

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel

Der *Hypoxia-inducible factor-1*- Signalweg fördert die Metastasierung von Tumorzellen unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion

Florian Peter Schelter

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.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. H. Daniel
Prüfer der Dissertation:
1. Univ.-Prof. Dr. D. Haller
2. apl. Prof. Dr. A. Krüger
3. Univ.-Prof. Dr. J. Sleeman
Universität Heidelberg
(schriftliche Beurteilung)

Die Dissertation wurde am 07.04.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.09.2011 angenommen.

Für Anne und Judith

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Das Problem der Metastasierung	2
2.2	Invasion und Metastasierung	3
2.2.1	Die metastatische Kaskade	3
2.2.2	Abbildung der metastatischen Kaskade im murinen Modellsystem	7
2.3	Hypoxie und Tumorprogression	9
2.4	Zelluläre Adaption an hypoxische Gegebenheiten	11
2.5	Der Transkriptionsfaktor HIF-1	12
2.5.1	Aufbau des Transkriptionsfaktor HIF-1	12
2.5.2	Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1	12
2.5.3	Einfluss von HIF-1 auf das Zellüberleben.....	14
2.5.4	Die Bedeutung der Hif-1 α Untereinheit bei menschlichen Tumorerkrankungen	15
2.5.5	Einfluss von HIF-1 auf die Invasivität von Tumorzellen.....	16
2.5.6	Zusammenhang zwischen HIF-1 α und Proteolyse	18
2.5.7	Hypoxie und der Met-Signalweg.....	19
3	Ziel der Arbeit.....	22
4	Material und Methoden.....	23
4.1	Material.....	23
4.1.1	Zelllinien.....	23
4.1.2	Bakterienstamm Top10	24
4.1.3	Plasmide	24
4.1.4	Antikörper und weitere Proteine	25
4.1.5	Medien, Lösungen für die Zellkultur, Antibiotika	26
4.1.6	Standards und Kits.....	27
4.1.7	Puffer und Lösungen	28
4.1.8	Chemikalien.....	30
4.1.9	Sonstige Materialien	32
4.2	Tierexperimentelle Methoden.....	32
4.2.1	Verwendete Versuchstiere.....	32
4.2.2	Metastasierungsmodelle	32
4.2.3	Probengewinnung	34
4.3	Methoden der Zellkultur	34
4.3.1	Zellkulturmedien	34

4.3.2	Kulturbedingungen	35
4.3.3	Passagieren von adhärennten Zellen.....	35
4.3.4	Passagieren von Suspensionszellen.....	35
4.3.5	Bestimmung der Zellzahl.....	35
4.3.6	Produktion lentiviraler Zellkulturüberstände.....	36
4.3.7	Infektion von adhärennten Zellen.....	37
4.3.8	Co-Transfektion.....	37
4.3.9	Selektion mit Antibiotika	38
4.3.10	Proliferationsassay.....	38
4.3.11	Boyden-Chamber-Invasionsassay	38
4.3.12	Scatterassay	39
4.3.13	<i>Shedding</i> -Assays.....	40
4.4	Molekularbiologische Methoden	40
4.4.1	Transformation von Bakterien.....	40
4.4.2	Kultivierung und Selektion von Bakterien	41
4.4.3	DNA-Maxipräparation.....	41
4.4.4	RNA-Gewinnung aus Gewebeproben	41
4.4.5	RNA-Gewinnung aus Zellen	41
4.4.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	42
4.4.7	Agarosegelelektrophorese	42
4.4.8	Reverse Transkription.....	43
4.4.9	<i>Real-time</i> Polymerasekettenreaktion	43
4.5	Proteinbiochemische Methoden.....	44
4.5.1	Immunpräzipitation	44
4.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mit BCA TM von Pierce.....	45
4.5.3	Western Blot.....	45
4.6	Immunhistochemische Methoden	48
4.6.1	Herstellung von Kryo-Schnitten.....	48
4.6.2	IHC Protokoll Kryoschnitte (phospho-Met).....	48
4.6.3	Immunzytochemische Färbung phospho-Met	49
4.6.4	<i>In situ</i> Zymography	49
4.6.5	Herstellung von Paraffinschnitten	50
4.6.6	IHC Protokoll Paraffinschnitte	50
4.6.7	IHC Protokoll zur Detektion von Hypoxie mittels Pimonidazol.....	51

4.6.8	TUNEL-Assay	52
4.7	X-Galfärbung	53
4.7.1	X-Galfärbung von Organen	53
4.7.2	X-Galfärbung von Gewebeschnitten	53
4.8	Statistische Analyse	54
5	Ergebnisse	55
5.1	Unabhängigkeit der Nettoproliferation von L-CI.5s Zellen unter Normoxie und Hypoxie von Hif-1 α	55
5.2	Reduktion der Invasivität von L-CI.5s Tumorzellen in vitro durch Knockdown von Hif-1 α	56
5.3	Auftreten hypoxischer Zuständen im L-CI.5s-Modell	57
5.4	Notwendigkeit von Hif-1 α zur Erhöhung des metastatischen Indexes im L-CI.5s Primärtumormodell	59
5.5	Unabhängigkeit der Vaskularisierung von intradermalen L-CI.5s Primärtumoren von Hif-1 α	60
5.6	Notwendigkeit von Tumorzell-Hif-1 α für die Kolonisierung der Leber durch L-CI.5s Tumorzellen	62
5.7	Unabhängigkeit des Überlebens von L-CI.5s Tumorzellen in vivo von Hif-1 α	63
5.8	Regulation der Expression der pro-invasiven Matrix-Metallo-Proteinase-9 (Mmp-9) durch Hif-1 α	65
5.9	Erhöhung der gelatinolytische Aktivität in CT-26L-Lungenmetastasen durch Hif-1 ..	70
5.10	Notwendigkeit von Hif-1 α für das Auswachsen von L-CI.5s Lebermetastasen	71
5.11	Eignung des HGF/Met-Signalweges als Ziel einer gegen die durch Hif-1-gesteigerten Invasivität gerichteten Therapie	74
5.12	Zeitabhängige Reduktion der Met-Oberflächenlevel durch den monoklonalen anti-Met-Antikörper DN30	76
5.13	Hemmung der DN30-induzierten Reduktion der Met-Oberflächenrezeptoren durch die endogenen Breitspektrum-inhibitoren TIMP-1 und TIMP-3	78
5.14	Vermittlung des DN30-induzierten Met-Rezeptor Shedding durch ADAM-10 nicht aber ADAM-17	80
5.15	Vermittlung der DN30-induzierte Reduktion der Aktivierung des Met-Signalweges durch ADAM-10	84

