

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
**Lehrstuhl für Humanbiologie**

# Hypoxie und Epithel-Mesenchym- Transition bei der malignen Tumorprogression

Susanne Pielhofer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum  
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann
2. apl. Prof. Dr. K.-F. Becker

Die Dissertation wurde am 07. 07. 2008 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum  
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14. 10. 2008  
angenommen.

# Danksagung

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Karl-Friedrich Becker, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die Unterstützung während der experimentellen und während der Schreibphase.

Auch Prof. Dr. Michael Schemann möchte ich herzlich für die Übernahme meiner Doktorarbeit als mein Doktorvater danken.

Dem Leiter des Instituts Herrn Prof. Dr. Heinz Höfler danke ich, daß ich die Doktorarbeit an seinem Institut durchführen durfte.

Danke auch an die Kooperationspartner, die an diesem Projekt beteiligt waren: vom Institut für Nuklearmedizin der TU München: Dr. Janette Carlsen, Dr. Roswitha Beck, Dr. Roshni Molls; vom Institut für experimentelle Kinderkardiologie des deutschen Herzzentrums: Dr. Agnes Görlach, Kerstin und alle Doktoranden; vom Ion Channels and Cell Signalling Centre der St. George's University of London, UK: Dr. Holger Laux.

Vielen Dank für die Unterstützung, die Tipps und die Hilfe im Labor an Christa, Michi, Frauke, Christine, Catarina, Kareen, Susanne, Birgit G., Andrea B. und natürlich an alle anderen Labormitstreiter.

Ein besonderer Dank geht auch an alle, die mir das Leben in der Pathologie angenehm gemacht haben: Joelle, Anja, Catarina, Kathrin, Kareen, Volker, Sebastian, Michi, Christine, Rita, Susanne, Felix, Anne, Jenny. Danke für die Pausen und die Aufmunterungen und für Partys und für neu gewonnene Freundschaften!

Vielen Dank für die Unterstützung und das Rücken-stärken an Birgit L., Gisela, Ina und Klara.

Einen herzlichen Dank möchte ich Juli, Kareen und Anna aussprechen, die sich stundenlang mit dem Lesen von Dingen beschäftigen mußten von denen sie teilweise nicht mal was verstanden haben... Kareen: Danke für die fachliche Expertenmeinung! Die Korrekturen haben mir sehr geholfen.

Danke an alle meine Freunde, die immer für mich da waren und für Ablenkung aller Art gesorgt haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich ganz herzlich für die finanzielle, seelische und moralische Unterstützung danken, ohne die ich sicher irgendwann das Handtuch geworfen hätte. DANKE!!!

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
2.1	HYPOXIE .....	7
2.1.1	<i>Die Rolle von Hif-1 .....</i>	<i>7</i>
2.1.2	<i>Tumorhypoxie .....</i>	<i>9</i>
2.2	EPITHEL-MESENCHYM-TRANSITION .....	10
2.3	E-CADHERIN .....	13
2.4	DIE SNAIL-FAMILIE DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN .....	15
2.5	NIERENZELLKARZINOM .....	19
2.6	ZIEL DER ARBEIT .....	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
3.1	PUFFER UND LÖSUNGEN .....	23
3.2	ZELLKULTUR .....	27
3.2.1	<i>Zellkulturbedingungen .....</i>	<i>27</i>
3.2.2	<i>Zelllinien und Medien .....</i>	<i>27</i>
3.2.3	<i>Passagieren der Zellen .....</i>	<i>27</i>
3.2.4	<i>Herstellen von gefrorenen Stocklösungen .....</i>	<i>28</i>
3.2.5	<i>In-Kulturnahme von gefrorenen Stocklösungen .....</i>	<i>28</i>
3.3	HYPOXIE-EXPERIMENTE .....	28
3.3.1	<i>CoCl<sub>2</sub>-Behandlung .....</i>	<i>28</i>
3.3.2	<i>Inkubation in einer Hypoxiekammer .....</i>	<i>29</i>
3.4	TRANSFEKTION VON HUMANEN ZELLEN MIT EINEM HIF-1A-PLASMID .....	29
3.4.1	<i>Präparation der Plasmide für die Transfektion .....</i>	<i>29</i>
3.4.2	<i>Transiente und stabile Transfektion .....</i>	<i>30</i>
3.5	WESTERN BLOT .....	31
3.5.1	<i>Proteinextraktion aus Zellen mit T-PER<sup>®</sup>Tissue Protein Extraction Reagent .....</i>	<i>31</i>
3.5.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode .....</i>	<i>31</i>
3.5.3	<i>SDS Gelelektrophorese .....</i>	<i>32</i>
3.5.4	<i>Protein-Transfer von SDS-Gelen auf Nitrozellulose-membranen (Western Blotting) .....</i>	<i>32</i>
3.5.5	<i>Immunologische Detektion der immobilisierten Proteine .....</i>	<i>32</i>
3.5.6	<i>Wiederverwenden der Western-Blot Membran .....</i>	<i>34</i>
3.6	EXPRESSIONSANALYSE DURCH REAL-TIME RT-PCR .....	34
3.6.1	<i>RNA-Extraktion aus Zelllinien .....</i>	<i>34</i>
3.6.2	<i>RNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe .....</i>	<i>34</i>
3.6.3	<i>Reverse Transkription .....</i>	<i>36</i>

3.6.4	<i>Quantitative real-time RT-PCR</i> .....	36
3.6.5	<i>Relative Quantifizierung der Expression</i> .....	37
3.7	EXPRESSIONSANALYSE ÜBER MICROARRAYS.....	38
3.8	GEWEBE.....	39
3.8.1	<i>Induktion der Tumorbildung in Nacktmäusen</i> .....	39
3.8.2	<i>Klarzelliges Nierenzellkarzinom</i> .....	39
3.8.3	<i>Anfertigung von Paraffinschnitten</i> .....	40
3.9	IMMUNOHISTOCHEMIE .....	40
3.9.1	<i>Immunhistochemische Analysen</i> .....	40
3.9.2	<i>Auswertung der Immunhistochemie</i> .....	42
3.10	PROTEIN AUS FORMALIN-FIXIERTEM, PARAFFIN-EINGEBETTETEM GEWEBE ..	42
3.10.1	<i>Proteinextraktion</i> .....	42
3.10.2	<i>Reverse Phase Protein Microarray</i> .....	43
3.10.3	<i>Quantifizierung von Protein Microarrays und Western Blots</i> .....	44
3.11	STATISTISCHE AUSWERTUNGEN .....	45
3.12	HERSTELLERLISTE.....	45
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>47</b>
4.1	EINFLUSS VON HYPOXIE AUF DIE EXPRESSION VON E-CADHERIN, SNAIL UND SLUG IN ZELLINIEN.....	47
4.1.1	<i>Endometrium-Adenokarzinom Zelllinie Ishikawa</i> .....	48
4.1.2	<i>Magenkarzinom Zelllinie GC 2957</i> .....	57
4.1.3	<i>Mammakarzinom-Zelllinie MCF7</i> .....	63
4.2	TRANSFEKTION .....	68
4.2.1	<i>Stabile Transfektion</i> .....	69
4.2.2	<i>Transiente Transfektion</i> .....	70
4.3	MAUSMODELL .....	74
4.3.1	<i>Untersuchung der Proteinexpression von E-cadherin, Snail und Vimentin anhand von Immunhistochemie</i> .....	75
4.3.2	<i>Untersuchung der Proteinexpression anhand von Reverse Phase Protein Microarrays</i> .....	77
4.3.3	<i>RNA-Expression von E-cadherin, Snail und Slug</i> .....	78
4.3.4	<i>Vergleich von RNA und Protein</i> .....	79
4.4	NIERENZELLKARZINOM.....	81
4.4.1	<i>RNA-Expression von E-cadherin, Snail, Slug und Gapdh</i> .....	81
4.4.2	<i>Protein</i> .....	83
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>85</b>
5.1	HYPOXIE UND EMT IN ZELLINIEN.....	86
5.1.1	<i>Auswirkungen von Hypoxie auf die Endometriumkarzinom-Zelllinie Ishikawa</i> .....	86
5.1.2	<i>Auswirkungen von Hypoxie auf die Magenkarzinom-Zelllinie GC 2957</i> .....	92

5.1.3	<i>Auswirkungen von Hypoxie auf die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7</i> .....	95
5.2	HYPOXIE UND EMT IM MAUSMODELL .....	97
5.3	HYPOXIE UND EMT IN NIERENZELLKARZINOMEN.....	100
<b>6</b>	<b>REFERENZEN.....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>116</b>

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Es ist heute unbestritten, dass Hypoxie unmittelbaren Einfluss auf Invasion und Metastasierung von Tumoren hat. Die molekularen Mechanismen, wie ein Sauerstoffmangel im Tumorgewebe zu einem erhöhten Invasionspotential und damit einhergehender Epithel-Mesenchym-Transition (EMT) führt, sind jedoch nur in Ansätzen bekannt. Das Ziel dieser Studie war, Hypoxie-induzierbare EMT-Regulatoren zu identifizieren und *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren.

Ich habe durch Zeitreihenversuche mit mehreren Zelllinien nachweisen können, dass die E-cadherin-Repressoren Slug und Snail durch  $\text{CoCl}_2$  (Stabilisierung von Hif-1 $\alpha$ ) oder Hypoxie (1 % Sauerstoff) vermehrt exprimiert werden. Im Slug-Promoter habe ich eine mögliche Hif-1 $\alpha$ -Bindungsstelle identifiziert, was einen direkten Effekt nahe legt. Transiente und stabile Transfektion einer Hif-1 $\alpha$  cDNA führte ebenfalls zu einer erhöhten mRNA Expression dieser Transkriptionsfaktoren. In 1 % Sauerstoff kam es zudem zu einer Verminderung der E-cadherin Protein-Expression. Genauere Untersuchungen einer Tumorzelllinie mittels RNA-Microarray zeigten Einflüsse von Hypoxie auf vielfältige Signalwege, die die Tumorprogression fördern und eine Rolle bei der Hypoxie-induzierten EMT spielen könnten. Im Nacktmausmodell konnte ich zeigen, dass Slug mRNA in 6 (60%) und Snail mRNA in 8 (80%) von 10 Pimonidazol-positiven Tumorarealen vermehrt exprimiert wurde, im Vergleich zu Pimonidazol-negativen Bereichen der gleichen Tumoren. Die E-cadherin Immunreaktivität war in 5 (83%) von 6 Pimonidazol-positiven Tumoren reduziert. Die Untersuchung menschlicher Nierenzellkarzinome ergab eine erhöhte mRNA-Expression der E-cadherin-Repressoren Snail und Slug in „hypoxischen“ Gewebearealen.

Unsere Daten lassen auf einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Hypoxie und Hif-1 $\alpha$  vermittelter Überexpression von E-cadherin hemmenden Transkriptionsfaktoren schließen. Zudem scheint die Überexpression von Hif-1 $\alpha$  zu einer Destabilisierung von E-cadherin-Protein zu führen.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 HYPOXIE

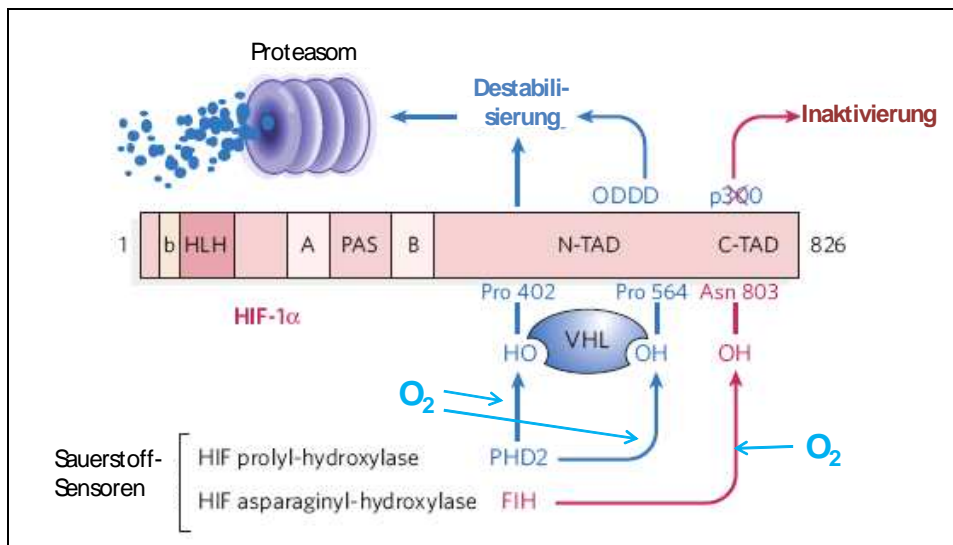
Sauerstoff wird von den Zellen vieler Organismen für die Bereitstellung von Energie in Form von ATP benötigt. Hypoxie ist eine Reduktion des Normalgehalts an Sauerstoff im Gewebe ( $pO_2 \leq 2,5$  mmHg, [1]) und kommt vor allem bei Gefäßerkrankungen, Lungenerkrankungen und Tumorerkrankungen vor [2, 3]. Hypoxische Bereiche im Gewebe entstehen durch ein Ungleichgewicht von Versorgung mit und Verbrauch von Sauerstoff. Abhängig von Schwere und Dauer der Hypoxie kann sie zu einer dauerhaften Schädigung von Zellen führen [1]. Interessanterweise spielt Hypoxie aber auch eine wichtige Rolle in der menschlichen Embryonalentwicklung. Hypoxie nimmt Einfluß auf den Schluß des Neuralrohrs und auf weitere morphologische Entwicklungsschritte, und vermittelt Apoptose während der Entwicklung [4]. Viele Organismen haben Mechanismen entwickelt, um sich an Hypoxie anzupassen. Diese Anpassung greift unter anderem in die Vaskularisierung und in das Zellwachstum ein und wird über regulatorische Gene gesteuert. Zu diesen zählen die *Hypoxia Inducible Factors* (Hifs), die eine zentrale Rolle in der Zellantwort auf Hypoxie spielen.

#### 2.1.1 Die Rolle von Hif-1

Es gibt drei Vertreter der Hif-Familie: Hif-1, Hif-2 und Hif-3. Da Hif-1 die größte Rolle in der Zellantwort auf Hypoxie zu spielen scheint [5], wird in dieser Arbeit ausschließlich auf dieses Molekül eingegangen. Hif-1 besteht aus einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit und einer Sauerstoff-abhängig regulierten  $\alpha$ -Untereinheit (siehe **Abb. 2.1**). Hif-1 $\alpha$  (HIF1A, Acc. Nr. NC\_000014) ist auf dem humanen Chromosom 14q21-q24 lokalisiert, Hif-1 $\beta$  (ARNT, Acc. Nr. NC\_000001) auf Chromosom 1q21. Herrschen normale Sauerstoffbedingungen (Normoxie) wird Hif-1 $\alpha$  durch die Hydroxylasen FIH (*factor inhibiting Hif*) und PDH2 (*prolyl hydroxylase domain protein*) an einem Asparagin- und zwei Prolin-Resten hydroxyliert. Durch Hydroxylierung des

Asparagin-Restes wird Hif-1 $\alpha$  inaktiviert, durch Hydroxylierung der Prolin-Reste kann der von-Hippel-Lindau Faktor (VHL) an die  $\alpha$ -Untereinheit binden, was zur Ubiquitinylierung und zum Abbau von Hif-1 $\alpha$  im Proteasom führt. Bei geringen Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) wird Hif-1 $\alpha$  nicht hydroxyliert, kann mit Hif-1 $\beta$  dimerisieren, in den Nukleus translozieren und dort mit den Cofaktoren p300/CBP die Transkription von Hif-1 Zielgenen aktivieren [6, 7]. Durch diesen Mechanismus kann Hif-1 im Zusammenspiel mit den Hydroxylasen als molekularer Sauerstoffsensor fungieren und die Antwort auf Sauerstoffmangel über seine Zielgene steuern. Ein Mittel Hypoxie *in vitro* zu simulieren ist die Behandlung von Zellen mit CoCl<sub>2</sub>. Diese Substanz führt zur Stabilisierung von Hif-1 $\alpha$  und zu einer Hypoxieantwort unter normoxischen Bedingungen.

Die Zielgene von Hif-1 enthalten in ihrem Promotor sogenannte HREs (*hypoxia responsive elements*). Ein HRE besteht aus einer Hif-1 Bindungskonsensussequenz (HBS): BACGTSSK (B=G/C/T, S=G/C, K=G/T) [8, 9] und einer Hilfssequenz, die als „Hif-1 ancillary sequence“ bezeichnet wird: CAC(A/G)K und die möglicherweise eine Hif-1 $\beta$  Bindesequenz darstellt [10].



**Abb. 2.1:** Regulation der HIF Stabilität und Aktivität durch Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung. Schematische Darstellung der Proteindomänen von Hif-1 $\alpha$ : bHLH (*basic helix-loop-helix*), PAS (*Per/Arnt/Sim*), NTAD (*N-terminal transactivation domain*), CTAD (*C-terminal transactivation domain*) und ODDO (*O<sub>2</sub>-dependent degradation domain*). Bei niedriger Sauerstoffkonzentration kann Hif-1 $\alpha$  mit Hif-1 $\beta$  dimerisieren und aktiviert mit seinen Coaktivatoren p300 und CBP (*CREB binding protein*) die Transkription seiner Zielgene. Ist Sauerstoff vorhanden, wird Hif von FIH (*factor-inhibiting Hif*) an einem Asparagin-Rest hydroxyliert, was zur Inaktivierung von Hif führt. Bei hohen Sauerstoffkonzentrationen wird Hif zusätzlich von PHD2 (*prolyl hydroxylase domain protein = EGLN1*) an zwei Prolin-Resten hydroxyliert. Dadurch kann VHL an Hif binden, Hif kann ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut werden. Modifiziert aus Pouyssegur *et al.* [6]



Zellen reagieren auf vielfältige Weise auf eine hypoxische Umgebung. Eine der bestuntersuchten zellbiologischen Antworten auf Hypoxie ist die Produktion von Wachstumsfaktoren, die eine vermehrte Blutgefäßbildung induzieren [2]. Doch hat Hif-1 weit vielfältigere Zielgene; schon im Jahre 2003 waren über 60 mutmaßliche Hif-1 Zielgene bekannt. Dazu gehört der Angiogenese-Faktor Vegf (*vascular endothelial growth factor*) und der Glucose Transporter Glut1, die häufig in Expressionsstudien als Hypoxiemarker verwendet werden. Auch Gene, die in den Bereichen Zellüberleben, Proliferation, Zellmotilität, Zytoskelettstruktur, Extrazelluläre Matrix Metabolismus und in vielen anderen Bereichen eine Rolle spielen, werden von Hif-1 reguliert [11-17].

### 2.1.2 Tumorhypoxie

Hypoxie ist ein weit verbreitetes Merkmal von lokal fortgeschrittenen soliden Tumoren [1]. Hauptursachen für Tumorhypoxie sind die schnelle Proliferation der Tumorzellen, die mit einem erhöhten Sauerstoffbedarf einhergeht, und die strukturell und funktionell abnormale Vaskularisierung und Mikrozirkulation, die zu einer ungleichmäßigen Verteilung von Sauerstoff im Tumor führen [2, 18]. Hypoxische Areale finden sich in einer Vielzahl bösartiger Tumoren, wie in Mammakarzinomen, in Zervixkarzinomen, in Kopf- und Halstumoren, in Prostata-, Pankreas-, Lungen- und Gehirntumoren, in rektalen Tumoren, in Weichteilsarkomen, in malignen Melanomen und in Nierenzellkarzinomen [19-26]. Es gibt immer mehr Hinweise, daß bis zu 60 % der lokal fortgeschrittenen soliden Tumoren hypoxische oder anoxische Bereiche aufweisen [1].

Tumorhypoxie hat zwei Gesichter, einerseits kann sie zu verminderter Proliferation und Zelltod führen. Auf der anderen Seite aber können durch Hypoxie ausgelöste Proteom- und/oder Genomänderungen die Tumorprogression fördern. Dies geschieht durch Mechanismen, die den Zellen helfen mit Nährstoffmangel zurecht zu kommen, ihre Ursprungsumgebung zu verlassen und unbegrenzt zu wachsen [24, 26]. Ergebnisse zahlreicher Studien legen eine Bedeutung von Hypoxie und dem Hif-System in der Vermittlung von Wachstumsvorteilen für Tumorzellen und der Tumorprogression nahe [2, 27-30]. Wahrscheinlich spielen drei Mechanismen bei der Hypoxie-induzierten Tumorprogression eine Rolle: Veränderungen der Genexpression, Klon-Selektionierung und Veränderungen des Genoms, ausgelöst durch gestörte DNA-Reperatur und erhöhte Mutagenese [11, 20, 31-35].

Eine besondere Bedeutung kommt Hypoxie auch bei der Tumorbehandlung zu. Tumorphoxie geht mit einer Resistenz gegen Strahlentherapie einher und scheint auch die Effizienz von bestimmten Formen der Chemotherapie, von photodynamischer Therapie und Immuntherapien negativ zu beeinflussen [19, 20, 24, 26].

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, daß Tumorphoxie ein unabhängiger nachteiliger Prognosefaktor ist und mit einem erhöhten Fernmetastase-Risiko verbunden ist [36-40]. Experimentelle Studien ergaben, daß Sauerstoffmangel zu einem erhöhten Invasions- und Metastasierungspotential von Tumorzellen führt [2, 18]. Generell spielt bei der Tumordinvasion die sogenannte Epithel-Mesenchym-Transition eine große Rolle, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

## 2.2 EPITHEL-MESENCHYM-TRANSITION

Mesenchymale Zellen sind eine großartige "Erfindung" des Reichs der Metazoa, deren Entstehung die Formung eines Embryos durch Gastrulation ermöglicht. Epitheliale Zellen können sich in mesenchymale Zellen durch einen als Epithel-Mesenchym-Transition (EMT) bezeichneten Prozess umwandeln. Dabei muß diese Umwandlung keineswegs vollständig sein; es reicht wenn eine Zelle viele ihrer epithelialen Eigenschaften verliert, zum Beispiel Zellpolarität, und dafür Eigenschaften, die typisch für mesenchymale Zellen sind erhält, zum Beispiel Motilität. EMT muß also keine komplette Umwandlung des Zelltyps bedeuten [41]. In **Tab. 2.1** sind Gene dargestellt, deren Expression typisch für Epithel- bzw. Mesenchymzellen sind (aus Thiery *et al.* [41]).

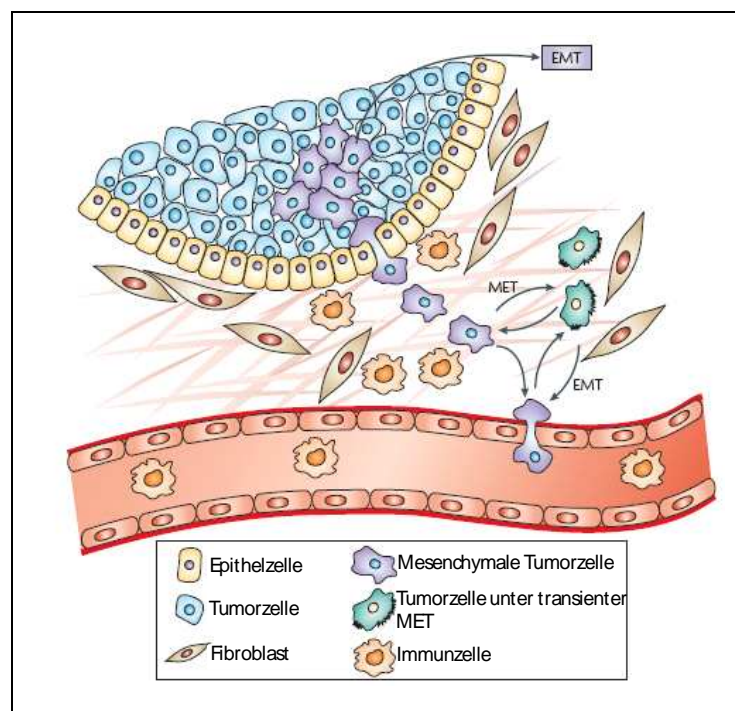
**Tab. 2.1:** Gene, deren Expression typisch für Epithel- (Epitheliale Marker) bzw. Mesenchymzellen (Mesenchymale Marker) ist.

Epitheliale Marker	Mesenchymale Marker
E-cadherin	Fibronektin
Claudine	Vitronektin
Occludine	FSP1
Desmoplakin	Vimentin
Cytokeratin 8/9/18	Smooth-muscle Aktin
Mucin-1	FGFR2 IIb/IIIc

FSP1 = Fibroblasten spezifisches Protein 1; FGFR2 = fibroblast-growth-factor receptor 2

Während der normalen Embryonalentwicklung spielt EMT eine Schlüsselrolle bei Gastrulationsbewegungen und der Entstehung der Neuralrinne [42]. Die Zellen können sich vom epithelialen Gewebe, aus dem sie stammen lösen, ohne Apoptose oder Anoikis zu unterlaufen. Stattdessen befähigt EMT die Zellen zur Invasion und dazu durch die extrazelluläre Matrix zu wandern [43]. Ohne EMT könnte die Embryonalentwicklung nicht über das Blastula-Stadium hinaus voranschreiten [41, 44-46]. Während der Gastrulation wandern die primären Mesenchymzellen vom Primitivstreifen weg, um sich in mesodermale und endodermale Epithelien zu differenzieren und die drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm) zu bilden [42, 43]. EMT ist ein essenzieller Prozess in der Embryonalentwicklung und ist dort ein präzise regulierter Ablauf.

Im Tumor jedoch führt EMT zur Progression, bei der sich Zellen vom Primärtumor lösen und in andere Bereiche abwandern [37, 47-50] (siehe **Abb. 2.2**). Lokale Invasion kann als "Initialzündung" für die Bösartigkeit von Karzinomen angesehen werden, die zur Bildung von im Allgemeinen fatalen Fernmetastasen führt [37].

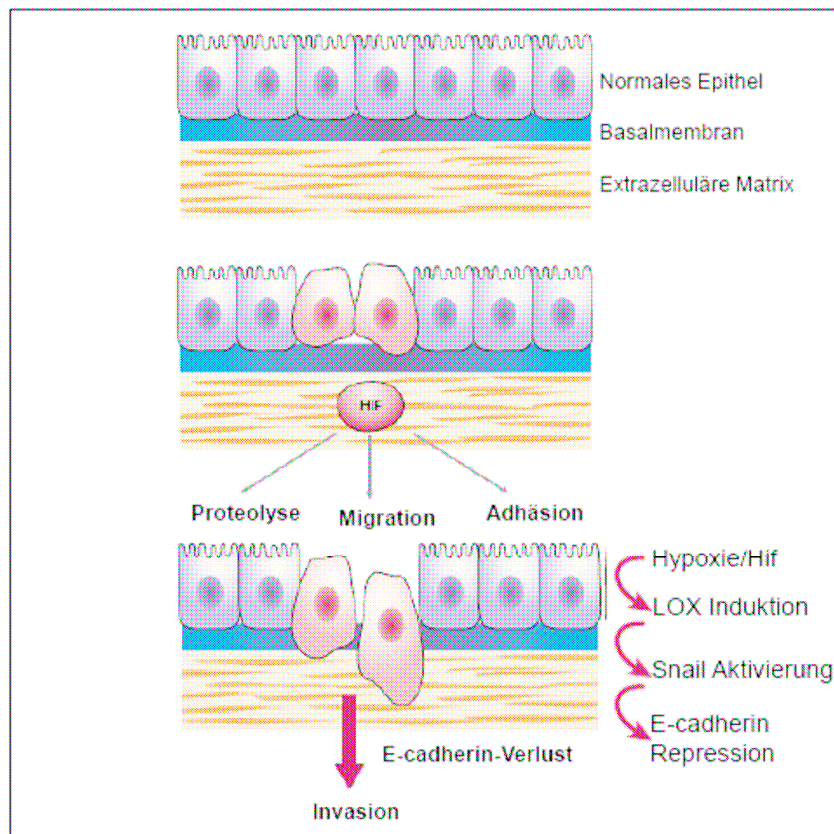


**Abb. 2.2:** Epithel-Mesenchym-Transition (EMT) im Tumor. Tumorzellen (blau) durchlaufen eine EMT und nehmen Eigenschaften einer mesenchymalen Zelle (violett) an. Sie können invadieren und durch die extrazelluläre Matrix wandern. Dadurch und durch Einwandern in Blutgefäße, Extravasation und erneuter Ansiedlung in entferntem Gewebe kommt es zur Bildung von Metastasen. Modifiziert aus Peinado *et al.* [37]

Epitheliales Gewebe besteht aus Zelllagen, die eng miteinander durch Zell-Zelladhäsion, wie zum Beispiel „adherens junctions“, „tight junctions“ oder Desmosomen verbunden sind und die eine apikal-basale Zellpolarität aufweisen [42]. EMT fördert Tumorzellmigration und -invasion, und dabei muß der Migration der Verlust von zellulärer Organisation vorausgehen.

Zellmigration vom Primärtumor und Invasion in umliegendes Bindegewebe sind Schritte, die zur Metastasierung von Karzinomen führen. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, daß Hypoxie bei der Initiation dieser Ereignisse eine Rolle spielt. Voraussetzungen für Invasion sind die proteolytische Modifikation der extrazellulären Matrix (ECM), die Induktion von Migration und ein Verlust der Zell-Zell-Adhäsion (siehe **Abb. 2.3**) [6]. Proteolyse der ECM wird unter anderem durch die Hif-regulierten Gene Cathepsin D, uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*) und MMP2 (Matrix-Metalloproteinase 2) vermittelt. PGI/AMF (*phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor*), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ) und c-Met (*mesenchymal-epithelial transition factor*) induzieren Migration und sind ebenfalls Zielgene von Hif [11, 51, 52]. Das gleiche gilt für die Gene Keratin 14, 18 und 19 und Vimentin, die bei der Adhäsion eine Rolle spielen. Eines der Schlüsselereignisse während der EMT ist der funktionelle Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-cadherin, welchem Eigenschaften als Invasionssuppressor während der Tumorprogression zugeschrieben werden [53]. Die transkriptionelle Repression wird als besonders wichtiger Mechanismus der dynamischen Stilllegung des E-cadherin Gens während der Tumorprogression angesehen [37]. Der Verlust von E-cadherin wurde ebenfalls in zahlreichen Studien mit Hypoxie in Verbindung gebracht [48, 54-56]. Pouysségur *et al.* schlagen als „missing link“ zwischen E-cadherin-Verlust und Hypoxie die Hochregulation von LOX (*lysyl oxidase*) durch Hif, mit anschließender Stabilisierung des Transkriptionsfaktors und EMT-Regulators Snail und damit Repression der E-cadherin-Expression vor [6] (siehe **Abb. 2.3**). Dabei sind aber nur einzelne Schritte dieser Kaskade unabhängig voneinander gezeigt worden. Und zwar die Induktion von LOX durch Hif [57, 58], die Aktivierung von Snail durch LOX [59] und die Repression von E-cadherin durch Snail [48].

Kürzlich wurde auch eine direkte Regulation des EMT-Regulators und E-cadherin-Repressors Twist durch Hif-1 gezeigt, was ein erneutes Indiz für die Regulation von EMT durch Hypoxie während der Tumorprogression ist [60].



**Abb. 2.3:** Modell des Hypoxie-induzierten E-cadherin-Verlustes. Hypoxie führt zur Stabilisierung von Hif. Hif reguliert die Transkription von Genen, die an der Proteolyse der extrazellulären Matrix, an der Zellmigration und an der Adhäsion beteiligt sind. Laut diesem Modell führt Hypoxie über eine LOX-Induktion und Snail-Aktivierung zur E-cadherin Repression und damit zur Invasion. Modifiziert aus Pouysségur *et al* [6].

## 2.3 E-cadherin

Das E-cadherin Gen *CDH1* (RefSeq Accession NM\_004360) liegt auf dem humanen Chromosom 16q22.1 [61]. E-cadherin, ein 120 kDa Transmembran-Glykoprotein, gehört zur Familie der klassischen Cadherine [62, 63]. Mitglieder dieser Familie bilden Calcium-abhängig homophile Dimere und sind an der selektiven Zell-Zelladhäsion beteiligt [64]. E-cadherin, ein wichtiges interzelluläres Adhäsionsmolekül [65] wird für die Aufrechterhaltung von stabilen Zell-Zell-Kontakten und einer epithelialen Zellpolarität benötigt [66, 67]. E-cadherin besteht aus einer extrazellulären Domäne, die die Dimerisierung vermittelt und einer intrazellulären Domäne, die mit verschiedenen Catenin-

Proteinen den cytoplasmatischen Zelladhäsions-Komplex bildet. Dieser Komplex ist über  $\alpha$ -catenin mit dem Aktin Zytoskelett verbunden, was die Stärke der Zell-Zelladhäsion erhöht [68]. Die von den Cadherinen gebildeten Strukturen, „adherens junctions“ und Desmosomen, definieren die physiologische Funktion einer Zelle, das heißt sie bestimmen ob und in welcher Form eine Zelle in funktionelle Strukturen, wie das Epithel eines Organs oder das Stroma, integriert ist [68].

Wie bereits erwähnt, spielt der Verlust von E-cadherin eine Schlüsselrolle in der Embryonalentwicklung. Bestimmte Prozesse erfordern eine EMT, zum Beispiel während der Gastrulation oder der Bildung des Neuralrohrs, wenn Zellen ihre epithelialen Merkmale verlieren, sich aus ihrem Zellverband lösen und motil werden [69].

Aber auch in der Tumorprogression spielt der Verlust von E-cadherin eine wichtige Rolle. E-cadherin wird in diesem Zusammenhang als Invasions-Suppressor angesehen [37]. In den meisten Tumoren epithelialen Ursprungs tritt ein E-cadherin-Verlust begleitet von einer Tumorprogression auf [68]. Aufgrund von deskriptiven und funktionellen Daten wird der E-cadherin-Verlust als eine Voraussetzung für Tumordinvasion und Metastasierung angesehen [53]. Mehrere Gruppen konnten unabhängig voneinander zeigen, daß eine Wiederherstellung der E-cadherin-Funktion in Tumorzelllinien die Umwandlung eines invasiven, mesenchymalen in einen nicht-invasiven, epithelialen Phänotyp bewirkt [53, 70]. In vielen Karzinomen, zum Beispiel in Mamma-, Endometrium-, Zervix- oder Magenkarzinomen, korreliert eine verminderte E-cadherin-Expression mit einer geringen histologischen Differenzierung, einem erhöhten Invasions- und Metastaserisiko, mit Rückfällen und einer schlechten Prognose [71-75].

Es gibt verschiedene Mechanismen, die zu einem funktionellen Verlust von E-cadherin während der Tumorprogression führen. Das sind vor allem Mutationen [76], Änderungen des Kondensationsgrades der DNA [77], Promoter Hypermethylierung [78, 79], posttranslationelle Spaltung [80] oder Modifikation [81] und direkte Repression der Transkription [82-85].

Der Promoter des humanen E-cadherin Gens enthält mehrere regulatorische Elemente, unter anderem eine CCAAT-Box, eine GC-reiche Region, einen *Enhancer* im ersten Intron [86-89] und ein palindromisches Element (E-pal) [86, 87] [89-91] (siehe **Abb. 2.4**). Die Repression der E-cadherin-Transkription wird über das E-pal-Element im E-cadherin-Promoter, das die E-Box enthält, vermittelt. Es sorgt für eine so starke Transkriptionsrepression, daß sogar die Effekte aktivierender Faktoren, die auf den proximalen Promoter wirken, überkompensiert werden können [92]. Die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren

Snail und Slug binden an das E-pal-Element im E-cadherin-Promoter, was zur Repression der E-cadherin Transkription führt [84, 93].

