedingungen in der Niere, der Nebennierenrinde, dem Pankreas und anderen Organen gefunden [137]. Hohe Spiegel von CA IX wurden bei physiologischem Sauerstoffpartialdruck in der Gallenblase, dem Plexus choroideus, der Magenschleimhaut und in anderen Geweben gemessen. Allerdings nicht in der Niere, der Mamma, dem Hirn oder der Prostata [45]. Auch eine GLUT1-Akkumulation wurde bei normoxischen Bedingungen beobachtet [18].

Gleichzeitig scheint kein endogener Hypoxiemarker in allen Tumorentitäten eine Hypoxie anzeigen zu können. VORDERMARK et al. geben zu diesem Thema einen Überblick [117].

Offenbar stimulieren bestimmte Sauerstoffpartialdrücke die Expression von allen bekannten endogenen Hypoxiemarkern unterschiedlich. Daher könnte

eine Kombination von Markern sinnvoll sein, um die intratumoralen Oxygenierungsverhältnisse richtig einschätzen zu können. Hilfreich erscheint ebenfalls, neben der Expression bestimmter Proteine andere Faktoren, wie die Vaskularisierungsdichte zu bestimmen [20].

#### 4. 4. HIF-1 $\alpha$ – ein möglicher Angriffspunkt in der Tumorthherapie

Hypoxie – und einhergehend damit eine HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation – verkürzt bei zahlreichen Tumoren die Überlebenszeit und auch die Zeit ohne Rezidiv zum einen durch HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Genexpression. Zum anderen bewirkt eine Tumorphypoxie, als deren Indikator ein erhöhter HIF-1 $\alpha$ -Spiegel dienen kann, jedoch auch eine Verschlechterung der Wirksamkeit von Radio- [11, 39, 41, 80] und Chemotherapien [44]. Doch die Tumorphypoxie und die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation bietet neben all ihren Nachteilen auch die Möglichkeit tumorspezifischer Therapiestrategien. Nachdem ich in Kapitel 4.2.3. auf die Verbesserung der Tumoroxygenierung und die Nutzung einer Tumorphypoxie eingegangen bin, sollen nun zukunftssträchtige therapeutische Mechanismen besprochen werden, die HIF-1 $\alpha$  selbst als Angriffsziel haben. Eine Drosselung der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität könnte die Pathophysiologie hypoxischer Genexpression durchbrechen und dadurch beispielsweise die Tumorangio-genese durch VEGF hemmen, während ein Anstieg der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität zum Beispiel bei kardiovaskulären Erkrankungen hypoxische Zustände durch Neoangiogenese verbessern könnte. Neuerdings mehren sich die Hinweise, daß eine Senkung der HIF-1 $\alpha$ -Level Entzündungen vorbeugen könnte [30]. Tatsächlich zeigten RYAN et al. 1998 erstmals am Tiermodell, daß das Fehlen von HIF-1 $\alpha$  oder HIF-1 $\beta$  zu einem verlangsamten Tumorwachstum führte [94].

Zunächst soll kurz auf genetische Möglichkeiten der Tumorthherapie eingegangen werden, die HIF-1 $\alpha$  als Ziel haben. SUN et al. konnten durch intratumoralen Gentransfer von Antisense-HIF-1 $\alpha$ -Plasmiden eine Suppression der HIF-1 $\alpha$ -Expression und nachfolgend eine Verringerung der Vaskularisierung

und des Tumorwachstums erreichen [106]. Ein anderer genetischer Ansatz ist die Verwendung von dominant-negativen HIF-1 $\alpha$ -Isoformen (dnHIF-1 $\alpha$ ). Eine Studie zeigte, daß die Tumoraggressivität durch transfizierte dominant-negative Pankreaskarzinomzellen deutlich sank. Vor allem eine Steigerung der Apoptose und der Wachstumsinhibition konnte bei dnHIF-1 $\alpha$ -Zellen beobachtet werden, die Hypoxie oder Nährstoffmangel ausgesetzt waren. Ferner wurde die GLUT1-Expression unterbrochen, somit die Glukoseaufnahme in Tumorzellen reduziert und auch das Tumorwachstum verlangsamt, was bei Mäusen in vivo nachgewiesen wurde. Die Angiogenese wurde hierbei nicht beeinträchtigt, was nahe legt, daß außer VEGF andere – auch HIF-1 $\alpha$ -unabhängige – Faktoren die Angiogenese induzieren [19]. Dieses Beispiel zeigt auch, daß ein Eingreifen in den Glukosemetabolismus von Tumorzellen Auswirkungen auf die Therapieeffizienz haben kann.

Ferner wurden kürzlich zwei cDNAs identifiziert, die therapeutisch nützlich sein könnten. Die eine Form nennt sich wegen der Induktion durch Zink HIF-1 $\alpha$ Z. Ihr Unterschied zu HIF-1 $\alpha$  ist das Fehlen des Exons Nummer 12. HIF-1 $\alpha$ Z ist nicht in der Lage bei Sauerstoffmangel eine Genexpression zu aktivieren. HIF-1 $\alpha$ Z inhibiert HIF-1 $\alpha$  wegen dessen kompetitiven Verdrängung bei der Bindung mit HIF-1 $\beta$  im Zellkern. Der anderen HIF-1 $\alpha$ -inhibierenden cDNA, HIF-1 $\alpha$ <sup>516</sup>, fehlen Exon 11 und 12. Durch die Verknüpfung von Exon 10 und 13 wird ein Stoppkodon generiert. Der Mechanismus der HIF-1 $\alpha$ -Inhibition entspricht dem von HIF-1 $\alpha$ Z [84, 130].