5.16	Notwendigkeit von ADAM-10 für die DN30-verursachte Reduktion des HGF-induzierten Tumorzellscatterings	87
5.17	Notwendigkeit von ADAM-10 für die DN30-verursachte Reduktion der HGF-induzierten Tumorzellinvasivität.....	89
5.18	Induktion der ADAM-10 Expression in A549 Lungenkarzinomzellen durch den HIF-1-Signalweg	90
5.19	Reduktion des Met-Signalwegs durch DN30 unter Hypoxie	91
5.20	Reduktion des HGF-induzierten Tumorzellscatterings durch DN30 unter Hypoxie ...	92
6	Diskussion.....	94
6.1	HIF-1 fördert die Metastasierung unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion	94
6.2	Pro-metastatische HIF-1-regulierte Mechanismen	97
6.2.1	Der HIF-1-Signalweg reguliert die Expression der pro-metastatischen Protease MMP-9	97
6.2.2	Der HIF-1-Signalweg reguliert die Aktivität des Met-Signalwegs	98
6.2.3	Der HIF-1-Signalweg als Sensor für Veränderungen im Protease-Netz – Konsequenzen für die prometastatische Nische.....	99
6.3	HIF-1 – ein riskantes therapeutisches Ziel	100
6.4	HIF-1-nachgeschaltete Moleküle als therapeutische Interventionsmöglichkeiten	102
6.4.1	Kritische Bewertung der HIF-1-nachgeschalteten Gelatinasen MMP-2 und -9 als therapeutische Interventionsmöglichkeiten	102
6.4.2	Der Met-Signalweg als vielversprechendes Ziel einer gegen den HIF-1-Signalweg gerichteten Therapie	103
6.5	Ausblick.....	107
7	Literaturverzeichnis	108
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	119
9	Abkürzungsverzeichnis.....	122
10	Danksagungen.....	124
Anhang	i
	Lebenslauf	i
	Publikationsverzeichnis	ii

1 Zusammenfassung

Während der Progression von malignen Tumorerkrankungen entstehen wiederholt Stresssituationen wie z.B. Sauerstoffmangel (Hypoxie), die eine Adaption der Tumorzellen zur Sicherung ihres Überlebens voraussetzen. Hierbei spielt der *Hypoxia-inducible-factor-1* (HIF-1)-Signalweg eine zentrale Rolle. Ergebnisse aus der Klinik zeigen, dass der Grad an Hypoxie im Primärtumor mit der Bildung von Metastasen korreliert. Dies weist auf eine mögliche Metastasen-fördernde Rolle von HIF-1 hin. Für die invasive Ausbreitung von Tumorzellen sind neben intrazellulären Signalkaskaden wie z.B. dem Met-Signalweg, der die Mobilisierung von Tumorzellen induziert, auch Extrazelluläre Matrix-abbauende Proteasen wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) essentiell. Obgleich vermutet, konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden, dass der HIF-1-Signalweg das metastatische Potential von Tumorzellen direkt und unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion fördert. Dieser Nachweis sollte in dieser Arbeit durch *Knockdown* der regulatorischen α -Untereinheit von HIF-1 in Tumorzellen mit Hilfe der shRNA-Technologie erbracht und anschließend daraus abzuleitende Interventionsmöglichkeiten gezeigt und diskutiert werden. Die hoch-aggressive murine Tumorzelllinie L-CI.5s stellte sich als geeignetes Modellsystem heraus, weil deren Überleben weder *in vitro* noch *in vivo* vom HIF-1 Signalweg abhing. Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, dass Tumorzellen den HIF-1-Signalweg für die Invasion *in vitro* und das metastatische Potential *in vivo* unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion verwenden. Der HIF-1-Signalweg stellte sich als essentiell für die Aktivierung des pro-invasiven Met-Signalweges und die Induktion der Expression und Aktivität der pro-invasiven Gelatinase Mmp-9 heraus. Von diesen Grundlagen der HIF-1-abhängigen Metastasierung wurde die Hemmung des Met-Signalwegs als therapeutische Strategie weiter verfolgt, da sowohl Proteasen als auch HIF-1 bei zu vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen und deren Hemmung zu Nebenwirkungen führen kann. Ein Met-spezifischer Antikörper (DN30) unterband die Hypoxie-induzierte, HIF-1-abhängigen Verstärkung des Met-Signalwegs durch Auslösen eines *a disintegrin and metalloproteinase-10* (ADAM-10)-vermittelten *Shedding* der Met-Rezeptoren von der Zelloberfläche und verhinderte so die Aktivierung der Met-induzierten Tumorzellmobilisierung. Die Hemmung des HIF-1-nachgeschalteten Met-Signalwegs bietet daher die Chance die HIF-1-vermittelte Metastasierung zu unterbinden, ohne unkontrolliert in die Vielzahl HIF-1-regulierter physiologischer Prozesse einzugreifen.

2 Einleitung

2.1 Das Problem der Metastasierung

Trotz enormen Fortschritts in der Entwicklung von modernen Bildgebungs- und Diagnosemöglichkeiten werden viele Primärtumoren erst relativ spät diagnostiziert. Oft kann daher die Erkrankung ungehindert fortschreiten, ehe geeignete therapeutische Maßnahmen ergriffen werden. Dies liegt vor allem daran, dass die Gewebe vieler Organe relativ elastisch sind und ein entstehender Tumor daher über längere Zeit wachsen kann, bevor er zu merklichen Symptomen beim Patienten führt (Weinberg, 2006). Ebenso können viele Organe aufgrund ihrer elastischen Struktur eine relativ große Masse an Tumorzellen verkraften ehe es zu Funktionsverlusten kommt, die vom Organ nicht mehr kompensiert werden können. Nur einige wenige Organe wie zum Beispiel das Gehirn oder das Pankreas sind hiervon ausgenommen, weil dort schon relativ kleine Tumoren zu Funktionsstörungen bzw. Organversagen führen können (Weinberg, 2006). Weitaus größeren Einfluss auf die Mortalität von Krebspatienten hat jedoch die Bildung von Tochtergeschwülsten, sogenannten Metastasen, die durch die Absiedlung von Tumorzellen vom Primärtumor in andere Organe entstehen (Schirmacher, 1985). Demnach sind über 90% der krebsassoziierten Todesfälle auf Metastasen und nicht auf den Primärtumor zurückzuführen (Sporn, 1996). Untersuchungen *post mortem* ergaben darüber hinaus, dass sich die weitaus größere Anzahl an Tumorzellen in Metastasen und nicht im Primärtumor befinden (Weinberg, 2006). Generell kommt es bei nahezu allen Organen aufgrund der durch die fortschreitende Metastasierung zunehmenden Tumorlast früher oder später zu einem Funktionsverlust bzw. einem vollständigen Organversagen (Weinberg, 2006). Diese Ergebnisse unterstreichen den Einfluss der Metastasierung auf den malignen (bösartigen) Verlauf von Krebserkrankungen.