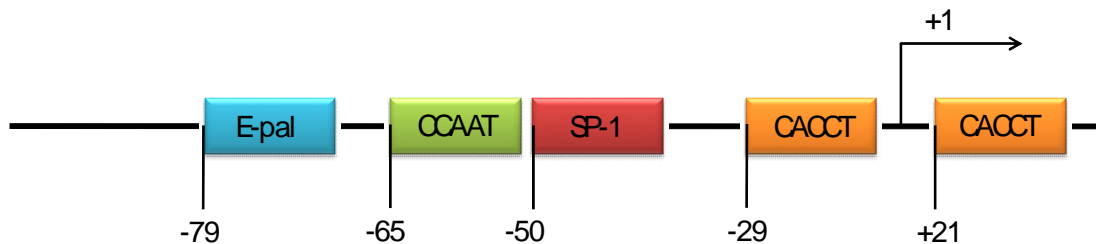


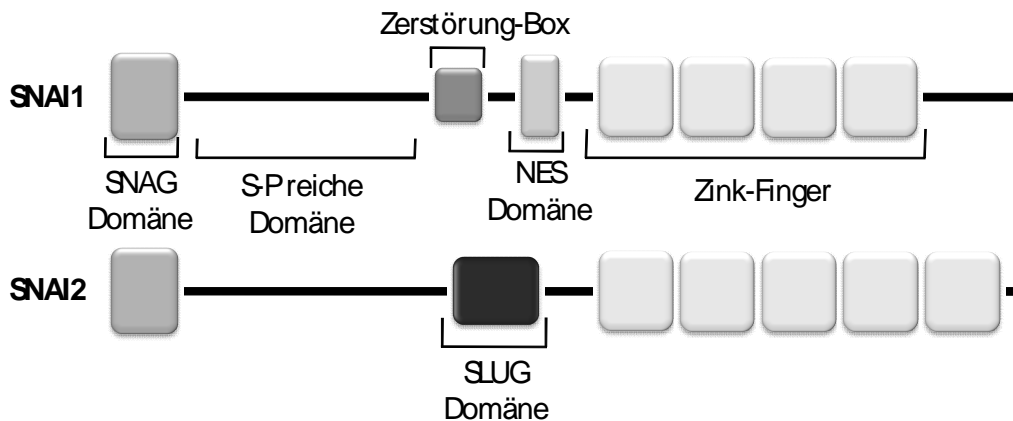
Abb. 2.4: Der Promoter des humanen E-cadherin Gens mit mutmaßlichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und mit dem Transkriptionsstart (Position +1). Gezeigt sind das E-pal-Element, die CCAAT-Box, eine SP-1 Konsensussequenz und zwei SIP1 Bindungsstellen (CACCT). Die Nukleotidsequenz der 5' Region des E-cadherin Gens findet sich in der GenBank Datenbank (Accession L34545).

## 2.4 Die Snail-Familie der Transkriptionsfaktoren

Bei der Tumorprogression scheint die transkriptionelle Repression von E-cadherin eine entscheidende Rolle zu spielen. Zu E-cadherin hemmenden Transkriptionsfaktoren zählen neben der ZEB-Familie (*Zinc finger E-box binding factor*) und den bHLH (*basic helix-loop-helix*)-Familien auch Mitglieder der Snail-Familie [37]. Die Snail Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung als EMT-Induktoren [82, 94]. Eine zentrale Rolle der Snail-Familie in der Mesodermbildung wurde in zahlreichen Spezies gezeigt. Ihre Expression in der Entwicklung ist mit der Bildung der Neuralrinne assoziiert [94-96].

Zur Snail-Familie gehören die Zink-Finger Transkriptionsfaktoren Snail (SNAI1) und Slug (SNAI2) [97] (siehe **Abb. 2.5**). Die im Protein enthaltenen Zink-Finger befinden sich am C-Terminus und gehören zum C2H2-Typ (zwei konservierte Cystein- und Histidin-Reste binden koordinativ das Zink-Ion). Die Zink-Finger Elemente ermöglichen die Sequenz-spezifische DNA-Bindung an E-Box Elemente. Die E-cadherin Repression wird von der SNAG (SNAIL/Gfi-1=*growth factor independent*) Domäne vermittelt (siehe **Abb. 2.5**) [98]. Die Zentralregion des Gens codiert für eine Serin-Prolin-reiche Domäne, die zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Snail-Familie variiert. Die Snail-Transkriptionsfaktoren hemmen die Transkription von E-cadherin indem sie an E-box Elemente (CANNTG, [84, 85, 99]) in der 5' Proximalsequenz des E-

cadherin-Promoters binden. Durch diese Funktion und durch Regulation ihrer anderen Zielgene können sie eine vollständige EMT auslösen und damit zum Erwerb von invasiven und onkogenen Eigenschaften führen [84, 85, 98, 100].



**Abb. 2.5:** Die Hauptkomponenten der Proteine Snail (SNAI1) und Slug (SNAI2). Die SNAG-Domäne ist für die Repression des E-cadherin-Gens verantwortlich. Snail enthält eine „Zerstörungsbox“ und ein nukleäres Exportsignal (NES Domäne), die beide die posttranslationale Regulation von Snail ermöglichen. Slug hat eine Slug-Domäne, deren Funktion noch unbekannt ist. Snail besitzt vier, Slug fünf Zink-Finger-Elemente, die der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung dienen.

### Snail

Die Charakterisierung von Snail als Transkriptionsrepressor von E-cadherin und EMT-Regulator im Jahre 2000 war ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorerkrankung [84, 85]. Snail wurde erstmals in *Drosophila melanogaster* als Regulator der Mesodermbildung beschrieben [101]. Nach und nach wurden dann auch Snail Homologe in anderen Spezies gefunden, unter anderem in der Maus und im Menschen.

Das humane Snail Gen (*SNAI1*, RefSeq Acc. NM\_005985) wurde 1999 von Twigg and Wilkie isoliert und analysiert [102]. Das Gen überspannt ungefähr 6,4 kb, besteht aus 3 Exons und weist eine CpG Insel oberhalb der Codierungssequenz auf. Die Lokalisierung des Snail Gens wurde auf dem humanen Chromosom 20q13.1 bestimmt.

Twigg and Wilkie [102] haben ein einzelnes Transkript von 1,8 kb (GenBank Accession NM\_005985) in mehreren humanen fetalen Geweben gefunden, mit der höchsten Expression in der Niere, aber auch in einigen adulten Geweben vor allem in der Lunge und in der Plazenta. Der offene Leserahmen des Snail Gens codiert ein Protein von 264 Aminosäuren, das aus vier Zink-Finger



Motiven besteht und ein Molekulargewicht von ungefähr 29,08 kDa hat (Swiss-Prot).

Peinado *et al.* [98] haben ein Modell für die Snail Repression der E-cadherin Transkription aufgestellt, das die Bildung eines Komplexes mit dem Co-Repressor SIN3A und den Histon Deacetylasen 1 und 2 (HDAC1 und 2) beinhaltet. Diese Interaktion scheint von der SNAG Domäne von Snail abhängig zu sein, was darauf hindeutet, daß Snail die Repression durch Rekrutierung von Chromatin-Modifikatoren vermittelt. Diese Tatsache legt eine dynamische Verbindung zwischen Transkriptions-Hemmung und epigenetischem „Gene silencing“ von E-cadherin während Tumorprogression und EMT nahe [37, 98].

Die Zentralregion des Snail-Proteins enthält ein nukleäres Exportsignal (NES) [103] und eine „destruction box“ Domäne [104] (siehe **Abb. 2.5**). Diese Proteindomänen spielen bei der posttranskriptionellen Regulation von Snail eine Rolle [37]. Phosphorylierung der Domänen durch GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) führt zum Export ins Cytoplasma und zum Ubiquitin-vermittelten Abbau im Proteasom [104, 105]. Die subzelluläre Lokalisation von Snail kann durch Phosphorylierung durch PAK1 (*p21-activated kinase*) reguliert werden [103, 106]. In Zebrafisch Embryonen wird die nukleäre Lokalisation außerdem durch die Expression des Zinktransporters LIV1 (*locus of insensitivity to victorin1 gene*) kontrolliert [107]. Zusätzlich zur Phosphorylierung können andere Wechselwirkungen die Stabilität von Snail beeinflussen. Zum Beispiel führt die Interaktion mit LOXL2 und 3 (*lysyl-oxidase like 2 und 3*) zur Repression der E-cadherin Expression und zu EMT [59].

Die Rolle von Snail als EMT-Regulator beruht neben der Transkriptions-Repression von E-cadherin auch auf der Hemmung der Expression von anderen epithelialen Markern wie Occludin und von Claudinen, die *Tight Junction* Komponenten sind [108, 109]. Zusätzlich bewirkt Transfektion von Zellen mit Snail die Herunterregulierung von anderen epithelialen Markern wie Desmoplakin [84], MUC-1 (Muzin1) und Cytokeratin-18 [110]. Dadurch verlieren Epithelzellen ihre Merkmale wie Zellpolarität und Zelladhäsion. Die Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin und Fibronectin hingegen wird induziert [84]. Peiro *et al.* haben außerdem gezeigt, dass Snail an seinen eigenen Promoter binden und damit seine eigene Expression hemmen kann [111]. Snail und Slug zeigen neben ihrer Rolle als EMT-Regulatoren auch anti-apoptotische Aktivität [112-115]. Eine Übersicht der Zielgene von Snail bietet **Tab. 2.2**.

In den letzten Jahren wurde Snail eine Rolle als EMT-induzierender Faktor in der Progression von humanen Tumoren zugeschrieben. Beim Menschen wurde eine Snail mRNA-Expression in Biopsien und Resektaten von Patienten mit

Mammakarzinomen [94], Magenkarzinomen [116], Leberkarzinomen [117], oralen Plattenepithelkarzinomen [118], Ovarialkarzinomen [119] und in Melanom-Zelllinien [120] gefunden.

### Slug

Slug ist ein weiterer Vertreter der Snail-Familie von Transkriptionsfaktoren. Slug wurde 1994 im Huhn als wichtiger Regulator der Mesoderm-Bildung und Neuralrinnen-Migration, zwei auf EMT basierenden Entwicklungsprozessen, entdeckt [121, 122]. Das humane Slug Gen (SNAI2, RefSeq Acc. NM\_003068) wurde von Cohen *et al.* 1998 isoliert und charakterisiert [123]. Slug besteht aus drei Exons, überspannt ca. 4 kb und ist auf Chromosom 8q11 lokalisiert. Cohen *et al.* beschreiben ein einzelnes Transkript von 2,2 kb Länge, das in der Plazenta, im Herzen, im Pankreas, in der Leber, in der Niere und im Skelettmuskel exprimiert wird. Das Slug Protein besteht aus 268 Aminosäuren und sein Molekulargewicht beträgt 29989 Dalton [123]. Slug besitzt fünf Zinkfingerdomänen für die Sequenz-spezifische DNA-Bindung und eine Slug-Domäne, deren Funktion noch unbekannt ist (siehe **Abb. 2.5**) [37].

Auch über die posttranslationelle Regulation von Slug ist wenig bekannt. Die Arbeitsgruppe um Vernon hat kürzlich beschrieben, dass in *Xenopus* Ppa (*partner of paired*) bei der Stabilität und dem Abbau von Slug eine Rolle spielt [124].

Ebenso wie Snail hat Slug neben E-cadherin noch weitere Zielgene. Darunter befinden sich die epithelialen Marker Occludin, Claudin1 und Cytokeratin 18 und 19 [125-128]. Auch Slug kann an seinen eigenen Promoter binden, im Gegensatz zu Snail induziert aber Slug die Transkription seines eigenen Gens [37]. Wie bereits erwähnt kann Slug neben seiner Rolle als EMT-Regulator auch als anti-apoptotischer Faktor agieren [112-115]. **Tab. 2.2** zeigt eine Übersicht über die Zielgene von Slug.

Auch Slug scheint eine Rolle in der Progression von humanen Tumoren zu spielen. In Mamma- und Ovarialkarzinomen wurde eine Slug-Expression mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert [129, 130]. Come *et al.* konnten eine Assoziation von Slug-Überexpression und Lymphknoten-Metastasen in Mammakarzinomen zeigen [131]. Die Expression von Slug in kolorektalen Tumoren stellt einen unabhängigen Faktor für eine schlechte Prognose dar [132]. Castro Alves *et al.* beschreiben die Assoziation von Slug-Überexpression und E-cadherin Herunterregulierung in diffusen und intestinalen Magenkarzinomen und deren Korrelation mit dem Auftreten von Fernmetastasen [133]. Auch in Oesophagus-Plattenepithelkarzinomen [134] und in primären Lungen-Adenokarzinomen [135, 136] ist eine Slug-Expression

mit einem schlechten klinischen Verlauf verbunden. Möglicherweise trägt eine Slug-Expression auch zur Bösartigkeit von Melanomen bei [137].

**Tab. 2.2: Zielgene von Snail und Slug**

Zielgene von Snail		Zielgene von Slug	
Repression	Induktion	Repression	Induktion
E-cadherin	Vimentin	E-cadherin	Slug
Occludin	Fibronektin	Occludin	
Claudine		Claudin 1	
Desmoplakin		Cytokeratin 18/19	
Cytokeratin 17/18			
MUC-1			
Snail			

## 2.5 NIERENZELLKARZINOM

Fünf Prozent aller epithelialen Tumoren sind Nierenzellkarzinome (*renal cell carcinoma*, RCC). Im Jahr 2007 gab es in den USA 38.000 neu diagnostizierte Fälle der Krankheit [138, 139]. Die Mehrheit der Nierenzellkarzinome (96 %) sind sporadisch, lediglich 4 % sind hereditär. 75 % der Nierenzellkarzinome sind vom klarzelligen Typ, 15 % sind papilläre, 5 % chromophobe und 5 % unterschiedliche Formen von Tumoren, unter anderem Onkozytome [140, 141]. Klarzellige Nierenzellkarzinome sind zu einem hohen Prozentsatz (ca. 70 %) von einem funktionellen Verlust des von Hippel-Lindau Gens (VHL) gekennzeichnet (vergleiche **Abb. 2.1**). Dabei sind die Ursachen des VHL-Verlusts je nach Studie in 40 - 60 % der Nierenzellkarzinome Mutationen, in 10 - 20 % epigenetische Veränderungen [142]. Der VHL-Verlust resultiert in einer konstitutiv aktivierten Hypoxie-Antwort, die durch die Stabilisierung der  $\alpha$ -Untereinheiten von Hif-1 und 2 ausgelöst wird [143]. Obwohl wahrscheinlich die Hif-Deregulation allein nicht ausreicht um Tumoren zu erzeugen [144], spielt Hif bei der Entstehung von RCCs eine wichtige Rolle [145].

Das fortgeschrittene Nierenzellkarzinom ist fast immer resistent gegenüber konventioneller Chemo- und Strahlentherapie und in den meisten Fällen unheilbar [139, 146]. Oft wird eine Nephrektomie vorgenommen, auch wenn

schon Metastasen bestehen, weil sie trotzdem noch einen Einfluß aufs Überleben zu haben scheint [139] und die einzige Möglichkeit einer „Therapie“ darstellt.

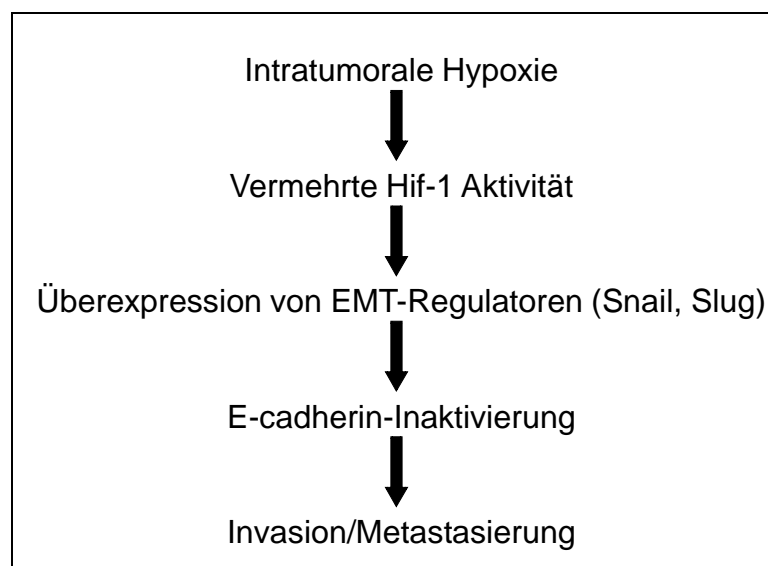
Es gibt einige neue Ansätze von Therapien, wie zum Beispiel einen VEGF-Antikörper (Bevacizumab, Avastin<sup>®</sup>, Genentech Inc.), der in einer Phase III Studie zwar ein längeres Progressions-freies Überleben und ein höheres objektives Tumoransprechen zeigte als das Placebo, jedoch keine signifikante Überlebenssteigerung mit sich brachte [139]. Desweiteren haben sich Multikinase-Inhibitoren als vielversprechende Substanzen zur Therapie von Nierenzellkarzinomen herauskristallisiert, hier vor allem Sunitinib (Sutent<sup>®</sup>, Pfizer Inc.) [139]. Sunitinib blockiert die Aktivität von VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), PDGFR- $\beta$  (*platelet derived growth factor receptor  $\beta$* ), Src (*sarcoma virus transforming gene*), ABL (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*), sowie von IGFR-1 (*insuline like growth factor receptor 1*) und FGFR-1 (*fibroblast growth factor receptor 1*) Tyrosinkinassen [147]. In einer Phase III Studie wurde Sunitinib mit IFN- $\alpha$  (Interferon  $\alpha$ ), einem Immuntherapeutikum das bei der Therapie von Nierenzellkarzinomen bescheidene aber gute Ergebnisse bringt, verglichen. Dort zeigte sich unter Sunitinib eine erhöhte objektive Ansprechrates, ein längeres Progressions-freies Überleben und eine verbesserte Lebensqualität im Vergleich zur IFN- $\alpha$ -Therapie [148]. Aber trotz dieser positiven Effekte der Multikinase-Inhibitoren kann der Krankheitsverlauf nicht aufgehalten werden [139]. Da es also noch keine befriedigende Therapie gibt und da Nierenzellkarzinome ein gutes Modellsystem für Tumorphypoxie im Allgemeinen darstellen, lohnt es sich die Mechanismen der Tumorprogression in diesen Tumoren weiter zu ergründen.

## 2.6 ZIEL DER ARBEIT

Tumorhypoxie ist ein weitverbreitetes Phänomen und hat unmittelbaren Einfluß auf Invasion und Metastasierung. Die molekularen Mechanismen mit denen Sauerstoffmangel im Tumorgewebe zu einem erhöhten Invasionspotential führt, sind erst in Ansätzen bekannt. Ein erhöhtes Invasionspotential von Zellen ist typischerweise mit einer Epithel-Mesenchym-Transition verbunden. Mittlerweile gibt es deutliche Hinweise, daß ein Zusammenhang zwischen Hypoxie und der direkten Induktion von E-cadherin-hemmenden Transkriptionsfaktoren besteht. Die genauen Zusammenhänge sind jedoch noch immer ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, erstmalig umfangreich den Zusammenhang zwischen Hypoxie und Epithel-Mesenchym-Transition *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

Die Arbeitshypothese dieser Studie ist in **Abb. 2.6** dargestellt. Danach führt intratumorale Hypoxie und die damit verbundene erhöhte Hif-1-Aktivität zu einer Überexpression der EMT-Regulatoren Snail und/oder Slug. Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung von E-cadherin und dadurch schließlich zur Invasion von Tumorzellen und zur Metastasierung.



**Abb. 2.6:** Arbeitshypothese dieser Studie.

Folgende spezifische Ziele wurden für diese Arbeit definiert:

1. Untersuchung der Hypoxie-Induzierbarkeit der Expression von Snail und Slug und des Einflusses auf die E-cadherin Expression in Zellkulturmodellen verschiedener Tumorarten. Untersuchung der Auswirkungen von
  - a) Behandlung der Zellen mit  $\text{CoCl}_2$ .
  - b) Inkubation der Zellen in 1 %  $\text{O}_2$ .
  - c) Transfektion der Zellen mit einem Expressionsvektor für stabilisiertes Hif-1 $\alpha$ .
2. Aufbau und Verwendung eines Tiermodells. Untersuchung der Expression der EMT-Regulatoren, von E-cadherin und von Vimentin in hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bereichen experimenteller Tumore.
3. Untersuchung der Expression der EMT-Regulatoren, von E-cadherin und von Vimentin in klarzelligem Nierenkarzinomen. Vergleich von VHL-negativen ( $\rightarrow$  Hif-1 $\alpha$  stabilisiert) und VHL-positiven Tumoren.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 PUFFER UND LÖSUNGEN

Die folgende Liste zeigt gebräuchliche Puffer und Lösungen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Spezielle Puffer finden sich am Ende des jeweiligen Abschnitts. Eine Liste der Adressen der Hersteller der verwendeten Produkte findet sich in **Abschnitt 3.12**.

#### Zitratpuffer

10 mM Zitronensäure-Monohydrat (#1.00244.1000, Merck KGaA)

Aqua dest.

pH = 6,0 (NaOH)

#### PBS

137 mM NaCl (#1.06404.5000, Merck KGaA)

8,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (#1.06580.1000, Merck KGaA)

1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (#1.04873.1000, Merck KGaA)

pH = 7,4

Eine 20 x Lösung wurde hergestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### TE Puffer

10 mM Tris (#75825, USB Corporation)

1 mM EDTA (#34103, Merck KGaA)

pH 8

### **SDS-Polyacrylamide Gel**

#### **Trenngel (10%, 10ml)**

4,88 ml Aqua dest.

2,5 ml 1 M Tris (#75825, USB Corporation) pH 8.8

2,5 ml 40 % Acrylamide/Bis solution 37,5:1 (#161-0148, BioRad Lab.)

50 µl 20 % SDS (#A0675,1000, AppliChem)

60 µl 10% APS (#A7460, Sigma-Aldrich)

6 µl TEMED (#161-0801, BioRad)

#### **Sammelgel (5ml)**

3,05 ml Aqua dest.

1,25 ml 0,5M Tris (#75825, USB Corporation) ph 6,8

0,63 ml 40% Acrylamide/Bis Solution 37,5:1 (#161-0148, BioRad Lab.)

25 µl 20% SDS (#A0675,1000, AppliChem)

40 µl 10% APS (#A7460, Sigma-Aldrich)

4 µl TEMED (#161-0801, BioRad)

### **Laemmli Ladepuffer**

60 mM Tris (#75825, USB Corporation) pH=6.8

8,7 % v/v Glycerol (#1.04092.1000, Merck KGaA)

0,72 M 2-Mercaptoethanol (#M7154, Sigma-Aldrich)

80 µg/ml Bromphenolblau (#B5525, Sigma-Aldrich)

2 % w/v SDS (#A0675,1000, AppliChem)

Der Puffer wurde 5 x konzentriert angesetzt und aliquotiert bei 4°C gelagert.

### **SDS Laufpuffer**

193 mM Glycin (#1.04201.1000, Merck KGaA)

25 mM Tris (#75825, USB Corporation)

0,05 % w/v SDS (#A0675,1000, AppliChem)



Ein 10 x Puffer wurde hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert.

### **Blotpuffer**

192 mM Glycin (#1.04201.1000, Merck KGaA)

25 mM Tris (#75825, USB Corporation)

0,2 % w/v SDS (#A0675,1000, AppliChem)

20 % v/v Methanol (#1.06009.1000, Merck KGaA)

Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

### **“Strip-Puffer”**

10 % v/v Methanol (#1.06009.1000, Merck KGaA)

10 % v/v Essigsäure (Eisessig) (#1.00063.1000, Merck KGaA)

in Aqua dest.

Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

### **TBS**

20 mM Tris (#75825, USB Corporation)

137 mM NaCl (#1.06404.5000, Merck KGaA)

pH=7,3

Eine 10 x Lösung wurde hergestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

### **TBST**

TBS mit 0,1 % v/v Tween-20 versetzt (#8.22184.1000, Merck KGaA).

Der Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

### **TBST-M**

TBST mit 2,5-5 % w/v Magermilchpulver versetzt (#60219, Töpfer)

Der Puffer wurde frisch vor Gebrauch hergestellt und bei 4°C gelagert.

### **LB-Medium**

20 g LB Broth Base (# 12780-052, Gibco) wurden in 1 l Aqua dest. gelöst, autoklaviert und, wenn nötig mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt.

### **LB-Platten**

32 g LB Agar (#22700-025, Gibco) wurden in 1 l Aqua dest. gelöst, autoklaviert und mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt.

### **TBE**

10 x TBE (#15581-028, Invitrogen), daraus wurde eine 1 x Lösung hergestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

### **Agarose Gelelektrophorese von DNA**

Seakem LE Agarose (#50004, Cambrex) wurde in 1 x TBE durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung wurde das Gel mit einem Tropfen Ethidiumbromid versetzt und in Gelkammer mit Kamm gegossen. DNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen.

#### **10 x DNA Ladepuffer**

0,4 % Bromphenolblau

0,4 % Xylene Cyanol

50 % Glycerol

1mM EDTA (#34103, Merck KGaA)

## 3.2 ZELLKULTUR

### 3.2.1 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden bei 37° C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> in einem Heraeus CO<sub>2</sub> Inkubator (Typ BBK 6220, Kendro Laboratory Products) kultiviert.

### 3.2.2 Zelllinien und Medien

Folgende Zelllinien wurden benutzt: Ishikawa (Humanes asiatisches Endometrium-Adenokarzinom, European Collection of Cell Cultures (ECACC) No. 99040201), MCF7 (Humanes Mamma-Adenokarzinom, ATCC No. HTB-22), MDA-MB-435S (Humanes duktales Mammakarzinom, ATCC No. HTB-129), GC 2957 (Humanes Magenkarzinom, intestinaler Typ, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Seruca, IPATIMUP, Portugal) und A431 (Humanes Epidermoid-Karzinom, ATCC No. CRL-1555). Die Zellen wurden ausgesucht, da sie E-cadherin auf RNA- und Proteinebene exprimieren, Snail allerdings nur auf RNA-Ebene. Slug und Snail mRNA werden von diesen Zelllinien relativ schwach exprimiert. Alle diese Zelllinien sind epitheliale Zelllinien, die starke Zell-Zellkontakte bilden. Dadurch sollten durch Hypoxie induzierte Veränderungen der Zellen zum mesenchymalen Typ hin leicht auszumachen sein. Außerdem war das Ziel, Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs zu untersuchen.

GC 2957-Zellen wurden in RPMI-Medium (RPMI 1640, #31870-025, Gibco) kultiviert, alle anderen Zelllinien in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, #31966-021, Gibco), mit 10 % FCS und 2,5 ml Penicillin/Streptomycin.

### 3.2.3 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden mit 10 ml vorgewärmtem PBS (37° C) gewaschen, ca. 5 Minuten trypsiniert (0,5 ml Trypsin pro 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche, 37° C), in vorgewärmtem Zellkulturmedium (37° C) aufgenommen, in einem angemessenen Verhältnis gesplittet und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgelegt.

**Dulbecco's PBS** (#H15-002, PAA Laboratories)

Trypsin-EDTA (#L11-004, PAA Laboratories)

### 3.2.4 Herstellen von gefrorenen Stocklösungen

Zellen wurden bei 80 % Konfluenz in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, trypsiniert und in 10 ml Zellkulturmedium (4° C) aufgenommen. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 300 x g und 4° C wurden die Zellen in 5 ml Einfriermedium resuspendiert und in 2 ml Kryoröhrchen aliquotiert (auf Eis). Die Röhrchen wurden für vier Stunden bei -20° C gelagert und dann auf -80° C transferiert. Am folgenden Tag wurden die Stocklösungen für die dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### Einfriermedium

90 % v/v FCS (#3302-P260317, PAN Biotech)

10 % v/v DMSO (#20385, SERVA)

### 3.2.5 In-Kulturnahme von gefrorenen Stocklösungen

15 ml-Falcon-Röhrchen mit 9 ml Zellkulturmedium (37° C) wurden vor dem Auftauen vorbereitet. Kryoröhrchen mit der gefrorenen Stocklösung wurden in einem 37° C-Wasserbad aufgetaut und in die vorbereiteten Falcon-Röhrchen transferiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 300 x g wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgelegt. Das Medium wurde am folgenden Tag gewechselt.

## 3.3 HYPOXIE-EXPERIMENTE

### 3.3.1 CoCl<sub>2</sub>-Behandlung

Zellen wurden zwei Tage vor CoCl<sub>2</sub>-Zugabe ausgelegt, so daß sie bei Zugabe von CoCl<sub>2</sub> eine Dichte von ca. 70 % aufwiesen. Am Tag der Zugabe wurde das Medium gewechselt und eine CoCl<sub>2</sub> Stocklösung (10mM, Feststoff #C-8661, Sigma) wurde ins Medium zugegeben (Endkonzentration 400 µM).

Kontrollkulturen ohne CoCl<sub>2</sub>-Zugabe wurden mitgeführt. RNA- und Proteinlysate wurden nach 0, 12, 24 und 48 Stunden Behandlung mit Trizol (Invitrogen) bzw. T-PER Lysepuffer (Pierce) bereitet.

### 3.3.2 Inkubation in einer Hypoxiekammer

Drei Tage vor Start eines Hypoxieexperiments wurden Zellen so ausgelegt, daß sie bei Beginn des Experiments eine Dichte von ca. 70 % erreicht hatten. Am Tag des Experiments wurde das Medium gewechselt, die Zellen in einen Hypoxie-Inkubator (WTB Binder) überführt und dort bei 1 % O<sub>2</sub> in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> und bei 37° C inkubiert. Kontrollkulturen wurden ebenfalls in einer feuchten Atmosphäre bei 21 % O<sub>2</sub> mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. RNA- und Proteinlysate wurden nach 0, 12, 24 und 48 Stunden Behandlung mit Trizol (Invitrogen) bzw. T-PER Lysepuffer (Pierce) hergestellt.

## 3.4 TRANSFEKTION VON HUMANEN ZELLEN MIT EINEM HIF-1 $\alpha$ -PLASMID

### 3.4.1 Präparation der Plasmide für die Transfektion

Der Expressionsvektor für mutiertes Hif-1 $\alpha$  p(HA)Hif1 $\alpha$ (P402A,P564A) wurde uns freundlicherweise von Curtis C. Harris zur Verfügung gestellt und beruht auf dem Vektor pcDNA3 (#V79020, Invitrogen). Er wurde in der Gruppe von L. Eric Huang durch Insertion eines Konstrukts von Hif-1 $\alpha$  hergestellt, das über *site directed mutagenesis* modifiziert worden war [149]. Durch die Mutation der Prolinreste 402 und 564 zu Alanin kann der von Hippel-Lindau-Faktor nicht mehr an Hif-1 $\alpha$  binden. Dadurch wird Hif-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen stabilisiert.

Der Vektor wurde zunächst in One Shot Top10 (#C4040-10, Invitrogen) kompetente *E.coli* Bakterien transformiert. Dazu wurden 5  $\mu$ l des gelösten Plasmids zu 50  $\mu$ l der kompetenten Zellen gegeben; diese wurden zunächst 30 Minuten auf Eis belassen. Dem folgte ein 30 sekundiger Hitzeschock bei

42° C, woraufhin die Zellen wieder auf Eis gestellt wurden. Die Zellen wurden dann in 250 µl vorgewärmtes SOC Medium (#15544-034, Invitrogen) gegeben und eine Stunde bei 37° C geschüttelt. 100 µl wurden auf LB Platten mit Ampicillin ausplattiert, über Nacht bei 37° C inkubiert und am folgenden Tag wurden Klone gepickt. Diese wurden zum Vermehren des Plasmids hochgezüchtet und mit dem QIAGEN Plasmid MidiKit (#12143, Qiagen) aufgereinigt. Nach Überprüfung durch Restriktionsverdau und Sequenzierung wurde das Plasmid in die Transfektion eingesetzt.

Zusätzlich wurde für die Herstellung Mock-transfizierter Zellen ein „leeres“ Plasmid durch Herausschneiden des Inserts hergestellt. Dazu wurde das Insert zunächst in folgendem Ansatz mit den Enzymen KpnI (#R0124L, New England Biolabs) und XbaI (#ER0681, Fermentas) herausgeschnitten: 1 µg Plasmid, je 0,5 µl Enzym, 2 µl Puffer 2 (#B70025, New England Biolabs) in Aqua dest., 30 Minuten bei 37° C. Um die zur Religation nötigen „ blunt ends“ zu erzeugen, wurde das geschnittene Plasmid zusätzlich mit 1 µl eines Klenow-Fragments (#27-0928-02, Pharmacia, jetzt GE Healthcare) und 1 µl (2 µM) dNTPs (#200415-51, Stratagene) 45 Minuten bei 37° C behandelt. Das Produkt dieser Reaktion wurde auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und durch Gelextraktion mit dem QIAquick Gel Extraktionskit (#28706, Qiagen) aufgereinigt.

### **3.4.2 Transiente und stabile Transfektion**

Humane Zellen wurden mittels Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) mit dem Expressionsvektor für stabilisiertes Hif-1α p(HA)HIF1alpha(P402, P564A) transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in eine Vertiefung einer 6-Well Zellkultur-Testplatte in 2 ml Medium ohne Penicillin/Streptomycin ausgelegt. Lösung A, bestehend aus 2 µg DNA in 250 µl OptiMEM (#31985, Invitrogen), und Lösung B, bestehend aus 7 µl Lipofectamin™ 2000 (#11668019, Invitrogen) in 250 µl OptiMEM, wurden zusammen gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben, die Zellen wurden für sechs Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt. Mock-transfizierte Zellen wurden mit dem „leeren“ Plasmid transfiziert. Für eine transiente Transfektion wurden die Zellen nach drei und fünf Tagen geerntet und RNA bzw Protein extrahiert. Für stabil transfizierte Zellen wurden die Zellen nach vier Tagen mit 600µg/ml G-418 Sulphate (#P25-011, PAA Laboratories) selektioniert.

## 3.5 WESTERN BLOT

### 3.5.1 Proteinextraktion aus Zellen mit T-PER<sup>®</sup>Tissue Protein Extraction Reagent

Die Zellen wurden mit gekühltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit eiskaltem T-PER Puffer mit einem Zellschaber abgekratzt (100 µl/25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche), 10 Minuten auf Eis inkubiert und dabei immer wieder gevortext. Anschließend wurde das Lysat 15 Minuten bei 4 °C und 20800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

**T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (#78510, PIERCE)**

Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette Complete Mini (#1836153, Roche)/10 ml T-PER Puffer) wurde vor Gebrauch hinzugefügt.

### 3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode

Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradford-Methode bestimmt [150]. Das Prinzip dieser Konzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und die damit verbundene Blaufärbung, deren Intensität der Proteinkonzentration proportional ist. Die Absorption der Proben wird bei 959 nm spektrophotometrisch gemessen. Mithilfe einer Eichgerade kann dann die Proteinkonzentration berechnet werden.

Das Protein Assay Farbstoffkonzentrat (#500-0006, BioRad) wurde 1:5 in Aqua dest. verdünnt. Protein Standard II (1.48 mg BSA/ml, #500-0007, BioRad) wurde 1:10 in Aqua dest. verdünnt. Die Proben für die Standardkurve wurden vorbereitet (1,48 - 10,36 µg Protein) und in Plastikküvetten überführt. 995 µl des verdünnten Protein Assay Farbstoffkonzentrats wurden in Plastikküvetten aliquotiert und 5 µl der Proben unbekannter Konzentration wurden hinzugefügt (Verdünnung 1:200). Nach Mischen wurde die Absorption der Proben im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen, eine Standardkurve erstellt, und damit die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

### 3.5.3 SDS Gelelektrophorese

Die Proben wurden mit Laemmli Puffer versehen und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 3.5.4 Protein-Transfer von SDS-Gelen auf Nitrozellulosemembranen (Western Blotting)

Die Nitrozellulosemembran (#NC02, Schleicher&Schuell Bioscience, über Hartenstein), Schwämme und Whatman-Papier (#10426693, Schleicher&Schuell Bioscience) wurden in Blotpuffer befeuchtet. Das Blot-Sandwich wurde wie folgt aufgebaut: Ein Schwamm wurde auf die schwarze Seite der Blotkassette gelegt, darauf wurde ein Whatman-Papier gelegt und darauf das vom Sammelgel abgetrennte Trenngel. Auf das Gel wurde die Membran und ein weiteres Whatman-Papier gelegt. Nach Entfernen von Luftblasen wurde ein zweiter Schwamm darauf gelegt, die Kassette geschlossen und in eine mit Blotpuffer gefüllte Blotkammer gegeben. Der Transfer wurde auf Eis mit einer konstanten Spannung von 100 V 90 Minuten lang durchgeführt.

### 3.5.5 Immunologische Detektion der immobilisierten Proteine

Unspezifische Bindestellen auf der Membran wurden mit Block-Puffer eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt (**Tab. 3.1**). Die Membran wurde mit dem primären Antikörper (**Tab. 3.1**) in Block-Puffer verdünnt für 16 Stunden bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper (**Tab. 3.1**) wurde ebenfalls in Block-Puffer verdünnt und für zwei Stunden bei 4°C auf der Membran belassen. Danach wurde die Membran wieder 3 x 10 Minuten in TBST gewaschen. Die Aktivität der Meerrettich Peroxidase (HRP) wurde mit dem ECL-Plus Western Blotting Detection System (#RPN2132, GE Healthcare) detektiert. Ein Röntgenfilm (#RPN 3103K, Amersham Biosciences) wurde in einer Filmkassette durch die spezifische Reaktion auf der Membran belichtet, in einer Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine vom Typ SRX-101A (Konica Minolta) entwickelt und fixiert.