DACHS et al. berichteten von der Möglichkeit, bestimmte in die Zelle „eingeschleuste“ Gene unter der Kontrolle des Promotors HRE hypoxiespezifisch zu transkribieren. Die Studie beschrieb dies in vitro an transfizierten HT-1080-Zellen mit der hypoxischen Aktivierung der Cytosindeaminase, einem Enzym, das die Reaktion des wirkungslosen Prodrugs 5-Fluorcytosin zum aktiven Zytostatikum 5-Fluoruracil katalysiert, bei Säugetieren gewöhnlich aber nicht vorkommt. Die Einführung des genannten bakteriellen Enzyms in Körperzellen kann daher hypoxische Zellen für das Prodrug 5-Fluorcytosin sensibilisieren. Gleichzeitig würden nicht hypoxische Zellen bei Einsatz des Prodrugs geschont werden. Weiterhin zeigten DACHS et

al. an Maus-Xenografttumoren, daß auch in vivo eine HIF-1 $\alpha$ -regulierte HRE-abhängige hypoxische Gentranskription in gentherapeutisch modifizierten Tumorzellen möglich war [23] (vgl. auch Kapitel 4.2.3.2.).

Obwohl genannte Strategien in Zellkulturversuchen und Experimentaltumoren von einiger Relevanz sein können, muß man sagen, daß es zur Zeit nicht möglich ist, im klinischen Rahmen in vivo therapeutische Effekte zu erzielen. Zwar zeigten DACHS et al. grundsätzlich die Anwendbarkeit in vivo [23], doch wird erst die Zukunft zeigen, inwiefern, durch eine Verbesserung der Gen-Transfer-Möglichkeiten, die aufgeführten Strategien die Krebstherapie beeinflussen können [130].

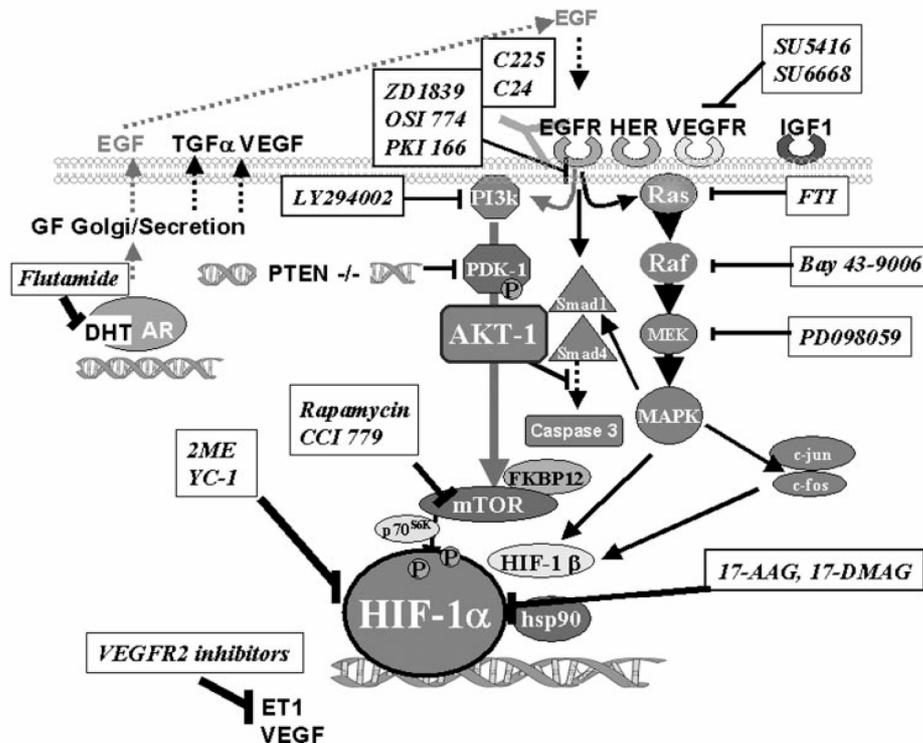
Aufgrund der komplizierten Aktivierungs- und Stabilisierungskaskaden von HIF-1 $\alpha$  ergeben sich jedoch auch viele pharmakologische Möglichkeiten am HIF-1-System anzugreifen: (vgl. *Abb. 4.3.*)

Das Chaperon Heat Shock Protein 90 (HSP90), zuständig für die korrekte Faltung von HIF-1 $\alpha$  und anderen Proteinen, kann durch Geldanamycin und Analoga (z.B. 17-Alylamino-17-demethoxygeldanamycin 17-AAG) inhibiert werden, und so HIF-1 $\alpha$  destabilisieren. Auch HIF-1 $\alpha$ -abhängige Genprodukte wie GLUT1 und VEGF wurden supprimiert. Bemerkenswert ist das gesteigerte Ansprechen von mit Geldanamycin behandelten Tumorzellen auf Bestrahlung [6, 30].

Eine andere Ebene der HIF-1 $\alpha$ -Regulation ist durch den intranukleären Redox Factor 1 (REF-1) und das zytosolische Thioredoxin gegeben [30]. Die Thioredoxinreduktase kann durch verschiedene Substanzen, wie PX-12 oder Pleurotin, blockiert werden [124].

Auch Onkogene können die Aktivität von HIF-1 $\alpha$  erhöhen. Es konnten Substanzen entwickelt werden, die die Aktivität der Onkogene reduzieren, wie beispielsweise Farnesyltransferaseinhibitoren für das RAS-Onkogen, SRC-Kinaseinhibitoren für das SRC-Onkogen oder Herceptin als Inhibitor für HER2<sup>neu</sup>. Theoretisch könnte auch eine HIF-1 $\alpha$ -Regulierung auf Ebene der Tumorsuppressorgene (z.B. p53, PTEN, vHL) erfolgen, doch erscheint dies,

unter anderem aufgrund einer erhöhten Mutagenität in hypoxischen Arealen (vgl. Kapitel 1.4.4.) wenig praktikabel [30].



*Abbildung 4.3.: Modell zur pharmakologischen Beeinflussung des HIF-1α-Mechanismus [55]*

Wie beschrieben existieren zwei Wege der nicht-hypoxischen HIF-1α-Aktivierung: der PI3K/AKT/FRAP- und der MAP-Kinase-Weg. Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren, wie etwa Trastuzumab, ZD-1839 oder Imatinib, können membranständige Rezeptoren für EGFR, VEGFR, IGF1 oder HER blockieren und erscheinen sehr aussichtsreich für den Einsatz in der Praxis [84]. Wortmannin und LY294002 sind in der Lage die PI3K zu blockieren [7, 30]. FRAP (FKBP-Rapamycin-associated-Protein) entspricht im PI3K/AKT/FRAP-Weg dem TOR (Target of Rapamycin). TOR ist eine Kinase, die als Bindeglied zwischen AKT und HIF-1α gesehen werden kann. Durch Rapamycin, einem hochspezifischen Inhibitor von TOR, oder dem Rapamycin-Analogon CCI779, kann eine verminderte HIF-1α-Stabilität erreicht werden [43].