Problematisch ist, dass sich zum Zeitpunkt der Entdeckung des Primärtumors häufig schon Tumorzellen abgesiedelt haben. Diese stellen die größte Gefahr bei der Krebserkrankung dar, weil sie bei erfolgreichem Auswachsen zu einer Metastase häufig großen Schaden anrichten (Geiger, Peeper, 2009). So können Patienten im Falle von Mammakarzinom oder Kolonkarzinom nach Entfernung des Primärtumors häufig ohne große Einschränkungen weiter leben. Im Gegensatz hierzu können Metastasen in Gehirn, Lunge oder Leber schnell die vitalen Funktionen dieser Organe beeinflussen (Weinberg, 2006). Glücklicherweise bilden jedoch nicht alle invasiven Tumorzellen, die den Primärtumor verlassen haben, Metastasen. So werden von Primärtumoren täglich zwar mehrere tausend Tumorzellen abgegeben, jedoch steht dem die

Bildung einer relativ geringen Anzahl an erfolgreichen Absiedlungen und damit Bildungen von Metastasen gegenüber (Butler, Gullino, 1975).

Der gesamte Prozess der Metastasierung ist daher als sehr ineffektiv einzustufen (Fidler, 2003). Letztendlich schaffen es nur wenige Tumorzellen erfolgreich eine Metastase auszubilden (Fidler, 1990). Der Großteil der Zellen geht im Blutstrom oder im Zielorgan der Metastasierung zu Grunde (Fidler, 1970). Neben Zellen, die erfolgreich zu Metastasen auswachsen, gibt es auch Zellen, die viele Jahre als Einzelzellen im Zielorgan der Metastasierung ruhen können. Diese Zellen werden daher als ruhende Tumorzellen (*Dormancy*) bezeichnet (Hedley, Chambers, 2009). Da sie normalerweise nicht detektiert werden können und sie, wie Untersuchungen zeigten, überaus resistent gegenüber konventionellen Chemotherapien sind, können sie auch in scheinbar erfolgreich therapierten Patienten noch Jahre später zur Ausbildung von Rezidiven führen (Hedley, Chambers, 2009).

Ebenso kann ein erneutes Streuen von Tumorzellen von bereits etablierten Metastasen ausgehen. Ein Beleg für diese Phänomene ist die explosionsartige Vermehrung von Metastasen, die häufig im Endstadium maligner Krebserkrankungen auftritt (Nguyen, 2011). Dieses Phänomen lässt sich u.a. auch im Tiermodell beobachten. So kommt es zum Beispiel im murinen L-CI.5s T-Zell-Lymphom-Modell nach einer Etablierungs- und Auswachsphase der Metastasen in der Leber zu einer explosionsartigen Durchsetzung der Leber mit metastatischen Foci (sekundäre Invasion) (Gerg *et al.*, 2008). Betrachtet man den gesamten Prozess der Metastasierung, so scheint nicht das Loslösen von Tumorzellen vom Primärtumor der limitierende Faktor der Metastasierung zu sein, sondern vielmehr die Etablierung von Metastasen in Zielorganen der Metastasierung (Weinberg, 2008). Von einem therapeutischen Standpunkt aus gesehen erscheinen daher Therapieansätze, die das Auswachsen von Metastasen sowie die sekundäre Invasion von Tumorzellen inhibieren und die Erkrankung somit in eine latente chronische Form überführen, vielversprechend zu sein.

2.2 Invasion und Metastasierung

2.2.1 Die metastatische Kaskade

Im Unterschied zu benignen (gutartigen) Tumorerkrankungen besitzen Zellen aus malignen Tumoren die Möglichkeit den Primärtumor zu verlassen und Tochtergeschwülste, so genannte Metastasen, in anderen Organen zu bilden. Der Prozess der Metastasenbildung im Verlauf

maligner Krebserkrankungen erfolgt in einem komplexen, mehrstufigen Prozess, der als metastatische Kaskade bezeichnet wird (Schirmacher, 1985; Weinberg, 2006; Geiger, Peeper, 2009). Um letztendlich erfolgreich eine Metastase bilden zu können, muss eine Tumorzelle alle Stufen dieses komplexen Prozesses durchlaufen. Da über 80% der lebensbedrohlichen Krebserkrankungen durch Karzinome (Tumoren mit Ursprung in epithelialen Geweben) verursacht sind, bezieht sich die Definition der metastatischen Kaskade auf diese Tumorklasse (Weinberg, 2006). Grundsätzlich lassen sich die einzelnen Schritte der metastatischen Kaskade aber auch auf andere Krebsarten wie zum Beispiel Fibrosarkome, Glioblastome oder sogar hematopoetische Tumoren übertragen (Weinberg, 2006). Eine Übersicht der metastatischen Kaskade ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

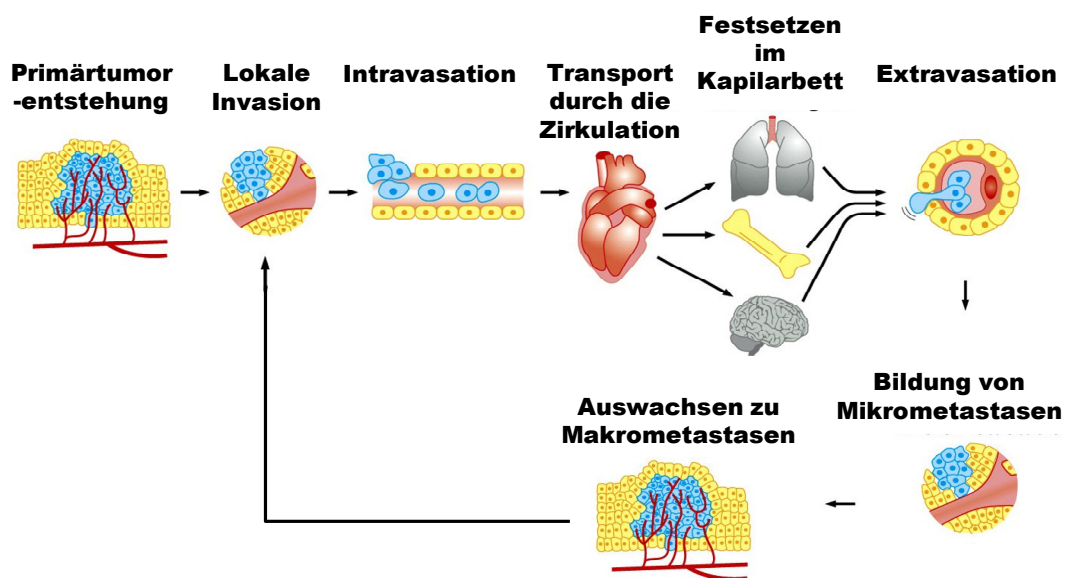


Abbildung 2.1 Die metastatische Kaskade (modifiziert nach Robert A. Weinberg: *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007))