Tab. 3.1: Im Western Blot und Microarray verwendete Antikörper, Antikörperverdünnungen und Block-Puffer

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Blocking/Verd.
Snail (Dr. E. Kremmer, GSF, München [151])	Ratte	1:2500	0.5 % BSA/ 2.5 % TBST-M
E-cadherin (#610182 BD Biosciences)	Maus	1:5000	5 % TBST-M
Hif-1 $\alpha$ (#610959, BD Biosciences)	Maus	1:250	5 % TBST-M
Gapdh (#CSA-335, Stressgen Bioreagents)	Maus	1:5000	5 % TBST-M
Vimentin (#M0725 , Dako)	Maus	1:1000	5 % TBST-M
Cytokeratin 18 (DC10) (#4548, Cell Signaling)	Maus	1:1000	5 % TBST-M/ 5 %BSA
$\beta$ -actin (#A 5441, Sigma-Aldrich)	Maus	1:10000	5 % TBST-M
<b>Sekundärantikörper</b>			
anti-mouse IgG HRP-conjugated (#NA931-1ML, GE Healthcare)	Schaf	1:10000	5 % TBST-M
anti-rat IgG HRP-conjugated (#NA9350, GE Healthcare)	Ziege	1:5000	0.5 % BSA/ 2.5 % TBST-M

### 3.5.6 Wiederverwenden der Western-Blot Membran

Nach dreimal 10-minütigem Waschen der Membran in TBST wurde die Membran zweimal 10 Minuten bei Raumtemperatur in Strippuffer inkubiert. Nach nochmals dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran bei 4° C gelagert oder wie in **Abschnitt 3.5.5** beschrieben weiterbehandelt.

## 3.6 EXPRESSIONSANALYSE DURCH REAL-TIME RT-PCR

### 3.6.1 RNA-Extraktion aus Zelllinien

Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde mit dem TRIzol<sup>®</sup> LS reagent (#10296-028, Invitrogen) extrahiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen und dann in 1,5 ml Trizol pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit einem Zellschaber abgekratzt. Die RNA wurde nach einem Standard Phenol/Chloroform Extraktions-Protokoll isoliert, indem zuerst 1/5 des Volumens an Chloroform zugegeben, dann gevortext, 15 Minuten bei 2900 x g abzentrifugiert und danach aus der oberen Phase mit demselben Volumen Isopropanol die RNA für eine Stunde bei -20°C gefä llt wurde. Daraufhin wurde wieder 15 Minuten bei 20800 x g und 4°C abzentrifu giert, das Pellet einmal mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

### 3.6.2 RNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe

Gesamt-RNA aus formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem Gewebe wurde aus 8 µm Schnitten wie zuvor beschrieben extrahiert [152]. Die Schnitte wurden durch zweimaliges Baden in Xylol für 10 Minuten entparaffiniert und durch Waschen in 100, 90 und 70 % Ethanol, Spülen mit RNase-freiem Wasser und Baden in TE-Puffer rehydriert. Die Schnitte wurde mithilfe eines Referenzschnitts, der mit einem Hypoxie-spezifischen Pimonidazol-Antikörper

immunhistochemisch gefärbt wurde, makrodisseziert (siehe **Abb. 3.1**). Das Gewebe wurde in 200 µl Lysepuffer aufgenommen und mit 25 µl Proteinase K versetzt. Die Lyse erfolgte bei 60° C für 16 Stunden oder bis das gesamte Gewebe gelöst war. Die RNA wurde nach einem Standard Phenol/Chloroform Extraktionsprotokoll isoliert (ein Volumen an Phenol pH 4,5, ein halbes Volumen an Chloroform/ Isoamylalkohol (25:1)) und durch Zugabe von einem Volumen an Isopropanol eine Stunde bei -20° C gefällt. Nach Waschen mit eiskaltem 70 % Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet, in 20 µl Aqua dest. gelöst und die RNA bei -80° C gelagert.

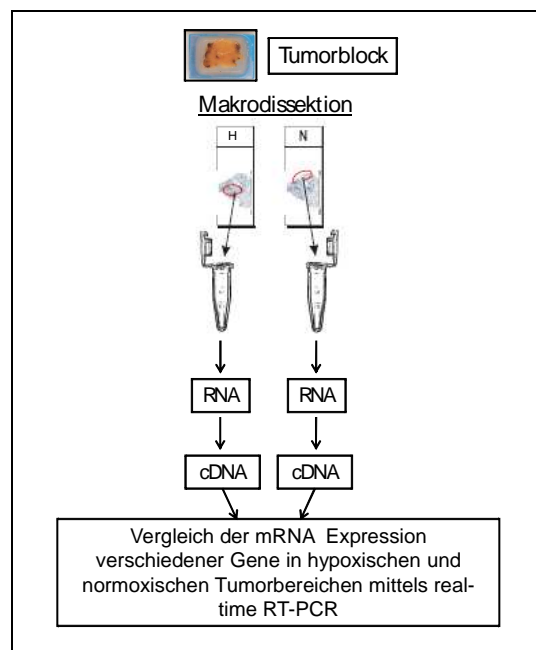
### RNA Lysepuffer

10 mM Tris/HCL pH 8,0

0,1 mM EDTA pH 8,0

2 % SDS pH 7,3

500 µg/ml Proteinase K (#03115887001, Roche Diagnostics)



**Abb. 3.1:** Schema der RNA Isolierung aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe. Von ungefärbten Schnitten eines Tumorblocks wurden mittels Makrodissektion auf Referenzschnitten markierte Bereiche abgekratzt. Auf den Referenzschnitten wurden zuvor immunhistochemisch normoxische (N) und hypoxische (H) Bereiche mithilfe eines Pimonidazol-Antikörpers bestimmt. Die daraus gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels TaqMan real-time RT-PCR die Expression verschiedener Gene in den Bereichen miteinander verglichen.

### 3.6.3 Reverse Transkription

cDNA aus Zelllinien wurde durch reverse Transkription mit der SuperScript II reversen Transkriptase (#18064-014, Invitrogen) in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 1 µg RNA eine Stunde bei 42°C hergestellt.

RNA aus formalin-fixiertem, Paraffin eingebettetem Gewebe wurde in derselben Weise in cDNA umgeschrieben, dabei wurden jedoch 10 µl der RNA-Lösung verwendet.

### 3.6.4 Quantitative real-time RT-PCR

Die Expressionsanalyse der mRNA-Mengen von  $\beta$ -actin, 18S rRNA, Slug, Snail, E-cadherin, Glut1 und Vegf mittels real-time RT-PCR wurde mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System Gerät und der dazugehörigen Software (PE Applied Biosystems Inc) durchgeführt. Intron-überspannende Primer und Probes für das TaqMan<sup>®</sup> System wurden mit der Primer Express Software (Perkin Elmer) designt. Die Sequenzen der PCR Primer Paare und TaqMan<sup>®</sup> Probes sind in **Tab. 3.2** gezeigt. Die TaqMan<sup>®</sup> Probes wurden bei PE Applied Biosystems hergestellt. Der Reaktionsansatz für die real-time RT-PCR bestand aus 10 µl TaqMan<sup>®</sup> Universal MasterMix (#4305719, PE Applied Biosystems), 5 µl verdünnter cDNA, 300 nmol/l von jedem Primer und der Probe, in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Nach zweiminütiger Uracil *N*-Glykosylase Spaltung bei 50° C wurde die AmpliTaq Gold durch eine zehnminütige Inkubation bei 95° C aktiviert. Jeder der 40 PCR-Zyklen umfasste 15 Sekunden Denaturierung bei 95° C und eine Minute Hybridisierung der Probe und Primer bei 60° C.

**Tab. 3.2: Sequenz der verwendeten TaqMan Primer und Probes**

Oligo	Acc. Number	Sequenz 5'- 3'	Größe des PCR-Produkts
$\beta$ -actin fw		CCTGGCACCCAGCACAAAT	
$\beta$ -actin rev	NM_001101	AGTACTCCGTGTGGATCGGC	70 bp
$\beta$ -actin P		ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC	

Oligo	Acc. Number	Sequenz 5'- 3'	Größe des PCR-Produkts
GLUT1 fw		GCTCATCAACCGCAACGAG	
GLUT1 rev	NM_006516	CAGCTGTCCC GCGCA	61 bp
GLUT1 RNA P		AGAACCGGGCCAAGAGTGTGCTAAAGAAG	
VEGF fw		CGCAAGAAATCCCGGTATAAGT	
VEGF rev	NM_001025366	TGCTTTCTCCGCTCTGAGC	65 bp
VEGF P		TGGAGCGTTCCTGTGGGCC	
E-cad fw		GAACAGCACGTACACAGCCCT	
E-cad rev	NM_004360	GCAGAAGTGTCCCTGTTCCAG	76 bp
E-cad P		ATCATAGCTACAGACAATGGTTCTCCAGTTGCT	
Snail fw		TGCAGGACTCTAATCCAAGTTTACC	
Snail rev	NM_005985	GTGGGATGGCTGCCAGC	71 bp
Snail P		TCCAGCAGCCCTACACCAGGCC	
Slug fw		TGTGTGGACTACCGCTGC	
Slug rev	NM_003068	TCCGAAAAGAGGAGAGAGG	63 bp
Slug P		TTCCACGCCCAGCTACCCAATG	
18S rRNA fw		CCCTGTAATTGGAATGAGTCCAC	
18S rRNA rev	X03205	GCTGGAATTACCGCGGCT	89 bp
18S rRNA P		GAGGGCAAGTCTGGTGCC	

fw, forward Primer; rev, reverse Primer; P, Probe

### 3.6.5 Relative Quantifizierung der Expression

Relative Expressionlevel der Zielgene wurden mit der Standardkurvenmethode evaluiert. Dabei wurden Standard-cDNA Lösungen der Magenkarzinom-Zelllinie MDA-MB-435S, die mit einem Expressionsvektor für *E-cadherin* transfiziert war, seriell vierfach verdünnt (100-0,39) und in Duplikaten auf den Gehalt an Zielgenen und den Housekeeping-Genen 18S rRNA bzw.  $\beta$ -actin untersucht. Mit den erhaltenen Daten wurden Standardkurven für jedes Gen erstellt indem  $C_T$ -Werte gegen die relative Menge an Nukleinsäure aufgetragen wurden. Durch Auflösen nach der relativen Menge an Nukleinsäure beim Housekeeping-Gen und beim Zielgen und durch Division von Zielgen durch Housekeeping-Gen ergab sich die relative Genexpression.

### 3.7 EXPRESSIONSANALYSE ÜBER MICROARRAYS

Die mRNA Expression in unbehandelten und in 1 % Sauerstoff (48 h) inkubierten Ishikawa-Zellen wurde mit Agilent "Whole Human genome (4 x 44K) Oligo Microarrays" und der "Genespring GX" Software in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde spektrophotometrisch mit dem Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies) bestimmt. Die RNA Integrität wurde mit dem Agilent *Bioanalyzer* auf RNA *NanoChips* überprüft. Cy3 Fluoreszenz-markierte cRNA wurde aus 1 µg Gesamt-RNA mithilfe des Agilent *Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit* gewonnen. Die markierte cRNA wurde über *RNeasy mini columns* (Qiagen) aufgereinigt. Die cRNA Konzentration, Cy3 Aufnahme und Reinheit wurde spektrophotometrisch mit dem Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies) und die Länge des amplifizierten Produkts mit dem Agilent *Bioanalyzer* bestimmt. Gleiche Mengen (1,65 µg) gereinigter Cy 3 markierter cRNA wurden für 17 Stunden bei 65° C mit den *Whole human Genome Microarrays* hybridisiert. Die Mikroarrays wurden mit dem Agilent *Microarray Scanner* gescannt und die Bildgebung mit dem *Feature Extraction Software* Paket erzielt. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Arrays zu erzielen wurden die Daten auf die jeweiligen Durchschnitts-intensitätswerte der Arrays normalisiert. Die Expressionsänderung wurde über den Quotienten von Expression in hypoxischen zur Expression in normoxischen Zellen ermittelt. Die Daten wurden einem t-Test unterzogen. Diese Arbeiten wurden in Kollaboration mit Dr. Holger Laux (St. George's University of London, Ion Channels and Cell Signalling Centre, Division of Basic Medical Sciences, UK) durchgeführt.

## 3.8 GEWEBE

### 3.8.1 Induktion der Tumorbildung in Nacktmäusen

Weibliche CD1-nude Mäuse (CrI:CD1-Foxn1nu, Charles River Laboratories) wurden im Tierstall der Nuklearmedizinischen Klinik der TU München gehalten. In einem Alter von sechs bis acht Wochen wurden den Mäusen ca  $1 \times 10^7$  Zellen der Zelllinien A431 oder Ishikawa in 150  $\mu$ l PBS in die Schulterpartien injiziert. Das Tumorwachstum wurde beobachtet, und bei einer Größe von mindestens 15 mm wurden die Tumoren entfernt. Eine Stunde vor Herausschneiden der Tumoren wurde den Mäusen intraperitoneal 1,5 mg Pimonidazol (#HP2-1000, Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 Plus Kit, Chemicon) in 200  $\mu$ l NaCl injiziert. Pimonidazol bildet in hypoxischen Bereichen Proteinaddukte, die mit dem Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 Plus Kit immunhistochemisch angefärbt werden können. Die Tiere wurden vor dem Entfernen der Tumoren getötet. Diese Tierexperimente wurden von Frau Dr. Roswitha Beck und Frau Dr. Janette Carlsen in der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München nach den Richtlinien zum Umgang mit lebenden Tieren in wissenschaftlichen Studien und dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

### 3.8.2 Klarzelliges Nierenzellkarzinom

Eine Anzahl von 16 formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten Gewebeproben klarzelliger Nierenzellkarzinome wurde aus der Patientendatenbank des Instituts für Pathologie der TU München ausgesucht. Alle Gewebeproben stammten aus dem Jahr 2003, acht Proben von weiblichen, acht Proben von männlichen Patienten. Die Proben wurden aufgrund ihrer großen Menge an Tumormaterial ausgewählt. Die Tumorbereiche wurden von der Pathologin Dr. Frauke Neff an H&E-Färbungen mit einem Folienstift für die Extraktion von RNA und Protein markiert.

### 3.8.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Das entnommene Gewebe wurde zunächst routinemäßig in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Isopropanol, Xylol) entwässert, in 4 % Formalin für 24 h fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die Proteinextraktion wurden 10 µm, für die RNA-Extraktion 8 µm dicke Schnitte und für Immunhistochemie und HE-Färbung wurden 3 µm dicke Schnitte hergestellt, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 55° C getrocknet.

## 3.9 IMMUNOHISTOCHEMIE

### 3.9.1 Immunhistochemische Analysen

3 µm Schnitte von formalin-fixiertem, paraffin-eingebettetem Gewebe wurden wie zuvor beschrieben immunhistochemisch analysiert [153]. Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Um die Antigene zu demaskieren wurden sie für vier Minuten in Citratpuffer (für Snail mit 0,1 % Tween) im Schnellkochtopf gekocht und anschließend wieder in PBS abgekühlt. Durch 15 minütige Inkubation mit 1 % Wasserstoffperoxid wurden endogene Peroxidasen geblockt. Bei Snail wurde stattdessen mit 3 % Ziegen-Normalserum (#S-1000, Vector) 20 Minuten nicht-spezifischer Hintergrund geblockt. Nach 3 mal 2 Minuten Waschen in PBS wurden die Schnitte mit je 100 µl Erstantikörperverdünnung wie in **Tab. 3.3** dargestellt inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 3 mal 2 Minuten Waschen in PBS entfernt und die Schnitte wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundäntikörper inkubiert (siehe **Tab. 3.3**). Gleichzeitig wurde der Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex angesetzt (Lösung A und Lösung B 1:50 verdünnt in PBS; aus Vectastain<sup>®</sup> Elite ABC-Kit, Vector) und ebenfalls 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (entfällt bei Hypoxyprobe). Nachdem der nicht gebundene sekundäre Antikörper durch Waschen in PBS entfernt worden war, wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Schnitte 10 Minuten bei Raumtemperatur in DAB (1 Sigma FAST<sup>™</sup> DAB und eine Sigma FAST<sup>™</sup> Urea H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Tablette in 5 ml destilliertem Wasser) inkubiert. Anschließend wurden die



Schnitte erneut in PBS gewaschen, für 10 Sekunden mit Hämatoxylin gefärbt, kurz in warmem Wasser gebläut, durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Pertex eingedeckt.

Tab. 3.3: Liste der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Inkubation
Snail (Dr. E. Kremmer, GSF, Munich)	Ratte	1:3000 in PBS/BSA	2 h RT
E-cadherin (#610182 BD Biosciences Pharmigen)	Maus	1:1500 in PBS/BSA	1 h RT
“anti-Pimonidazol” Hypoxyprobe™-1Mab1 FITC-labeled (#HP2-1000, Chemicon)	Maus	1:250 in TBS/BSA	30 min. RT
Vimentin (Clone V9) (#M0725, Dako)	Maus	1:3000 in Dako Antibody Diluent	30 min. RT
Sekundärantikörper			
anti-mouse IgG aus Vectastain Elite ABC kit (#PK-6102, Vektor)		1:200 in PBS/BSA	30 min. RT
anti-rat IgG aus Vectastain Elite ABC kit (#PK-6104, Vektor)		1:200 in PBS/BSA	30 min. RT
anti-FITC Mab Labeled with HRP (#HP2-1000, Chemicon)		1:50 in TBS/BSA	30 min. RT

**Albumin aus Rinderserum (BSA)** (#A3912-100G, Sigma-Aldrich)

### 3.9.2 Auswertung der Immunhistochemie

Intensität und Verteilung der spezifischen Färbung wurde von Frau Dr. Frauke Neff mit Hilfe eines semi-quantitativen Immunreaktivitäts-Score (IRS, Score 0-12) ausgewertet, der von Remmele and Stegner 1987 beschrieben wurde [154]. Der IRS Score errechnet sich durch Multiplikation der Färbeintensität (staining intensity, SI) und des Prozentsatzes positiver Zellen (percentage of positivity, PP). Genauer gesagt ist der SI abgestuft in 0 = keine Färbung, 1 = schwache Färbung, 2 = moderate Färbung, 3 = starke Färbung. Der PP ist bei 200 gezählten Zellen abgestuft in 0 = keine gefärbten Zellen, 1 = weniger als oder 10 % gefärbte Zellen, 2 = zwischen 11 und 50 % gefärbte Zellen, 3 = 51 - 80 % der Zellen sind gefärbt, 4 = mehr als 80 % der Zellen sind gefärbt.

Bei der E-cadherin-Färbung wurde nur eine membranständige Färbung als positiv gewertet, bei der Snail-Färbung nur eine nukleäre Färbung. Als starke Färbung wurden hier für E-cadherin Remmele Scores von 9 bis 12, als intermediäre Färbung von 5 bis 8 und als schwache Färbung von 0 bis 4 gewertet. Bei der Snail Färbung wurden Remmele Scores zwischen 3 und 4 als intermediäre Färbung und Werte zwischen 0 und 2 als schwache Färbung gewertet.

## 3.10 PROTEIN AUS FORMALIN-FIXIERTEM, PARAFFIN-EINGEBETTETEM GEWEBE

### 3.10.1 Proteinextraktion

Proteine aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe wurde wie zuvor beschrieben extrahiert [155]. Für die Proteinextraktion wurde Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe mit je drei mal 10 Minuten Xylol, zwei mal 10 Minuten 100 % Isopropanol, zwei mal 10 Minuten 96 % Ethanol und zwei mal 70 % Ethanol entparaffiniert und anschließend in destilliertem Wasser feucht gehalten. Vor der Extraktion wurden die Tumorbereiche anhand der HE-Färbung bzw. die normoxischen und hypoxischen Bereiche anhand einer anti-Pimonidazol-Färbung von einem erfahrenen Pathologen markiert. Der gekennzeichnete Bereich wurde von einem ungefärbten 10 µm dicken Schnitt mit einer Kanüle

abgekratzt und in einer geeigneten Menge Qproteome FFPE tissue kit Puffer (#37623, Qiagen) suspendiert. Die Gewebeschnitte wurden für fünf Minuten auf Eis inkubiert und gelegentlich mit einem Vortexer gemischt. Anschließend wurden sie für 20 min. im Wasserbad bei 100 °C erhitzt, für 2 h bei 80 °C und 750 rpm geschüttelt und zum Schluss 15 Minuten bei 4 °C und 16600 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei –20 °C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 1 µl der Extrakte in einen Bradford-Assay (siehe **Abschnitt 3.5.2**) eingesetzt.

### 3.10.2 Reverse Phase Protein Microarray

Mithilfe des BioOdyssey™ Calligrapher™ MiniArrayer (BioRad) und der dazugehörigen Software wurden die Proteinlysate der Tumor-Xenotransplantate in Triplikaten von Verdünnungsreihen auf FAST® Slide Nitrozellulose-Objektträger (#10484182, Schleicher&Schuell) gespottet. Die Proteinlysate der Nierenzellkarzinome wurden mit dem Handgerät „MicroCaster“ (#10485047, Whatman/Schleicher&Schuell) wie zuvor beschrieben in Quadruplikaten auf Nitrozellulose-Objektträger gespottet [155]. Die Gesamtproteinmenge wurde mithilfe des SYPRO® Ruby *protein blot stain* (#S11791, Invitrogen) bestimmt und zur Normalisierung der Färbeintensitäten der Antikörper verwendet. Vor der Antikörper-Inkubation wurden bei den Objektträgern zusätzlich zum Blocking endogene Peroxidasen mit der Dako REAL™ Peroxidase Blocking Solution (#S2023, Dako) geblockt. **Abb. 3.2** zeigt einen Beispiel-Proteinmicroarray mit vier Replikaten einer Probe in einer Verdünnungsreihe gespottet. Das linke Bild zeigt einen mit SYPRO® Ruby gefärbten Objektträger, das rechte einen mit einem Antikörper gegen Snail inkubierten Objektträger.

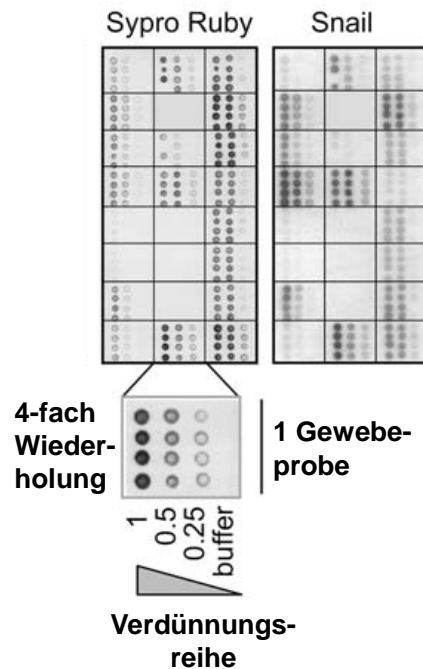


Abb. 3.2: Beispiel eines Reverse Phase Protein-Microarrays. Das linke Bild zeigt einen mit SYPRO® Ruby gefärbten Objektträger, das rechte einen mit einem Antikörper gegen Snail inkubierten Objektträger. Die Proben wurden in Quadruplikaten und in einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:2, 1:4, Puffer) aufgespottet. Modifiziert aus Hipp *et al.*, 2008 [156].

### 3.10.3 Quantifizierung von Protein Microarrays und Western Blots

Die Western Blots und Protein Microarrays wurden mit einer Auflösung von 600 bzw. 1200 dpi in Graustufen als tif-Datei eingescannt. Die Intensitäten der Schwärzung des Röntgenfilms wurden mit der Bildbearbeitungssoftware Scion Image (Scion Corporation) gemessen. Die Hintergrundkorrektur wurde über den 2D Rolling Ball (Radius 100 für Microarrays und 200 für Western Blots) durchgeführt. Die ermittelten Intensitäten wurden in Microsoft Excel kopiert und ausgewertet. Bei den Protein-Mikroarrays wurde von den Werten jeweils der Hintergrundwert abgezogen und es wurden Mittelwerte errechnet.

Zur statistischen Auswertung wurde die Standardabweichung (Stabwn) berechnet (siehe **Formel 3-1**).

$$\text{Stabwn} = \frac{n \sum X^2 - (\sum x)^2}{n^2}$$

Formel 3-1

n = Gesamtzahl der Messwerte

x = Messwert

### 3.11 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN

Die Daten wurden zur statistischen Auswertung mit der SPSS Software (SPSS GmbH) der Spearman rank Korrelation unterzogen und die Signifikanzgrenze mit dem Benjamini und Hochberg Verfahren angepasst. Hierarchische Clusteranalysen wurden mit der *Cluster und TreeView Software* durchgeführt [157]. Dabei wurde ein *Average Linkage Clustering* auf Basis der Spearman rank Korrelation ausgewählt.

Die RNA Microarray Daten wurden mittels t-Test statistisch ausgewertet.

### 3.12 HERSTELLERLISTE

Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Applied Biosystems (Applied Biosystems Corporation), Norwalk, CT, USA

Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

BD Biosciences, San Diego, CA, USA

BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA

Cambrex Corporation, East Rutherford, New Jersey, USA

Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA

Chemicon International, Temecula, CA, USA  
DakoCytomation, Glostrup, Denmark  
Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland  
GE Healthcare, Buckinghamshire, UK  
Gibco, Paisley, Scotland/UK  
Hartenstein, Würzburg/Versbach, Deutschland  
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland  
Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland  
Konica Minolta, München, Deutschland  
medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburg, Deutschland  
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
New England Biolabs, Ipswich, MA, USA  
PAA Laboratories, Pasching, Austria  
PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland  
PIERCE, Rockford, IL, USA  
Qiagen, Hilden, Deutschland  
Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland  
Schleicher&Schuell Bioscience, Dassel, Deutschland  
SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland  
Sigma-Aldrich, München, Deutschland  
SPSS Inc., Chicago, IL, USA  
Stratagene, La Jolla, CA, USA  
Stressgen, Victoria, BC, Canada  
Töpfer GmbH, Dietmannsried, Deutschland  
USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA  
Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA  
WTB Binder, Tuttlingen-Möhringen, Deutschland  
Zeiss, Jena, Deutschland

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 EINFLUSS VON HYPOXIE AUF DIE EXPRESSION VON E-CADHERIN, SNAIL UND SLUG IN ZELLINIEN

Um die Auswirkungen von Hypoxie auf die Expression von E-cadherin, Snail und Slug in Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen zum einen mit  $\text{CoCl}_2$  behandelt und zum anderen in 1 % Sauerstoff inkubiert. Untersucht wurde eine Endometrium-Adenokarzinom Zelllinie (Ishikawa), eine Magenkarzinom-Zelllinie (GC 2957) und eine Mammakarzinom-Zelllinie (MCF7).

$\text{CoCl}_2$  ist eine Substanz mit der sich Hypoxie nachahmen lässt, indem Hif-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen stabilisiert wird. Da  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung ein leicht zugängliches Modell für Hypoxie darstellt, wurden die Zellen zunächst mit dieser Substanz inkubiert. Um zu untersuchen, ob die Hif-1 Expression einen Einfluss auf die Expression des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-cadherin und der EMT-Regulatoren Snail und Slug hat, wurden die drei humanen Tumorzelllinien mit 400  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  behandelt. Aus diesen Zellen und aus Kontrollkulturen ohne  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung wurde zum Zeitpunkt 0, nach 12, 24 und 48 Stunden RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR die Expression der Zielgene verglichen. Um sicher zu stellen, daß Hif-1 $\alpha$  tatsächlich stabilisiert war, wurden die Hif-1-Zielgene Glut1 und Vegf untersucht. Die Expression des jeweiligen Zielgens wurde auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -actin normalisiert und die relative Expression durch Division der mRNA-Menge in behandelten Zellen durch die mRNA-Menge in unbehandelten Zellen errechnet. Zusätzlich wurden Proteinlysate zum Zeitpunkt 0, nach 12, 24 und 48 Stunden aus den Zellen gewonnen. Diese wurden mit Western-Blot-Analysen auf die Expression von Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin und Snail untersucht. Außerdem wurde auch die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin untersucht. Keine der Zelllinien exprimiert dieses Protein unter normoxischen Bedingungen und auch durch hypoxische Bedingungen konnte die Expression nicht induziert werden. Die Proteinexpression von Glut1, Vegf und Slug konnte nicht untersucht werden. Gegen diese Proteine wurde

auch nach intensiver Suche und Austestung kein spezifischer Antikörper gefunden, der unseren Qualitätsansprüchen genüge.

Um die Konditionen von Tumorphoxie besser widerspiegeln zu können, wurden die Zelllinien auch auf Veränderungen der Expression nach Inkubation in 1 % Sauerstoff untersucht. Dabei wurde wiederum zum Zeitpunkt 0, nach 12, 24 und 48 Stunden RNA aus den hypoxischen Zellen und Kontrollkulturen unter 21 % O<sub>2</sub> isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR auf den Gehalt an mRNA der Hypoxiemarker Glut1 und Vegf, des Zelladhäsionsmoleküls E-cadherin und der EMT-Regulatoren Slug und Snail untersucht. Die Untersuchungen wurden wie in obigem Abschnitt beschrieben durchgeführt. Aus Ishikawa-Zellen gewonnene RNA wurde zusätzlich durch RNA Microarrays untersucht, um die Auswirkungen von Hypoxie auf diese Zelllinie genauer zu untersuchen. Dabei wurde die Expression in hypoxischen und normoxischen Zellen nach 48 Stunden verglichen. Auch aus den in 1 % O<sub>2</sub> inkubierten Zellen wurden zum Zeitpunkt 0, nach 12, 24 und 48 Stunden Proteinlysate gewonnen und in Western-Blot Analysen auf die Expression von Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin und Snail untersucht.

Im Folgenden werden diese Ergebnisse - nach Zelllinien getrennt - im Einzelnen vorgestellt.

#### 4.1.1 Endometrium-Adenokarzinom Zelllinie Ishikawa

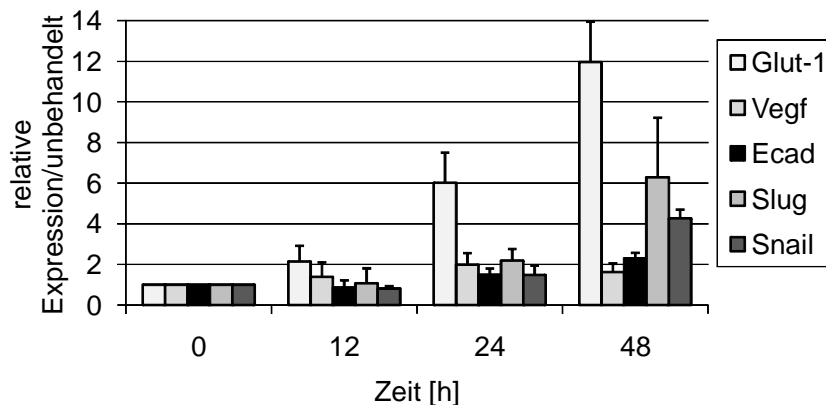
Verschiedene Gruppen haben in der Vergangenheit einen Zusammenhang zwischen der Entstehung oder dem Verlauf von Endometriumkarzinomen und Hypoxie gezeigt. So schrieben Pijnenborg *et al.* der Hif-1 $\alpha$ -Proteinexpression eine Rolle bei der Entstehung von Endometriumkarzinom-Rezidiven zu [158]. Eine andere Gruppe hat gezeigt, daß die Hif-1 $\alpha$ -Expression vom normalen Endometrium, über prämalignes Gewebe bis hin zum endometrioiden Adenokarzinom ansteigt, und postuliert deshalb eine wichtige Rolle für Hypoxie in der Entstehung solcher Tumoren [159]. Außerdem scheint der EMT-Regulator Snail Einfluß auf die Progression von endometrioiden Adenokarzinomen zu haben [160]. Ishikawa ist eine Endometrium-Adenokarzinom Zelllinie, die epitheliale Eigenschaften wie E-cadherin-Expression und starke Zell-Zellkontakte besitzt. Blechschmidt *et al.* konnten außerdem in *Wound-healing-assays* zeigen, daß eine Variante dieser Zelllinie, die Snail exprimiert, ein höheres Migrationspotential besitzt als die Snail-negativen Ishikawa-Zellen [160]. Diese Zelllinie bietet deshalb ein ideales



Modell, um die Auswirkungen von Hypoxie auf die Tumorprogression durch mögliches Auslösen von EMT zu untersuchen.

### Hif-1 $\alpha$ -Stabilisierung durch Behandlung mit CoCl<sub>2</sub>

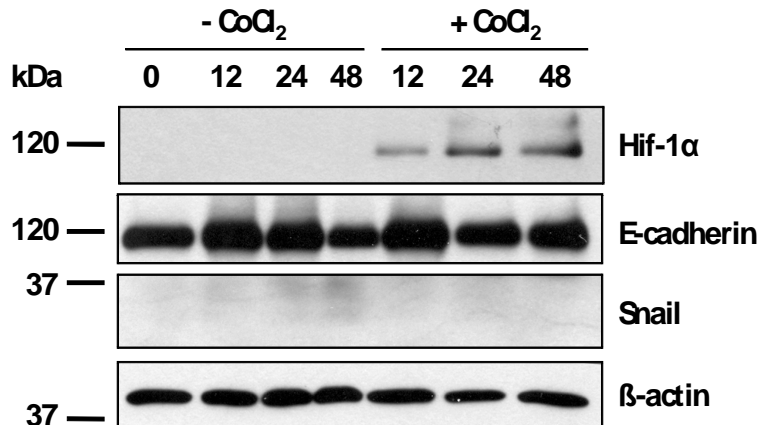
Bei der Endometrium-Karzinom Zelllinie Ishikawa bewirkte die Behandlung mit 400  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> einen kontinuierlichen Anstieg der Glut1 **mRNA-Expression** (siehe **Abb. 4.1**). Die Vegf Expression war weniger deutlich erhöht. Die Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-cadherin verlief von unverändert (12h) über leicht erhöht (24h) bis zu 2-fach erhöht zum Zeitpunkt 48 Stunden. Slug wurde nach 12-stündiger CoCl<sub>2</sub>-Behandlung unverändert, nach 24 Stunden 2-fach erhöht und nach 48 Stunden 6-fach erhöht in behandelten Ishikawa-Zellen exprimiert. Die Snail Expression war zunächst unverändert, nach 24 Stunden leicht erhöht und nach 48 Stunden 4-fach erhöht.



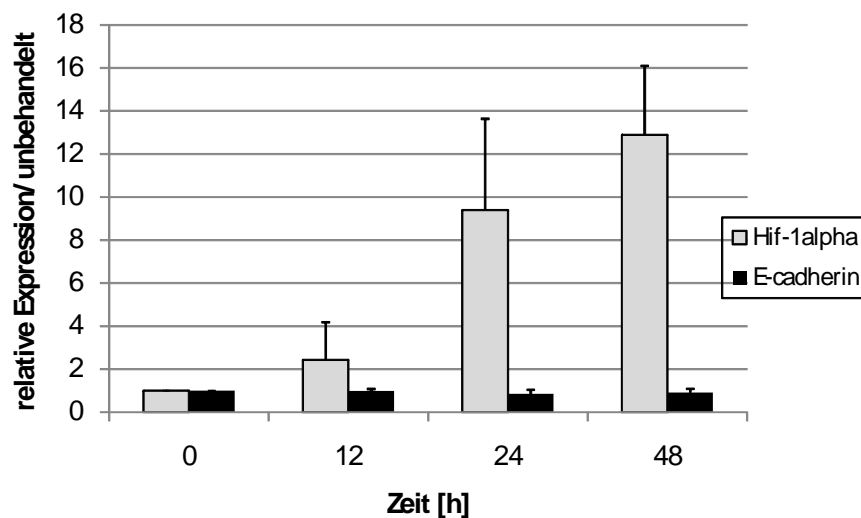
**Abb. 4.1:** Relative mRNA-Expression der Gene Glut1, Vegf, E-cadherin, Slug und Snail in der Endometrium-Adenokarzinom Zelllinie Ishikawa. Gezeigt ist das Verhältnis der Expression in CoCl<sub>2</sub>-behandelten zu unbehandelten Zellen, jeweils normalisiert auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -actin. Der Mittelwert aus Triplikaten ist mit der Standardabweichung dargestellt. Die Expression wurde zum Zeitpunkt 0, 12, 24 und 48 Stunden nach CoCl<sub>2</sub>-Zugabe mittels TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR untersucht.