In zweitgenanntem Weg führt eine Inhibition der MAPK ebenfalls zu einer Instabilität von HIF-1 $\alpha$  [30] (siehe auch *Abbildung 1.8.*).

Eine wieder andere Möglichkeit therapeutisch einzuwirken, besteht darin, die Transkriptionsaktivität für HIF-1-abhängige Gene am HRE (hypoxia responsive element) zu blockieren. Dafür stehen Stoffe wie Quinocarmycin oder NSC-607097 (entspricht DX-52-1) zur Verfügung. Zu einer anderen Substanzgruppe, die ebenfalls die Transkriptionsaktivierung durch HIF-1 inhibiert, gehört Topotecan (entspricht NSC-609699), ein Hemmer der Topoisomerase I [89]. Die Substanz greift am Komplex zwischen Topoisomerase I und DNA an und führt so zum Sistieren des Zellzyklus und konsekutiv zum Zelltod. Der Mechanismus der HIF-1-Inhibition ist noch ungeklärt [130].

Es wurden zwei Stoffe entdeckt, die sowohl die HIF-1 $\alpha$ -Stabilität als auch dessen Transkriptionsaktivierung reduzieren. Das oral wirksame 2-Methoxyöstradiol (2-ME2) senkt in Tumorzellen unter anderem die HIF-1 $\alpha$ -Zielgenexpression durch Mikrotubulusdepolymerisation, was die Relevanz des Zytoskeletts bei der HIF-Regulierung zeigt. Interessanterweise können gängige Zytostatika wie Taxol oder Vincristin, Substanzen die die Mikrotubulusdepolymerisation hemmen, jedoch auch HIF-1 inhibieren, was nahe legt, daß zumindest ein Teil derer Wirkung auf der – bislang unbekannten – Blockade von HIF-1 beruht [66]. Ein anderer Wirkstoff mit einzigartigem Wirkmechanismus ist YC-1. Es handelt sich um einen löslichen Stimulator der Guanylatcyclase, also des Rezeptors für NO, d.h. YC-1 katalysiert die Bildung von cGMP. Eine Suppression von HIF-1 $\alpha$  über diesen Mechanismus erscheint aber sehr unwahrscheinlich. Man muß von einem neuen, bisher unbekanntem Wirkmechanismus ausgehen. Mit YC-1 behandelte Tumoren zeigten geringere HIF-1 $\alpha$ -Spiegel, verminderte Mengen HIF-1 $\alpha$ -abhängiger Proteine wie etwa auch VEGF und somit eine schlechtere Vaskularisierung und ein verlangsamtes Tumorwachstum [84, 130].

Ein weiterer neuer Zugang zur Reduktion von HIF-1 $\alpha$  könnte eine Blockierung von Dehydroxylasen und Enzymen zur Deubiquitylierung sein [30].

Durch HIF-1 $\alpha$  als Ziel einer Therapie können relativ gezielt hypoxische Tumorzellen angegriffen werden. Allerdings führt wahrscheinlich auch ein totaler Verlust von HIF-1 $\alpha$  lediglich zu einer Inhibition des Metabolismus und des Wachstums der Zelle, nicht zu deren Tod [30].

Die Tatsache, daß nicht alle hypoxischen Zellen HIF-1 $\alpha$  exprimieren, und die, daß aufgrund der nicht-hypoxischen Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  unter Umständen auch nicht hypoxische Zellen gesteigerte HIF-1 $\alpha$ -Spiegel aufweisen, könnte ein therapeutisches Eingreifen auf Ebene von HIF-1 $\alpha$  – als vermeintlich tumorspezifische Therapieform – in Frage stellen. Doch auch der Einsatz von HIF-1 $\alpha$  als endogener Hypoxiemarker erscheint dadurch sehr fragwürdig. Die Ergebnisse zahlreicher Studien zeigen vielmehr, daß HIF-1 $\alpha$  weder hypoxiespezifisch [137] noch tumorspezifisch [99, 100] in der Zelle akkumuliert. Ferner darf man nicht vergessen, daß z.B. eine Blockade von TOR durch Rapamycin den PI3K/AKT/FRAP-Transduktionsweg nicht HIF-1 $\alpha$ -spezifisch blockiert, sondern daß dadurch auch Einfluß auf andere Gene und Proteine genommen wird. Noch kann außerdem die Toxizität möglicher Wirkstoffe nur unzureichend genau eingeschätzt werden [30]. So geht man etwa davon aus, daß YC-1, das als Mittel bei kardiovaskulären Erkrankungen und als Thrombozytenaggregationshemmer entwickelt wurde, in der chemotherapeutischen Dosis eine arterielle Hypotonie und eine hämorrhagische Diathese bewirken könnte [130]. Gegenwärtig sind aus diesen Gründen mehrere klinische Studien im Gange, die den möglichen klinischen Einsatz verschiedener Substanzen beurteilen sollen. Erst in mehreren Jahren wird sich zeigen, ob es in der Klinik eine neue Substanzklasse der „HIF-1-Inhibitoren“ geben wird.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Transduktionsfaktoruntereinheit HIF-1 $\alpha$  ist der zentrale Sauerstoffsensor für Säugerzellen aller Art. Er ist in der Lage durch Steuerung der Transkription entsprechender Gene auf die Zellproliferation, verschiedene Transportvorgänge, die Angiogenese, die Glykolyse und andere Vorgänge Einfluß zu nehmen. Zahlreiche Studien belegen den Zusammenhang zwischen HIF-1 $\alpha$ -Überexpression in soliden Tumoren und Verkürzung der Überlebens- bzw. der rezidivfreien Zeit. Schon lange ist die Assoziation von Tumorphypoxie mit der Verschlechterung der Prognose der Erkrankung bekannt. Die Trennung der hypoxischen Strahlenresistenz von der pro-proliferativen und pro-metastatischen Potenz von HIF-1 $\alpha$  als Ursache der Prognoseverschlechterung von tumorkranken Patienten ist derzeit nicht möglich.