In dieser Arbeit soll auf das Entstehen von Tumoren nicht näher eingegangen werden, da hier die Mechanismen der metastatischen Ausbreitung von Tumorzellen im Fokus stehen. Daher soll hier nur erwähnt werden, dass sich die Bildung von Tumoren in einem komplexen, mehrstufigen Prozess vollzieht, an dessen Beginn die Entwicklung einer normalen Zelle hin zu einer Tumorzelle steht (Lee, Muller, 2010). Durch Teilung dieser Tumorzelle kommt es zu einer Neubildung von Gewebe, einer sogenannten Neoplasie. Ab einer bestimmten Größe kommt es innerhalb der Neoplasie zu einem Sauerstoffmangel (Hypoxie), auf den die Tumorzellen mit der Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) reagieren, um sich in ausreichendem Maße mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Hanahan, Weinberg, 2000; Hanahan, Weinberg, 2011).

Der erste Schritt der metastatischen Kaskade markiert den Übergang von einem Tumor *in situ* zu einem invasiv wachsenden Karzinom (Geiger, Peeper, 2009). Bei der lokalen Invasion durchbrechen Tumorzellen die Basalmembran, eine besonders dichte extrazelluläre Matrix (EZM), die unterhalb der Epithelzellschichten liegt und diese von der unterstützenden Schicht des Bindegewebes, dem Stroma, trennt (Weinberg, 2006).

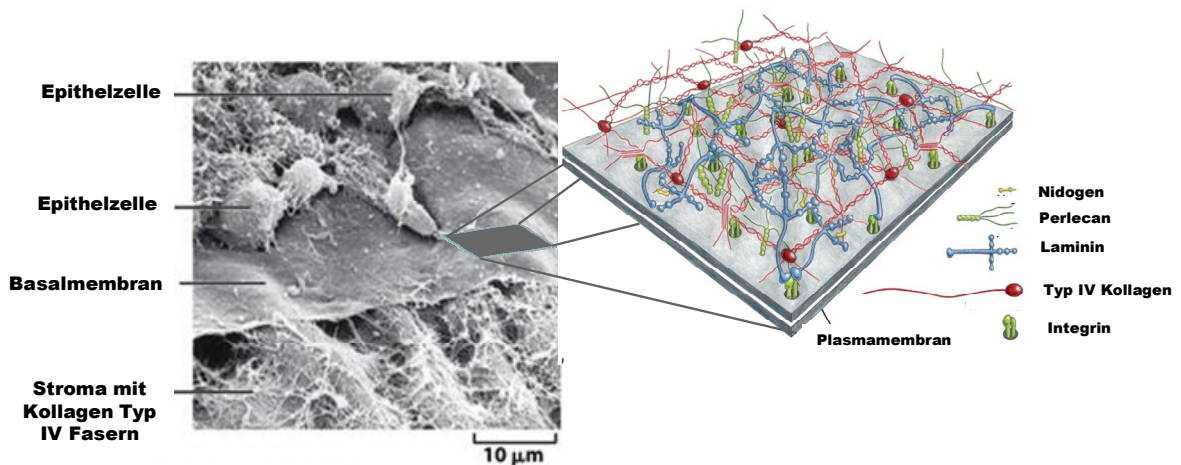


Abbildung 2.2 Aufbau der Basalmembran: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Hühnerhornhautepithelschicht (linker Bildteil) und schematischer Aufbau (rechter Bildteil) der hauptsächlich aus vier Komponenten bestehenden Basalmembran: Laminin, Collagen Typ IV, Perlecan und Nidogen. Epithelzellen haften auf der oberen Seite der Basalmembran, die die Epithelzellschicht vom darunter liegenden Stroma trennt, welches hauptsächlich aus Kollagensträngen besteht (modifiziert nach Robert A. Weinberg: *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007)).

Wie Abbildung 2.2 zeigt, stellt die Basalmembran die erste physikalische Hürde dar, die Tumorzellen überwinden müssen, um überhaupt in der Lage zu sein den Primärtumor zu verlassen. Einer der Hauptbestandteile der Basalmembran ist Kollagen Typ IV (Bosman *et al.*, 1985). Dieses extrazelluläre Matrixprotein bildet zusammen mit den anderen Bestandteilen der Basalmembran ein dichtes, membranartiges Netzwerk. Die Basalmembran wird von Tumorzellen bzw. von Zellen des Tumorstromas unter Zuhilfenahme von proteinspaltenden Enzymen, den Proteasen (Deryugina, Quigley, 2006), durchbrochen. Hierbei spielen vor allem einige Vertreter der Metalloproteinasen eine wichtige Rolle, da viele Proteasen dieser Familie in der Lage sind, Kollagen Typ IV zu spalten (Egeblad, Werb, 2002). Prominenteste Vertreter sind hierbei die Gelatinasen A (Matrix-Metalloprotease-2; MMP-2) und B (Matrix-Metalloprotease-9; MMP-9), die beide zur Familie der Zink-abhängigen Endopeptidasen gehören (Nagase *et al.*, 2006). Sie unterscheiden sich von den anderen Mitgliedern der Familie der Matrix-Metalloproteasen durch das Vorhandensein einer Kollagenbindedomäne (*collagen*

binding domain; CBD) innerhalb der katalytischen Domäne (Visse, Nagase, 2003). Durch die CBD können MMP-2 und -9 besonders gut Kollagen Typ IV binden und Kollagen Typ IV nachfolgend effizient abbauen. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass beide Proteasen eine wichtige Rolle bei der Invasivität von Tumoren spielen (Fingleton, 2007; Gerg *et al.*, 2008). Darüber hinaus machen Proteasen durch den Abbau der Basalmembran dort gespeicherte Wachstums- sowie Überlebensfaktoren für Tumorzellen erst verfügbar (Overall, Kleinfeld, 2006).