Die **Proteinexpressionen** von Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin, Snail und  $\beta$ -actin (als Housekeeping-Protein) wurde in drei unabhängigen Experimenten untersucht. **Abb. 4.2** zeigt einen repräsentativen Western-Blot dieser Experimente. Wie bereits erwähnt konnten mangels verlässlicher Antikörper Glut1, Vegf und Slug nicht auf Proteinebene untersucht werden. Ishikawa-Zellen reagierten auf die

CoCl<sub>2</sub>-Behandlung zwar mit einem deutlichen Anstieg der Hif-1α-Expression, E-cadherin wurde jedoch nahezu unverändert exprimiert. Snail wurde in Ishikawa-Zellen auf Proteinebene nicht exprimiert. Die semi-quantitative Auswertung dieser Western-Blots zeigt **Abb. 4.3**.



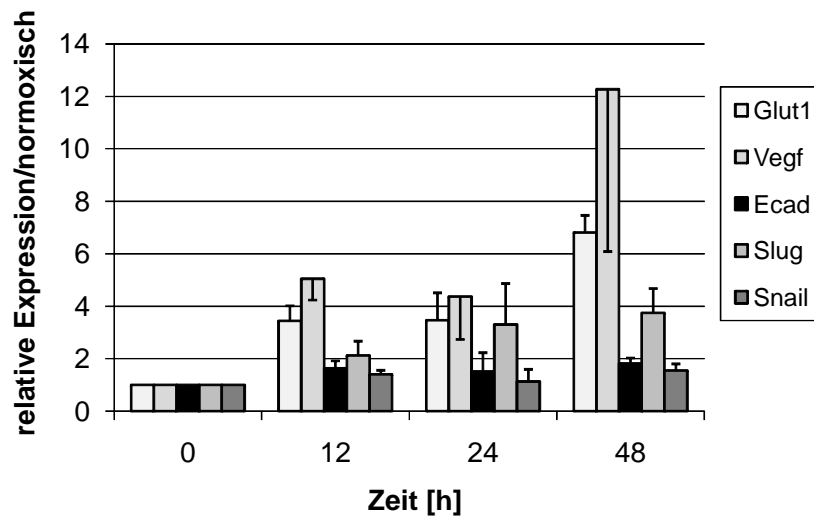
**Abb. 4.2:** Western-Blot von Proteinlysaten un behandelter und CoCl<sub>2</sub>-behandelter Ishikawa-Zellen nach 0, 12, 24 und 48 Stunden. Hif-1α wird nur in behandelten Zellen exprimiert, E-cadherin bleibt zu allen Zeitpunkten relativ unverändert. Snail wird in dieser Zelllinie auf Proteinebene überhaupt nicht exprimiert. Als Housekeeping-Protein wurde β-actin mit untersucht.



**Abb. 4.3:** Semiquantitative Analyse der Proteinexpression von Hif-1α und E-cadherin in Ishikawa-Zellen in Reaktion auf Behandlung mit 400 μM CoCl<sub>2</sub>. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression in behandelten Zellen zur Expression in unbehandelten Zellen, jeweils normalisiert auf β-actin. Die Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten an, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Inkubation in 1 % O<sub>2</sub>

In Ishikawa-Zellen waren die Hypoxiemarker Glut1 und Vegf unter hypoxischen Bedingungen auf **RNA-Ebene** überexprimiert (siehe **Abb. 4.4**). E-cadherin und Snail wurden in Ishikawa-Zellen unter 1 % O<sub>2</sub> leicht verstärkt exprimiert im Vergleich zu Zellen unter 21 % O<sub>2</sub> (1,5- bis 1,8-fach). Slug wurde über die Zeit unter hypoxischen Bedingungen immer stärker exprimiert (2- bis 4-fach).



**Abb. 4.4:** Relative mRNA-Expression der Gene Glut1, Vegf, E-cadherin, Slug und Snail in der Endometrium-Adenokarzinom Zelllinie Ishikawa nach Inkubation in 1 % O<sub>2</sub>. Gezeigt ist das Verhältnis der Expression in hypoxischen zu normoxischen Zellen, jeweils normalisiert auf das Housekeeping-Gen β-actin. Die Expression wurde zum Zeitpunkt 0, 12, 24 und 48 Stunden nach Start des Experiments mittels TaqMan® real-time RT-PCR untersucht. Die Werte ergaben sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

**Abb. 4.5** zeigt ein Beispiel einer Western-Blot Analyse von Proteinlysaten der Zelllinie Ishikawa unter 21 % und 1 % O<sub>2</sub> aus drei unabhängigen Experimenten. Gezeigt ist hier die **Proteinmenge** von Hif-1α, E-cadherin, Snail und von β-actin als Housekeeping-Protein. In **Abb. 4.6** ist die semiquantitative Auswertung von Western-Blots dieser Experimente dargestellt. Hif-1α war unter 1 % O<sub>2</sub> nach 12 Stunden am deutlichsten überexprimiert (6-fach), nach 24 Stunden noch 3-fach und nach 48 Stunden noch doppelt so hoch wie in normoxischen Zellen. Die E-cadherin Proteinmenge zeigte ebenfalls nach 12 Stunden die deutlichste Reaktion, sie war in hypoxischen Zellen auf 44 % im Vergleich zu normoxischen Zellen gesunken. Nach 24 Stunden war sie nur noch auf 70 % erniedrigt, nach 48 Stunden war sie in hypoxischen Zellen unverändert. Snail wurde in diesen Zellen überhaupt nicht exprimiert.

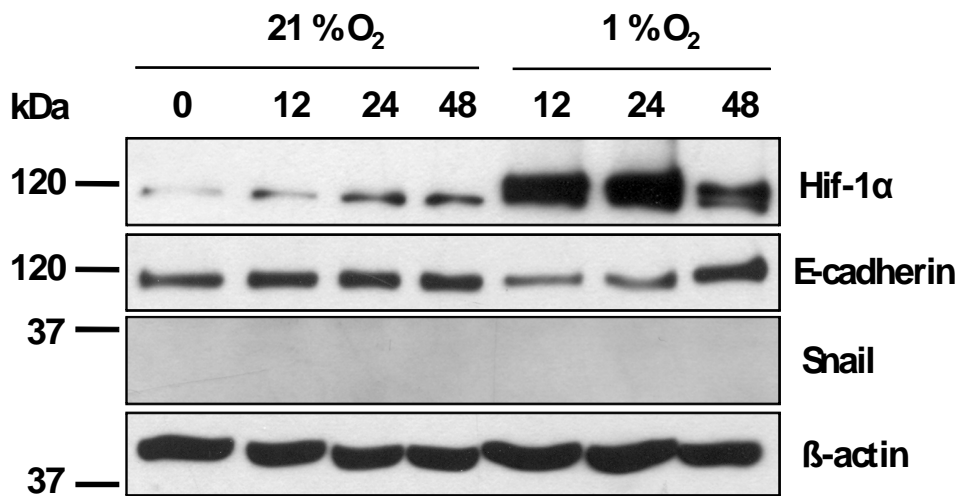


Abb. 4.5: Western-Blot Analyse von Zelllysaten der Zelllinie Ishikawa und deren Reaktion auf Inkubation bei 1 % O<sub>2</sub>. Untersucht wurde die Expression von Hif-1α, E-cadherin, Snail und als Housekeeping-Protein β-actin zum Zeitpunkt 0 und nach 12, 24 und 48 Stunden.

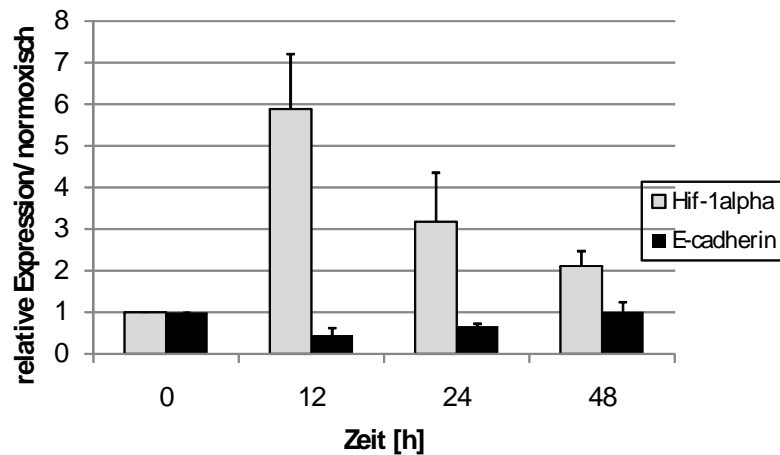
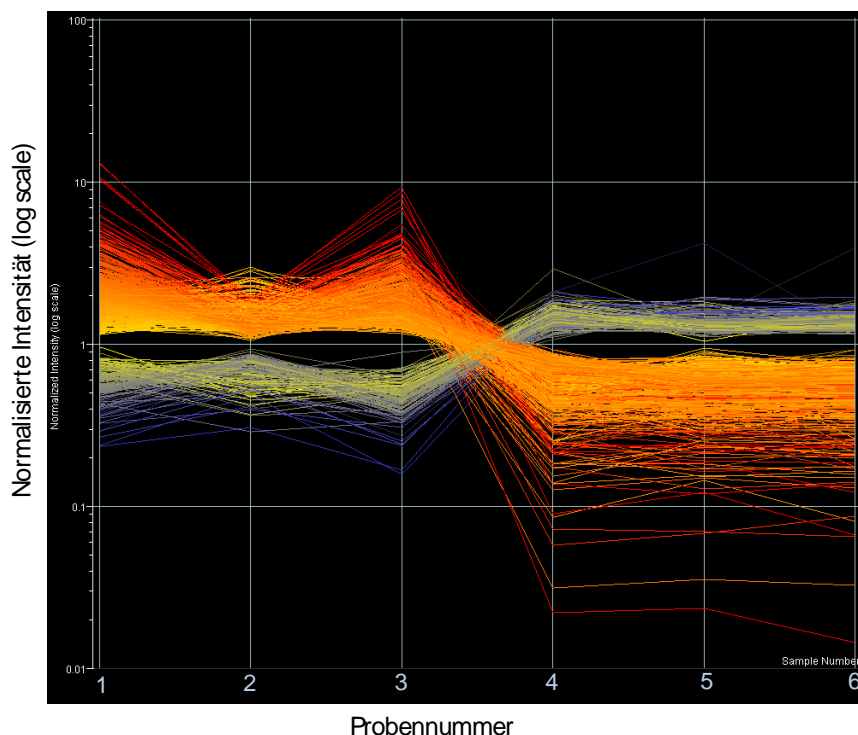


Abb. 4.6: Semiquantitative Analyse der Proteinexpression von Hif-1α und E-cadherin in Ishikawa-Zellen in Reaktion auf Inkubation in 1 % O<sub>2</sub>. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression in hypoxischen Zellen zur Expression in normoxischen Zellen, jeweils normalisiert auf β-actin. Die Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten an, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Um einen umfassenderen Überblick über die Einflüsse von Hypoxie auf die Genexpression in Ishikawa-Zellen zu erhalten wurde aus normoxischen und hypoxischen Zellen gewonnene RNA auch mit **RNA-Microarrays** (Agilent Technologies) analysiert. Die Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Holger Laux (St. George's University of London, Ion Channels and Cell Signalling Centre, Division of Basic Medical Sciences, UK) durchgeführt. RNA aus drei unabhängigen Experimenten wurde untersucht. **Abb. 4.7** zeigt den Linegraphen der drei Replikate, in dem die differentielle Expression in den hypoxischen (Proben 1-3) und den normoxischen (Proben 4-6) Ishikawa-Zellen dargestellt ist. Der Linegraph zeigt, daß die Daten der drei Experimente sehr gut übereinstimmen, und daß die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist. Zunächst sollte festgelegt werden, welche Gene als differentiell exprimiert angesehen wurden. Als Ausschlußgrenze für „differentiell exprimierte“ Gene wurde ein Quotient der Expression in hypoxischen Zellen zu der Expression in normoxischen Zellen von 1,5 bzw. 0,67 gewählt. Bei dieser Ausschlußgrenze waren über 1400 Gene in hypoxischen Zellen differentiell exprimiert. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in **Tab. 4.1** zusammengefasst.



**Abb. 4.7:** Der Linegraph der Mikroarray-Analysen zeigt die differentielle Expression der untersuchten Gene in den hypoxischen Proben (1-3) und in den normoxischen Proben (4-6). Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten stimmen gut überein.

Tab. 4.1: Auswahl von Ergebnissen der Microarrays von hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Ishikawa-Zellen

Gen Ontologie	x-fache Expression in Hypoxie	Genname	Acc. Nummer	p-Wert
<b>Hypoxie</b>	208,6	CA9	NM_001216	0,0017
	5,439	CA12	NM_001218	0,0159
	16,82	CXCR4	NM_001008540	0,0109
	4,577	GLUT1	NM_006516	0,0008
	5,196	VEGF	AF022375	0,0383
<b>Glycolyse</b>	18,65	ALDOC	NM_005165	0,0025
	4,817	LDHA	NM_005566	0,0048
<b>Angiogenese</b>	65,88	ANGPTL4	NM_016109	0,0133
	2,284	CYR61	NM_001554	0,0084
	39,13	EDN2	NM_001956	0,0185
<b>Zell-Zelladhäsion</b>	0,449	AMBP	NM_001633	0,0469
	1,532	<b>CDH1</b>	NM_004360	0,0057
	3,965	CDH23	NM_022124	0,0199
	2,336	FLRT3	NM_198391	0,0145
	5,027	JAM2	NM_021219	0,0286
	7,927	LOX	NM_002317	0,0068
	6,241	LOXL2	NM_002318	0,0134
	0,565	PCDH20	NM_022843	0,0233
	2,314	SAP30	NM_003864	0,0053
	1,548	<b>SNAI1</b>	NM_005985	0,0008
<b>Zellmotilität</b>	1,526	<b>SNAI2</b>	NM_003068	0,0998
	20,04	ANK1	NM_000037	0,0013
	3,4	FSCN1	NM_003088	0,0056
	2,527	LAMB3	NM_001017402	0,0037
	2,385	MMP25	NM_022718	0,0104
<b>Signalwege</b>	3,975	VIM	NM_003380	0,0049
	8,025	ASCL2	NM_005170	0,0040
	3,684	DACT2	NM_214462	0,0419
	4,482	DTX1	NM_004416	0,0331
<b>Signalwege</b>	0,427	IL4	NM_000589	0,0288
	8,025	IL17RB	NM_172234	0,0036
	2,302	SMAD7	NM_005904	0,0005
	2,047	SMAD9	NM_005905	0,0333
	2,743	SOCS2	NM_003877	0,0317
	9,841	WISP2	NM_003881	0,0107

Gen Ontologie	x-fache Expression in Hypoxie	Genname	Acc. Nummer	p-Wert
<b>Apoptose</b>	65,88	ANGPTL4	NM_016109	0,0133
	13,03	BNIP3	NM_004052	0,0011
	0,491	CASP9	NM_001229	0,0393
	3,894	TERT	NM_003219	0,0227
	2,034	TNFAIP3	NM_006290	0,0193
<b>Tumorbiologie</b>	3,523	BCL6	NM_138931	0,0499
	3,349	JUN	NM_002228	0,0049
	2,41	JUNB	NM_002229	0,0166
	2,485	PDGF-A	X06374	0,0003
	2,176	TGFA	NM_003236	0,0113

In jedem Fall zeigten bekannte **Hypoxie-regulierte Gene**, daß in dem untersuchten System tatsächlich Hypoxie herrschte. So war das am stärksten regulierte Gen die Carbonic Anhydrase 9 (CA9, 208-fach überexprimiert in hypoxischen Zellen). VEGF (*vascular endothelial growth factor*) war in hypoxischen Ishikawa-Zellen 5-fach überexprimiert, GLUT1 (*solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1*) 4,5-fach. Auch das bekannte Hif-1-Zielgen CXCR4 (*chemokine (C-X-C motif) receptor 4*) war in hypoxischen Zellen höher exprimiert (ca. 17-fach). Gene, die bei der Glykolyse eine Rolle spielen, sind für ihre Hypoxie-induzierbarkeit bekannt und waren auch in großer Zahl in hypoxischen Zellen überexprimiert, darunter zum Beispiel Aldolase C (ALDOC, ca. 19-fach) und Lactat Dehydrogenase A (LDHA, ca. 5-fach). Gapdh war in hypoxischen Zellen 2,8-mal so stark exprimiert wie in normoxischen Zellen.

Auch **Angiogenese-Regulatoren** werden durch Hypoxie beeinflusst. Hier war ANGPTL4 (*angiopoietin-like 4, transcript variant 2*) in hypoxischen Zellen ca. 66-fach im Vergleich zu normoxischen Zellen exprimiert. Endothelin 2 (EDN2) wurde in hypoxischen Ishikawa-Zellen 39-fach überexprimiert und der Angiogenese-Induktor CYR61 (*cysteine-rich, angiogenic inducer, 61*) ca. 2-fach.

Die mRNA-Mengen von **Snail und Slug** waren in hypoxischen Zellen 1,5-fach erhöht im Vergleich zu normoxischen Zellen. Das gleiche gilt für **E-cadherin**.

Einige andere Gene, die bei der **Zelladhäsion** eine Rolle spielen, waren in hypoxischen Ishikawa-Zellen differentiell exprimiert. LOXL2, welches mit Snail bei der E-cadherin-Repression interagiert und kooperiert und möglicherweise Snail stabilisiert [161], war in hypoxischen Zellen 6-fach überexprimiert. Auch

LOX, ein naher Verwandter von LOXL2, war in hypoxischen Zellen höher exprimiert als in normoxischen (ca. 8-fach). Wie bereits erwähnt kooperiert SIN3A mit Snail bei der Repression von E-cadherin. Das SIN3A-assoziierte Protein SAP30 (*sin3-associated polypeptide*, 30 kDa) war in hypoxischen Zellen doppelt so hoch exprimiert wie in normoxischen. Die Zelladhäsionsproteine PCDH20 (Protocadherin 20) und AMBP (*alpha-1-microglobulin/bikunin precursor*) wiesen in hypoxischen Zellen eine halb so große mRNA-Menge auf wie in normoxischen Zellen. Andere Adhäsionsmarker hingegen waren in hypoxischen Zellen stärker exprimiert als in normoxischen Zellen. So war CDH23 (*Cadherin-like 23*) 4-fach, das am Aufbau von „tight junctions“ beteiligte JAM2 (*junctional adhesion molecule 2*) 5-fach und FLRT3 (*fibronectin leucine rich transmembrane protein 3*), das eine Rolle bei der Zelladhäsion und der Signaltransduktion zu spielen scheint, ca. 2-fach in hypoxischen Zellen exprimiert.

Auch Gene, die bei der **Zellmotilität** eine Rolle spielen, waren in hypoxischen Ishikawa-Zellen differentiell exprimiert. So war der mesenchymale Marker Vimentin (VIM) ca. 4-fach, das Actin-bündelnde Fascin (FSCN1) ca. 3-fach unter hypoxischen Bedingungen überexprimiert. Die mRNA-Menge von Laminin-beta3 (LAMB3) war in hypoxischen Zellen 2,5-fach erhöht, die von MMP25 (*matrix metalloproteinase 25*) 2,4-fach. Das unter anderem an Vimentin bindende Protein ANK1 (*ankyrin 1, erythrocytic transcript variant 3*), welches Membranstrukturen mit dem Cytoskelett verbindet, war in hypoxischen Zellen 20-fach überexprimiert.

Mitglieder von **Signalwegen**, die normalerweise in der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen und deren Deregulation zur Tumorentstehung und -progression beitragen, zeigten sich in diesen Microarray-Analysen als in Hypoxie differentiell exprimiert. So waren zwei Mitglieder des WNT-Signalweges, WISP2 (*WNT1 inducible signaling pathway protein 2*) und DACT2 (*dapper homolog 2, antagonist of beta-catenin (Xenopus)*) in hypoxischen Zellen vermehrt exprimiert (ca. 10- bzw. 4-fach). Auch Proteine des Notch-Signalweges wurden in hypoxischen Zellen überexprimiert, wie zum Beispiel ASCL2 (*achaete-scute complex-like 2 (Drosophila)*, 8-fach) und DTX1 (*deltex homolog 1 (Drosophila)*, 4,5-fach). SMAD7 und SMAD9 (*mothers against DPP homolog 7 bzw. 9 (Drosophila)*) sind Beispiele für Gene, die im TGF- $\beta$ -Signalweg eine Rolle spielen und in hypoxischen Zellen ungefähr doppelt so hoch exprimiert wurden wie in normoxischen. Cytokin-Signale scheinen in diesen Zellen zum Teil negativ durch Hypoxie reguliert zu werden. So wurde SOCS2 (*suppressor of cytokine signaling 2*) in hypoxischen Ishikawa-Zellen ca. 3-fach exprimiert und die IL4-Expression (Interleukin 4) war auf 43 % vermindert. IL17RB (*interleukin 17 receptor B*), ein anderer Cytokin-Rezeptor, war hingegen unter hypoxischen Bedingungen 8-fach überexprimiert.



**Apoptose-assoziierte Gene** wurden in hypoxischen und normoxischen Ishikawa-Zellen ebenfalls differentiell exprimiert. Es wurden sowohl Gene induziert, die vor Apoptose schützen, wie zum Beispiel ANGPTL4 (*angiopoietin-like 4, transcript variant 2*, 66-fach), TNFAIP3 (*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*, 2-fach), TERT (*telomerase reverse transcriptase*, 4-fach) als auch Gene, die Apoptose induzieren können, wie zum Beispiel BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*, 13-fach). CASP9 (*caspase 9, apoptosis-related cysteine protease*), ein wichtiger Apoptosefaktor, war in hypoxischen Zellen auf 49 % der Expression in normoxischen Zellen herunterreguliert.

Auch einige **Tumor-assoziierte Gene** wurden in hypoxischen Ishikawa-Zellen verändert exprimiert. So waren die zwei Onkogene JUN und JUNB in hypoxischen Ishikawa-Zellen 2- bzw. 3-fach überexprimiert. Die Wachstumsfaktoren PDGF-A (*platelet-derived growth factor*) und TGFA (*transforming growth factor, alpha*) waren in hypoxischen Zellen 2,5- bzw. 2-fach erhöht exprimiert. Die mRNA-Menge von BCL6 (*B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51) transcript variant 2*) war in hypoxischen Zellen auf das 3,5-Fache erhöht.

Zusammengefasst zeigen die Daten aus den RNA-Microarrays, daß das System, hypoxische Bedingungen in Ishikawa-Zellen zu schaffen, funktioniert hat, da bekannte Hypoxie-regulierte Gene in den hypoxischen Zellen deutlich überexprimiert waren. Die mRNAs von Snail, Slug und E-cadherin waren hingegen nur leicht verändert exprimiert.

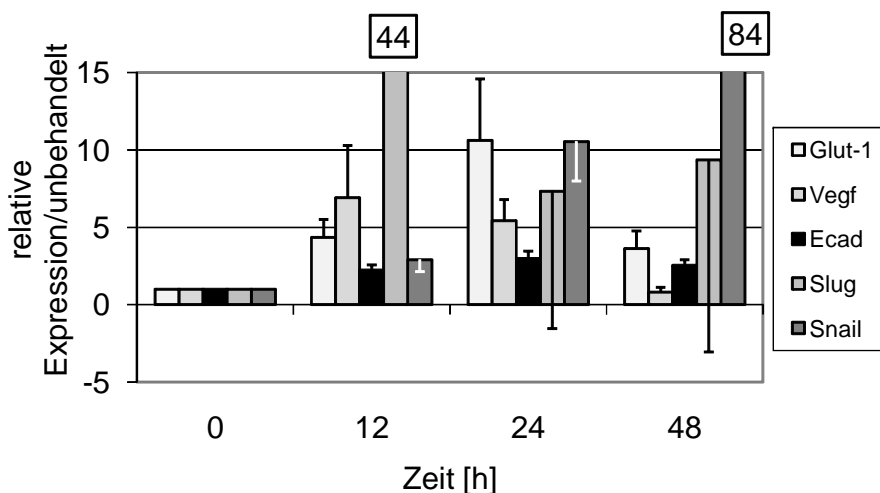
#### 4.1.2 Magenkarzinom Zelllinie GC 2957

In Magenkarzinomen konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Hypoxie und Tumorprogression gezeigt werden. Ma *et al.* haben einen signifikanten Zusammenhang zwischen Hif-1 $\alpha$ -Expression und der Tiefe der Invasion, der Invasion in Blutgefäße und dem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen in Magenkarzinomen gefunden [162]. In der Studie von Sumiyoshi *et al.* zeigte sich Hif-1 $\alpha$ -Expression sogar als unabhängiger Prognosefaktor für Patienten mit Magenkarzinomen [163]. Eine Rolle für EMT bei der Tumorprogression von Magenkarzinomen konnten Castro Alves *et al.* darlegen. In ihrer Studie korrelierte eine Slug Überexpression und die damit einhergehende E-cadherin Repression mit dem Auftreten von Fernmetastasen

und mit fortgeschrittenem pTNM *staging* [133]. Um nun den Zusammenhang zwischen Hypoxie und EMT in Magenkarzinomen genauer zu untersuchen, bot sich als Modell die Magenkarzinom-Zelllinie GC 2957 an. Sie bildet starke Zell-Zellkontakte, exprimiert E-cadherin auf RNA- und Proteinebene und Snail (und Slug) nur schwach auf RNA-Ebene.

#### Hif-1 $\alpha$ -Stabilisierung durch Behandlung mit CoCl<sub>2</sub>

Der Hypoxiemarker Glut1 wurde in den Magenkarzinom-Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach CoCl<sub>2</sub>-Zugabe auf **RNA-Ebene** vermehrt exprimiert (4- bis 10-fach, siehe **Abb. 4.8**). Vegf hingegen ging nach 48 Stunden in den CoCl<sub>2</sub>-behandelten Zellen wieder ungefähr auf das Level von unbehandelten Zellen zurück (0,8-fach), nachdem es nach 12 und 24 Stunden eine 7- bzw. 5-fache Expression gezeigt hatte. Die E-cadherin mRNA-Expression war in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zwischen 2- und 3-fach erhöht. Snail wurde in CoCl<sub>2</sub>-behandelten Zellen auf mRNA-Ebene erhöht exprimiert. Der EMT-Regulator Slug zeigte eine Tendenz dazu, unter CoCl<sub>2</sub>-Einfluss erhöht exprimiert zu werden. Die Variationsbreite war allerdings in den Triplikaten aus nicht bekannten Gründen sehr groß, so daß sich große Standardabweichungen ergaben.



**Abb. 4.8:** Relative mRNA-Expression der Gene Glut1, Vegf, E-cadherin, Slug und Snail in der Magenkarzinom-Zelllinie GC 2957. Gezeigt ist das Verhältnis der Expression in CoCl<sub>2</sub>-behandelten zu unbehandelten Zellen, jeweils normalisiert auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -actin. Der Mittelwert aus Triplikaten ist mit der Standardabweichung dargestellt. Bei Slug 12h beträgt die Standardabweichung 27, bei Snail 48h 21. Die Expression wurde zum Zeitpunkt 0, nach 12, 24 und 48 Stunden CoCl<sub>2</sub>-Behandlung mittels TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR untersucht.

Auf **Proteinebene** zeigten GC 2957-Zellen eine drastische Reaktion auf  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung. In Western-Blot Analysen dreier unabhängiger Experimente zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Expression von Snail, wobei das Housekeeping-Protein  $\beta$ -actin unverändert exprimiert wurde (siehe **Abb. 4.9**). Semiquantitative Auswertung der Expression in diesen Experimenten ergab eine 2-, 8- und 13-fache Erhöhung an Hif-1 $\alpha$ -Protein durch  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung nach 12, 24 und 48 Stunden (siehe **Abb. 4.10**). Die Snail Proteinmenge erhöhte sich in derselben Zeit auf das 2-, 9- und 23-Fache. Die Expression von E-cadherin blieb von der  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung unberührt.

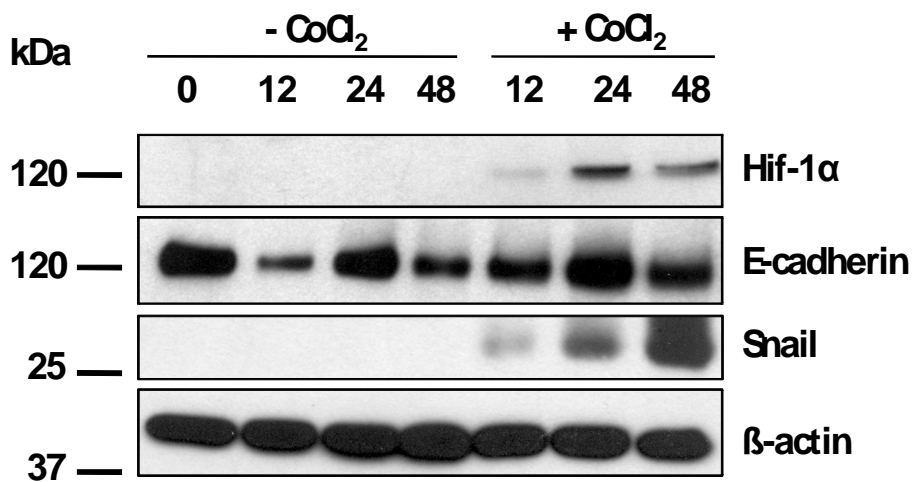
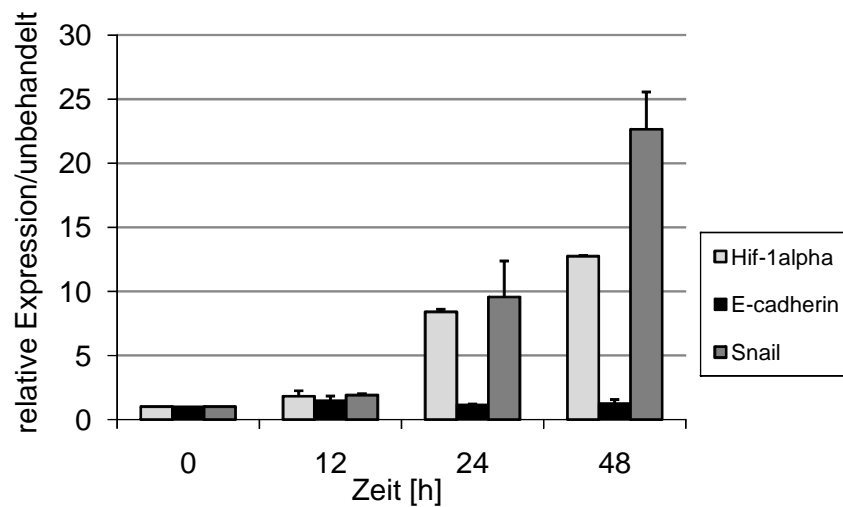
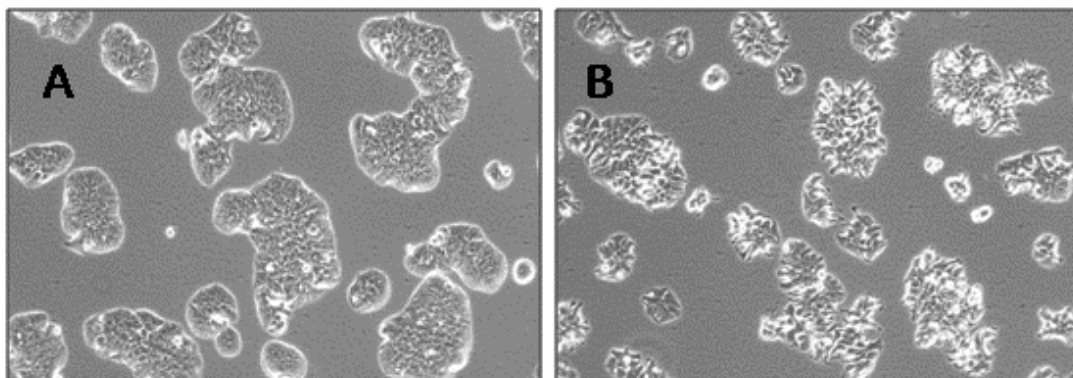


Abb. 4.9: Western-Blot Analyse von Zelllysaten der Zelllinie GC2957 und deren Reaktion auf Behandlung mit 400  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ . Untersucht wurde die Expression von Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin, Snail und als Housekeeping Protein  $\beta$ -actin zum Zeitpunkt 0 und 12, 24 und 48 Stunden nach Zugabe von  $\text{CoCl}_2$  bzw.  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Abb. 4.10:** Semiquantitative Analyse der Proteinexpression von Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin, und Snail in GC 2957-Zellen in Reaktion auf Behandlung mit 400  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression in behandelten Zellen zur Expression in unbehandelten Zellen, jeweils normalisiert auf  $\beta$ -actin. Die Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten an, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

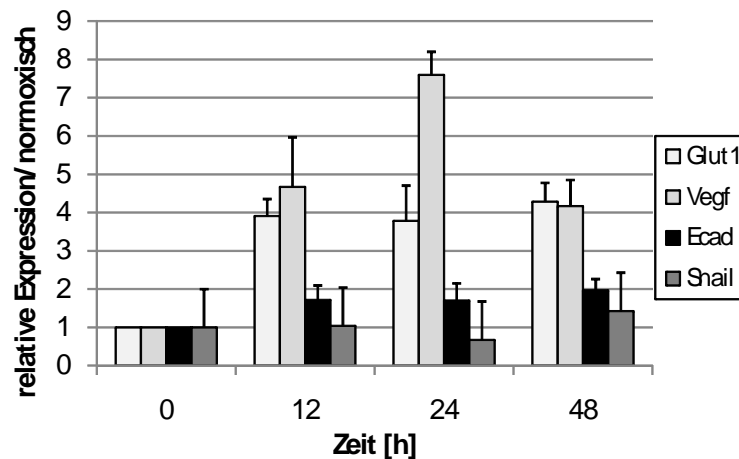
Eine Transfektion von EMT-Regulatoren (z.B. Slug) in GC 2957-Zellen führt zu einer veränderten Morphologie (C. Alves und F. Carneiro, Porto, persönliche Mitteilung). Daher untersuchte ich bei diesen Zellen die Morphologie nach CoCl<sub>2</sub>-Behandlung. Die unbehandelten Zellen bilden stark zusammen haftende Zellinseln, wobei die CoCl<sub>2</sub>-behandelten Zellen deutlich lockerer angeordnet sind (siehe **Abb. 4.11**).



**Abb. 4.11:** GC 2957 Zellen veränderten stark ihr Aussehen nach 24-stündiger CoCl<sub>2</sub>-Behandlung. Abbildung A zeigt unbehandelte Zellen, Abbildung B Zellen, die 24 Stunden mit 400  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> behandelt wurden. Die Zellen sind lockerer angeordnet und bilden nicht mehr so stark zusammen haftende Inseln. (Vergrößerung: 100-fach)

Inkubation in 1 % O<sub>2</sub>

**Abb. 4.12** zeigt die relative **mRNA-Expression** der untersuchten Gene in der Magenkarzinom-Zelllinie GC 2957 unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen. Die Werte für Slug sind nicht dargestellt, da sie in den drei Experimenten so stark variierten, daß sich sehr große Standardabweichungen ergeben hätten. In zwei von drei Experimenten zeigte sich jedoch die Tendenz, daß Slug in hypoxischen GC 2957-Zellen vermehrt exprimiert wird. Überexpression von Glut1 und Vegf (4- bis 7,5-fach) zeigt, daß tatsächlich hypoxische Bedingungen herrschten. E-cadherin wurde unter 1 % O<sub>2</sub> ca. doppelt so hoch wie unter 21 % O<sub>2</sub> exprimiert. Die Snail mRNA-Menge wurde nicht deutlich von den hypoxischen Bedingungen beeinflusst (0,7- bis 1,4-fach).



**Abb. 4.12:** Relative mRNA-Expression der Gene Glut1, Vegf, E-cadherin und Snail in der Magenkarzinom-Zelllinie GC 2957. Gezeigt ist das Verhältnis der Expression in hypoxischen zu normoxischen Zellen, jeweils normalisiert auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -actin. Die Expression wurde zum Zeitpunkt 0, 12, 24 und 48 Stunden nach Start des Experiments mittels TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR untersucht. Die Werte ergaben sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

**Abb. 4.13** zeigt einen Western-Blot von **Proteinlysaten** der Zelllinie GC 2957 mit Antikörpern gegen Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin und gegen  $\beta$ -actin. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Semiquantitative Analyse dieser Western-Blots ergab, daß Hif-1 $\alpha$  nach 12 und 24 Stunden in 1 % O<sub>2</sub> 5-fach erhöht exprimiert wurde, nach 48 Stunden 2-fach (siehe **Abb. 4.14**). Die E-cadherin Proteinmenge war nach 12 Stunden in hypoxischen Zellen leicht auf 80 % erniedrigt, nach 24 Stunden gleich hoch wie in normoxischen Zellen und

nach 48 Stunden deutlicher auf 60 % erniedrigt. Snail wurde auf Proteinebene überhaupt nicht exprimiert und die Expression wurde auch nicht durch Hypoxie induziert.