Die vorliegende Arbeit zeigt anhand zweier etablierter humaner Tumorzelllinien, daß Faktoren des Tumormikromilieus in der Lage sein können, die HIF-1 $\alpha$ -Expression zu modulieren. Hypoxie war stets eine Grundvoraussetzung für die Messung erhöhter HIF-1 $\alpha$ -Spiegel. Jedoch waren annähernd normale Glukosespiegel des Tumormikromilieus für eine nennenswerte HIF-1 $\alpha$ -Überexpression erforderlich. Dies könnte erklären, warum immunhistochemische Schnitte von HIF-1 $\alpha$  und von exogenen Hypoxiemarkern bezüglich der angefärbten Areale differieren. Sowohl die mangelnde Spezifität der HIF-1 $\alpha$ -Expression für Hypoxie, als auch die für klinische Routinearbeiten ungünstige Kinetik des endogenen Hypoxiemarkers HIF-1 $\alpha$ , lassen an seiner praktischen Einführung in der Klinik zweifeln. Da noch kein endogener Hypoxiemarker gefunden werden konnte, der spezifisch bei Hypoxie akkumulieren würde, und darüber hinaus alle bekannten endogenen Hypoxiemarker bei Sauerstoffmangel unterschiedlich reagieren, scheint es derzeit am sinnvollsten zu sein, neben der Kombination von verschiedenen Markern außerdem andere Faktoren, wie die Vaskularisierungsdichte zu bestimmen.

Die Tatsache, daß nicht alle hypoxischen Zellen HIF-1 $\alpha$  exprimieren, und die, daß aufgrund der nicht-hypoxischen Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  unter Umständen auch nicht hypoxische Zellen gesteigerte HIF-1 $\alpha$ -Spiegel aufweisen, könnte ein therapeutisches Eingreifen auf Ebene von HIF-1 $\alpha$  – als vermeintlich tumorspezifische Therapieform – in Frage stellen. Die Ergebnisse zahlreicher Studien zeigen deutlich, daß HIF-1 $\alpha$  weder hypoxiespezifisch noch tumorspezifisch in der Zelle akkumuliert. Die Zukunft wird zeigen, ob es eine neue Substanzklasse der „HIF-1-Inhibitoren“ geben wird. Derzeit laufen mehrere klinische Studien zur Evaluierung denkbarer Substanzen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Air	Sauerstoffpartialdruck 20,9%
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH-Domäne	basic-Helix-Loop-Helix
CA	Carboanhydrase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMV	Zytomegalievirus
DFO	Deferoxamin
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DNA	desoxyribonuclein acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EPO	Erythropoetin
FACS	fluorescent activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FDG	2-Fluordesoxyglukose
FGF	fibroblast growth factor
FRAP	FKBP-Rapamycin-associated-Protein
FSC	Forward Scatter
GFP	green fluorescent protein
GLUT	Glukosetransporter
HIF	hypoxia inducible factor
HRE	hypoxia response element
HRP	horseradish peroxidase
Hypox	Sauerstoffpartialdruck 0,1%
IGF	Insulin-like growth factor
LASER	light amplification by stimulated emission of radiation
LDH	Laktatdehydrogenase
LET	linearen Energietransfer

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MMP	Matrix-Metallo-Proteasen
mRNA	messenger ribonuclein acid
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumbikarbonat
OER	oxygen enhancement ratio
PAS-Domäne	PER-ARNT-SIM-Domäne
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
pH <sub>e</sub>	extrazellulärer pH-Wert
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH-Wert
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinasen
PKB = AKT	Proteinkinase B
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck (21% O <sub>2</sub> entsprechen 150 mmHg)
pVHL	VON-HIPPEL-LINDAU-Protein
SDS-PAGE	Natriumdodekylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	standard error of the mean
SSC	Right Angle Scatter = Sideward-Scatter
TGF	transforming growth factor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Aebersold DM, Burri P, Beer KT, et al. (2001)  
Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer  
Cancer Res 61:2911-2916
- [2] Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, et al. (2003)  
GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding  
Int J Cancer 104:85-91
- [3] Atema A, Buurman KJ, Noteboom E, et al. (1993)  
Potentiation of DNA-adduct formation and cytotoxicity of platinum-containing drugs by low pH  
Int J Cancer 54:166-172
- [4] Beasley NJ, Wykoff CC, Watson PH, et al. (2001)  
Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density  
Cancer Res 61:5262-5267
- [5] Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. (2000)  
Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer  
Cancer Res 60:4693-4696
- [6] Bisht KS, Bradbury CM, Mattson D, et al. (2003)  
Geldanamycin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiate the in vitro and in vivo radiation response of cervical tumor cells via the heat shock protein 90-mediated intracellular signaling and cytotoxicity  
Cancer Res 63:8984-8995

- [7] Blancher C, Moore JW, Robertson N, et al. (2001)  
Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway  
Cancer Res 61:7349-7355
- [8] Boado RJ, Pardridge WM (2002)  
Glucose deprivation and hypoxia increase the expression of the GLUT1 glucose transporter via a specific mRNA cis-acting regulatory element  
J Neurochem 80:552-554
- [9] Bouterfa H, Darlapp AR, Klein E, et al.(1999)  
Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions  
J Neurooncol 44:23-33
- [10] Braunschweiger PG, Schiffer LM (1986)  
Effect of dexamethasone on vascular function in RIF-1 tumor  
Cancer Res 46:3299-3303
- [11] Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, et al. (1996)  
Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma  
Cancer Res 56(5):941-3
- [12] Brown JM (1979)  
Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation  
Br J Radiol 52:650-656
- [13] Burbridge MF, West DC, Atassi G, et al. (1999)  
The effect of extracellular pH on angiogenesis in vitro  
Angiogenesis 3:281-288