Nachdem die Tumorzellen in das Stroma eingedrungen sind, können sie die dort liegenden Blut- und Lymphgefäße erreichen (Weinberg, 2006). Nun folgt der zweite Schritt der metastatischen Kaskade, die Intravasation der Tumorzellen (Abbildung 2.1). In diesem Schritt verlassen die Tumorzellen das Stroma und dringen in Blut- oder Lymphgefäße ein (Geiger, Peeper, 2009). Auch hierbei sind Proteasen essentiell (Deryugina, Quigley, 2006). Die Tumorzellen werden nun passiv durch das Blut- bzw. Lymphsystem transportiert (Fidler, 2003). Der Großteil der Tumorzellen ist noch auf den Kontakt zum Substratum angewiesen und stirbt daher schnell an Anoikis, einer Spezialform der Apoptose (Hanahan, Weinberg, 2011). Ebenso müssen Tumorzellen mit den im Blutstrom herrschenden Scherkräften und der Armut an Wachstums- und Überlebensfaktoren zurechtkommen.

Nach dem Verlassen des Kapillarbett des Primärtumors gelangen die Tumorzellen über die Zirkulation in das nachfolgende Kapillarbett (Weinberg, 2008). Im Kapillarbett des Zielorgans der Metastasierung angekommen, bleiben die Tumorzellen entweder stecken oder adhären aktiv an der Gefäßwand (Weinberg, 2006). Um den unwirtlichen Gegebenheiten des Blutstroms zu entgehen, müssen die Tumorzellen das Lumen der Gefäße verlassen und in das darunterliegende Stroma invadieren. Dieser Vorgang wird als Extravasation bezeichnet (Fidler, 2003). Auch hier benutzen die Tumorzellen dieselben Mechanismen und „Werkzeuge“ (Proteasen) wie bei der lokalen Invasion und Intravasation (Deryugina, Quigley, 2006). Der nun folgende Schritt, der als Kolonisierung des Zielorgans der Metastasierung bezeichnet wird, stellt nach Weinberg die größte Herausforderung für Tumorzellen dar, weil Tumorzellen nun mit einer neuen Mikroumgebung zurechtkommen müssen, die meist völlig anders zusammengesetzt ist als die Mikroumgebung, aus der die Tumorzelle ursprünglich stammt (Weinberg, 2008). Viele Tumorzellen sterben daher relativ schnell ab (Geiger, Peeper, 2009). Einige wenige liegen oft über mehrere Jahre als ruhende Tumorzellen (*Dormancy*) im Gewebe vor (Hedley, Chambers, 2009). Wie bereits erwähnt schaffen es aber nur sehr wenige Tumorzellen, zu einer Metastase auszuwachsen. Die Ineffizienz dieses Prozesses wird deutlich, wenn man bedenkt, dass, wie im Tiermodell gezeigt (Primärtumor bestehend aus humanen

Mammakarzinomzellen subkutan inokuliert in Wistar-Furth Ratten), pro Gramm Tumor und Tag mehrere Millionen Tumorzellen in den Blutkreislauf abgeben werden (Butler, Gullino, 1975), letztendlich in spontanen murinen Metastasierungsmodellen wie zum Beispiel bei inokulierten Mammakarzinomzelllinien (orthotopes Modell) (Krüger *et al.*, 2000) oder bei spontanen gebildeten Mammakarzinomen (*polyoma middle T* (PyMT)-Modell) (Sevenich *et al.*, 2011) jedoch nur einige wenige Metastasen detektiert werden. Sollte jedoch eine Tumorzelle zu einer Metastase auswachsen, so kann ausgehend von dieser eine sekundäre Invasion und damit eine Neubildung von Metastasen stattfinden (Fidler, 2003; Gerg *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen aus Tiermodellen erklären auch das bereits erwähnte Auftreten einer explosionsartigen Vermehrung von Metastasen im Endstadium maligner Krebserkrankungen (Nguyen, 2011).

2.2.2 Abbildung der metastatischen Kaskade im murinen Modellsystem

Um die Rolle einzelner Gene während der metastatischen Kaskade untersuchen zu können, werden Modelle benötigt, die zum einen den Prozess der metastatischen Kaskade möglichst genau abdecken und zum anderen eine genaue Quantifizierung der Metastasierung und damit eine Beurteilung des metastatischen Potentials zulassen. Ein solches Modell ist das hochaggressive murine T-Zell-Lymphom Metastasierungsmodell L-CI.5s (Gerg *et al.*, 2008; Krüger *et al.*, 1994a), dessen Tumorzellen hauptsächlich in Leber, Lymphknoten und Milz streuen. Die Markierung der Tumorzellen mit dem bakteriellen *lacZ*-Gen ermöglicht eine spezifische Detektion der Tumorzellen *in vivo* bis auf Einzelzellebene (Krüger *et al.*, 1994a). Durch die Verwendung von *syngenen*, immunkompetenten Wirtstieren (Mausstamm: DBA/2) wird im Gegensatz zu Xenograftmodellen auch der Einfluss des Immunsystems auf die Metastasierung berücksichtigt. Bei einer Verwendung als spontanes Metastasierungsmodell kann die gesamte metastatische Kaskade einschließlich der Prozesse im Primärtumor beobachtet werden. Intradermale Inokulation führt zur Bildung eines Primärtumors. An eine lineare Wachstumsphase, die ca. 10 d dauert, schließt sich eine ca. 10-tägige Plateauphase an, in der sich die Größe des Primärtumors nicht mehr stark verändert. Anschließend vergrößert sich der Primärtumor weiter. Bereits während der linearen Wachstumsphase können gestreute Tumorzellen in der Leber detektiert werden (Krüger *et al.*, 1994b).

Eine genauere Analyse der Kolonisierung des Zielorgans der Metastasierung kann jedoch nur durch die Verwendung als experimentelles Metastasierungsmodell erreicht werden, bei

dem die Tumorzellen intravenös inokuliert werden. Abbildung 2.3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Leberkolonisierung (Gerg *et al.*, 2008). Bereits wenige Stunden nach Tumorzellinokulation können durch die X-Gal-Färbung einzelne Tumorzellen in der Leber detektiert werden. Die erste Phase der Kolonisierung, die Extravasation der Tumorzellen, wird gefolgt von einer Adaptionsphase ohne Metastasenwachstum (bis Tag 2). Nach erfolgter Adaption wachsen die Tumorzellen zu Metastasen aus (Tag 3 bis 5). Tag 6 stellt den Übergang von der Wachstumsphase zur Phase der sekundären Invasion dar. Ab Tag 7 kann ein vermehrtes Streuen von Tumorzellen ausgehend von etablierten Metastasen in das umliegende Leberparenchym detektiert werden. Das L-CI.5s Modell bildet somit sämtliche Schritte der Metastasierung ab und erlaubt eine genaue Analyse einzelner Prozesse und deren Einflüsse auf die Metastasierung.