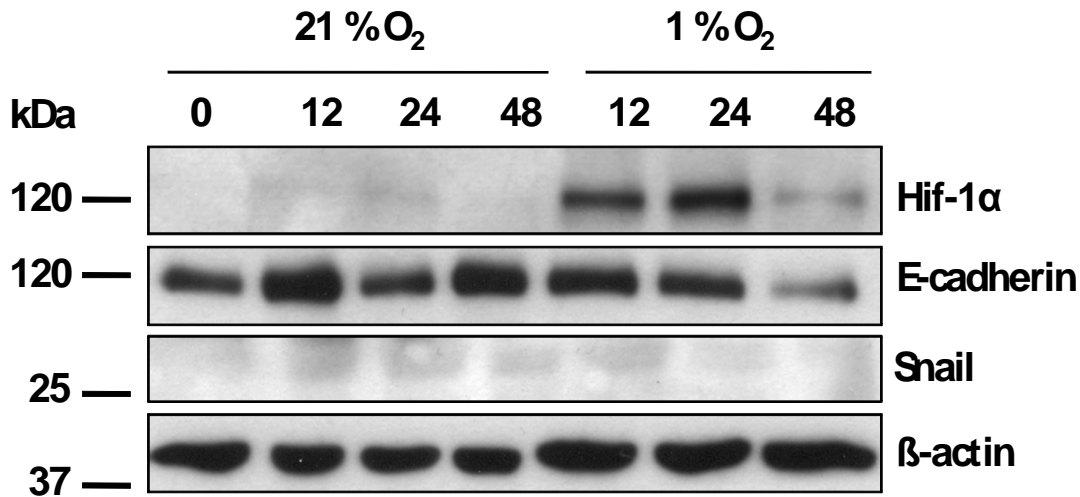


Abb. 4.13: Western-Blot Analyse von Zelllysaten der Zelllinie GC2957 und deren Reaktion auf Inkubation bei 1 % O<sub>2</sub>. Untersucht wurde die Expression von Hif-1α, E-cadherin, Snail und als Housekeeping Protein β-actin zum Zeitpunkt 0 und nach 12, 24 und 48 Stunden.

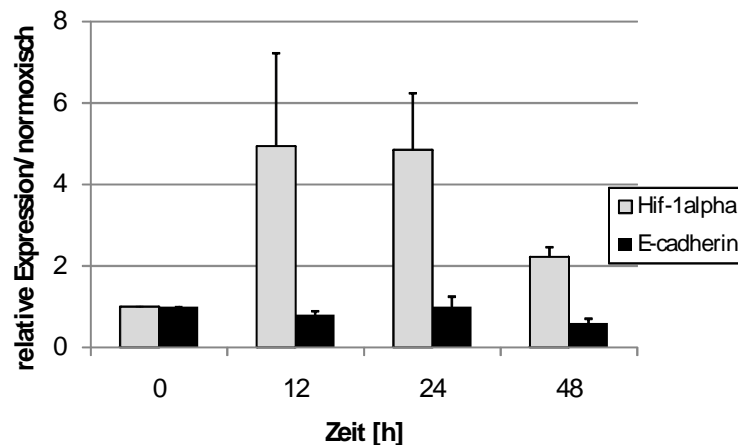


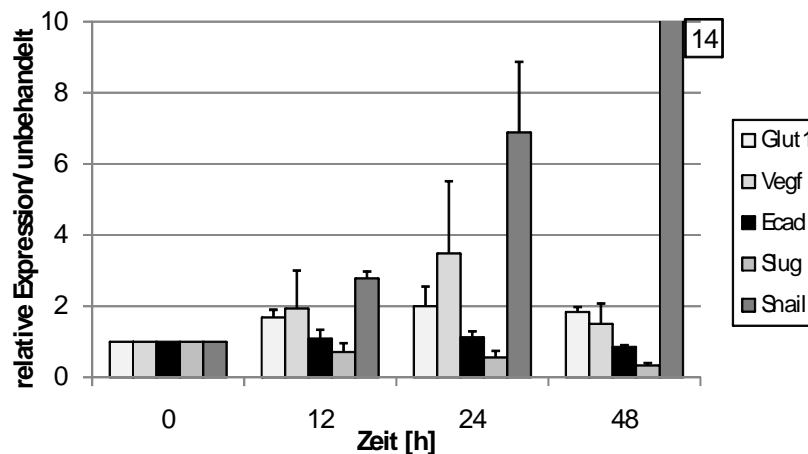
Abb. 4.14: Semiquantitative Analyse der Proteinexpression von Hif-1α und E-cadherin in GC 2957-Zellen in Reaktion auf Inkubation in 1 % O<sub>2</sub>. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression in hypoxischen Zellen zur Expression in normoxischen Zellen, jeweils normalisiert auf β-actin. Die Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten an, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

### 4.1.3 Mammakarzinom-Zelllinie MCF7

Hypoxie scheint auch einen Einfluß auf die Progression von Mammakarzinomen zu haben. Tan *et al.* haben in ihrer Studie gezeigt, daß ein hohes Hif-1 $\alpha$ -Expressionslevel signifikant mit Lymphknoten-Metastasen und kürzerem krankheitsfreien Überleben bei Mammakarzinompatienten korreliert [164]. In diversen Studien hat sich Hif-1 $\alpha$  als unabhängiger Prognosemarker für unterschiedliche Mammakarzinom-Subtypen gezeigt [165-171]. Come *et al.* zeigen einen Zusammenhang zwischen Snail, Slug und Lymphknoten-Metastasen in einem großen Mammakarzinom-Kollektiv. Die Expression von Snail und Slug scheint eine wichtige Rolle in der Invasion von Mammakarzinomen zu spielen [131]. MCF7 ist eine Mammakarzinom-Zelllinie, die starke Zell-Zellkontakte ausbildet, E-cadherin auf RNA- und Proteinebene exprimiert und Slug und Snail schwach auf RNA-Ebene exprimiert. Sie ist eine typische epitheliale Zelllinie und deshalb ein ideales Modell um die Auswirkungen von Hypoxie auf EMT in Mammakarzinomen zu untersuchen.

#### Stabilisierung von Hif-1 $\alpha$ durch Behandlung mit CoCl<sub>2</sub>

Die **mRNA-Expression** der Hypoxiemarker Glut1 und Vegf in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 war nach CoCl<sub>2</sub>-Behandlung zu allen untersuchten Zeitpunkten erhöht (1,5- bis 3,5-fach, siehe **Abb. 4.15**). E-cadherin wurde in diesen Zellen unter CoCl<sub>2</sub>-Einfluss unverändert exprimiert. Die Menge an Slug mRNA in behandelten Zellen nahm kontinuierlich ab, von 70 % der Menge in unbehandelten Zellen nach 12 Stunden bis 33 % nach 48 Stunden. Snail hingegen wurde nach CoCl<sub>2</sub>-Zugabe stark vermehrt exprimiert, und zwar von 3-fach nach 12 Stunden bis zu 14-fach nach 48 Stunden.



**Abb. 4.15:** Relative mRNA-Expression der Gene Glut1, Vegf, E-cadherin, Slug und Snail in der Mammakarzinom Zelllinie MCF7. Gezeigt ist das Verhältnis der Expression in  $\text{CoCl}_2$ -behandelten zu unbehandelten Zellen, jeweils normalisiert auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -actin. Der Mittelwert aus Triplikaten ist mit der Standardabweichung dargestellt. Bei der Snail-Expression nach 48 h beträgt die Standardabweichung 2. Die Expression wurde zum Zeitpunkt 0, 12, 24 und 48 Stunden nach  $\text{CoCl}_2$ -Zugabe mittels TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR untersucht.

Die Behandlung mit 400  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  bewirkte in MCF7-Zellen auf **Proteinebene** ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Expression von Snail. **Abb. 4.16** zeigt die Western-Blot Analysen der Proteine Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin, Snail, und  $\beta$ -actin als Housekeeping-Protein. Die semiquantitative Auswertung der Immunreaktion ist in **Abb. 4.17** dargestellt. Darin zeigt sich, daß die Hif-1 $\alpha$  Proteinmenge 12 Stunden nach  $\text{CoCl}_2$ -Zugabe auf das 14-fache anstieg, nach 24 Stunden 12-fach und nach 48 Stunden noch 8-fach so hoch war wie in unbehandelten Zellen. Snail wurde in behandelten Zellen 6-fach (12 und 24 Stunden nach Zugabe) bzw. 9-fach (48h) so hoch exprimiert wie in unbehandelten Zellen. Die E-cadherin Expression war nach 48-stündiger  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung leicht auf das 1,5-Fache erhöht, nachdem sie nach 12- und 24-stündiger Behandlung nahezu unverändert war.



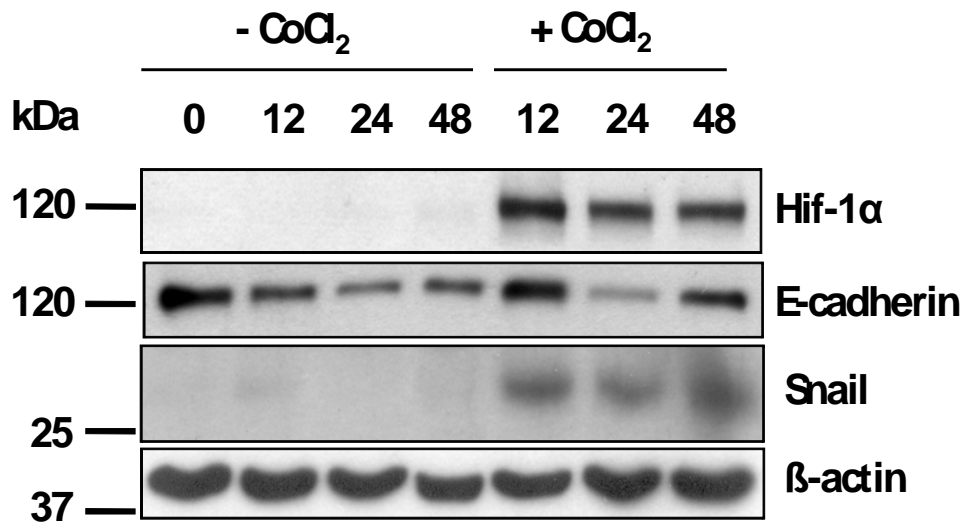


Abb. 4.16: Western-Blot Analyse von Zelllysaten der Zelllinie MCF7 und deren Reaktion auf Behandlung mit 400  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ . Untersucht wurde die Expression von Hif-1 $\alpha$ , Snail und als Housekeeping-Protein  $\beta$ -actin zum Zeitpunkt 0 und 12, 24 und 48 Stunden nach Zugabe von  $\text{CoCl}_2$  bzw.  $\text{H}_2\text{O}$ .

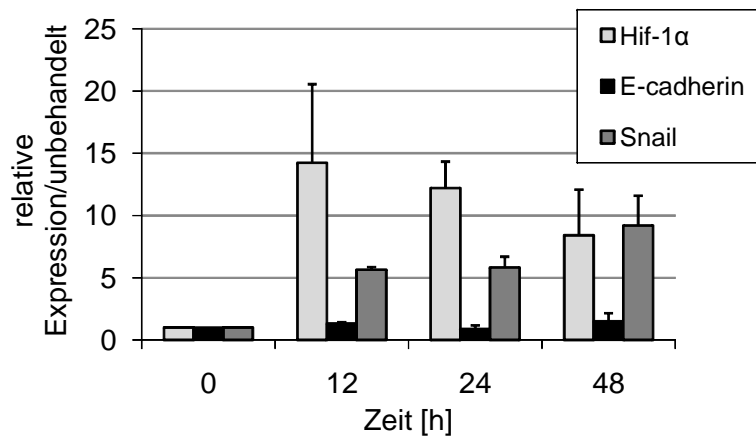
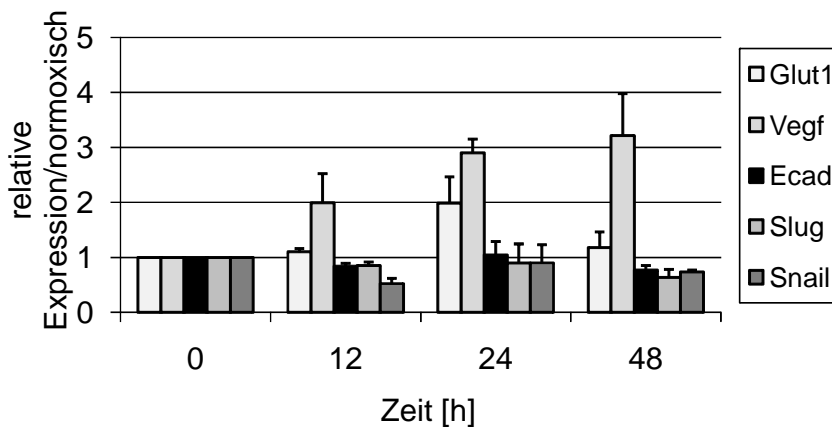


Abb. 4.17: Semiquantitative Analyse der Proteinexpression von Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin und Snail in MCF7-Zellen in Reaktion auf Behandlung mit 400  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ . Dargestellt ist das Verhältnis der Expression in behandelten Zellen zur Expression in unbehandelten Zellen, jeweils normalisiert auf  $\beta$ -actin. Die Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten an, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.

Inkubation in 1% O<sub>2</sub>

In MCF7-Zellen, die in 1 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden, wurde die mRNA des Hypoxiemarkers Vegf zu allen untersuchten Zeitpunkten vermehrt exprimiert, die von Glut1 dagegen nur zum Zeitpunkt 24 Stunden (siehe **Abb. 4.18**). Die mRNAs von E-cadherin, Slug und Snail lagen in hypoxischen MCF7-Zellen in unveränderter bzw. verminderter (0,5- bis 1-fach) Menge vor als in normoxischen Zellen.



**Abb. 4.18:** Relative mRNA-Expression der Gene Glut1, Vegf, E-cadherin, Slug und Snail in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 in 1 % O<sub>2</sub>. Gezeigt ist das Verhältnis der Expression in hypoxischen zu normoxischen Zellen, jeweils normalisiert auf das Housekeeping-Gen  $\beta$ -actin. Die Expression wurde zum Zeitpunkt 0, 12, 24 und 48 Stunden nach Start des Experiments mittels TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR untersucht. Die Werte ergaben sich aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Einen Western-Blot von **Proteinlysaten** der Zelllinie MCF7 mit Antikörpern gegen Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin, Snail und das Housekeeping-Protein  $\beta$ -actin in Reaktion auf Inkubation bei 1 % O<sub>2</sub> zeigt **Abb. 4.19**. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten. Die semiquantitative Analyse der Expression in diesen Experimenten ist in **Abb. 4.20** dargestellt. Diese ergab, daß Hif-1 $\alpha$  nach 12 und 24 Stunden in hypoxischen Zellen 5-fach erhöht exprimiert wurde, nach 48 Stunden 3,5-fach erhöht. Die E-cadherin Proteinmenge bei 1 % O<sub>2</sub> war zunächst nur leicht auf 85 bzw. 80 % erniedrigt (12 bzw. 24 Stunden), erniedrigte sich aber dann nach 48 Stunden drastisch auf 30 %. Snail war auf Proteinebene nicht exprimiert.

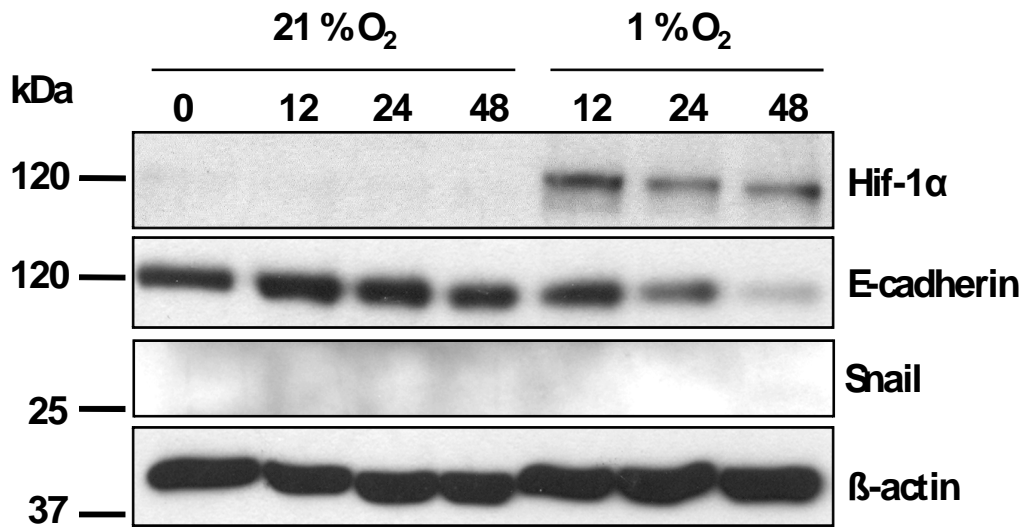


Abb. 4.19: Western-Blot Analyse von Zelllysaten der Zelllinie MCF7 und deren Reaktion auf Inkubation bei 1 % O<sub>2</sub>. Untersucht wurde die Expression von Hif-1α, E-cadherin und als Housekeeping-Protein β-actin zum Zeitpunkt 0 und nach 12, 24 und 48 Stunden.

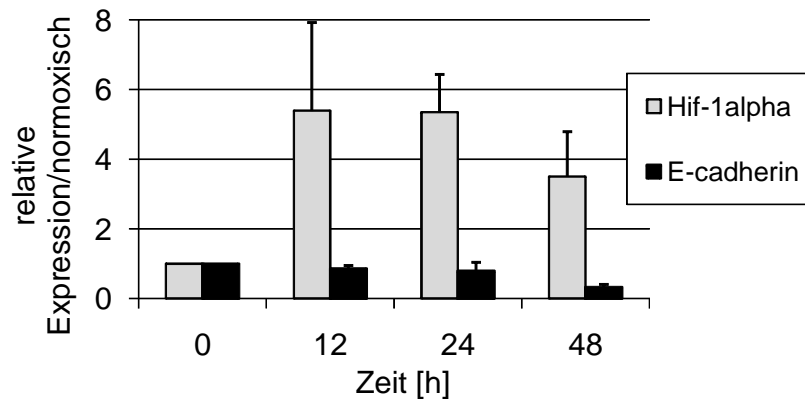
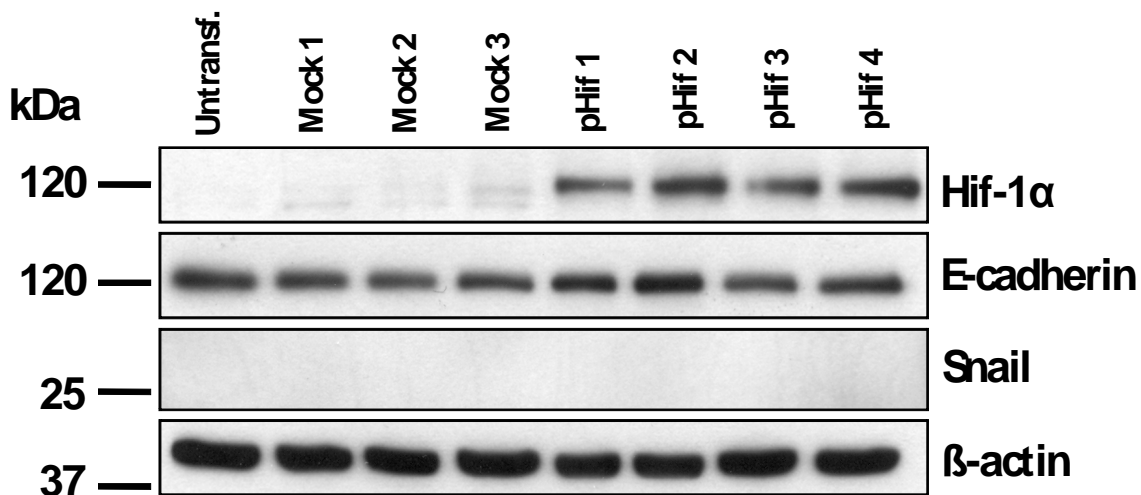


Abb. 4.20: Semiquantitative Analyse der Proteinexpression von Hif-1α und E-cadherin in MCF7-Zellen in Reaktion auf Inkubation in 1 % O<sub>2</sub>. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression in hypoxischen Zellen zur Expression in normoxischen Zellen, jeweils normalisiert auf β-actin. Die Werte geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten an, die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.



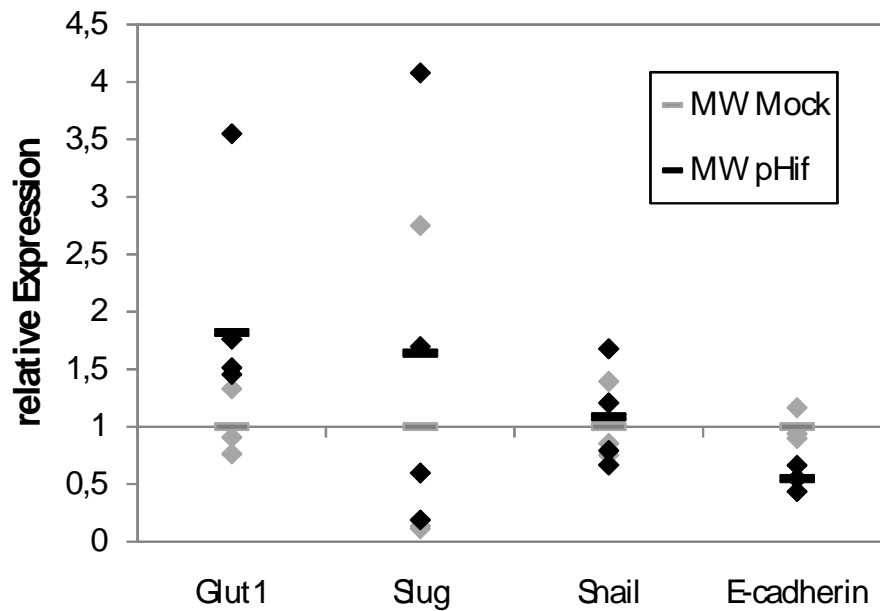
### 4.2.1 Stabile Transfektion

Zunächst sollten die drei Karzinom-Zelllinien stabil mit dem Vektor p(HA)Hif1 $\alpha$ (P402A,P564A), einem Expressionsplasmid für in Normoxie stabilisiertes Hif-1 $\alpha$  transfiziert werden. Das gelang allerdings nur für die Endometriumkarzinom-Zelllinie Ishikawa. **Abb. 4.22** zeigt eine Western-Blot Analyse von untransfizierten, drei Mock- (Plasmid ohne Insert) und vier Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Klonen der Ishikawa-Zellen. Hif-1 $\alpha$  wurde nur in den mit p(HA)Hif1 $\alpha$ (P402A,P564A) transfizierten Klonen exprimiert. Die **Protein**-Expression von Snail und E-cadherin wurde nicht von der Transfektion beeinflusst.



**Abb. 4.22:** Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin, Snail und das Housekeeping-Protein  $\beta$ -actin mit Proteinlysaten aus untransfizierten, Mock- und Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Ishikawa-Zellen.

Auf **RNA-Ebene** wurde Glut1 im Mittel in den Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Ishikawa-Zellen ca. doppelt so hoch exprimiert wie in den Mock-transfizierten Zellen (siehe **Abb. 4.23**). Auch die Slug-Expression verdoppelte sich in den Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Zellen nahezu. Snail wurde in Mock- und Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Zellen gleichermaßen exprimiert. Die mRNA Menge von E-cadherin halbierte sich nach der Hif-1 $\alpha$ -Transfektion.



**Abb. 4.23:** Relative mRNA-Expression der Gene Glut1, Slug, Snail und E-cadherin in Mock-transfizierten (grau hinterlegt) und Hif-1 $\alpha$ -transfizierten (schwarz) Ishikawa-Zellen. Die Rauten geben die einzelnen Klone an, die horizontalen Striche die Mittelwerte aus den Klonen.

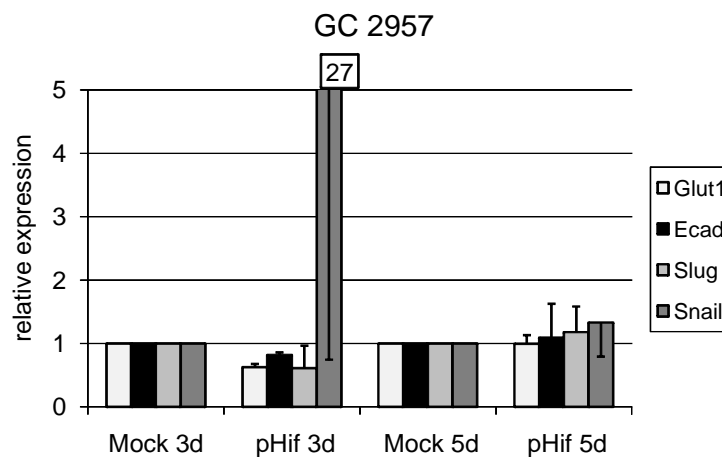
#### 4.2.2 Transiente Transfektion

Es war lediglich bei Ishikawa-Zellen möglich, Hif-1 $\alpha$  stabil zu transfizieren. Bei den anderen beiden Zelllinien (GC 2957 und MCF7) konnte die Hif-1 $\alpha$ -Expression schon nach kurzer Zeit nicht mehr festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden diese Zelllinien nur nach transients Transfektion auf die Expression der zu untersuchenden Gene analysiert. Da aus diesen Ansätzen nur eine kleine RNA-Ausbeute erzielt werden konnte, wurde nur die Expression von Glut1, E-cadherin, Snail und Slug untersucht.

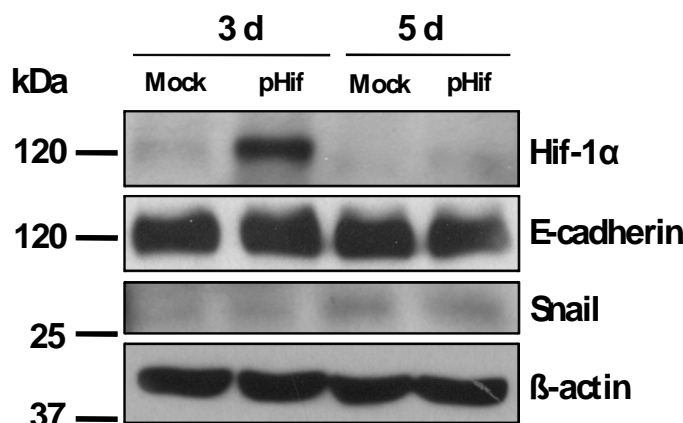
##### Magenkarzinom-Zelllinie GC 2957

**Abb. 4.24** zeigt TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR Analysen von drei unabhängigen transienten Transfektions-Experimenten der Zelllinie GC 2957. Drei Tage nach der Transfektion zeigten die Zellen eine Verringerung der Expression von Glut1, E-cadherin und Slug. Die Snail mRNA-Menge war im Mittel auf das 27-Fache erhöht, die einzelnen Experimente wichen allerdings so stark voneinander ab,

daß dies lediglich als Tendenz bewertet werden kann. Fünf Tage nach der Transfektion sind in den Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Zellen alle Gene weitgehend unverändert im Vergleich zu den Mock-transfizierten Zellen exprimiert. In **Abb. 4.25** ist eine Western-Blot Analyse mit einem Hif-1 $\alpha$ -, einem E-cadherin-, einem Snail- und einem  $\beta$ -actin-Antikörper dargestellt. Die Expression von E-cadherin und Snail war in Hif-1 $\alpha$ -transfizierten GC 2957-Zellen unverändert im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen. Auch in diesen Zellen war Hif-1 $\alpha$  nur zum Zeitpunkt 3d erhöht exprimiert, nach fünf Tagen war die Expression gleich hoch wie in Mock-transfizierten Zellen.



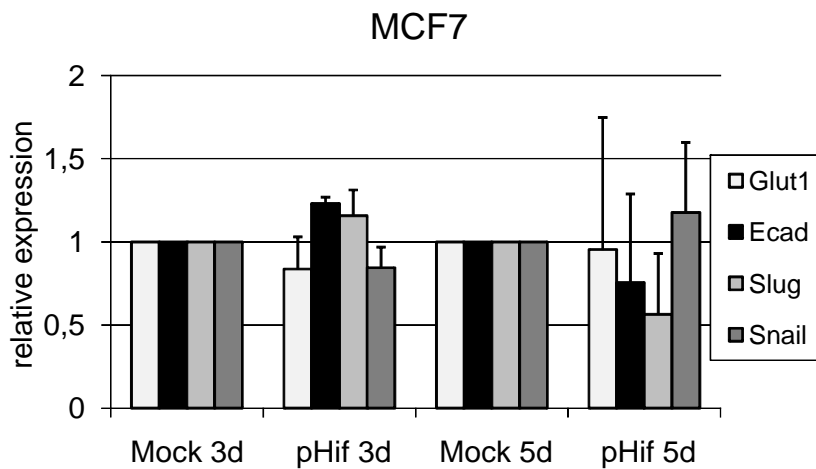
**Abb. 4.24:** mRNA-Expression von Glut1, E-cadherin, Slug und Snail in GC 2957-Zellen drei und fünf Tage nach Transfektion mit dem Expressionsvektor für stabilisiertes Hif-1 $\alpha$  p(HA)Hif1 $\alpha$ (P402A,P564A) bzw mit dem leeren Vektor (Mock). Die Abbildung zeigt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf  $\beta$ -actin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.



**Abb. 4.25:** Western-Blot Analyse von Zelllysaten der Zelllinie GC 2957 mit Antikörpern gegen Hif-1 $\alpha$  und  $\beta$ -actin. Die Zellen wurden mit Expressionsvektor p(HA)Hif1 $\alpha$ (P402A,P564A) für stabilisiertes Hif-1 $\alpha$ , beziehungsweise mit dem leeren Vektor (Mock) transfiziert und nach drei und fünf Tagen wurden Proteinlysate analysiert.

Mammakarzinom-Zelllinie MCF7

In MCF7-Zellen zeigte sich nach transients Transfektion mit dem Vektor für stabilisiertes Hif-1 $\alpha$  nach drei Tagen eine leichte Abnahme der Glut1 und Snail mRNA-Expression auf ca. 80 %, die Expression von E-cadherin und Slug war unverändert (siehe **Abb. 4.26**). Fünf Tage nach der Transfektion waren in Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Zellen Glut1 und Snail genauso hoch exprimiert wie in Mock-transfizierten Zellen. Die E-cadherin mRNA-Menge nahm in Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Zellen auf 75 % ab, die Slug mRNA Menge auf 56 %.



**Abb. 4.26:** mRNA-Expression von Glut1, E-cadherin, Slug und Snail in MCF7-Zellen drei und fünf Tage nach Transfektion mit dem Expressionsvektor p(HA)Hif1 $\alpha$ (P402A,P564A) für stabilisiertes Hif-1 $\alpha$  bzw mit dem leeren Vektor (Mock). Die Abbildung zeigt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf  $\beta$ -actin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung

Einen Kontrast dazu bildete die Untersuchung der Expressionslevel auf Proteinebene. In **Abb. 4.27** ist ein Western-Blot mit Antikörpern gegen die Proteine Hif-1 $\alpha$ , Snail, E-cadherin und  $\beta$ -actin dargestellt. Dabei zeigten semiquantitative Analysen einen deutlichen Anstieg der Hif-1 $\alpha$ -Expression auf 5-fach nach drei Tagen und auf 16-fach nach fünf Tagen (siehe **Abb. 4.28**). Die Snail-Proteinmenge war nach drei sowie nach fünf Tagen verdoppelt. E-cadherin war nach der Transfektion unverändert exprimiert.



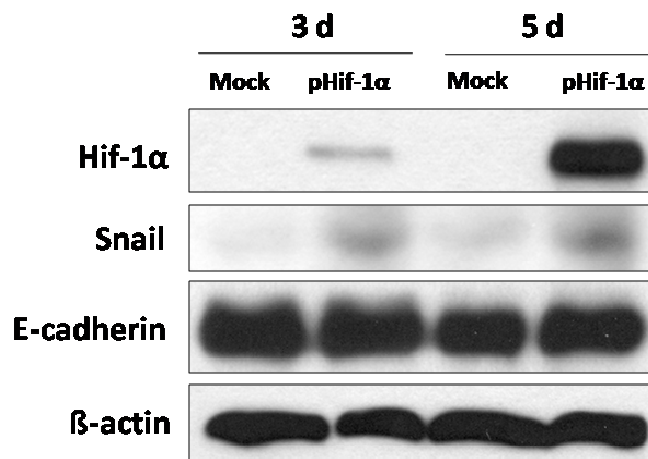


Abb. 4.27: Western-Blot Analyse von Zelllysaten der Zelllinie MCF7 mit Antikörpern gegen Hif-1 $\alpha$ , Snail, E-cadherin und  $\beta$ -actin. Die Zellen wurden mit Expressionsvektor p(HA)Hif1 $\alpha$ (P402A,P564A) für stabilisiertes Hif-1 $\alpha$ , beziehungsweise mit dem leeren Vektor (Mock) transfiziert und nach drei und fünf Tagen wurden Proteinlysate analysiert.