- [14] Bussink J, Kaanders JHAM, van der Kogel AJ (2003)  
Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers  
Radiother Oncol 67:3-15
- [15] Carmeliet P, Jain RK (2000)  
Angiogenesis in cancer and other diseases; from genes to function to therapy  
Nature 407:249-257
- [16] Carter NP, Meyer EW (1994)  
Introduction in the principles of flow cytometry  
In: Ormerod MG (1994), Flow cytometry – a practical approach, 2<sup>nd</sup> edition, Oxford university press, New York, Seite 1ff
- [17] Chapman JD, Engelhardt EL, Stobbe CC, et al. (1998)  
Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays  
Radiother Oncol 46:229-237
- [18] Chen C, Pore N, Behrooz A, et al. (2001)  
Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia  
J Biol Chem 276:9519-9525
- [19] Chen J, Zhao S, Nakada K, et al. (2003)  
Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism  
Am J Pathol 4:1283-1291
- [20] Cooper R, Sarioğlu S, Sökmen S, et al. (2003)  
Glucose transporter-1 (GLUT-1): a potential marker of prognosis in rectal carcinoma?  
Br J Cancer 89:870-876

- [21] Cottier H (1966)  
Histopathologie der Wirkung ionisierender Strahlen auf höhere Organismen  
(Tier und Mensch)  
In: Diethelm L, Olsson O, Strnad F, et al. (1966), Handbuch der medizinischen  
Radiologie – Encyclopedia of medical radiology, Springer-Verlag, Berlin-  
Heidelberg-New York, Seite 67
- [22] Curran S, Murray GI (2000)  
Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion  
and metastasis  
Eur J Cancer 36:1621-1630
- [23] Dachs GU, Patterson AV, Firth JD, et al. (1997)  
Targeting gene expression to hypoxic tumor cells  
Nat Med 3:515-520
- [24] D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. (1994)  
Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis  
Proc Natl Acad Sci USA 91:4082-4085
- [25] Denk H, Zatloukal K (2001)  
Zell- und Gewebsreaktionen  
In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (2001), Pathologie, 2. Auflage, Urban&Fischer,  
München, Jena, Seite 35ff
- [26] Durand RE, Raleigh JA (1998)  
Identification of nonproliferating but viable hypoxic cells in vivo  
Cancer Res 58:3547-50
- [27] Evans SM, Koch CJ (2003)  
Prognostic significance of tumor oxygenation in humans  
Cancer Lett 195:1-16

- [28] Fleckenstein W, Jungblut JR, Suckfüll M, et al. (1993)  
Sauerstoffdruckverteilungen in Zentrum und Peripherie maligner Kopf-Hals-Tumoren  
Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir 12:205-211
- [29] Fukumura D, Xu L, Chen Y, et al. (2001)  
Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo  
Cancer Res 61:6020-6024
- [30] Giaccia A, Siim BG, Johnson RS (2003)  
HIF-1 as a target for drug development  
Nat Rev Drug Discov 2:803-811
- [31] Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al. (1996)  
Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours  
Nature 379:88-91
- [32] Gross MW, Karbach U, Groebe K, et al. (1995)  
Calibration of Misonidazole labeling by simultaneous measurement of oxygen tension and labeling density in multicellular spheroids  
Int J Cancer 61:567-573
- [33] Haber RS, Rathan A, Weiser KR, et al. (1998)  
Glut-1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis  
Cancer 83:34-40
- [34] Hall EJ (1994)  
The oxygen effect and reoxygenation  
In: Hall EJ (1994), Radiobiology for the radiologist, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 4<sup>th</sup> edition, Seite 133ff

- [35] Hasan NM, Adams GE, Joiner MC, et al. (1998)  
Hypoxia facilitates tumour cell detachment by reducing expression of surface adhesion molecules and adhesion to extracellular matrices without loss of cell viability  
Br J Cancer 77:1799-1805
- [36] Haugland HK, Vukovic V, Pintili M, et al. (2002)  
Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in cervical carcinomas: correlation with tumor oxygenation  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 53:854-861
- [37] Heidbreder M, Fröhlich F, Jöhren O, et al. (2003)  
Hypoxia rapidly activates HIF-3α mRNA expression  
FASEB J 17:1541-43
- [38] Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, et al. (1997)  
Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation  
Nat Med 3:177-182
- [39] Höckel M, Schlenger K, Aral B, et al. (1996)  
Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix  
Cancer Res 56(19):4509-15
- [40] Höckel M, Schlenger K, Knoop C, et al. (1991)  
Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: evaluation by computerized O<sub>2</sub> tension measurements  
Cancer Res 51:6098-6102

- [41] Höckel M, Vaupel P (2000)  
The prognostic significance of hypoxia in cervical cancer: a radiobiological or tumor biological phenomenon?  
In: Molls M, Vaupel P (2000), Blood perfusion and microenvironment of human tumors – implications for clinical radiooncology, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2000, Seite 73ff
- [42] Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, et al. (2003)  
Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in hypoxic gene regulation  
Mol Cell Biol 23(24):9361-9374
- [43] Hudson CC, Liu M, Chiang GG, et al. (2002)  
Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression and function by the mammalian target of rapamycin  
Mol Cell Biol 22:7004-7014
- [44] Hyun JY, Chun YS, Kim TY, et al. (2004)  
Hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated resistance to phenolic anticancer  
Chemotherapy 50:119-126
- [45] Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, et al. (2001)  
Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer  
Am J Pathol 158:905-919
- [46] Iyer NV, Leung SW, Semenza GL (1998)  
The human hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene: HIF1A structure and evolutionary conservation  
Genomics 52:159-165

- [47] Jain RK (2004)  
Molecular pathophysiology of tumors  
In: Perez CA, Brady LW, Halperin EC, et al. (2004), Principles and practice of radiation oncology, 4<sup>th</sup> edition, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, Seite 162ff
- [48] Janssen HLK, Haustermans KMG, Sprong D, et al. (2002)  
HIF-1A, pimonidazole, and iododeoxyuridine to estimate hypoxia and perfusion in human head-and-neck tumors  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 54:1537-1549
- [49] Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, et al. (2001)  
Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous  
FASEB J 15:1312-1314
- [50] Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, et al. (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
- [51] Jungermann K, Kietzmann T (2000)  
Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver  
Hepatology 31:255-60
- [52] Kaanders JHAM, Pop LAM, Marres HAM, et al. (2002)  
ARCON: experience in 215 patients with advanced head-and-neck cancer  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 52:769-778
- [53] Kallinowski F, Vaupel P, Runkel S, et al. (1988)  
Glucose uptake, lactate release, ketone body turnover, metabolic micromilieu, and pH distributions in human breast cancer xenografts in nude rats  
Cancer Res 48:7264-7272