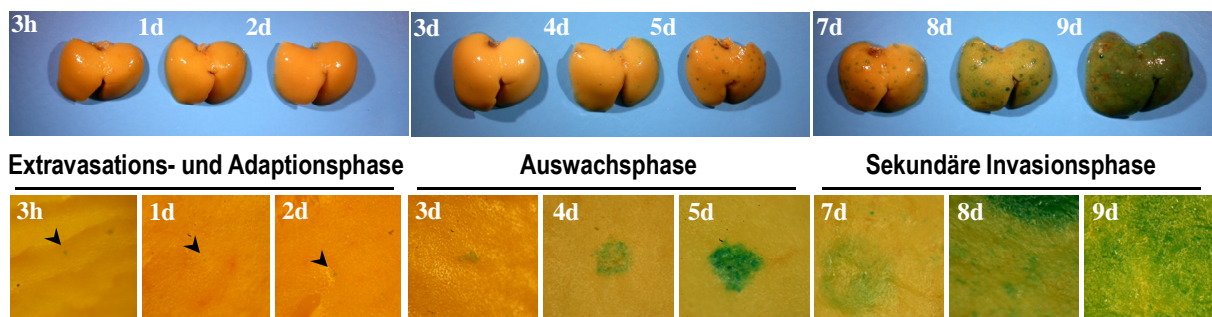


Abbildung 2.3 Zeitlicher Verlauf der Metastasierung im L-CI.5s Modell: Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Metastasierung in der Leber nach Inokulation von 5×10^3 lacZ markierten L-CI.5s Lymphomzellen. Modifiziert nach Gerg *et al.* 2008.

Letztendlich scheint die Bildung von Metastasen auf einigen wenigen Zelllinien in der heterogenen Tumorzellpopulation des Primärtumors zu beruhen (Nguyen, 2011). Diese werden daher auch als Tumorstammzellen bezeichnet (Visvader, Lindeman, 2008). Tumorstammzellen scheinen sich gegenüber wesentlichen Stresszuständen bei der Metastasierung angepasst zu haben und scheinen deshalb in der Lage zu sein, effizient zu metastasieren und Tumoren in vom Primärtumor entfernt liegenden Organen auszubilden. Jedoch ist der Anteil dieser Zellen in den meisten etablierten Zelllinien relativ gering. Dies wird durch die vergleichsweise geringe Anzahl an erfolgreichen Metastasenbildungen nach i.v. Inokulation einer relativ großen Anzahl von Tumorzellen (1 bis 2×10^6 für die meisten etablierten Tumorzelllinien, siehe z.B. Krüger *et al.*, 2000) deutlich. Die extrem hohe Aggressivität sowie die Effizienz der metastatischen Kolonisierung, die sich in der ungewöhnlich geringen Anzahl an inokulierten Tumorzellen von nur 5×10^3 im experimentelles Metastasierungsmodell widerspiegelt (Krüger *et al.*,

1994a; Gerg *et al.*, 2008), zeigt, dass L-CI.5s Zellen Tumorstammzell-ähnliche Eigenschaften besitzen und somit die oben erwähnte hoch-aggressive, Metastasen-bildende Teilpopulation repräsentieren. Daher sollte sie auch an Stresssituationen wie z.B. Hypoxie, die im Verlauf der metastatischen Kaskade auftreten, angepasst sein.

2.3 Hypoxie und Tumorprogression

Während der gesamten Metastatischen Kaskade geraten Tumorzellen wiederholt in Stresssituationen. Eine der ersten und prominentesten Stresssituationen ist das Auftreten von Hypoxie, die ein häufig relativ früh beobachtetes Ereignis bei der Tumorgenese ist. Ohne ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung können Primärtumoren nur wenige mm³ groß werden (Dang, Semenza, 1999; Hanahan, Folkman, 1996). Daher wird bereits frühzeitig eine Neubildung von Blutgefäßen, die sogenannte Angiogenese, induziert (Geiger, Peeper, 2009). Durch diesen Prozess sollen die Nährstoff- und vor allem die Sauerstoffversorgung der Tumorzellen im Tumor sichergestellt werden. Häufig sind jedoch gerade diese neugebildeten Blutgefäße nicht ausreichend, um die Versorgung aller Zellen des Tumors sicher zu stellen. Hauptgründe hierfür sind vor allem in einer „Überforderung“ der neugebildeten Blutgefäße zu sehen, den rasch steigenden Sauerstoffbedarf unkontrolliert wachsender Tumoren zu decken (Brahimi-Horn *et al.*, 2007). Darüber hinaus sind Tumorgefäße im Vergleich zu normalen Blutgefäßen durch funktionelle und biologische Anomalien wie z.B. ungleichmäßige Verteilung, das Fehlen von Perizyten oder Undichtigkeit ineffizienter als regulär gebildete Blutgefäße (Jain, 2005). Dadurch kommt es häufig zu einem akuten oder sogar chronischen Sauerstoffmangel (Michieli, 2009). Des Weiteren wird das Entstehen von hypoxischen Arealen in Tumoren durch die physikalisch limitierte Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen in das Tumorgewebe begünstigt. Bei menschlichen Tumorerkrankungen ist daher die Hypoxie ein nahezu immer zu beobachtendes Phänomen.