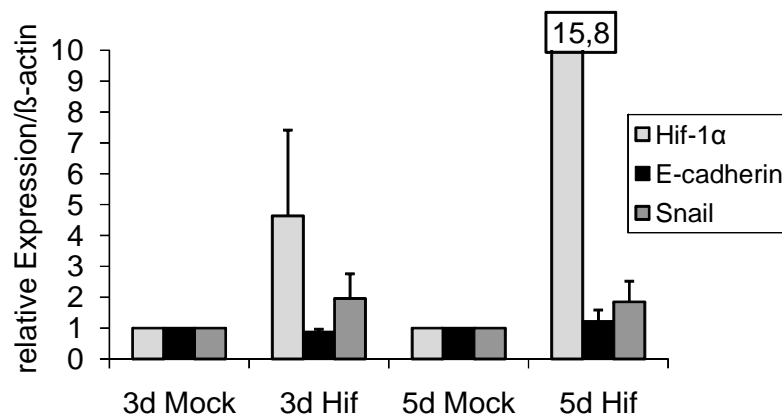


Abb. 4.28: Transiente Transfektion der Zelllinie MCF7 mit dem Expressionsvektor p(HA)Hif1 $\alpha$ (P402A,P564A) für stabilisiertes Hif-1 $\alpha$ . Proteinlysate wurden drei und fünf Tage nach Transfektion aus Mock- und Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Zellen isoliert und in Western-Blot Analysen auf die Expression von Hif-1 $\alpha$ , E-cadherin und Snail untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils auf  $\beta$ -actin normalisiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

### 4.3 MAUSMODELL

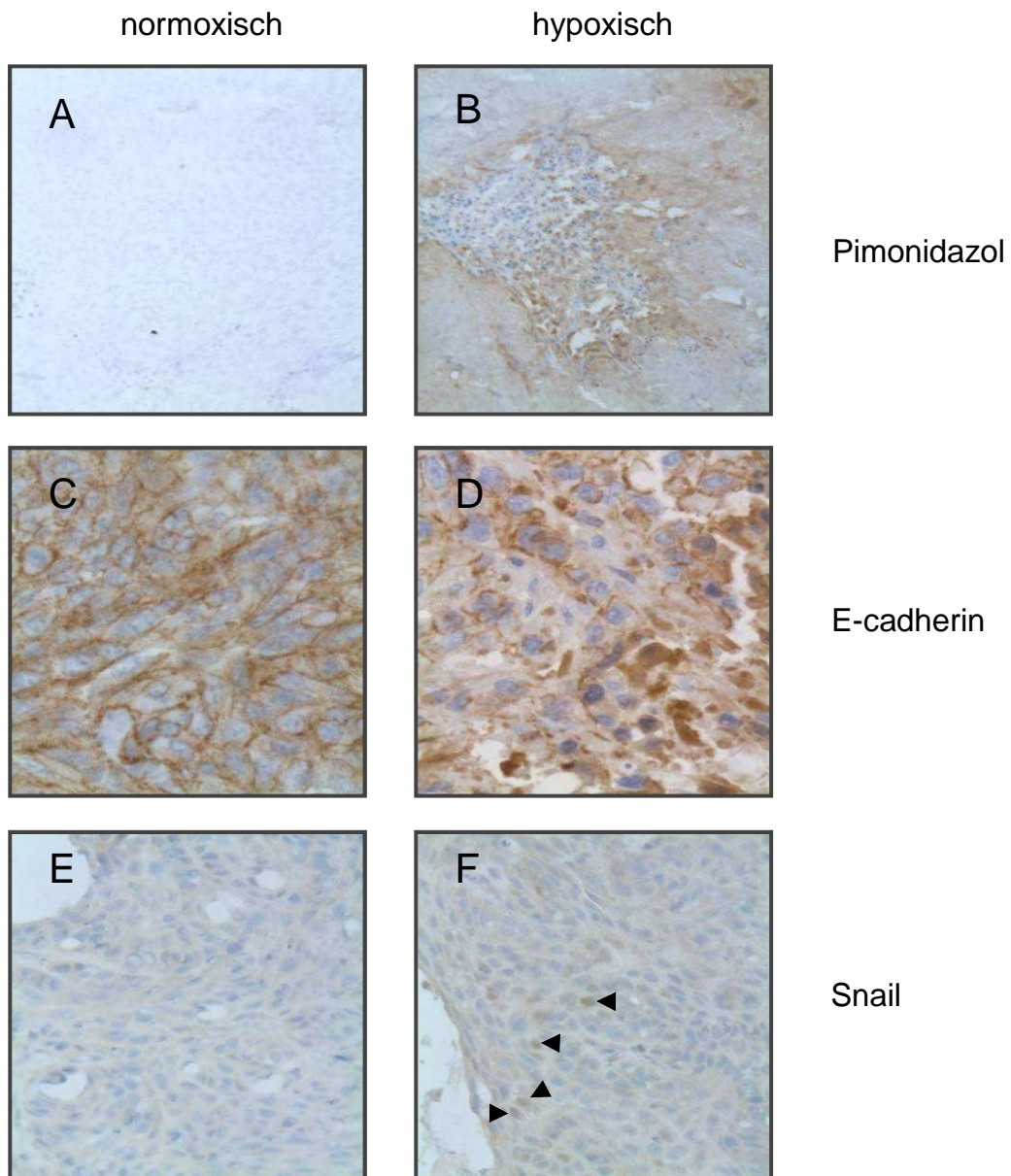
Die bisherigen *in vitro*-Daten legen nahe, daß Hypoxie einen Einfluß auf die Expression von EMT-Regulatoren haben kann. Da *in vitro* Versuche mit Zelllinien nur in Ansätzen die Bedingungen im Tumorgewebe wiedergeben können, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ein *in vivo*-System aufgebaut. So konnten Einflüsse von Hypoxie auf die Expression von E-cadherin und dessen Regulatoren Snail und Slug *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden Mäusen subkutan Ishikawa-Zellen injiziert um experimentelle Tumore zu erzeugen. Ishikawa-Zellen wurden in dieser Arbeit schon in Zellkultur auf ihre Reaktion auf Hypoxie untersucht. Zusätzlich wurden A431-Zellen in die Untersuchung aufgenommen. Die Zelllinie A431 war bereits im Institut für Nuklearmedizin für die Erzeugung von Tumorxenotransplantaten in Nacktmäusen etabliert und wurde für Hypoxie-Studien verwendet [173]. Es wurden insgesamt 20 Tumoren untersucht, davon stammten 13 von der Zelllinie A431, sieben von der Zelllinie Ishikawa. Eine Stunde vor Entnahme der Tumoren wurde den Mäusen intraperitoneal Pimonidazol-Hydrochlorid (Pimonidazol) gespritzt. Pimonidazol bildet unter hypoxischen Bedingungen Proteinaddukte, die immunhistochemisch angefärbt werden können. Über diese Immunfärbung wurden von einer Pathologin (Dr. Frauke Neff) normoxische („Pimonidazol“-negative) und hypoxische („Pimonidazol“-positive) Bereiche markiert. Diese markierten Schnitte dienten dann als Referenzschnitte, anhand derer die betreffenden Bereiche makrodisseziert und daraus RNA oder Protein isoliert werden konnte (vergleiche Abschnitt 3.6.2). Die Pimonidazol-Färbung wird als Goldstandard für Hypoxie angesehen. Zusätzlich wollten wir Hypoxie-spezifische Proteine untersuchen (CAIX, Glut1, Vegf). Da aber die von uns getesteten kommerziellen Antikörper unseren Anforderungen hinsichtlich Spezifität, Hintergrund und Sensitivität nicht genügten, wurde die Hypoxie auf mRNA-Ebene mittels der Glut1-Expression verifiziert. Nur die Pimonidazol-positiven Bereiche wurden als tatsächlich hypoxisch eingestuft, die Glut1 höher exprimierten als die korrespondierenden Pimonidazol-negativen Bereiche. Daraus ergaben sich zehn Tumore, die tatsächlich hypoxische Bereiche aufweisen. Davon waren acht Xenotransplantate der Zelllinie A431, zwei stammten aus der Zelllinie Ishikawa.

### 4.3.1 Untersuchung der Proteinexpression von E-cadherin, Snail und Vimentin anhand von Immunhistochemie

Schnitte der formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Tumoren wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Pimonidazol-Proteinaddukte, E-cadherin, Snail und Vimentin gefärbt. Die Expression von Slug konnte leider nur auf mRNA-Ebene untersucht werden, da - wie zuvor erwähnt - die kommerziellen Antikörper gegen dieses Protein uns hinsichtlich ihrer Spezifitäten nicht überzeugten. Gesamt betrachtet waren 6 der 10 Tumore E-cadherin positiv. Von diesen E-cadherin positiven Tumoren zeigten 5 (83 %) eine verminderte E-cadherin-Färbung in hypoxischen Bereichen (siehe **Tab. 4.2**). In 2 (33 %) der 6 Tumore wurde Snail in hypoxischen Bereichen stärker exprimiert als in normoxischen Bereichen. Die Vimentin-Expression war in keinem der 6 Tumore in hypoxischen Arealen erhöht. **Abb. 4.29** zeigt Beispiele von immunhistochemischen Analysen eines A431-Tumorentransplantats, in welchem in hypoxischen Arealen die Snail-Färbung stärker und die E-cadherin Färbung schwächer bzw. weniger membranständig ist als in normoxischen Bereichen.

**Tab. 4.2:** Relative Expression in hypoxischen im Verhältnis zu normoxischen Bereichen von E-cadherin-positiven A431- und Ishikawa-Tumoren (n=6), bestimmt durch immunhistochemische Analysen

Expression in hypoxischen Bereichen	A431	Ishikawa	gesamt
<b>E-cadherin ↓</b>	4/4 (100 %)	1/2 (50 %)	5/6 (83,3 %)
<b>Snail ↑</b>	1/4 (25 %)	1/2 (50 %)	2/6 (33,3 %)



**Abb. 4.29:** Bilder der immunhistochemischen Färbungen eines A431-Tumorxenotransplantats mit einem Pimonidazol-Antikörper (A und B), einem Antikörper gegen E-cadherin (C und D) und einem Snail-Antikörper (E und F). Gezeigt sind Färbungen in normoxischen (A, C und E) und in hypoxischen Bereichen (B, D und F) des Tumors. Die Tumoren zeigten starke Pimonidazol-Färbungen in hypoxischen Bereichen. Die Membran-ständige E-cadherin-Reaktivität im normoxischen Bereich (C) ging in dem hypoxischen Bereich (D) fast vollständig verloren. Der hypoxische Bereich (F) zeigt im Gegensatz zum normoxischen Bereich (E) Snail-positiv gefärbte Zellkerne (Pfeile).

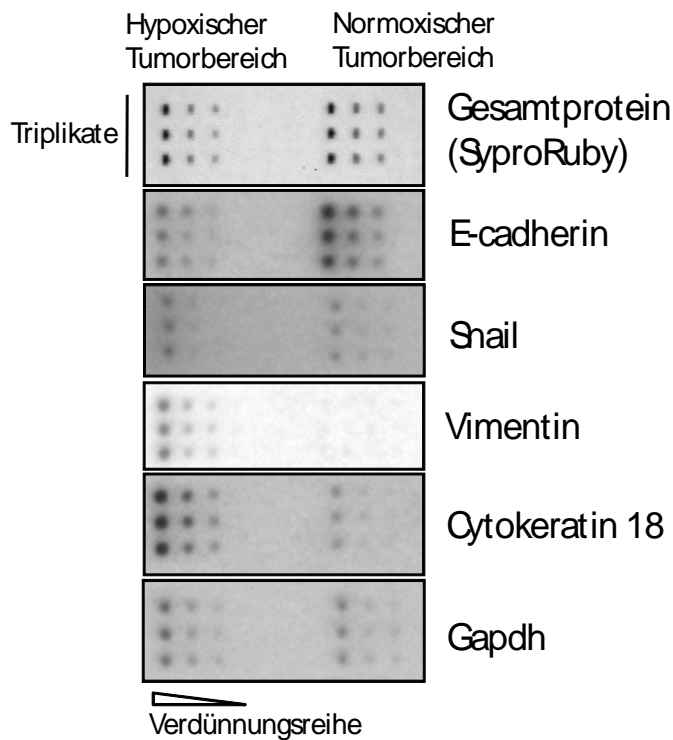
### 4.3.2 Untersuchung der Proteinexpression anhand von Reverse Phase Protein Microarrays

Von normoxischen und hypoxischen Bereichen der Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorxenotransplantate wurde auch Protein extrahiert. Diese Proteinlysate wurden anhand von Reverse Phase Protein Microarrays auf die Expression von E-cadherin, Snail, Gapdh, Vimentin und Cytokeratin 18 hin untersucht. Die Expression der einzelnen Proteine wurden auf das Gesamtprotein normalisiert. **Tab. 4.3** gibt eine Übersicht über die relative Expression der zuvor genannten Proteine in hypoxischen Bereichen der Tumore. Ausschnitte aus den Proteinmikroarrays mit einem hypoxischen und einem normoxischen Tumorbereich zeigt **Abb. 4.30**. Aufgrund von Materialmangel war es nur möglich aus 4 Tumoren (3 E-cadherin-positiv, 1 E-cadherin-negativ) aus der Gruppe der 10 Glut1-verifizierten Tumore Protein zu extrahieren. Diese Auswertung ergab, daß von den E-cadherin-positiven Tumoren alle 3 E-cadherin in den hypoxischen Bereichen vermindert exprimierten. Die Snail Proteinmenge war in keinem der 4 Tumore in hypoxischen Arealen erhöht. Vimentin wurde in 75 % der Tumore (3/4) in hypoxischen Bereichen stärker exprimiert als in normoxischen. Auch Cytokeratin war in hypoxischen Arealen von 3 von 4 Tumoren (75 %) überexprimiert. Gapdh wurde nur in 1/4 (25 %) Tumoren in hypoxischen Bereichen überexprimiert.

**Tab. 4.3:** Relative Expression von E-cadherin, Snail, Vimentin, Cytokeratin 18 und Gapdh in hypoxischen Bereichen von Glut1 verifizierten Tumoren und von allen untersuchten Tumoren. Bei E-cadherin zählten zur Gesamtumoranzahl nur die Tumore, die in normoxischen Bereichen E-cadherin-positiv waren.

Expression in hypoxischen Bereichen	der 4 Glut1-verifizierten Tumore
E-cadherin ↓	3/3 (100 %)*
Snail ↑	0/4 (0 %)
Vimentin ↑	3/4 (75 %)
Cytokeratin 18 ↑	3/4 (75 %)
Gapdh ↑	1/4 (25 %)

\* der vierte Tumor war in normoxischen Bereichen E-cadherin-negativ



**Abb. 4.30:** Ausschnitte aus den Proteinmikroarrays von einem hypoxischen und einem normoxischen Tumorbereich. Gezeigt sind Ausschnitte von entwickelten Röntgenfilmen, die mit Objektträgern belichtet wurden, die mit Antikörpern gegen E-cadherin, Snail, Vimentin, Cytokeratin 18 und Gapdh inkubiert wurden. Das oberste Bild zeigt das Gesamtprotein dargestellt mit einer SyproRuby-Färbung.

#### 4.3.3 RNA-Expression von E-cadherin, Snail und Slug

Um die Veränderungen in den hypoxischen Bereichen der Tumore in einem noch früheren Stadium nachvollziehen zu können, wurde zusätzlich der Einfluß der Hypoxie auf die RNA-Expression untersucht. Außerdem kann dadurch geklärt werden, ob Hypoxie einen Einfluß auf die Transkription oder auf die Proteinstabilität des betreffenden Gens hat. Dazu wurde die Expression von Glut1, Slug, Snail und E-cadherin mit real-time RT-PCR analysiert. Außerdem konnte die Slug-Expression nur auf RNA-Ebene untersucht werden, weil leider kein funktionierender Slug-Antikörper vorlag. Es wurden wieder hypoxische mit normoxischen Bereichen verglichen. In **Abb. 4.31** sind die 10 Tumore dargestellt, bei denen die relative mRNA-Expression des Hypoxiemarkers Glut1 in hypoxischen Bereichen größer als in normoxischen Bereichen war. In 6 (60 %) dieser 10 Tumore war Slug in hypoxischen Arealen stärker exprimiert als

in normoxischen. Die Snail mRNA Menge war in 8 (80 %) dieser 10 Tumore in hypoxischen Bereichen größer als in normoxischen. Auch die E-cadherin-mRNA-Expression war in 90 % der Tumore in den hypoxischen Bereichen erhöht.

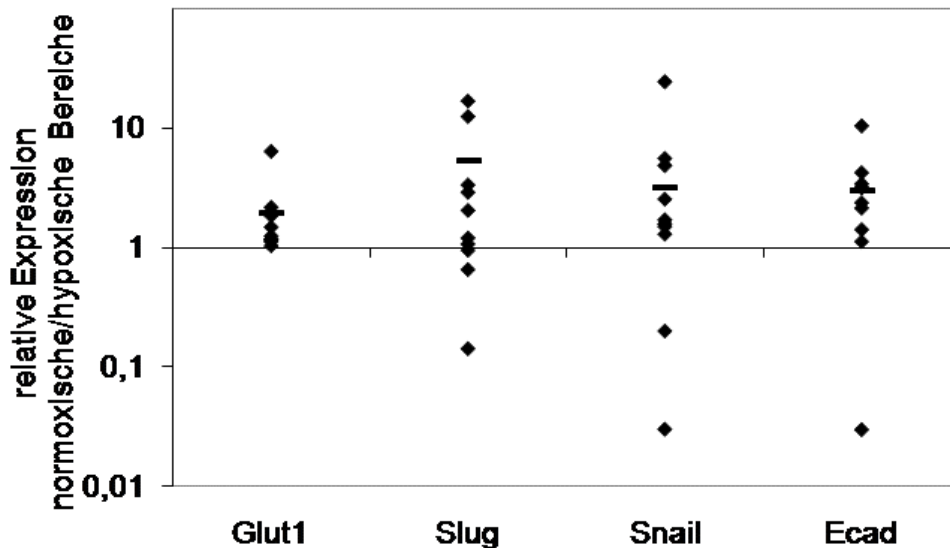


Abb. 4.31: Relative mRNA-Expression von Glut1, Slug, Snail und E-cadherin in hypoxischen Bereichen im Verhältnis zu normoxischen Bereichen in den experimentellen Tumoren, die Glut1 in hypoxischen Bereichen überexprimieren. Die Rauten geben die Expression in hypoxischen Bereichen einzelner Tumore an, die horizontalen Striche den Mittelwert der 10 Tumore.

#### 4.3.4 Vergleich von RNA und Protein

Zur besseren Übersicht werden hier nochmals alle *in vivo*-Ergebnisse zusammengefasst. Beim Vergleich der gewonnenen Ergebnisse aus der Immunhistochemie, des Protein Microarrays und der TaqMan<sup>®</sup> Analysen ergaben sich einige Unterschiede (siehe Tab. 4.4). Die relative Snail-Expression in hypoxischen Bereichen stimmt nur in einem der Tumore in der Immunhistochemie und im Protein Microarray überein. Von sechs Tumoren konnten keine Mikroarray-Daten erhoben werden. Die Ergebnisse zur Snail-Expression aus TaqMan<sup>®</sup> Analyse und Microarray stimmen bei zwei Tumoren überein, ebenso verhält es sich beim Vergleich von immunhistochemischer und TaqMan<sup>®</sup> Analyse. Bei einem Tumor ist das Verhältnis von Snail-Expression in

hypoxischen zu normoxischen Bereichen auf RNA-Ebene umgekehrt zu dem Verhältnis auf Protein-Ebene.

Die relative E-cadherin-Expression in hypoxischen Bereichen stimmt nur in einem Tumor in der Immunhistochemie und im Microarray überein. In zwei Tumoren unterscheiden sich die Ergebnisse stark zwischen erhöht und erniedrigt. In Microarray und TaqMan<sup>®</sup> Analyse stimmt die relative Expression in hypoxischen Bereichen ebenfalls nur in einem Tumor überein. Drastisch unterscheiden sich die Ergebnisse hier bei zwei Tumoren. Bei einem Vergleich von immunhistochemischer mit der TaqMan<sup>®</sup> Analyse stimmen die Ergebnisse zur E-cadherin-Expression in drei Tumoren überein, in zwei Tumoren sind sie entgegengesetzt.

**Tab. 4.4:** Vergleich der relativen Expression in hypoxischen zu normoxischen Bereichen von Snail und E-cadherin ermittelt mit Immunhistochemie (IHC), reverse Phase Protein Microarray (Array) oder TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR (RNA). Grün bedeutet eine verringerte Expression in hypoxischen Bereichen, rot eine erhöhte, schwarz eine gleich gebliebene. Weiße Felder bedeuten es liegen keine Daten vor. A hinter der Tumornummer bedeutet A431-Tumor, I Ishikawa-Tumor.

Tumor #	Snail			E-cadherin		
	IHC	Array	RNA	IHC	Array	RNA
1 A	Black	Green	Red	Red	Green	Black
2 A	Black	Green	Green	Black	Green	Red
3 A	Red	White	Red	Green	White	Red
4 A	Black	White	Red	Red	White	Red
5 A	Black	White	Red	Green	White	Red
6 A	Black	White	Red	Green	White	Red
7 A	Black	Green	Green	Green	Green	Green
8 A	Black	Black	Red	Red	Green	Red
9 I	Red	White	Red	Green	White	Red
10 I	Black	White	White	Black	White	White



## 4.4 NIERENZELLKARZINOM

Beim klarzelligen Nierenzellkarzinom gibt es einen großen Anteil (ca. 70 %) von Patienten mit einem Defekt im VHL-Gen, welcher wiederum zur Stabilisierung von Hif-1 $\alpha$  führt. Damit bietet das klarzellige Nierenzellkarzinom ein ideales Modell für Hif-1-vermittelte Genregulation. In dieser Arbeit sollte die Expression von E-cadherin, Snail und Slug in VHL-positiven („normoxischen“) und VHL-negativen („hypoxischen“) Tumoren verglichen werden. Da ich aber auch nach intensiver Suche keinen spezifischen Antikörper gegen VHL gefunden habe, erfolgte die Einteilung der Tumore in „normoxisch“ und „hypoxisch“ wiederum über die Glut1 mRNA-Expression. Da Glut1 ein Zielgen von Hif-1 ist, lässt eine hohe Expression dieses Gens auf eine hohe Hif-1 Expression schließen.

### 4.4.1 RNA-Expression von E-cadherin, Snail, Slug und Gapdh

Zunächst wurde aus 16 Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorproben RNA isoliert und in TaqMan<sup>®</sup> real-time RT-PCR Analysen auf die Expression von Glut1, Vegf, Snail, Slug, E-cadherin und Gapdh untersucht. Dabei zeigte sich in 9 von 16 Tumoren eine starke Glut1-Expression, was auf eine hohe Hif-1 $\alpha$  Expression hinweisen könnte. Die anderen 7 Tumore zeigten eine niedrige Glut1-Expression. Die Einteilung wurde über den Median aus allen Werten vorgenommen; diejenigen Tumoren, die eine Glut1-Expression über dem Median zeigten, wurden als „hypoxisch“ eingestuft, diejenigen, deren Glut1-Expression unter dem Median lag als „normoxisch“. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.32** dargestellt, wobei „normoxische“ Tumore in grau hinterlegt sind, „hypoxische“ in schwarz. Die Vegf-Expression korrelierte nach der Spearman *rank correlation* und Anpassung nach Benjamini und Hochberg statistisch signifikant mit der Glut1-Expression ( $p=0,009$ ). Snail wurde im Mittel in „normoxischen“ Tumoren höher exprimiert als in „hypoxischen“. E-cadherin wurde in den zwei Tumortypen nicht unterschiedlich exprimiert. Slug und Gapdh wurden in „hypoxischen“ Tumoren höher exprimiert als in „normoxischen“. Die Expression dieser beiden Gene in den Nierenzellkarzinomen korrelierte statistisch signifikant miteinander ( $p=0,0001$ ).

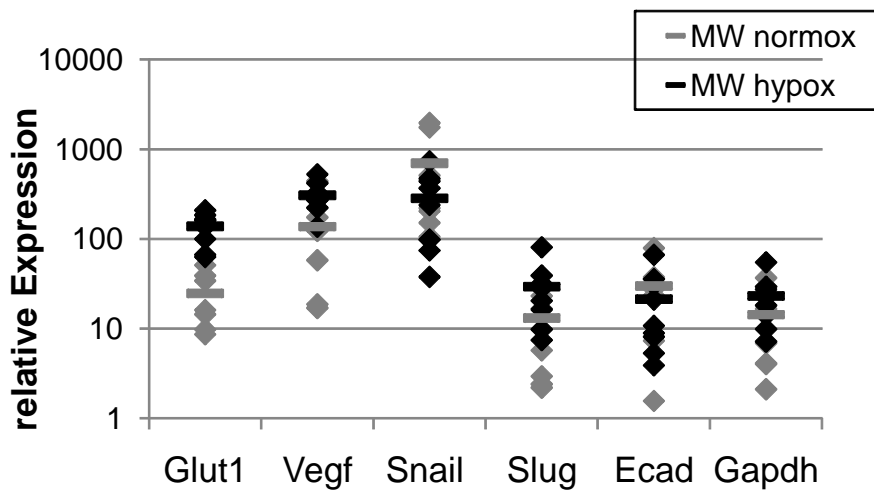


Abb. 4.32: Relative mRNA-Expression von Glut1, Vegf, Snail, Slug, E-cadherin und Gapdh in 16 klarzelligen Nierenkarzinom-Proben. Dargestellt ist die Expression des jeweiligen Gens in den einzelnen Patienten normalisiert auf 18S rRNA (Rauten). Die horizontalen Striche geben die Mittelwerte an. In grau hinterlegt sind die Werte von „normoxischen“ Tumoren, schwarz von „hypoxischen“.

Unterzieht man die Daten einer hierarchischen Clusteranalyse so zeigt sich, daß die Expression von Glut1 und Vegf stark miteinander korreliert (siehe **Abb. 4.33**). Genauso verhält es sich mit Gapdh und Slug, und entgegen den Erwartungen auch mit Snail und E-cadherin.

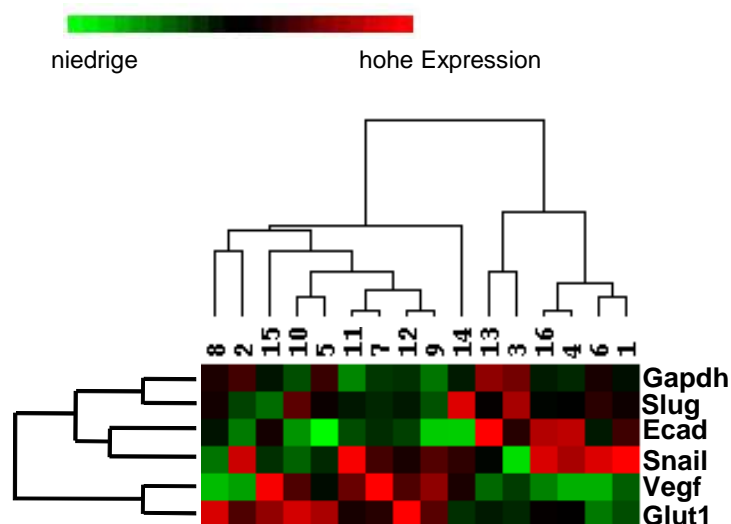
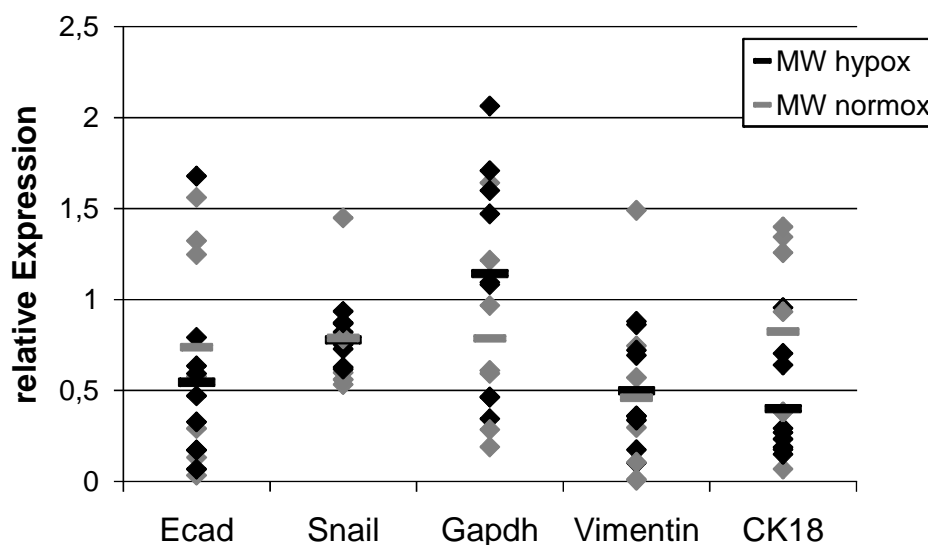


Abb. 4.33: Ergebnisse der hierarchischen Clusteranalyse. Die grüne Farbe zeigt niedrige Expression an, die schwarze intermediäre und die rote Farbe hohe Expression der mRNA. Die Expression von Vegf und Glut1 korreliert stark miteinander. Die von E-cadherin und Snail und die von Gapdh und Slug korrelieren ebenfalls.

### 4.4.2 Protein

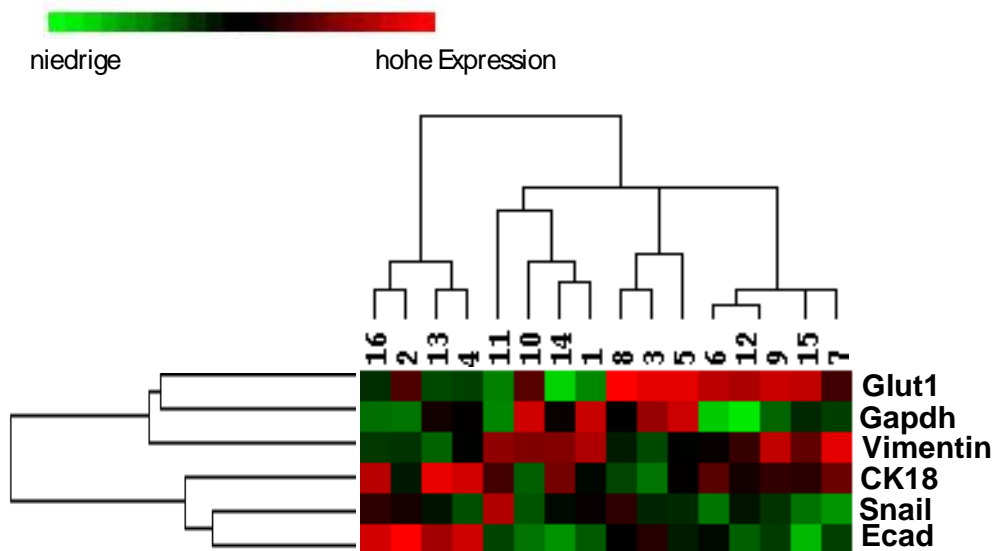
Von den 16 Nierenzellkarzinom-Proben wurde auch Protein isoliert. Mit den Proteinlysaten wurden reverse Phase Protein-Microarrays angefertigt und diese mit Antikörpern gegen E-cadherin, Snail, Gapdh, Vimentin und Cytokeratin 18 inkubiert. Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung des Schwärzungsgrades des Röntgenfilms normalisiert auf das Gesamtprotein zeigt **Abb. 4.34**. Dabei zeigte sich, daß E-cadherin im Mittel in hypoxischen Tumoren geringer exprimiert wird als in normoxischen. Snail wird im Mittel in Glut1 überexprimierenden Tumoren etwa gleich hoch exprimiert wie in Glut1 schwach exprimierenden Tumoren. Gapdh liegt in hypoxischen Tumoren in größerer Menge vor. In hypoxischen und normoxischen Tumoren liegt etwa gleich viel Vimentin-Protein vor. Cytokeratin 18 wurde in hypoxischen Tumoren weniger exprimiert als in normoxischen.



**Abb. 4.34:** Relative Protein Expression von E-cadherin, Snail, Gapdh, Vimentin und Cytokeratin 18 (CK18) in 16 klarzelligen Nierenkarzinom-Proben. Dargestellt ist die Expression des jeweiligen Proteins in den einzelnen Patienten normalisiert auf das Gesamtprotein ermittelt durch SyproRuby (Rauten). Die horizontalen Striche geben die Mittelwerte an. In grau hinterlegt sind die Werte von normoxischen Tumoren, in schwarz die von hypoxischen.

Analyse der Daten in einer hierarchischen Clusteranalyse ergibt zwei Gruppen von Proteinen (siehe **Abb. 4.35**). In der einen befinden sich Vimentin, Glut1 und Gapdh, in der anderen Cytokeratin 18, E-cadherin und Snail. Dabei korrelieren

hier stark die Expression von Gapdh mit der von Glut1 und die Expression von Snail mit der von E-cadherin.



**Abb. 4.35:** Ergebnisse der hierarchischen Clusteranalyse der Protein-Expression von Vimentin, Gapdh, CK18, Snail und E-cadherin und der mRNA-Expression von Glut1. Die grüne Farbe zeigt niedrige Expression an, die Schwarze intermediäre und die rote Farbe hohe Expression des Proteins. Die Expression von Gapdh und Glut1, und von E-cadherin und Snail korrelieren stark miteinander. In Untergruppen kann man CK18, Snail und E-cadherin und Vimentin, Glut1 und Gapdh zusammenfassen.

## 5 DISKUSSION

Hypoxie wurde in vielen verschiedenen Arten solider Tumore nachgewiesen [174]. Immer mehr deutet darauf hin, daß bis zu 60 % lokal fortgeschrittener Tumore hypoxische oder anoxische Bereiche aufweisen [1]. Erniedrigte intratumorale Sauerstoffkonzentrationen werden vor allem durch eine fehlerhafte Vaskularisierung in proliferierendem Tumorgewebe verursacht [174].

Zellen, die sich nicht an Sauerstoffmangel anpassen können unterlaufen Zelltod durch Apoptose oder Nekrose [165]. Aber Hypoxie kann auch adaptive Veränderungen in Tumorzellen auslösen, die mit einem aggressiveren malignen Phänotyp verbunden sind und zu einer schlechten Prognose führen [165, 175]. Zu diesen Veränderungen gehören unter anderem solche, die zu einer Zunahme der Invasivität führen, wie Verminderung von Zell-Zelladhäsion, zum Beispiel durch funktionellen Verlust von E-cadherin, und solche die zu einer erhöhten Zellmotilität führen. Sie können unter dem Oberbegriff Epithel-Mesenchym-Transition (EMT) zusammengefaßt werden.

EMT, gekennzeichnet durch Verlust von epithelialer Zellpolarität und Umwandlung in einen mesenchymalen Phänotyp, tritt in unterschiedlichem Umfang während der Embryonalentwicklung, in normalen adulten Zellen während der Wundheilung und in zahlreichen pathologischen Prozessen auf. Auch während der Tumorprogression spielt EMT eine wichtige Rolle. Ein wichtiger Schritt in der EMT ist der funktionelle Verlust von E-cadherin, der verschiedene Ursachen haben kann. Als besonders wichtig hat sich hierbei die transkriptionelle Repression des E-cadherin-Gens herausgestellt [82-85].

Es wurde bereits mehrfach beschrieben, daß Hypoxie einen Einfluß auf die E-cadherin-Expression zu haben scheint [55, 56, 176, 177]. Zellkultur-Studien haben auch gezeigt, daß die Hypoxie-vermittelte E-cadherin-Repression durch Überexpression verschiedener Inhibitoren, zum Beispiel Snail, ZEB1 und ZEB2 ausgelöst wird [55, 176, 177]. Genaue Mechanismen und Übertragbarkeit auf die *in vivo*-Situation blieben bisher jedoch weitgehend ungeklärt.

## 5.1 HYPOXIE UND EMT IN ZELLINIEN

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression von EMT-assoziierten Genen in drei verschiedenen Tumorzelllinien in Reaktion auf Hypoxie untersucht. Bei den Zelllinien handelte es sich um die Endometriumkarzinom-Zelllinie Ishikawa, die Magenkarzinom-Zelllinie GC 2957 und die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7. Die Expression von E-cadherin und dessen Repressoren Snail und Slug wurde nach Gabe der Hypoxie-simulierenden Substanz  $\text{CoCl}_2$ , nach Inkubation in 1 %  $\text{O}_2$  und nach Transfektion mit einem Expressionsplasmid für stabilisiertes Hif-1 $\alpha$  auf RNA- und Proteinebene untersucht. Zusätzlich wurden die Auswirkungen von Hypoxie/Hif-1 $\alpha$ -Stabilisierung auch auf funktioneller Ebene untersucht. Dazu wurden normoxische und hypoxische Zellen in „Wound-healing-Assays“ im Bezug auf ihre Motilität und in Invasion-Assays auf ihre Invasivität hin untersucht. Die Ergebnisse sind in dieser Arbeit nicht beschrieben, da weder  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung, noch Inkubation in 1 %  $\text{O}_2$  oder Transfektion mit stabilisiertem Hif-1 $\alpha$  Auswirkungen auf die Motilität und die Invasivität der Zellen hatte.

### 5.1.1 Auswirkungen von Hypoxie auf die Endometriumkarzinom-Zelllinie Ishikawa

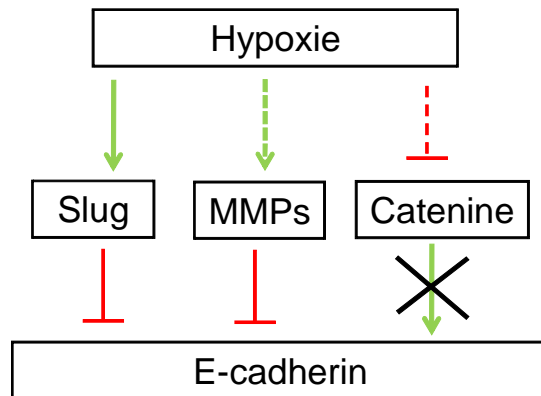
Das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-cadherin wird in normoxischen Ishikawa-Zellen auf RNA- und Proteinebene exprimiert. In  $\text{CoCl}_2$ -behandelten Ishikawa-Zellen war lediglich die mRNA-Expression von E-cadherin leicht erhöht, die Proteinexpression war unverändert. In transient Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Ishikawa-Zellen war die mRNA-Expression von E-cadherin leicht erhöht, in stabil transfizierten Zellen dagegen erniedrigt. Das E-cadherin-Protein war in beiden Fällen in gleicher Menge wie in Mock-transfizierten Zellen vorhanden. Ishikawa-Zellen unter 1 % Sauerstoff exprimierten deutlich weniger E-cadherin-Protein als Zellen unter 21 % Sauerstoff. Allein die Stabilisierung von Hif-1 $\alpha$  scheint also für die Herunterregulierung von E-cadherin nicht ausreichend zu sein, es müssen wohl noch zusätzliche Faktoren, die bei Sauerstoffmangel vorhanden sind zum Tragen kommen. Welche das sind bleibt allerdings noch zu klären. Im Gegensatz zur Proteinexpression von E-cadherin war die mRNA-Expression in hypoxischen Zellen allerdings leicht erhöht. Das spricht gegen eine transkriptionelle Regulation von E-cadherin durch Hypoxie. Die E-cadherin Repression in Ishikawa-Zellen unter hypoxischen Bedingungen scheint also eher eine Proteinstabilisierung oder Hemmung der Translation darzustellen. Freie Cadherine, die nicht im Komplex mit Cateninen in der Membran vorliegen,

sind instabil [178]. Der E-cadherin/Catenin-Komplex kann durch Phosphorylierung von E-cadherin stabilisiert oder destabilisiert werden [179, 180]. Möglicherweise liegt hier eine durch Hypoxie induzierte E-cadherin Protein-Destabilisierung vor, indem der E-cadherin/Catenin-Komplex geschwächt wird. Das E-cadherin-Protein könnte auch durch MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) abgebaut werden, was ein weiterer Mechanismus der E-cadherin-Regulation ist [68]. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte RNA-Expression von E-cadherin unter hypoxischen Bedingungen ist, daß durch fehlendes Protein eine Gegensteuerung der Zelle in Gang gesetzt wird, die eine erhöhte Transkription des E-cadherin-Gens nach sich zieht.