- [54] Kaluz S, Kaluzova M, Chrastina A, et al. (2002)  
Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  stabilization: A role for phosphatidylinositol 3'-Kinase  
Cancer Res 62:4469-4477
- [55] Kaufman B, Scharf O, Arbeit J, et al. (2004)  
Proceedings of the oxygen homeostasis/hypoxia meeting  
Cancer Res 64:3350-3356
- [56] Kietzmann T, Krones-Herzig A, Jungermann K (2002)  
Signaling cross-talk between hypoxia and glucose via hypoxia-inducible factor 1 and glucose response elements  
Biochem Pharmacol 64:903-911
- [57] Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, et al. (2000)  
Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide  
Blood 95:189-197
- [58] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. (2001)  
Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy  
Clin Cancer Res 7:3399-3403
- [59] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. (2003)  
Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis  
Br J Cancer 89:877-885

- [60] Koutcher JA, Ballon D, Graham M, et al. (1990)  
<sup>31</sup>P NMR spectra of extremity sarcomas: diversity of metabolic profiles and changes in response to chemotherapy  
Magn Reson Med 19:19-34
- [61] Krüger W, Mayer W-K, Schaefer C, et al. (1991)  
Acute changes of systemic parameters in tumour-bearing rats, and of tumour glucose, lactate and ATP levels upon local hyperthermia and/or hyperglycaemia  
J Cancer Res Clin Oncol 117:409-415
- [62] Laderoute KR, Calaoagan JM, Knapp M, et al. (2004)  
Glucose utilization is essential for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -dependent phosphorylation of c-jun  
Mol Cell Biol 24:4128-4137
- [63] Liu S-C, Minton NP, Giaccia AJ, et al. (2001)  
Anticancer efficiency of systematically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis  
Gene Ther 9:291-296
- [64] Lu H, Forbes RA, Verma A (2002)  
Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis  
J Biol Chem 26:23111-23115
- [65] Luca M, Huang S, Gershenwald JE (1997)  
Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis  
Am J Pathol 151:1105-1113
- [66] Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee, et al. (2003)  
2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF  
Cancer Cell 3:363-375

- [67] Malhotra R, Tyson DGW, Sone H, et al. (2002)  
Glucose uptake and adenoviral mediated GLUT1 infection decrease hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  levels in cardiac myocytes  
J Mol Cell Cardiol 34:1063-1073
- [68] Marfella R, D'Amico M, Di Filippo C, et al. (2002)  
Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycaemia on infarction size and early expression of hypoxia-inducible factor 1  
Diabetologia 45:1172-1181
- [69] Maynard MA, Ohh M (2004)  
Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer  
Am J Nephrol 24:1-13
- [70] McBride WH, Withers HR (2004)  
Biologic basis of radiation therapy  
In: Perez CA, Brady LW, Halperin EC, et al. (2004), Principles and practice of radiation oncology, 4<sup>th</sup> edition, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, Seite 96ff
- [71] Minton NP, Mauchline ML, Lemmon MJ, et al. (1995)  
Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores  
FEMS Microbiol Rev 17:357-364
- [72] Möller BJ, Cao Y, Li CY, et al. (2004)  
Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors : role of reoxygenation, free radicals, and stress granules  
Cancer cell 5 :429-441
- [73] Müller-Klieser W, Kroeger M, Walenta S, et al. (1991)  
Comparative imaging of structure and metabolites in tumors (invited review)  
Int J Radiat Biol 60:147-159

- [74] Müller-Klieser W, Vaupel P, Streffer C (2000)  
Energy status of malignant tumors in patients and experimental animals  
In: Molls M, Vaupel P (2000), Blood perfusion and microenvironment of human tumors – implications for clinical radiooncology, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2000, Seite 121ff
- [75] Müller-Klieser W, Walenta S, Paschen W, et al. (1988)  
Metabolic imaging in microregions of tumors and normal tissues with bioluminescence and photon counting  
J Natl Cancer Inst 80:842-848
- [76] Murphy BJ (2004)  
Regulation of malignant progression by the hypoxia-sensitive transcription factors HIF-1 $\alpha$  and MTF-1  
Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 139:495-507
- [77] Ng TC, Majors AW, Vijayakumar S, et al. (1989)  
Human neoplasm pH and response to radiation therapy: P-31 MR spectroscopy studies in situ  
Radiology 170:875-8
- [78] Nordmark M, Hoyer M, Keller J, et al. (1996)  
The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 35:701-708
- [79] Nordmark M, Loncaster J, Aquino-Parsons C, et al. (2003)  
Measurements of hypoxia using pimonidazole and polarographic oxygen-sensitive electrodes in human cervix carcinomas  
Radiother Oncol 67:35-44

- [80] Nordmark M, Overgaard J (2000)  
A confirmatory prognostic study on oxygenation status and loco-regional control in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiation therapy  
Radiother Oncol 57:39-43
- [81] Olive PL, Aquino-Parsons C, MacPhail SH, et al. (2001)  
Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer  
Cancer Res 61:8924-8929
- [82] Ormerod MG (1994)  
Flow cytometry – a practical approach  
2<sup>nd</sup> edition  
Oxford university press, New York
- [83] Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, et al. (1998)  
A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish head and neck cancer study (DAHANCA) protocol 5-85  
Radiother Oncol 46:135-146
- [84] Park JW, Chun YS, Kim MS (2004)  
Hypoxia-inducible factor 1-related diseases and prospective therapeutic tools  
J Pharmacol Sci 94:221-232
- [85] Pschyrembel (1994)  
Klinisches Wörterbuch  
257. Auflage  
Walter de Gruyter, Berlin, New York

- [86] Rafajová M, Zatovicová M, Kettmann R, et al. (2004)  
Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells  
Int J Oncol 24:995-1004
- [87] Rampling R, Cruickshank G, Lewis AD, et al. (1994)  
Direct measurement of pO<sub>2</sub> distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumours  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 29:427-432
- [88] Rangan SR (1972)  
A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma  
Cancer 29:117-121
- [89] Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, et al. (2002)  
Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway  
Cancer Res 62:4316-4324
- [90] Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, et al. (1974)  
Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)  
Cancer 33:1027-1033
- [91] Reichert M, Steinbach JP, Supra P, et al. (2002)  
Modulation of growth and radiochemosensitivity of human malignant glioma cells by acidosis  
Cancer 95:1113-1119
- [92] Richard DE, Berra E, Pouyssegur J (2000)  
Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in vascular smooth muscle cells  
J Biol Chem 275:26765-26771

- [93] Runkel S, Wischnik A, Teubner J, et al. (1994)  
Oxygenation of mammary tumors as evaluated by ultrasound-guided  
computerized-pO<sub>2</sub>-histography  
Adv Exp Med Biol 345:451-458
- [94] Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998)  
HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization  
EMBO J 17:3005-3015
- [95] Schmid T, Zhou J, Brüne B (2004)  
HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia  
J Cell Mol Med 8:423-431
- [96] Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, et al. (1991)  
Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the  
human erythropoietin gene  
Proc Natl Acad Sci 88:5680-5684
- [97] Semenza GL (2000)  
Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences  
Biochem Pharmacol 59:47-53
- [98] Semenza GL (2000)  
HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia  
J Appl Physiol 88:1474-1480
- [99] Semenza GL (2001)  
Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease  
Pediatr Res 49:614-617
- [100] Semenza GL (2001)  
Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology  
Trends Mol Med 7:345-350

- [101] Semenza GL (2002)  
HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics  
Trends Mol Med 8:62-67
- [102] Semenza GL (2002)  
Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1  
Biochem Pharmacol 64:993-998
- [103] Shi Q, Le X, Wang B, et al. (2001)  
Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells  
Oncogene 20:3751-3756
- [104] Stubbs M (2000)  
Tumour pH  
In: Molls M, Vaupel P (2000), Blood perfusion and microenvironment of human tumors – implications for clinical radiooncology, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2000, Seite 113-120
- [105] Stubbs M, Bhujwala ZM, Tozer GM, et al. (1992)  
An assessment of <sup>31</sup>P MRS as a method of measuring pH in rat tumors  
NMR Biomed 5:351-359
- [106] Sun X, Kanwar JR, Leung E, et al. (2001)  
Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy  
Gene Ther 8:638-645
- [107] Suzuki K, Kizaki T, Hitomi Y, et al. (2003)  
Genetic variation in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and its possible association with high altitude adaptation in Sherpas  
Med Hypotheses 61:385-389

- [108] Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, et al. (2002)  
Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway  
J Biol Chem 31:27975-27981
- [109] Turner KJ, Crew JP, Wykoff CC, et al. (2002)  
The hypoxia-inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer  
Br J Cancer 86:1276-1282
- [110] van den Berg AP, Wike Hooley JL, Broekmeyer-Reurink MP, et al. (1989)  
The relationship between the unmodified initial tissue pH of human tumours and the response to combined radiotherapy and local hyperthermia treatment  
Eur J Cancer Clin Oncol 25:73-8
- [111] van Putten LM, Kallman RF (1968)  
Oxygenation status of a transplantable tumor during fractionated radiotherapy  
J Natl Cancer Inst 40:441-451
- [112] Von Pawel J, von Roemeling R, Gatzemeier U, et al. (2000)  
Tirapazamine plus cisplatin versus cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a report of the international CATAPULT1 study group  
J Clin Oncol 18:1351-1359
- [113] Vaupel P, Höckel M (2000)  
Oxygenation of human tumors  
In: Molls M, Vaupel P (2000), Blood perfusion and microenvironment of human tumors – implications for clinical radiooncology, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2000, Seite 63ff
- [114] Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, et al. (1991)  
Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized pO<sub>2</sub> tension measurements  
Cancer Res 51:3316-3322

- [115] Vaupel P, Thews O, Höckel M (2001)  
Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia  
Med Oncol 18:243-59
- [116] Volk T, Jahde E, Fortmeyer HP, et al. (1993)  
pH in human tumour xenografts: effect of intravenous administration of glucose  
Br J Cancer 68:492-500
- [117] Vordermark D, Brown JM (2003)  
Endogenous markers of tumor hypoxia: predictors of clinical radiation resistance?  
Strahlenther Onkol 179(12):801-11
- [118] Vordermark D, Kaffer A, Riedl S, et al. (2005)  
Characterization of carbonic anhydrase IX (CA IX) as an endogenous marker of chronic hypoxia in live human tumor cells  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 61:1197-1207
- [119] Vordermark D, Katzer A, Baier K, et al. (2004)  
Cell type-specific association of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein accumulation and radiobiologic tumor hypoxia  
Int J Radiation Oncology Biol Phys 58:1242-1250
- [120] Vordermark D, Shibata T, Brown M (2001)  
Green fluorescent protein is a suitable reporter of tumor hypoxia despite an oxygen requirement for chromophore formation  
Neoplasia 3:527-534
- [121] Vukovic V, Haugland HK, Nicklee T, et al. (2001)  
Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is an intrinsic marker for hypoxia in cervical cancer xenografts  
Cancer Res 61:7394-7398

- [122] Walenta S, Snyder S, Haroon ZA, et al. (2001)  
Tissue gradients of energy metabolites mirror oxygen tension gradients in a rat mammary carcinoma model  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 51:840-848
- [123] Walenta S, Salameh A, Lyng H, et al. (1997)  
Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis  
Am J Pathol 150:409-415, 1997
- [124] Welsh SJ, Williams RR, Birmingham A, et al. (2003)  
The thioredoxin redox inhibitors 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide and pleurotin inhibit hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor formation  
Mol Cancer Ther 2:235-243
- [125] Wen B, Burgman P, Zanzonico P, et al. (2004)  
A preclinical model for noninvasive imaging of hypoxia-induced gene expression; comparison with an exogenous marker of tumor hypoxia  
Eur J Nucl Med Mol Imaging 31:1530-1538
- [126] Williamson JR, Chang K, Frangos M et al. (1993)  
Hyperglycaemic pseudohypoxia and diabetic complications  
Diabetes 42 :801-813
- [127] Wouters BG, Wepler SA, Koritzinsky M, et al. (2002)  
Hypoxia as a target for combined modality treatment  
Eur J Cancer 38:240-257
- [128] Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH, et al. (2000)  
Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases  
Cancer Res 60:7075-7083