Snail wird in normoxischen Ishikawa-Zellen nur auf RNA-Ebene exprimiert. Die  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung, Inkubation in 1 %  $\text{O}_2$  und transiente Transfektion mit Hif-1 $\alpha$  bewirkte in diesen Zellen einen Anstieg der Snail mRNA-Expression. Stabil transfizierte Ishikawa-Zellen exprimierten Snail in gleicher Menge wie Mock-transfizierte Zellen. Die Proteinexpression von Snail konnte in Ishikawa-Zellen nicht durch hypoxische Bedingungen induziert werden. Möglicherweise wird die Snail-Expression durch Hypoxie zwar induziert, aber das Protein wird destabilisiert. Dies könnte durch Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  geschehen, was zum Export von Snail aus dem Nukleus und zum Abbau durch das Proteasom führt [104]. Nachdem das Protein nicht exprimiert wird, scheint Snail in der Hypoxie-assoziierten EMT in diesen Endometriumkarzinom-Zellen keine Rolle zu spielen.

Der E-cadherin-Repressor Slug wurde auf RNA-Ebene sowohl unter 1 %  $\text{O}_2$ , als auch in  $\text{CoCl}_2$ -behandelten und in Hif-1 $\alpha$ -transfizierten (stabil und transient) Zellen stärker exprimiert als in „normoxischen“ Zellen. Slug könnte also durchaus eine Rolle in der Antwort von Ishikawa-Zellen auf Hypoxie spielen. Die Proteinexpression von Slug konnte leider nicht untersucht werden, da kein spezifischer Antikörper gegen Slug vorlag. Slug könnte auch für die E-cadherin-Repression in stabil Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Ishikawa-Zellen verantwortlich sein, da dort die mRNA-Menge von E-cadherin erniedrigt ist.

**Abb. 5.1** zeigt das durch diese Ergebnisse aufgestellte Modell der Auswirkung von Hypoxie auf EMT-assoziierte Proteine im Endometriumkarzinom. Danach wird in Hypoxie die Expression von Slug induziert. Dadurch wird E-cadherin herunterreguliert. Denkbar - aber ohne Bestätigung durch eigene Ergebnisse - könnte durch eine Hemmung von Bestandteilen des E-cadherin/Catenin-Komplexes oder durch die Aktivität von MMPs E-cadherin destabilisiert werden.



**Abb. 5.1:** Modell der Regulation von EMT-assoziierten Proteinen im Endometriumkarzinom durch Hypoxie. Durch Hypoxie wird die Expression von Slug und möglicherweise von MMPs induziert, wodurch E-cadherin herunterreguliert wird. Durch eine Hypoxie-induzierte Hemmung von Bestandteilen des Catenin/E-cadherin-Komplexes könnte E-cadherin destabilisiert werden. Die gestrichelten Linien geben mögliche Regulationswege an, die allerdings nicht durch eigene Ergebnisse belegt wurden.

Durch Vergleich der Genexpression in normoxischen und hypoxischen Ishikawa-Zellen durch RNA-Microarrays zeichneten sich zahlreiche Kandidatengene ab, die eine Rolle bei der Hypoxie-induzierten EMT spielen könnten oder die die Tumorprogression vorantreiben.

Für eine Epithel-Mesenchym-Transition muß sich die Zelladhäsion ändern. Einige Gene, deren Funktion im Bereich Zelladhäsion liegt, waren in hypoxischen Ishikawa-Zellen differentiell exprimiert. So waren die Lysyl-Oxidase LOX und LOXL2 in hypoxischen Zellen stärker exprimiert als in normoxischen. Beide Proteine stabilisieren den E-cadherin-Repressor Snail, indem sie ihn vor dem GSK3 $\beta$ -induzierten Abbau schützen [59]. SIN3A kooperiert mit Snail bei der Repression von E-cadherin. Das SIN3A-assoziierte Protein SAP30 war in hypoxischen Zellen überexprimiert. Die mRNA-Expressionen der Zelladhäsionsmoleküle Protocadherin 20 und AMBP waren in Hypoxie deutlich verringert. Imoto *et al.* postulieren eine Rolle von einem PCDH20-Verlust in der Karzinogenese von NSCLC (non small cell lung cancer), da es zwar in normalem Lungengewebe exprimiert wird, im Tumorgewebe jedoch nicht [181]. AMBP kodiert für die leichte Kette eines Plasma-Protease-Inhibitors, der zur Stabilisierung der extrazellulären Matrix beiträgt. Hamm *et al.* zeigten einen weitverbreiteten Verlust von AMBP-Expression in verschiedenen Tumorarten und schlugen aufgrund ihrer Ergebnisse AMBP als Tumorsuppressor-Gen vor [182]. FLRT3 funktioniert als De-Adhäsionsprotein,



indem es die subzelluläre Lokalisation von C-cadherin beeinflusst [183]. In hypoxischen Ishikawa-Zellen war FLRT3 überexprimiert. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen war die Expression einiger Gene, die die Zelladhäsion fördern allerdings in hypoxischen Ishikawa-Zellen erhöht. Zum Beispiel CDH23 (cadherin-like 23) und die *tight junctions*-Komponente JAM2. Dazu muß beachtet werden, daß Migration auch eine Adhäsionskomponente enthält. Zellmigration besteht aus den Schritten Ausstülpung der Zelloberfläche durch Actin-Polymerisation, Matrixadhäsion (Bildung von *focal adhesions*) und Nachziehen der Zelle (durch Actomyosin-Kräfte) [184]. Andererseits könnte es auch einfach eine Gegensteuerung der Zelle zum Erhalt des epithelialen Phänotyps sein. Insgesamt scheint Hypoxie in diesen Endometriumkarzinom-Zellen zu einem Expressionsprofil zu führen, das eher lockere Zell-Zelladhäsion begünstigt.

Einige Gene, die bei der Zellmotilität eine Rolle spielen, sind in hypoxischen Ishikawa-Zellen überexprimiert. Fascin, das cytoplasmatisches Actin bündelt und eine Schlüsselrolle in diversen Formen von Actin-basierten Motilitätsstrukturen inne hat [185], war in hypoxischen Zellen überexprimiert. In Epithelien ist dieses Protein sehr gering exprimiert oder fehlt völlig [185, 186]. Yoder *et al.* zeigen, daß Fascin-Expression in Mammakarzinomen mit einem aggressiven klinischen Verlauf einhergeht [187]. Die Überexpression des mesenchymalen Markers Vimentin in hypoxischen Ishikawa-Zellen zeigt, daß die Zellen eine EMT durchlaufen haben. In humanen Mammakarzinom-Zelllinien wurde gezeigt, daß eine Vimentin-Expression mit einer erhöhten Basalmembran-Invasivität assoziiert ist [188]. Zeng *et al.* zeigten in ihrer Studie in endometrioiden Karzinomen, daß Vimentin mit dem klinischen Staging in diesen Karzinomen korreliert. Sie schlagen deshalb Vimentin als Prognosefaktor für den häufigsten Subtyp von Endometriumkarzinomen vor [189]. Auf Proteinebene wurde allerdings die Expression von Vimentin in Ishikawa-Zellen durch Hypoxie nicht induziert. Möglicherweise wird die Translation gehemmt oder das Protein wird destabilisiert. Das unter anderem an Vimentin bindende Ankyrin war in hypoxischen Zellen deutlich erhöht exprimiert. LAMB3, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix Komponente Laminin 5, war in hypoxischen Ishikawa-Zellen ebenfalls höher exprimiert als in normoxischen. Kita *et al.* [190] zeigten eine erhöhte LAMB3 mRNA-Expression in malignem Gewebe von Patienten mit Plattenepithel-Karzinomen des Ösophagus im Vergleich zum Normalgewebe. Außerdem korreliert in diesen Tumoren die LAMB3-Expression signifikant mit der Tiefe der Invasion und der Intravasation [190]. Insgesamt legen die Ergebnisse aus den RNA-Mikroarrays eine Induktion der Zellmotilität durch Hypoxie in diesen Endometriumkarzinom-Zellen nahe.

In Ishikawa-Zellen führte Hypoxie auch zur Regulation der Expression von Bestandteilen von Signalwegen, die eine wichtige Rolle in der Embryogenese spielen und deren Deregulation zur Tumorentstehung und -progression beiträgt. Ein solcher Signalweg ist der WNT-Signalweg [191], von dem zwei Mitglieder, WISP2 und DACT2 in hypoxischen Ishikawa-Zellen vermehrt exprimiert wurden. Ein weiterer Signalweg, dessen Deregulation zur Tumorentstehung beiträgt, ist der Notch-Signalweg [191]. Die Notch-Signalmoleküle ASCL2 und DTX1 waren in hypoxischen Ishikawa-Zellen stärker exprimiert als in normoxischen. SMAD7 und SMAD9 sind Mitglieder des TGF- $\beta$ -Signalwegs, deren Expression in Ishikawa-Zellen ebenfalls durch Hypoxie induziert wurde. Katoh beschreibt, daß die Balance zwischen den verschiedenen Signalwegen in Stamm- und Vorläuferzellen sehr wichtig ist. Wenn diese aus dem Gleichgewicht gerät, führt dies zu pathologischen Veränderungen, wie zum Beispiel zu Tumoren [191, 192].

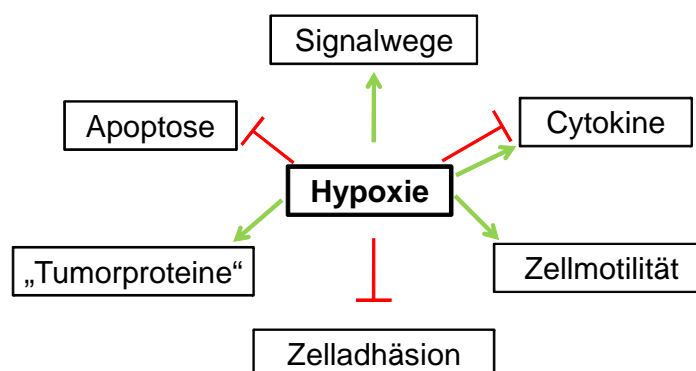
Cytokine regulieren eine Vielzahl an biologischen Prozessen, indem sie Membranrezeptoren aktivieren. Die Signaltransduktion über den JAK/STAT-Signalweg verleiht den Cytokinen vielfältige Funktionen in der „Zellkommunikation“. Interleukin 4 (IL4) besitzt anti-Tumorfunktionen [193, 194]. Seine Expression war in hypoxischen Ishikawa-Zellen deutlich herunterreguliert. Eine IL17RB-Expression korreliert in Mammakarzinomen negativ mit Tumorgad und Nodalstatus, das heißt mit Metastasierung [195]. Dieses Gen war in hypoxischen Zellen überexprimiert. SOCS2, ein Cytokin-Signal Suppressor, war ebenfalls in hypoxischen Zellen höher exprimiert als in normoxischen. SOCS2 kann zwar Tumorsuppressor-Funktionen ausüben, Rico-Bautista *et al.* beschreiben aber für SOCS2 eine Rolle in der Entwicklung und Progression von Leukämie und in *High-grade intraepithelial lesions*, Vorläufern von Anatumoren [196]. Hypoxie scheint vielfältige Einflüsse auf Cytokin-Signale zu haben, sie führt sowohl zu Förderung als auch zur Hemmung des Cytokin-Signalling.

In Ishikawa-Zellen scheint Hypoxie zu einem Schutz vor Apoptose zu führen. So war der antiapoptotische Faktor ANGPTL4 [197] in hypoxischen Zellen stark überexprimiert. Ein anderes Protein, das Tumorzellen vor Apoptose zu schützen vermag, ist TNFAIP3 [198]. Es war ebenfalls in hypoxischen Zellen überexprimiert. Auch TERT, die Telomerase reverse Transkriptase, die bekanntermaßen Zellen vor Apoptose schützt [199], war in hypoxischen Zellen höher exprimiert als in normoxischen. Dagegen war CASP9, ein proapoptotischer Faktor [200], in hypoxischen Ishikawa-Zellen herunterreguliert. BNIP3, das bisher als proapoptotischer Faktor angesehen wurde, war in hypoxischen Zellen höher exprimiert als in normoxischen. Kürzlich konnten Giatromanolaki *et al.* in Endometrium-Karzinomen den Zusammenhang

zwischen BNIP3-Expression und schlechtem postoperativem *Outcome* zeigen [201]. Tracy *et al.* schreiben BNIP3 vor allem in Reaktion auf Hypoxie eine Rolle als Überlebensfaktor zu, indem BNIP3 entweder vor ATP-Verarmung schützt oder indem es für die Entsorgung beschädigter Mitochondrien sorgt [202].

Auch einige allgemeine Tumor-assoziierte Gene wurden in hypoxischen Ishikawa-Zellen stärker exprimiert als in normoxischen. Darunter waren die zwei Onkogene JUN und JUNB, deren knockout in Melanomzellen zu Zellzyklus-Arrest und Induktion von Apoptose führt [203]. Die Überexpression könnte also die Zelle in einem aktiven Zellzyklus verbunden mit Zellteilung halten und vor Apoptose schützen. Die Wachstumsfaktoren PDGF-A und TGFA wurden ebenfalls in Zellen unter Hypoxie stärker exprimiert. Beide sind bekannt für ihre Rolle in der Tumorbilogie als positive Regulatoren des Tumorwachstums. Reinartz *et al.* konnten zeigen, daß TGFA-Expression in Endometriumkarzinomen mit einer tieferen Invasion und einer Invasion in Blutgefäße korreliert [204, 205]. BCL6 ist ein weiteres Onkogen, das in hypoxischen Ishikawa-Zellen überexprimiert war. BCL6 spielt eine Rolle bei der Zellzyklus-Regulation und seine Deregulation führt zu einem erhöhten Wachstum von Lymphomen [206]. Insgesamt scheint Hypoxie in Ishikawa-Zellen also die Expression von tumorassoziierten Genen zu begünstigen.

**Abb. 5.2** zeigt ein zusammenfassendes Schema der regulierten Abläufe in Endometriumkarzinom-Zellen. Hypoxie induziert die Expression von Genen, die die Zellmotilität fördern, Tumor-assoziiertes Signalwege und von „Tumorproteinen“. Gene, die an Apoptose und Zelladhäsion beteiligt sind, werden durch Hypoxie herunterreguliert.



**Abb. 5.2:** Schema der Regulation von Tumor-relevanten Eigenschaften und Proteinen der Zelle durch Hypoxie in Endometriumkarzinom-Zellen. Hypoxie induziert die Expression von Genen, die bei der Zellmotilität und in Signalwegen eine Rolle spielen und von Tumor-assoziierten Genen. Hypoxie hemmt die Expression von Genen, die an der Zelladhäsion und an Apoptose beteiligt sind. Cytokine oder Mitglieder von Cytokin-Signalwegen werden sowohl herauf- als auch herunterreguliert.

Die von mehreren Gruppen aufgestellte These, daß Hypoxie einen Einfluß auf Entstehung und Progression von Endometriumkarzinomen hat, wird auch durch die vorliegenden Ergebnisse aus Ishikawa-Zellen unterstützt. Dies scheint aber nicht nur auf der Induktion von EMT zu basieren, sondern weit vielfältigere Ursachen zu haben.

### 5.1.2 Auswirkungen von Hypoxie auf die Magenkarzinom-Zelllinie GC 2957

Die Magenkarzinom-Zelllinie GC 2957 ist ein geeignetes Modell, um die Auswirkungen von Hypoxie auf EMT in Magenkarzinomen zu untersuchen. GC 2957-Zellen exprimieren das Zelladhäsionsmolekül E-cadherin sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Durch Behandlung dieser Zellen mit  $\text{CoCl}_2$  wurde zwar die mRNA-Expression von E-cadherin erhöht, aber die Proteinexpression blieb davon unberührt. Auch nach Inkubation der Zellen in 1 %  $\text{O}_2$  war die mRNA-Expression von E-cadherin erhöht. Es lag jedoch weniger E-cadherin-Protein als in normoxischen Zellen vor. Transfektion der Magenkarzinom-Zellen mit dem stabilisierten Hif-1 $\alpha$  hatte keinen nennenswerten Einfluß auf die E-cadherin-Expression. Wie bereits in **Abschnitt 5.1.1** beschrieben, könnte die Ursache der verringerten E-cadherin Proteinexpression in hypoxischen GC 2957-Zellen entweder eine Proteinstabilisierung oder Hemmung der Translation sein. Andererseits könnte die erhöhte RNA-Expression auch eine Gegenreaktion der Zellen auf die nun verringerte Proteinmenge von E-cadherin mit Ankurbeln der Transkription darstellen.

Der EMT-Regulator Slug wird in GC 2957-Zellen nur in sehr geringen Mengen auf RNA-Ebene exprimiert. Diese Zellen zeigten unter  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung die Tendenz dazu Slug mRNA vermehrt zu exprimieren. Die Triplikate wichen allerdings so weit voneinander ab, daß dies wirklich nur als Tendenz zu werten ist. Möglicherweise reichen durch die sehr geringe Basalexpression von Slug in dieser Zelllinie schon kleinere Abweichungen in den einzelnen Experimenten, um eine große Standardabweichung zu erzeugen. Auch nach Inkubation der Magenkarzinom-Zellen in 1 %  $\text{O}_2$  zeigte sich dieser Trend, vermehrt Slug mRNA zu erzeugen. Auch hier waren die Abweichungen zwischen den Triplikaten sehr hoch. Auf Proteinebene konnte Slug leider nicht untersucht

werden. Es kann also in diesem Zellkulturmodell keine verlässliche Aussage über die Rolle von Slug in Hypoxie-vermittelter EMT gemacht werden.

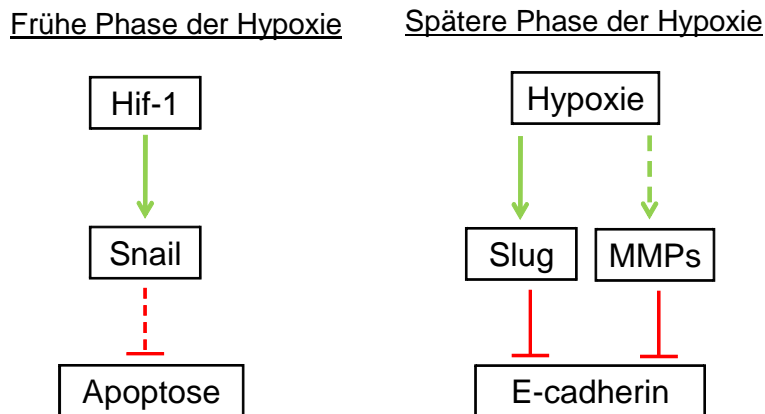
Der E-cadherin-Repressor Snail wird in GC 2957-Zellen ebenfalls nur in sehr geringen Mengen auf RNA-Ebene exprimiert, das Protein ist in diesen Zellen unter Normalbedingungen nicht nachzuweisen. 1 % O<sub>2</sub> hatte keinen nennenswerten Einfluß auf die Snail-Expression, weder auf RNA- noch auf Proteinebene. Nach CoCl<sub>2</sub>-Behandlung zeigten diese Zellen eine erhöhte Snail mRNA-Expression, die Snail-Proteinmenge wurde durch CoCl<sub>2</sub> sogar dramatisch erhöht. Nachdem die E-cadherin-Proteinmenge allerdings nicht verringert ist, liegt es nahe, daß Snail in Reaktion auf CoCl<sub>2</sub> in diesen Zellen eine andere Funktion hat. Leroy *et al.* [122] haben in ihrer Arbeit mit MDCK (*Madin-Darbin canine kidney*) Tubulogenese eine Rolle für Slug, aber wie sie vermuten auch für Snail, in partieller EMT (p-EMT) ohne E-cadherin-Repression beschrieben. In ihrem 3D-Modell werden epitheliale MDCK-Zellen in einem dreidimensionalen Gel aus extrazellulärer Matrix kultiviert. Werden diese Zellen mit HGF (*hepatocyte growth factor*) stimuliert, formen sie verzweigte Tubuli, in denen manche Zellen ihre Polarität verlieren und motil werden, aber nie alle Eigenschaften einer Mesenchymzelle erwerben. Die Autoren dieser Arbeit konnten in ihrem Modell eine Induktion der Slug-, und weniger deutlich der Snail-Expression in Reaktion auf HGF-Stimulation zeigen. In ihren weiteren Experimenten haben sie sich auf die Untersuchung von Slug beschränkt, vermuten aber, daß Snail die gleiche Funktion hat. In ihrem Modell scheint Slug die p-EMT nicht auszulösen. Slug scheint vielmehr als Überlebensfaktor zu fungieren, der die Zellen vor Apoptose schützt, indem er die Expression proapoptotischer Proteine wie p53 hemmt. Verschiedene Gruppen haben EMT als sequentiell ablaufendes, mehrstufiges Programm beschrieben. In diesem Programm ist der Verlust von E-cadherin unter den späteren Schritten [207, 208]. Slug und Snail könnten in den verschiedenen Phasen von EMT unterschiedliche Funktionen haben, und nur während der späten Phase von EMT eine Rolle als E-cadherin-Repressoren spielen [122]. So könnte es sein, daß sich in unserem Zellkulturmodell die GC 2957-Zellen noch in einer eher frühen EMT-Phase befinden. Die Rolle von Snail und Slug als antiapoptotische Faktoren in Hypoxie könnte man durch Analyse der Expression von proapoptotischen Proteinen in Reaktion auf hypoxische Bedingungen untersuchen.

GC 2957- und, wie im nächsten Abschnitt (Abschnitt **5.1.3**) näher beschrieben, auch MCF7-Zellen reagierten unterschiedlich auf die Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> und die Inkubation in 1 % O<sub>2</sub>. Vor allem in der Reaktion der Snail-Expression kam dies zum Tragen. Dies könnte zum Einen darauf beruhen, daß CoCl<sub>2</sub> lediglich Hif-1 $\alpha$  stabilisiert, wobei Sauerstoffmangel sicherlich einen globaleren Einfluß

auf Zellen hat. Zum Anderen kann man auch den Einfluß der pH-Wert-Änderung in 1 % O<sub>2</sub> oder einer möglichen Toxizität bzw. der Chlorierungseigenschaften von CoCl<sub>2</sub> nicht ausschließen.

Interessanterweise zeigten die Magenkarzinom-Zellen nach Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> auch eine sehr starke morphologische Veränderung. Die für diese Zelllinie typische Anordnung in fest zusammenhaftenden Zellinseln scheint unter CoCl<sub>2</sub>-Einfluß stark aufgelockert zu sein. Da E-cadherin unter diesen Bedingungen unverändert exprimiert wird, kann eine Herunterregulierung dieses Adhäsionsproteins nicht die Ursache der Veränderung sein. Möglicherweise sind andere Proteine in diesen Prozess involviert, die die Zell-Zelladhäsion schwächen, ohne daß E-cadherin herunterreguliert wird. Zum Beispiel könnte der cytoplasmatische Zelladhäsionskomplex, der die intrazelluläre Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet, nicht korrekt ausgebildet sein, was die Zell-Zelladhäsion schwächen würde [68]. Um dies aufzuklären könnte man die Expression von Komponenten dieses Komplexes, zum Beispiel  $\beta$ -Catenin, untersuchen. Der mesenchymale Marker Vimentin scheint hierbei keine Rolle zu spielen, da die Expression dieses Proteins nicht durch CoCl<sub>2</sub>-Behandlung induziert werden konnte.

**Abb. 5.3** faßt noch einmal das aus den vorliegenden Ergebnissen entstandene Modell der Regulation von EMT-assoziierten Proteinen durch Hypoxie im Magenkarzinom zusammen. Danach wirkt Hif-1 in der frühen Phase der Hypoxie als Induktor der Snail-Expression. Snail fungiert in diesem Stadium nicht als E-cadherin-Repressor, sondern könnte als Überlebensfaktor agieren. In der späteren Phase der Hypoxie wird die Expression von Slug und möglicherweise auch von MMPs induziert. Dadurch wird E-cadherin herunterreguliert.



**Abb. 5.3:** Modell der Regulation von EMT-assoziierten Proteinen im Magenkarzinom durch Hypoxie. In der frühen Phase von Tumorphypoxie wird Snail durch Hif-1 hochreguliert. Snail wirkt nicht als E-cadherin-Repressor, sondern könnte als antiapoptotischer Faktor wirken. In der späteren Phase der Hypoxie wird die Slug-Expression und möglicherweise die Expression von MMPs induziert, wodurch E-cadherin herunterreguliert wird. Die gestrichelten Linien geben mögliche Wege an, die allerdings nicht durch eigene Ergebnisse belegt wurden.

### 5.1.3 Auswirkungen von Hypoxie auf die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7

Die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 exprimiert unter Normalbedingungen E-cadherin sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Durch Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$  veränderte sich die mRNA-Menge nicht, die Proteinmenge stieg nach 48 Stunden leicht an. Nach Inkubation von MCF7-Zellen in 1 %  $\text{O}_2$  exprimierten diese E-cadherin auf RNA-Ebene zunächst unverändert und nach 48 Stunden leicht vermindert. Die E-cadherin Proteinmenge wurde in diesen Zellen durch Hypoxie allerdings drastisch verringert.

Snail wird in MCF7-Zellen nur schwach auf RNA-Ebene exprimiert.  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung induzierte die Expression von Snail stark, und zwar sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Die mRNA-Menge von Snail wurde durch Inkubation in 1 %  $\text{O}_2$  zunächst sogar verringert und war dann gleich hoch wie in normoxischen Zellen. Die Proteinexpression von Snail konnte durch Hypoxie in diesen Zellen nicht induziert werden. Wie bereits erwähnt könnte die Diskrepanz zwischen der Reaktion der Zellen auf  $\text{CoCl}_2$ -Behandlung und Inkubation in 1 %  $\text{O}_2$  zum Einen darauf beruhen, daß  $\text{CoCl}_2$  lediglich Hif-1 $\alpha$  stabilisiert, wobei Sauerstoffmangel sicherlich einen globaleren Einfluß auf

Zellen hat. Zum Anderen kann man auch den Einfluß der pH-Wert-Änderung in 1 % O<sub>2</sub> oder einer möglichen Toxizität bzw. der Chlorierungs-Eigenschaften von CoCl<sub>2</sub> nicht ausschließen.

Transfektion von MCF7-Zellen mit stabilisiertem Hif-1 $\alpha$  hatte zwar keine Auswirkung auf die mRNA-Expression von Snail, die Proteinexpression war allerdings in Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Zellen im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen erhöht. Das spricht für eine Regulation der Proteinstabilität von Snail durch Hif-1. So könnte Hif-1 zum Beispiel die Snail-Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  verhindern. Diese Phosphorylierung führt zum Export von Snail aus dem Zellkern ins Cytoplasma und zum Ubiquitin-vermittelten Abbau im Proteasom [104, 105]. Um diese Frage zu klären, sollte man die Expression von GSK3 $\beta$  und seinen Zielgenen oder Interaktionspartnern in Hif-1 $\alpha$ -transfizierten MCF7-Zellen untersuchen.

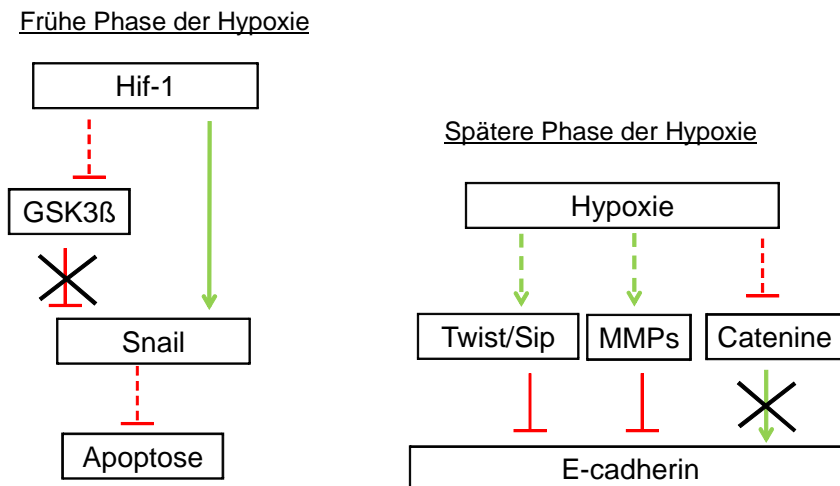
Die Slug mRNA-Expression nahm in den Mammakarzinom-Zellen unter CoCl<sub>2</sub>-Behandlung kontinuierlich ab. In MCF7-Zellen, die in 1 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden, war die Slug mRNA-Expression zunächst unverändert und nach 48 Stunden leicht vermindert. Auch nach Transfektion dieser Zellen mit stabilisiertem Hif-1 $\alpha$  war die RNA-Expression von Slug vermindert. Slug scheint also keine Rolle in der Hypoxie-vermittelten EMT in diesen Zellen zu spielen.

Auch durch eine Snail-vermittelte Repression kann die Herunterregulation der E-cadherin Expression in hypoxischen MCF7-Zellen nicht erklärt werden, da Snail weder vermehrt exprimiert noch stabilisiert wird. Es könnten andere E-cadherin-Repressoren, wie Twist oder Sip1 eine Rolle spielen. Da die mRNA-Menge von E-cadherin aber nur leicht vermindert ist, ist eine Regulation von E-cadherin auf einer anderen Ebene wahrscheinlicher. So könnte E-cadherin durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) abgebaut werden. Oder E-cadherin wird internalisiert und im Cytoplasma abgebaut. Um dies herauszufinden, könnte man beispielsweise über Immunfluoreszenz die Lokalisation des verbliebenen E-cadherin-Proteins bestimmen. Außerdem könnte man überprüfen, ob in hypoxischen MCF7-Zellen vermehrt MMPs exprimiert werden. Bei den Mammakarzinom-Zellen scheint außerdem wiederum nicht die Hif-1 $\alpha$ -Stabilisierung allein ausreichend zu sein, um E-cadherin herunterzuregulieren. In CoCl<sub>2</sub>-behandelten und Hif-1 $\alpha$ -transfizierten Zellen kam es nicht zu einer verminderten E-cadherin Proteinmenge. In „wirklicher“ Hypoxie scheinen also noch weitere Faktoren eine Rolle zu spielen.

**Abb. 5.4** faßt das Modell der Regulation von EMT-assoziierten Proteinen durch Hypoxie im Mammakarzinom noch einmal zusammen. Danach wird Snail durch Hif-1 in der frühen Phase der Hypoxie einerseits durch Hemmung von GSK3 $\beta$  stabilisiert. Andererseits wird aber auch die Snail-Expression durch



Hif-1 induziert. In der späteren Phase der Hypoxie könnte E-cadherin durch Hochregulation von Repressoren wie Twist oder Sip1 gehemmt werden. Außerdem könnte E-cadherin durch die Herunterregulierung von Bestandteilen des E-cadherin/Catenin-Komplexes destabilisiert werden.



**Abb. 5.4:** Modell der Regulation von EMT-assoziierten Proteinen durch Hypoxie im Mammakarzinom. Direkt durch Hif-1 oder in der frühen Phase der Hypoxie wird Snail einerseits durch Hemmung von GSK3β stabilisiert. Andererseits wird aber auch die Snail-Expression durch Hif-1 induziert. In der späteren Phase der Hypoxie könnte E-cadherin durch Hochregulation von Repressoren wie Twist oder Sip1 gehemmt werden. Außerdem könnte E-cadherin durch die Herunterregulierung von Bestandteilen des E-cadherin/Catenin-Komplexes destabilisiert werden. Die gestrichelten Linien geben mögliche Wege an, mit denen Hypoxie Einfluß auf die EMT nimmt, diese wurden allerdings nicht durch eigene Ergebnisse belegt.

## 5.2 HYPOXIE UND EMT IM MAUSMODELL

Um der Situation im Tumor noch näher zu kommen als im Zellkulturmodell, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Mausmodell aufgebaut und untersucht. Dazu wurden in Nacktmäusen Tumorxenotransplantate einer Endometriumkarzinom-Zelllinie (Ishikawa) und einer Epidermoid-Karzinom-Zelllinie (A431) erzeugt. Den Mäusen wurde kurz vor Herausschneiden der Tumore Pimonidazol injiziert. Dadurch konnten hypoxische Bereiche der Tumore immunhistochemisch von normoxischen Bereichen unterschieden

werden. Obwohl Pimonidazol als Hypoxiemarker allgemein anerkannt ist, wurden die hypoxischen Bereiche mit einem weiteren Marker verifizieren. Das hat sich allerdings als äußerst schwierig herausgestellt, da kein Hypoxie-spezifischer Antikörper gefunden wurde, der in der Immunhistochemie oder in Proteinextrakten zuverlässige Resultate geliefert hat. Deshalb wurde auf die RNA-Ebene zurückgegriffen, wo sich in der Zellkultur bereits Glut1 als guter Hypoxiemarker erwiesen hatte. So konnten von insgesamt 20 Tumoren in 10 Tumoren die Pimonidazol-positiven Bereiche mit der Glut1-Expression verifiziert werden.

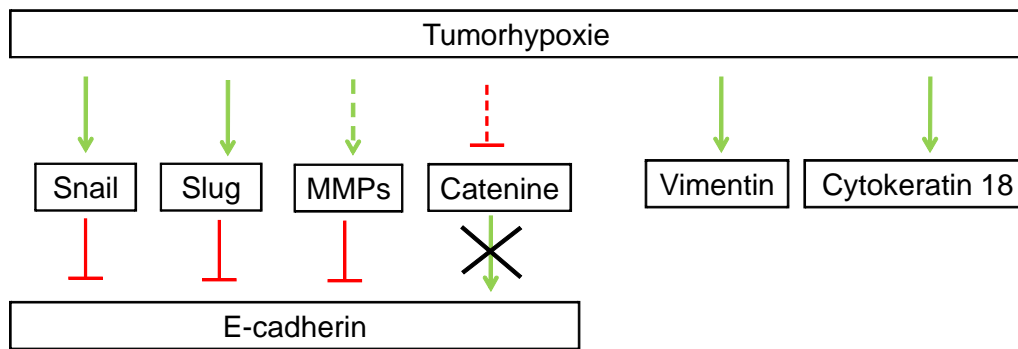
Aus dieser Gruppe von Tumoren war nur ein Teil E-cadherin-positiv, obwohl die zugrundeliegenden Zelllinien E-cadherin exprimieren. Zum Teil müssen die Zellen im Lauf des Tumorwachstums E-cadherin verloren haben. Bei den E-cadherin-positiven Tumoren zeigte sich in der immunhistochemischen Analyse bei einer großen Mehrzahl (83 %) eine Herunterregulierung von E-cadherin in hypoxischen Bereichen im Vergleich zu normoxischen Bereichen. 40 % dieser Tumore zeigten in der Immunhistochemie (IHC) eine Überexpression von Snail in hypoxischen Bereichen. In diesen Tumoren scheint die E-cadherin-Repression Snail-vermittelt zu sein. Allerdings konnte dies nicht in Protein-Mikroarrays bestätigt werden. In diesem Analyseverfahren zeigte keiner dieser Tumore eine Überexpression von Snail in hypoxischen Bereichen. Anscheinend besteht ein Unterschied in der Proteinbindung des Antikörpers in IHC und Mikroarray. In diesem Fall könnte dieser darin liegen, daß Snail ein nukleäres Protein ist. Möglicherweise werden durch die verwendete Methode für die Proteinextraktion die nukleären Proteine nicht vollständig extrahiert.

Ebenfalls in 40 % dieser Tumore war Slug in hypoxischen Bereichen auf RNA-Ebene überexprimiert. Dies konnte leider aufgrund des fehlenden Antikörpers nicht auf Proteinebene verifiziert werden. In diesen Tumoren könnte also Slug die E-cadherin-Transkription hemmen. Allerdings findet man in 80 % der Tumore, die in hypoxischen Arealen E-cadherin auf Proteinebene herunterreguliert haben, in diesen Bereichen mehr E-cadherin mRNA als in normoxischen Bereichen. Das könnte einerseits eine Gegensteuerung der Zellen auf fehlendes E-cadherin-Protein mit Hochfahren der Transkription sein. Andererseits könnte es sich bei der Herunterregulierung von E-cadherin auch hier um eine Regulation über Proteinstabilisierung handeln, beispielsweise durch Matrix-Metalloproteinasen. Es wurde bereits gezeigt, daß verschiedene Matrix-Metalloproteinasen, beispielsweise MMP2 und MMP9 durch hypoxische Konditionen überexprimiert werden [209] [210]. Außerdem könnte E-cadherin über eine Schwächung des E-cadherin/Catenin-Komplexes destabilisiert werden. Im Protein-Mikroarray konnten wegen Materialmangels leider nur vier (drei E-cadherin-positiv, ein E-cadherin-negativ) der zehn Tumore

untersucht werden. Von diesen zeigten interessanterweise alle drei E-cadherin-positiven Tumoren eine Herunterregulation von E-cadherin in hypoxischen Arealen. Dies stimmte nur in einem der insgesamt vier (25 %) mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Analyse überein. Möglicherweise sind in den Proteinlysaten die Epitope des E-cadherin-Proteins, an das der Antikörper bindet, besser zugänglich als in den Gewebeschnitten. Es könnte sein, daß deshalb dort Unterschiede in der Expression besser erkannt werden können.