- [129] Xu L, Fidler IJ (2000)  
Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells  
Cancer Res 60:4610-4616
- [130] Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, et al. (2003)  
YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1  
J Natl Cancer Inst 95:516-525
- [131] Yokohama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, et al. (2000)  
Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth  
Cancer Res 60:2190-2196
- [132] Young SD, Marshall RS, Hill RP (1988)  
Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells  
Proc Natl Acad Sci USA 85:9533-9537
- [133] Zagórska A, Dulak J (2004)  
HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing  
Acta Biochim Pol 51:563-585
- [134] Zhang G, Gurtu V, Kain SR (1996)  
An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells  
Biochem Biophys Res Commun 227:707-711
- [135] Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. (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 60:1541-1545

- [136] Zhong H, Mabjeesh N, Willard M, et al. (2002)  
Nuclear expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha protein is heterogeneous  
in human malignant cells under normoxic conditions  
Cancer Lett 181:233-238
- [137] Zhong H, de Marzo A, Laughner E, et al. (1999)  
Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and  
their metastases  
Cancer Res 59:5830-5835
- [138] Zölzer F, Streffer C (1999)  
Radiation and/or hyperthermia sensitivity of human melanoma cells grown for  
several days in media with reduced pH  
Strahlenther Onkol 175:325-32



## Danksagungen

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Flentje für die Überlassung des Themas, die Durchsicht der Arbeit und konstruktive Kritik bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem Betreuer der Arbeit Herrn Priv.-Doz. Dr. Dirk Vordermark. Er war nicht nur immer erreichbar, er half auch stets bei allen fachspezifischen oder methodischen Problemen weiter. Durch seine konstruktive und kritische Anleitung konnte ich vieles hinzulernen. Dank ihm hatte ich auch die Möglichkeit, die Arbeit national und international vorzustellen.

Ein ganz großes Dankeschön auch an alle Mitarbeiter des Labors, allen voran Frau Astrid Katzer, die mich mit viel Geduld in die Laborarbeit einlernte und auch später im Verlauf der Versuche immer ihre Hilfe anbot und stets einen Tipp parat hatte.

Wie bei den meisten Doktorarbeiten gibt es auch bei meiner viele Helfer im Hintergrund. Diesen allen möchte ich danken. Insbesondere meinem Bruder, Thomas Kraft, meinem Vater, Walter Kraft, und meinen Freunden Jochen Bayer, Önder Cora und Wolfgang C. Klein, die mich an Wochenenden bei Versuchen unterstützten.

Danke auch an alle bisher nicht genannten Freunde. Sie begleiteten mich durch Dick und Dünn. Zusammen erlebten wir viele unvergeßliche Momente.

Den größten Dank möchte ich aber meiner Familie aussprechen, die mir das Studium ermöglichte und ohne deren Unterstützung vieles unmöglich gewesen wäre. Sie war immer für mich da und ist es bis zum heutigen Tage.



# Curriculum Vitae

Peter Kraft

Glauberstraße 29  
97753 Karlstadt

Tel.: 09353/1529  
Handy: 017624275833  
Mail: pkraft@web.de

## Persönliche Daten

---

Geburtstag: 31. Dezember 1975  
Geburtsort: Karlstadt  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Werdegang

---

09/1986 – 06/1995 Johann-Schöner-Gymnasium Karlstadt

09/1995 – 09/1996 Zivildienst auf chirurgischer Station des Kreiskrankenhauses Marktheidenfeld

10/1996 – 10/1999 Krankenpflegeausbildung an der Krankenpflegeschule Marktheidenfeld

10/1999 – 11/2005 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

- Ärztliche Vorprüfung 09/2001
- 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 09/2002
- 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 09/2004
- 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 11/2005

## Dissertation

---

Experimentelle Arbeit an der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. M. Flentje) mit den Methoden der Durchflußzytometrie und des Immunoblots über ein Thema der Tumorbilogie und Strahlentherapie:

„Einfluß des Tumormikromilieus auf die Akkumulation des Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in humanen Tumorzellen“

## Veröffentlichungen

---

Vordermark D, Katzer A, Baier K, Kraft P, Flentje M  
Cell type-specific association of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1 alpha) protein accumulation and radiobiologic tumor hypoxia  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004 Mar 15;58(4):1242-50

Vordermark D, Kraft P, Katzer A, Bölling T, Willner J, Flentje M  
Glucose requirement for hypoxic accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )  
Cancer lett. 2005 Dec 8; 230(1): 122-33

Poster beim 9. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) vom 28. Juni bis 01. Juli 2003 in Essen

## Klinische Erfahrungen

---

03/2002	Famulatur in der Neurologie am Bezirkskrankenhaus Lohr am Main (Direktor: Dr. med. M. Schlenker)
04/2002	Famulatur in der Anästhesiologie am Kreiskrankenhaus Karlstadt (Direktor: Dr. med. P. Lübke)
08/2003	Famulatur in der Inneren Medizin (Schwerpunkt Kardiologie) am Juliusspital Würzburg (Direktor: PD Dr. med. M. Meesmann)
03/2004	Famulatur in der Radiologie am Policlinico San Matteo der Università degli studi di Pavia, Italien (Direktor: Prof. Dr. med. Calliada)
10/2004 – 02/2005	PJ-Tertial in der Neurologie an der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. K.V. Toyka)
02/2005 – 04/2005	PJ-Aufenthalt in der Inneren Medizin am Strong Memorial Hospital der University of Rochester, New York, USA (Direktor: Bradford C. Berk, M.D., Ph.D.)
04/2005 – 05/2004	PJ-Aufenthalt in der Inneren Medizin (Schwerpunkt Hämatonkologie) an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. H. Einsele)
06/2005 – 09/2005	PJ-Tertial in der Chirurgie am Spital Uster (Lehrkrankenhaus der Universität Zürich), Schweiz (Direktor: Prof. Dr. med. G. Melcher)
Seit 01/2006	Assistenzarzt an der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg

Würzburg, Februar 2006