In den zehn Tumoren zeigte sich in immunhistochemischen Analysen keine Auswirkung von Hypoxie auf die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin. Wurde dieses Protein allerdings über Protein-Mikroarrays analysiert, zeigten 75 % der Tumore eine Überexpression in hypoxischen Bereichen. Das spricht wiederum dafür, daß die Epitope, an die der Antikörper bindet, im Mikroarray besser zugänglich sind als im Gewebeschnitt. Möglicherweise wird in der Immunhistochemie nur eine sehr dramatische Überexpression von Vimentin erkannt, wobei der Mikroarray sensitiver ist. Cytokeratin 18 war interessanterweise in hypoxischen Arealen von 75 % der Tumore überexprimiert. Klassischerweise wird Cytokeratin 18 als epithelialer Marker angesehen. Verschiedene Studien haben allerdings bewiesen, daß die Coexpression von Vimentin und Cytokeratin 18 die Motilität von Tumorzellen und damit Metastasierung fördert [188, 211-215]. So exprimieren humane Melanome nur Vimentin. Metastasierende Melanome allerdings coexprimieren Vimentin und Cytokeratine [213-215]. In den experimentellen Maus-Tumoren in dieser Arbeit, die in hypoxischen Arealen Cytokeratin 18 überexprimieren, wird auch Vimentin vermehrt in hypoxischen Bereichen exprimiert. Diese Coexpression könnte also ein Hinweis auf erhöhte Zellmotilität und -invasivität in hypoxischen Tumorbereichen sein.

Insgesamt scheint die Regulation der EMT in diesem Modell sehr komplex zu sein. Was aber eine wichtige Rolle zu spielen scheint ist die Herunterregulierung der Proteinexpression von E-cadherin durch Hypoxie. **Abb. 5.5** fasst die Proteine, die durch Tumorhypoxie im Mausmodell reguliert werden, noch einmal zusammen.



**Abb. 5.5:** Proteine, die durch Hypoxie im Mausmodell reguliert werden. Es gibt mehrere Ebenen auf denen E-cadherin hier reguliert werden könnte. Durch die Hochregulation der Repressoren Snail und Slug, möglicherweise aber auch durch Hochregulation von MMPs oder durch Schwächung des E-cadherin/Catenin-Komplexes. Der mesenchymale Marker Vimentin wird durch Hypoxie in diesem Modell überexprimiert. Die erhöhte Cytokeratin 18 Expression könnte hier durch die Coexpression mit Vimentin auf eine erhöhte Zellmotilität und -invasivität hindeuten. Die gestrichelten Linien geben mögliche Wege an, über die Hypoxie EMT regulieren könnte, die allerdings nicht durch eigene Ergebnisse belegt wurden.

### 5.3 HYPOXIE UND EMT IN NIERENZELLKARZINOMEN

Klarzellige Nierenzellkarzinome sind zu einem hohen Prozentsatz (ca. 70 %) von einem Verlust des VHL-Tumorsuppressors gekennzeichnet. Durch eine fehlende VHL-Funktion wird Hif-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen stabilisiert, und Hif-1 kann die Transkription seiner Zielgene induzieren. Dadurch stellen klarzellige Nierenzellkarzinome ein ideales Modell für die Untersuchung von Tumorphypoxie dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumorproben von 16 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom untersucht. Da leider kein spezifischer Antikörper gegen VHL vorlag, wurde auch hier die Einteilung in „normoxische“ und „hypoxische“ Tumore über den Hypoxiemarker Glut1 vorgenommen. Unterstützt wurde diese Auswahl durch einen weiteren Hypoxiemarker, Vegf, dessen RNA-Expression statistisch signifikant mit der RNA-Expression von Glut1 korrelierte ( $p=0,009$ ). Bei der RNA-Expression von E-cadherin gab es keinen nennenswerten Unterschied in hypoxischen und normoxischen Tumoren. Auf Proteinebene hingegen war E-cadherin in hypoxischen Tumoren geringer exprimiert als in normoxischen. Hypoxische Tumore wiesen zwar eine

geringere mRNA-Menge von Snail als normoxische Tumore auf, die Proteinmenge war jedoch in hypoxischen Tumoren etwa gleich hoch wie in normoxischen. Slug wurde in den Tumoren, die Glut1 überexprimieren, höher exprimiert als in Glut1 schwach-exprimierenden Tumoren. Dies konnte wiederum nur auf mRNA-Ebene untersucht werden. Gapdh wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene stärker in hypoxischen Tumoren exprimiert. Auf die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin hatte in diesem Modell Hypoxie keinen Einfluß. Der epitheliale Marker Cytokeratin 18 dagegen wurde in „hypoxischen“ Nierenzellkarzinomen geringer exprimiert als in „normoxischen“.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß die epithelialen Marker E-cadherin und Cytokeratin 18 in Glut1 überexprimierenden Tumoren geringer exprimiert werden als in Tumoren, die Glut1 nur schwach exprimieren. Da der mesenchymale Marker Vimentin in beiden Tumorgruppen gleich exprimiert wird, scheint es sich bei der Hypoxie-induzierten EMT in Nierenzellkarzinomen eher um eine partielle EMT zu handeln. Zur Klärung dieser Frage wäre es aber sinnvoll, noch weitere mesenchymale Marker, wie zum Beispiel Fibronektin oder *Smooth-muscle Actin*, zu untersuchen. Diese partielle EMT scheint nicht Snail-vermittelt zu sein, da das Snail-Protein in hypoxischen und normoxischen Tumoren gleichermaßen exprimiert wird. Dagegen könnte die Herunterregulierung von E-cadherin und Cytokeratin 18 durch Slug ausgelöst werden. Slug mRNA wird in hypoxischen Tumoren stärker exprimiert als in normoxischen und sowohl E-cadherin als auch Cytokeratin 18 sind bekannte Zielgene von Slug. Ziel wäre es allerdings einen geeigneten Slug-Antikörper zu finden, um die Überexpression von Slug auf Proteinebene verifizieren zu können. Die Regulation von E-cadherin über Slug kommt allerdings wiederum nur in Frage, wenn man die unveränderte mRNA-Menge von E-cadherin mit einer Gegenreaktion der Zelle erklärt. Andererseits könnte auch hier wieder die E-cadherin Proteinmenge über eine Proteinstabilisierung reguliert werden. Um dies zu klären, könnte die Expression von Proteinen, die E-cadherin auf Proteinebene regulieren, beispielsweise MMPs, untersucht werden.

**Abb. 5.6** zeigt ein Modell zur Repression der epithelialen Proteine Cytokeratin 18 und E-cadherin in VHL-defizienten Nierenzellkarzinomen. Cytokeratin 18 könnte hier durch die Hif-1-vermittelte Überexpression von Slug herunterreguliert werden. Die E-cadherin Expression könnte ebenfalls über diesen Weg gehemmt werden. Außerdem könnte das E-cadherin-Protein in VHL-negativen Nierenzellkarzinomen durch MMPs oder durch Schwächung des E-cadherin/Catenin-Komplexes destabilisiert werden.

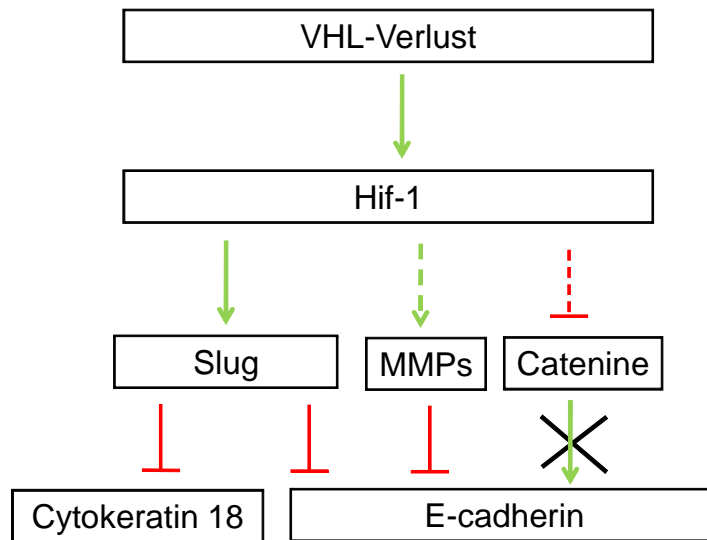


Abb. 5.6: In *Glut1*-überexprimierenden Nierenzellkarzinomen kommt es zur Überexpression von Slug und dadurch zur Repression von Cytokeratin 18 und E-cadherin. E-cadherin könnte aber auch auf Proteinebene durch MMPs oder über Schwächung des E-cadherin/Catenin-Komplexes destabilisiert werden. Die gestrichelten Linien geben mögliche Wege an, die allerdings nicht durch eigene Ergebnisse belegt wurden.

## 6 REFERENZEN

1. Vaupel, P. and A. Mayer, *Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(2): p. 225-39.
2. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(1): p. 38-47.
3. Patiar, S. and A.L. Harris, *Role of hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapy target*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13 Suppl 1**: p. S61-75.
4. Ziello, J.E., I.S. Jovin, and Y. Huang, *Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia*. *Yale J Biol Med*, 2007. **80**(2): p. 51-60.
5. Sowter, H.M., et al., *Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia*. *Cancer Res*, 2003. **63**(19): p. 6130-4.
6. Pouyssegur, J., F. Dayan, and N.M. Mazure, *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 437-43.
7. Kaelin, W.G., *Proline hydroxylation and gene expression*. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 115-28.
8. Kvietikova, I., et al., *The hypoxia-inducible factor-1 DNA recognition site is cAMP-responsive*. *Kidney Int*, 1997. **51**(2): p. 564-6.
9. Fink, T., et al., *Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1*. *Blood*, 2002. **99**(6): p. 2077-83.
10. Kimura, H., et al., *Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(3): p. 2292-8.
11. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(10): p. 721-32.
12. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
13. Carmeliet, P., et al., *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*. *Nature*, 1998. **394**(6692): p. 485-90.
14. Iyer, N.V., et al., *Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha*. *Genes Dev*, 1998. **12**(2): p. 149-62.
15. Ryan, H.E., J. Lo, and R.S. Johnson, *HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization*. *Embo J*, 1998. **17**(11): p. 3005-15.

16. Krishnamachary, B., et al., *Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1*. *Cancer Res*, 2003. **63**(5): p. 1138-43.
17. Wykoff, C.C., et al., *Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling*. *Oncogene*, 2000. **19**(54): p. 6297-305.
18. Guppy, M., *The hypoxic core: a possible answer to the cancer paradox*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **299**(4): p. 676-80.
19. Vaupel, P., O. Thews, and M. Hoekel, *Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia*. *Med Oncol*, 2001. **18**(4): p. 243-59.
20. Vaupel, P., A. Mayer, and M. Hockel, *Tumor hypoxia and malignant progression*. *Methods Enzymol*, 2004. **381**: p. 335-54.
21. Vaupel, P., S. Briest, and M. Hockel, *Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications*. *Wien Med Wochenschr*, 2002. **152**(13-14): p. 334-42.
22. Vaupel, P., *Tumor hypoxia and therapeutic resistance*, in *Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) in clinical oncology* M.R. Nowrousian, Editor. 2002, Springer: Berlin Heidelberg New York. p. 127-146.
23. Vaupel, P., *Tumor hypoxia*. 1999, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart.
24. Vaupel, P., *Effects of anaemia and hypoxia on tumour biology*, in *European school of oncology. Scientific Updates*, C.L. Bokemeyer, H., Editor. 2005. p. 47-66.
25. Vaupel, P., *Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography*. *Antioxidants & Redox Signalling*, 2007 (in press).
26. Vaupel, P., *The role of hypoxia-induced factors in tumor progression*. *Oncologist*, 2004. **9 Suppl 5**: p. 10-7.
27. Hockel, M. and P. Vaupel, *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects*. *J Natl Cancer Inst*, 2001. **93**(4): p. 266-76.
28. Semenza, G.L., *Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer*. *Intern Med*, 2002. **41**(2): p. 79-83.
29. Semenza, G.L., *HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics*. *Trends Mol Med*, 2002. **8**(4 Suppl): p. S62-7.
30. Leo, C., Giaccia, A. J., & Denko, N. C., *The hypoxic microenvironment and gene expression*. *Seminars in Radiation Oncology*, 2004. **14**: p. 207-214.
31. Reynolds, T.Y., S. Rockwell, and P.M. Glazer, *Genetic instability induced by the tumor microenvironment*. *Cancer Res*, 1996. **56**(24): p. 5754-7.
32. Yuan, J., et al., *Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH*. *Cancer Res*, 2000. **60**(16): p. 4372-6.
33. Graeber, T.G., et al., *Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours*. *Nature*, 1996. **379**(6560): p. 88-91.
34. Kim, C.Y., et al., *Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions*. *Cancer Res*, 1997. **57**(19): p. 4200-4.



35. Kondo, A., et al., *Hypoxia-induced enrichment and mutagenesis of cells that have lost DNA mismatch repair*. *Cancer Res*, 2001. **61**(20): p. 7603-7.
36. Chan, D.A. and A.J. Giaccia, *Hypoxia, gene expression, and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(2): p. 333-9.
37. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(6): p. 415-28.
38. Hockel, M., et al., *Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix*. *Radiother Oncol*, 1993. **26**(1): p. 45-50.
39. Brizel, D.M., et al., *Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma*. *Cancer Res*, 1996. **56**(5): p. 941-3.
40. Subarsky, P. and R.P. Hill, *The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression*. *Clin Exp Metastasis*, 2003. **20**(3): p. 237-50.
41. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(2): p. 131-42.
42. Hay, E.D., *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. *Dev Dyn*, 2005. **233**(3): p. 706-20.
43. Hay, E.D., *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. *Acta Anat (Basel)*, 1995. **154**(1): p. 8-20.
44. Christ, B. and C.P. Ordahl, *Early stages of chick somite development*. *Anat Embryol (Berl)*, 1995. **191**(5): p. 381-96.
45. Funayama, N., et al., *Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm*. *Development*, 1999. **126**(18): p. 4129-38.
46. Locascio, A. and M.A. Nieto, *Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(4): p. 464-9.
47. Gotzmann, J., et al., *Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis*. *Mutat Res*, 2004. **566**(1): p. 9-20.
48. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(6): p. 442-54.
49. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(6): p. 740-6.
50. Thiery, J.P. and D. Chopin, *Epithelial cell plasticity in development and tumor progression*. *Cancer Metastasis Rev*, 1999. **18**(1): p. 31-42.
51. Funasaka, T., et al., *Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor expression by hypoxia*. *Faseb J*, 2005. **19**(11): p. 1422-30.
52. Pennacchietti, S., et al., *Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene*. *Cancer Cell*, 2003. **3**(4): p. 347-61.
53. Birchmeier, W. and J. Behrens, *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1198**(1): p. 11-26.

54. Beavon, I.R., *Regulation of E-cadherin: does hypoxia initiate the metastatic cascade?* Mol Pathol, 1999. **52**(4): p. 179-88.
55. Imai, T., et al., *Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells.* Am J Pathol, 2003. **163**(4): p. 1437-47.
56. Esteban, M.A., et al., *Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor.* Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3567-75.
57. Denko, N.C., et al., *Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns.* Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5907-14.
58. Kallio, P.J., et al., *Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway.* J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6519-25.
59. Peinado, H., et al., *A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression.* Embo J, 2005. **24**(19): p. 3446-58.
60. Yang, M.H., et al., *Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis.* Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 295-305.
61. Berx, G., et al., *Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1).* Genomics, 1995. **26**(2): p. 281-9.
62. Ranscht, B., *Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development.* Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 740-6.
63. Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy, *Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members.* J Mol Biol, 2000. **299**(3): p. 551-72.
64. Takeichi, M., *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion.* Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 237-52.
65. Remmele, W., *Pathologie 4.* 1995: Springer.
66. Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs, *Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions.* Cell, 2003. **112**(4): p. 535-48.
67. Takeichi, M., *Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator.* Science, 1991. **251**(5000): p. 1451-5.
68. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 118-32.
69. Savagner, P., *Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition.* Bioessays, 2001. **23**(10): p. 912-23.
70. Vleminckx, K., et al., *Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role.* Cell, 1991. **66**(1): p. 107-19.
71. Fujimoto, J., et al., *Expression of E-cadherin and alpha- and beta-catenin mRNAs in uterine cervical cancers.* Tumour Biol, 1997. **18**(4): p. 206-12.
72. Jeffers, M.D., et al., *E-cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix.* Gynecol Oncol, 1997. **64**(3): p. 481-6.

73. Moll, R., et al., *Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1731-42.
74. Huiping, C., et al., *Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastric cancer*. BMC Cancer, 2001. **1**: p. 16.
75. Jawhari, A., et al., *Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival*. Gastroenterology, 1997. **112**(1): p. 46-54.
76. Berx, G., et al., *Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene*. Hum Mutat, 1998. **12**(4): p. 226-37.
77. Correa, P. and Y.H. Shiao, *Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(7 Suppl): p. 1941s-1943s.
78. Wheeler, J.M., et al., *Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer*. Gut, 2001. **48**(3): p. 367-71.
79. Strathdee, G., *Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(5): p. 373-9.
80. Rashid, M.G., et al., *Posttranslational truncation and inactivation of human E-cadherin distinguishes prostate cancer from matched normal prostate*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 489-92.
81. Fujita, Y., et al., *Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex*. Nat Cell Biol, 2002. **4**: p. 222-231.
82. Hemavathy, K., S.I. Ashraf, and Y.T. Ip, *Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer*. Gene, 2000. **257**(1): p. 1-12.
83. Comijn, J., et al., *The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion*. Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1267-78.
84. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
85. Battle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 84-9.
86. Behrens, J., et al., *The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11495-9.
87. Ringwald, M., et al., *The structure of the gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(23): p. 6533-9.
88. Bussemakers, M.J., et al., *Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cell lines: characterization of the human E-cadherin gene promoter*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **203**(2): p. 1284-90.
89. Hennig, G., et al., *Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 595-602.

90. Girolidi, L.A., et al., *Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **241**(2): p. 453-8.
91. Faraldo, M.L., et al., *Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis*. Mol Carcinog, 1997. **20**(1): p. 33-47.
92. Rodrigo, I., A.C. Cato, and A. Cano, *Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element*. Exp Cell Res, 1999. **248**(2): p. 358-71.
93. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 365-75.
94. Blanco, M.J., et al., *Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas*. Oncogene, 2002. **21**(20): p. 3241-6.
95. LaBonne, C. and M. Bronner-Fraser, *Snail-related transcriptional repressors are required in Xenopus for both the induction of the neural crest and its subsequent migration*. Dev Biol, 2000. **221**(1): p. 195-205.
96. Carver, E.A., et al., *The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): p. 8184-8.
97. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. Development, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
98. Peinado, H., et al., *Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 306-19.
99. Mauhin, V., et al., *Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(17): p. 3951-7.
100. De Craene, B., et al., *The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6237-44.
101. Grau, Y., C. Carteret, and P. Simpson, *Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of Snail, a gene involved in embryonic patterning in Drosophila Melanogaster*. Genetics, 1984. **108**(2): p. 347-360.
102. Twigg, S.R. and A.O. Wilkie, *Characterisation of the human snail (SNAI1) gene and exclusion as a major disease gene in craniosynostosis*. Hum Genet, 1999. **105**(4): p. 320-6.
103. Dominguez, D., et al., *Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(14): p. 5078-89.
104. Zhou, B.P., et al., *Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(10): p. 931-40.
105. Yook, J.I., et al., *A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1398-406.

106. Yang, Z., et al., *Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions*. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3179-84.
107. Yamashita, S., et al., *Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer*. *Nature*, 2004. **429**(6989): p. 298-302.
108. Ikenouchi, J., et al., *Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 10): p. 1959-67.
109. Ohkubo, T. and M. Ozawa, *The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 9): p. 1675-85.
110. Guaita, S., et al., *Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39209-16.
111. Peiro, S., et al., *Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(7): p. 2077-84.
112. Tripathi, M.K., et al., *Regulation of BRCA2 gene expression by the SLUG repressor protein in human breast cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(17): p. 17163-71.
113. Kajita, M., K.N. McClinic, and P.A. Wade, *Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(17): p. 7559-66.
114. Wu, W.S., et al., *Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma*. *Cell*, 2005. **123**(4): p. 641-53.
115. Inukai, T., et al., *SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein*. *Mol Cell*, 1999. **4**(3): p. 343-52.
116. Rosivatz, E., et al., *Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(5): p. 1881-91.
117. Jiao, W., K. Miyazaki, and Y. Kitajima, *Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo*. *Br J Cancer*, 2002. **86**(1): p. 98-101.
118. Yokoyama, K., et al., *Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro*. *Oral Oncol*, 2001. **37**(1): p. 65-71.
119. Elloul, S., et al., *Expression of E-cadherin transcriptional regulators in ovarian carcinoma*. *Virchows Arch*, 2006. **449**(5): p. 520-8.
120. Poser, I., et al., *Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 24661-6.
121. Nieto, M.A., et al., *Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene*. *Science*, 1994. **264**(5160): p. 835-9.
122. Leroy, P. and K.E. Mostov, *Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(5): p. 1943-52.

123. Cohen, M.E., et al., *Human SLUG gene organization, expression, and chromosome map location on 8q*. Genomics, 1998. **51**(3): p. 468-71.
124. Vernon, A.E. and C. LaBonne, *Slug stability is dynamically regulated during neural crest development by the F-box protein Ppa*. Development, 2006. **133**(17): p. 3359-70.
125. Wang, Z., et al., *Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug*. Oncogene, 2007. **26**(8): p. 1222-30.
126. Bolos, V., et al., *The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 3): p. 499-511.
127. Hajra, K.M., D.Y. Chen, and E.R. Fearon, *The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1613-8.
128. Sakai, D., et al., *Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development*. Development, 2006. **133**(7): p. 1323-33.
129. Elloul, S., et al., *Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma*. Cancer, 2005. **103**(8): p. 1631-43.
130. Martin, T.A., et al., *Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer*. Ann Surg Oncol, 2005. **12**(6): p. 488-96.
131. Come, C., et al., *Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5395-402.
132. Shioiri, M., et al., *Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients*. Br J Cancer, 2006. **94**(12): p. 1816-22.
133. Castro Alves, C., et al., *Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin*. J Pathol, 2007. **211**(5): p. 507-15.
134. Uchikado, Y., et al., *Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(3): p. 1174-80.
135. Shih, J.Y., et al., *Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(22): p. 8070-8.
136. Sivertsen, S., et al., *Expression of Snail, Slug and Sip1 in malignant mesothelioma effusions is associated with matrix metalloproteinase, but not with cadherin expression*. Lung Cancer, 2006. **54**(3): p. 309-17.
137. Gupta, P.B., et al., *The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation*. Nat Genet, 2005. **37**(10): p. 1047-54.
138. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2006*. CA Cancer J Clin, 2006. **56**(2): p. 106-30.
139. Costa, L.J. and H.A. Drabkin, *Renal cell carcinoma: new developments in molecular biology and potential for targeted therapies*. Oncologist, 2007. **12**(12): p. 1404-15.

140. Sufan, R.I., M.A. Jewett, and M. Ohh, *The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(1): p. F1-6.
141. Linehan, W.M., M.M. Walther, and B. Zbar, *The genetic basis of cancer of the kidney*. J Urol, 2003. **170**(6 Pt 1): p. 2163-72.
142. Yao, M., et al., *VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(20): p. 1569-75.
143. Kaelin, W.G., Jr., *The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 627-38.
144. Mandriota, S.J., et al., *HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron*. Cancer Cell, 2002. **1**(5): p. 459-68.
145. Kondo, K., et al., *Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth*. PLoS Biol, 2003. **1**(3): p. E83.
146. Sutphin, P.D., et al., *Targeting the loss of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in renal cell carcinoma cells*. Cancer Res, 2007. **67**(12): p. 5896-905.
147. Mendel, D.B., et al., *In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 327-37.
148. Motzer, R.J., et al., *Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 115-24.
149. Kageyama, Y., et al., *Leu-574 of human HIF-1alpha is a molecular determinant of prolyl hydroxylation*. Faseb J, 2004. **18**(9): p. 1028-30.
150. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-254.
151. Rosivatz, E., et al., *Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract*. Virchows Arch, 2006. **448**(3): p. 277-87.
152. Specht, K., et al., *Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue*. Am J Pathol, 2001. **158**(2): p. 419-29.
153. Blechschmidt, K., et al., *Expression of E-cadherin and its repressor snail in placental tissue of normal, preeclamptic and HELLP pregnancies*. Virchows Arch, 2007. **450**(2): p. 195-202.
154. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
155. Becker, K.F., et al., *Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis*. J Pathol, 2007. **211**(3): p. 370-8.

156. Hipp, S., et al., *Precise measurement of the E-cadherin repressor Snail in formalin-fixed endometrial carcinoma using protein lysate microarrays*. Clin Exp Metastasis, 2008.
157. Eisen, M.B., et al., *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14863-8.
158. Pijnenborg, J.M., et al., *Hypoxia contributes to development of recurrent endometrial carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(4): p. 897-904.
159. Horree, N., et al., *Hypoxia and angiogenesis in endometrioid endometrial carcinogenesis*. Cell Oncol, 2007. **29**(3): p. 219-27.
160. Blechschmidt, K., et al., *The E-cadherin repressor snail plays a role in tumor progression of endometrioid adenocarcinomas*. Diagn Mol Pathol, 2007. **16**(4): p. 222-8.
161. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta*. Cell Cycle, 2005. **4**(12): p. 1749-52.
162. Ma, J., et al., *Upregulation of hypoxia inducible factor 1alpha mRNA is associated with elevated vascular endothelial growth factor expression and excessive angiogenesis and predicts a poor prognosis in gastric carcinoma*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(11): p. 1680-6.
163. Sumiyoshi, Y., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(17): p. 5112-7.
164. Tan, E.Y., et al., *Cytoplasmic location of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter survival in invasive breast cancer*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(6): p. R89.
165. Vleugel, M.M., et al., *Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1alpha expression in invasive breast cancer*. J Clin Pathol, 2005. **58**(2): p. 172-7.
166. Kronblad, A., et al., *Hypoxia inducible factor-1alpha is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response*. Int J Cancer, 2006. **118**(10): p. 2609-16.
167. Lundgren, K., C. Holm, and G. Landberg, *Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(24): p. 3233-47.
168. Dales, J.P., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients*. Int J Cancer, 2005. **116**(5): p. 734-9.
169. Gruber, G., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter?* Breast Cancer Res, 2004. **6**(3): p. R191-8.
170. Schindl, M., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(6): p. 1831-7.
171. Bos, R., et al., *Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma*. Cancer, 2003. **97**(6): p. 1573-81.



172. Rosivatz, E., *Epithel-Mesenchymal Transition Regulators in Human Cancer* Dissertation 2004.
173. Piert, M., et al., *Hypoxia-specific tumor imaging with 18F-fluoroazomycin arabinoside*. J Nucl Med, 2005. **46**(1): p. 106-13.
174. Vaupel, P., et al., *Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O<sub>2</sub> tension measurements*. Cancer Res, 1991. **51**(12): p. 3316-22.
175. Zhou, J., et al., *Tumor hypoxia and cancer progression*. Cancer Lett, 2006. **237**(1): p. 10-21.
176. Krishnamachary, B., et al., *Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2725-31.
177. Kurrey, N.K., A. K, and S.A. Bapat, *Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level*. Gynecol Oncol, 2005. **97**(1): p. 155-65.
178. Huber, A.H., et al., *The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12301-9.
179. Huber, A.H. and W.I. Weis, *The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin*. Cell, 2001. **105**(3): p. 391-402.
180. Lilien, J., et al., *Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins*. Dev Dyn, 2002. **224**(1): p. 18-29.
181. Imoto, I., et al., *Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4617-26.
182. Hamm, A., et al., *Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITI<sub>H</sub>) genes in multiple human solid tumors: A systematic expression analysis*. BMC Cancer, 2008. **8**(1): p. 25.
183. Ogata, S., et al., *TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis*. Genes Dev, 2007. **21**(14): p. 1817-31.
184. Lindberg, U., et al., *The microfilament system and malignancy*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(1): p. 2-11.
185. Kureishy, N., et al., *Fascin, and their roles in cell structure and function*. Bioessays, 2002. **24**(4): p. 350-61.
186. Yamashiro, S., et al., *Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(5): p. 993-1006.
187. Yoder, B.J., et al., *The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor-negative breast cancer and a more aggressive clinical course*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(1): p. 186-92.
188. Thompson, E.W., et al., *Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines*. J Cell Physiol, 1992. **150**(3): p. 534-44.

189. Zeng, Q., et al., [The role of biomarkers CK7, Vim and P53 in the development of subtypes of endometrial carcinoma]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2005. **37**(1): p. 81-4.
190. Kita, Y., et al., Clinical significance of LAMB3 and COL7A1 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma. Eur J Surg Oncol, 2008.
191. Katoh, M., Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. Stem Cell Rev, 2007. **3**(1): p. 30-8.
192. Radtke, F., H. Clevers, and O. Riccio, From gut homeostasis to cancer. Curr Mol Med, 2006. **6**(3): p. 275-89.
193. Tepper, R.I., P.K. Pattengale, and P. Leder, Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. Cell, 1989. **57**(3): p. 503-12.
194. Li, W.Q., T. Diamantstein, and T. Blankenstein, Lack of tumorigenicity of interleukin 4 autocrine growing cells seems related to the anti-tumor function of interleukin 4. Mol Immunol, 1990. **27**(12): p. 1331-7.
195. Jansen, M.P., et al., HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. J Clin Oncol, 2007. **25**(6): p. 662-8.
196. Rico-Bautista, E., A. Flores-Morales, and L. Fernandez-Perez, Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(6): p. 431-9.
197. Kim, I., et al., Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis. Biochem J, 2000. **346 Pt 3**: p. 603-10.
198. Lerebours, F., et al., NF-kappa B genes have a major role in Inflammatory Breast Cancer. BMC Cancer, 2008. **8**(1): p. 41.
199. Sung, Y.H., et al., The pleiotropy of telomerase against cell death. Mol Cells, 2005. **19**(3): p. 303-9.
200. Garrido, C., et al., Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ, 2006. **13**(9): p. 1423-33.
201. Giatromanolaki, A., et al., BNIP3 expression in endometrial cancer relates to active hypoxia inducible factor 1alpha pathway and prognosis. J Clin Pathol, 2008. **61**(2): p. 217-20.
202. Tracy, K. and K.F. Macleod, Regulation of mitochondrial integrity, autophagy and cell survival by BNIP3. Autophagy, 2007. **3**(6): p. 616-9.
203. Gurzov, E.N., et al., Targeting c-Jun and JunB proteins as potential anticancer cell therapy. Oncogene, 2008. **27**(5): p. 641-52.
204. Ostman, A., PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 275-86.
205. Reinartz, J.J., et al., Expression of p53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in endometrial carcinoma and correlation with survival and known predictors of survival. Hum Pathol, 1994. **25**(10): p. 1075-83.
206. Sanchez-Beato, M., A. Sanchez-Aguilera, and M.A. Piris, Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. Blood, 2003. **101**(4): p. 1220-35.

207. Grunert, S., M. Jechlinger, and H. Beug, *Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(8): p. 657-65.
208. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 548-58.
209. Faller, D.V., *Endothelial cell responses to hypoxic stress*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(1): p. 74-84.
210. Miyazaki, Y., et al., *The effect of hypoxic microenvironment on matrix metalloproteinase expression in xenografts of human oral squamous cell carcinoma*. Int J Oncol, 2008. **32**(1): p. 145-51.
211. Chu, Y.W., et al., *Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4261-5.
212. Gunther, A., et al., *Differential expression of intermediate-filament proteins in murine sarcoma 180 ascites or solid tumor*. Cancer Res, 1984. **44**(6): p. 2590-4.
213. Trejdosiewicz, L.K., et al., *Phenotypic analysis of cultured melanoma cells. Expression of cytokeratin-type intermediate filaments by the M5 human melanoma cell line*. Exp Cell Res, 1986. **164**(2): p. 388-98.
214. Miettinen, M. and K. Franssila, *Immunohistochemical spectrum of malignant melanoma. The common presence of keratins*. Lab Invest, 1989. **61**(6): p. 623-8.
215. Hendrix, M.J., et al., *Coexpression of vimentin and keratins by human melanoma tumor cells: correlation with invasive and metastatic potential*. J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(3): p. 165-74.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
ALDOC	Aldolase C
AMBP	<i>Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor</i>
AMF	<i>Autocrine motility factor</i>
ANGPTL	<i>Angiopoietin-like</i>
ANK	Ankyrin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
ASCL	<i>Achaete-scute complex-like</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCL	B-Zell Lymphom
bHLH	basic helix-loop-helix
BNIP	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CA9/CAIX	<i>Carbonic anhydrase 9</i>
CASP	Caspase
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CDH	Cadherin
CDH1	Cadherin 1 = E-cadherin
cDNA	<i>copy DNA</i>
CK18	Cytokeratin 18
CTAD	<i>C-terminal transactivation domain</i>
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
CYR	<i>Cystein-rich angiogenic inducer</i>

Da	Dalton
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
DACT	<i>Dapper homolog, antagonist of beta-catenin</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>dots per inch</i>
DPP	<i>Decapentaplegic gene</i>
DTX	<i>Deltex homolog</i>
Ecad	E-cadherin
EDN	Endothelin
EMT	Epithel-Mesenchym-Transition
E-pal	palindromisches Element
FFPE	<i>Formalin-fixed, Paraffine-embedded</i>
FGFR	<i>Fibroblast-growth-factor receptor</i>
FIH	<i>Factor inhibiting Hif</i>
FLRT	<i>Fibronectin leucine rich transmembrane protein</i>
FSCN	Fascin
FSP1	Fibroblasten spezifisches Protein 1
fw	<i>forward</i>
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glut1	Glucose Transporter 1
GSK3 $\beta$	<i>Glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i>
HBS	Hif-1 Bindungssequenz
HDAC	Histon-Deacetylase
HE-Färbung	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung
Hif	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HRE	<i>Hypoxia responsive element</i>
IFN- $\alpha$	Interferon $\alpha$
IGFR	<i>Insuline like growth factor receptor</i>
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin

IL17RB	Interleukin 17 Rezeptor B
INT	<i>Integrase gene</i>
IRS	Immunoreaktivitäts-Score
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
k	Kilo
kb	Kilobasen
LAMB	Laminin-beta
LDHA	Laktat Dehydrogenase A
LIV1	<i>Locus of insensitivity to victorin1 gene</i>
LOX	<i>Lysyl oxidase</i>
LOXL	<i>LOX-like</i>
MDCK	<i>Madin-Darbin canine kidney</i>
MET	<i>Mesenchymal-epithelial transition factor</i>
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MUC-1	Muzin 1
NES	nukleäres Exportsignal
NSCLC	<i>Non small lung cancer</i>
NTAD	<i>N-terminal transactivation domain</i>
ODDD	<i>O<sub>2</sub>-dependent degradation domain</i>
PAK1	<i>p21-activated kinase</i>
PAS	Per/Arnt/Sim
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCDH	Protocadherin
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PDH2	<i>Prolyl hydroxylase domain protein</i>
p-EMT	partielle EMT
PER	<i>Period gene</i>
PGI	<i>Phosphoglucose isomerase</i>
PP	<i>Percentage of positivity</i>
Ppa	<i>Partner of paired</i>

RCC	<i>Renal cell carcinoma</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SAP	<i>Sin3-associated polypeptide</i>
SI	<i>Staining intensity</i>
SIM	<i>Single minded gene</i>
SMAD	<i>Mothers against DPP</i>
SNAG	<i>SNAIL/Gfi-1=growth factor independent</i>
SNAI1	Snail Gen
SNAI2	Slug Gen
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signalling</i>
SP-11	<i>Specificity protein 1</i>
Src	<i>Sarcoma virus transforming gene</i>
Stabwn	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TGF- $\alpha$	<i>Transforming growth factor <math>\alpha</math></i>
TNFAIP	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math> induced protein</i>
uPAR	<i>Urokinase plasminogen activator receptor</i>
Vegf	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VHL	von Hippel-Lindau Faktor
VIM	Vimentin
WISP	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein</i>
WNT	Wingless/INT
ZEB	<i>Zinc finger E-box binding factor</i>