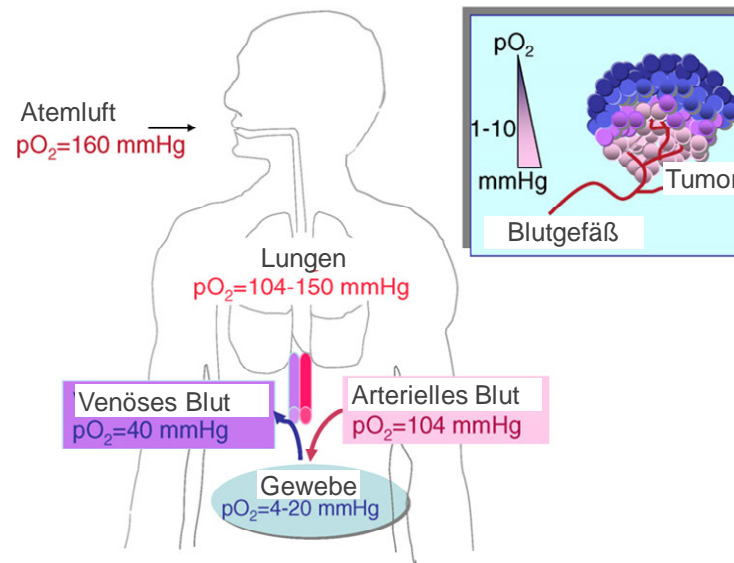


Abbildung 2.4 Physiologische und pathophysiologische Sauerstoffpartialdrücke: Dargestellt sind die physiologischen- und pathophysiologischen Sauerstoffpartialdrücke des menschlichen Körpers. Während unter physiologischen Bedingungen Sauerstoffpartialdrücke im Extremfall auf 4 mmHg im Gewebe sinken können, treten in Primärtumoren nicht selten Sauerstoffpartialdrücke unter 1 mmHg auf. Modifiziert nach Brahimi-Horn & Pouysségur 2007.

Generell herrschen in Tumoren relativ niedrige Sauerstoffpartialdrücke (Brahimi-Horn, Pouysségur, 2007). Abbildung 2.4 zeigt die unterschiedlichen Sauerstoffgehalte im menschlichen Körper. Vergleicht man die pathophysiologischen Sauerstoffpartialdrücke im Tumor, so stellt man fest, dass diese mit 10 mmHg im Vergleich zu physiologischen Gegebenheiten wesentlich geringer sind.

Da Tumorzellen, wie andere Zellen auch, zumindest für die Sicherung der Makromolekülsynthese und damit zur Sicherung des Überlebens auf Sauerstoff angewiesen sind (Michieli, 2009), vertreten viele Forscher die Meinung, dass die Hemmung der Angiogenese eine attraktive Strategie zur Therapie von Tumorerkrankungen ist (Cook, Figg, 2010). Dagegen sprechen jedoch zahlreichen Hinweise aus Klinik und Forschung. So ist aus der Klinik bekannt, dass der Grad der Hypoxie, der in Tumoren vorherrscht, einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Malignität und den Verlauf der Krebserkrankung ausübt (Hockel *et al.*, 1996). Ein höherer Grad an Hypoxie geht einer verstärkten Metastasierung und einer höheren Mortalitätsrate einher (Brizel *et al.*, 1996; Hockel *et al.*, 1996; Brizel *et al.*, 1997). Ferner wurde bei Patienten mit einem hohen Grad an Hypoxie im Primärtumor eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber konventionellen Therapien wie Chemo-, Immun- und Radiotherapien beobachtet (Brown, Giaccia, 1998; De Ridder *et al.*, 2008). Diese Phänomene lassen sich durch folgende Mechanismen erklären: Zum einen werden durch Hypoxie Adaptationsmechanismen wie zum

Beispiel die Umstellung auf anaerobe Glykolyse (Kim *et al.*, 2006) oder die Induktion von Angiogenese (Tang *et al.*, 2004) induziert. Tumorzellen können sich dadurch besser auf widrige Gegebenheiten einstellen. Darüber hinaus scheint durch das Auftreten von Hypoxie in Primärtumoren ein darwinistischer Selektionsdruck auf die heterogene Tumorzellpopulation ausgeübt zu werden, wodurch das Entstehen einer aggressiveren Population begünstigt wird (Graeber *et al.*, 1996).

2.4 Zelluläre Adaption an hypoxische Gegebenheiten

Hypoxie tritt wie bereits erwähnt relativ früh während der Entstehung von Tumoren auf, da Tumoren häufig noch keinen Zugang zu den im Stroma liegenden Blutgefäßen haben und die Diffusion von Sauerstoff in das Gewebe nicht ausreicht, um alle Tumorzellen zu versorgen (Gatenby, Gillies, 2004). Um Überleben zu können, müssen sich Tumorzellen daher an diese sauerstoffarmen Bedingungen anpassen. Grundsätzlich wird Sauerstoff für zwei wichtige Zellvorgänge benötigt. Zum einen gewinnt die Zelle durch oxidative Phosphorylierung Energie aus Glukose, zum anderen benötigt die Zelle Sauerstoff für die Synthese von Makromolekülen (Michieli, 2009). Im Gegensatz zur Synthese von Makromolekülen ist die Zelle nicht auf Sauerstoff für die Energiegewinnung angewiesen (Michieli, 2009). So können Zellen unter Sauerstoffmangel Glukose zu Laktat spalten und auf diese Weise Energie gewinnen (Gatenby, Gillies, 2004). Dieser Prozess läuft im Vergleich zur Energiegewinnung über die Atmungskette jedoch wesentlich ineffizienter ab. So werden bei der anaeroben Glykolyse im Vergleich zum Abbau von Pyruvat in den Mitochondrien 36 ATP pro Molekül Glukose weniger produziert (Gatenby, Gillies, 2004; Michieli, 2009). Um den Energiebedarf unter Sauerstoffmangel zu decken muss die Zelle daher mehr Glukose einsetzen. Um mehr Glukose bereitzustellen, werden daher unter hypoxischen Bedingungen Glukosetransporter wie Glut 1 und 3 verstärkt exprimiert (Gatenby, Gillies, 2004). Darüber hinaus entsteht, wie bereits erwähnt, bei der Glykolyse unter Sauerstoffmangel Laktat, das als Abfallprodukt aus den Zellen ausgeschleust werden muss. Trotz großer Ineffizienz sichert dieser Mechanismus jedoch letzten Endes das Überleben von eukaryotischen Zellen.

Im Vergleich zu normalen Zellen lässt sich jedoch ausschließlich bei Tumorzellen der nach seinem Entdecker Otto Warburg benannte Warbureffekt beobachten: Trotz Verfügbarkeit von Sauerstoff betreiben Tumorzellen häufig aerobe Glykolyse, d.h. sie bauen Glukose über Pyruvat zu Laktat ab ohne oxydative Atmung zu betreiben. Bisher ist nicht abschließend geklärt, warum Tumorzellen trotz schlechterer Energiebilanz aerobe Glykolyse betreiben (Gillies *et al.*, 2008). Es wird jedoch vermutet, dass sich Tumorzellen durch die aerobe Glykolyse

und der damit einhergehenden Ansäuerung des Gewebes andere Zellpopulationen unterdrücken und sich auf diese Weise einen Wachstumsvorteil verschaffen (Gatenby, Gillies, 2004).

Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung sicherzustellen induzieren Tumorzellen über die Sekretion von angiogenen Faktoren wie z.B. VEGF (*Vaskular endothelial growth factor*) die Neubildung von Blutgefäßen (Allen, Louise Jones, 2011).

Ein zentraler Faktor, der sowohl die Adaptation des Zellstoffwechsels als auch die Induktion der Angiogenese regelt ist der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor-1*) (Gatenby, Gillies, 2004; Michieli, 2009).

2.5 Der Transkriptionsfaktor HIF-1

2.5.1 Aufbau des Transkriptionsfaktor HIF-1

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer Hif-1 α und einer Hif-1 β (hARNT) Untereinheit besteht (Wang *et al.*, 1995; Wang, Semenza, 1995). Beide Untereinheiten gehören zur Familie der *basic helix-loop-helix* (bHLH) und *PER-ARNT-SIM* (PAS) enthaltenden Transkriptionsfaktoren. Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit enthalten zwei PAS Domänen, die gemeinsam mit den bHLH Domänen für die Heterodimerisierung verantwortlich sind. Nur nach Heterodimerisierung der beiden Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β kann der Transkriptionsfaktor Hif-1 an die Zielsequenzen der DNA binden (Jiang *et al.*, 1996). Im Gegensatz zur α -Untereinheit wird die β -Untereinheit von HIF-1 konstitutiv exprimiert. Die Regulation der α -Untereinheit hängt dagegen stark von vorhandenen Sauerstoffpartialdrücken ab und findet sowohl auf mRNA als auch post-translational auf Protein-Ebene statt (Hirota, Semenza, 2005).

2.5.2 Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1

Unter Normoxie wird die α -Untereinheit schnell degradiert, wohingegen der Abbau des Proteins unter hypoxischen Bedingungen inhibiert ist (Wang *et al.*, 1995). Die Mechanismen dieser Regulation sind in Abbildung 2.5 dargestellt. Unter Normoxie werden zwei Prolinaminosäuren in der Sauerstoff-abhängigen Degradierungsdomäne (P402 und P564) durch die Prolylhydroxylasen 1, 2 und 3 hydroxyliert (Masson *et al.*, 2001). Die hydroxylierten Prolinaminosäuren werden von einem Proteinkomplex mit E3 Ubiquitinligaseaktivität erkannt,

welcher das von Hippel-Lindau (VHL) Protein enthält (Hon *et al.*, 2002). Anschließend wird HIF-1 α von diesem Komplex ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut (Tanimoto *et al.*, 2000). Folglich kann HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen nicht detektiert werden (Brahimi-Horn, Pouyssegur, 2007). Durch den Abbau der α -Untereinheit wird daher eine Aktivität des Transkriptionsfaktors unter Normoxie verhindert. Ferner existiert ein zweiter Regulationsmechanismus, der die Bindung von HIF-1 an die DNA reguliert. Durch die Hydroxylierung einer Asparaginaminosäure (N803) in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne wird eine Komplexierung des HIF-1 α Proteins mit dem Co-Aktivator p300/CBP und somit eine Bindung an die Ziel-DNA verhindert (Lee *et al.*, 2004). Ausgeführt wird diese Hydroxylierung von der Asparaginyhydroxylase FIH (*factor-inhibiting HIF-1 α*). Da sowohl die Aktivität der PDHs als auch des FIHs von der Verfügbarkeit von Sauerstoff abhängig ist, werden diese Enzyme auch als zelluläre Sauerstoffsensoren bezeichnet (Lee *et al.*, 2004).

Unter hypoxischen Bedingungen sind die PHDs inaktiv. Es kommt zu keiner Hydroxylierung von P402 und P564 in der sauerstoffabhängigen Degradierungsdomäne von HIF-1 α . Durch die fehlende Hydroxylierung wird die Bindung des VHL-Proteins an HIF-1 α verhindert (Hon *et al.*, 2002). Eine Ubiquitinierung und somit der Abbau des Proteins im Proteasom unterbleibt. Es kommt zur Akkumulation von HIF-1 α im Zytoplasma und anschließend zur Translokation in den Nukleus (Wang *et al.*, 1995). Durch die fehlende Hydroxylierung der Asparaginaminosäure ist eine Komplexierung mit dem Co-Aktivator p300/CBP möglich. Es kommt nach Heterodimerisierung mit der HIF-1 β Untereinheit zur Bindung an *Hypoxia-responsive elements* (HRE) in der DNA (Brahimi-Horn, Pouyssegur, 2007). Da die β -Untereinheit konstitutiv exprimiert wird, HIF-1 α jedoch einer starken Regulation auf Proteinebene unterliegt, wird die Aktivität des HIF-1-Signalwegs folglich allein durch seine α -Untereinheit reguliert (Bertout *et al.*, 2008).

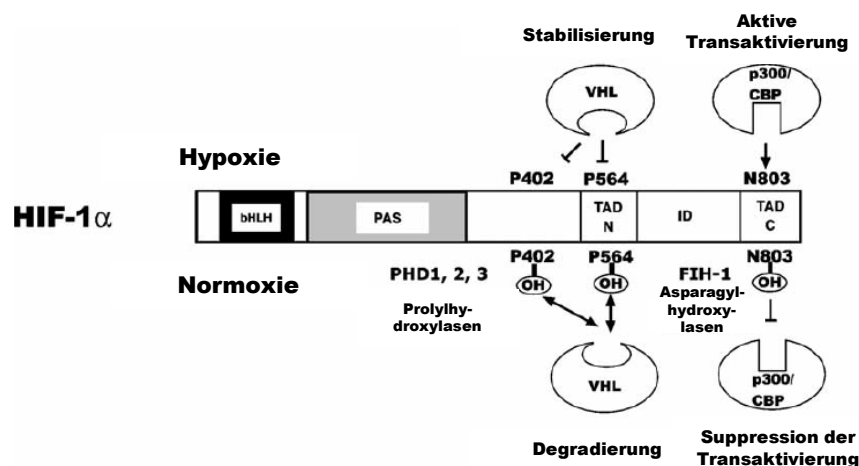


Abbildung 2.5 Regulation der Hif-1 α Untereinheit: Regulation der Hif-1 α Stabilität durch Prolyl- und Asparaginhydroxylasen (modifiziert nach (Hirota, Semenza, 2005)). VHL = von Hippel Lindau; TAD-N = N-Terminale Transaktivierungsdomäne; TAD-C = C-Terminale Transaktivierungsdomäne; ID = Inhibitorische Domäne; FIH-1 = Hif-1 α inhibierender Faktor; PAS = PER-ARNT-SIM Domäne; bHLH = basic Helix-Loop-Helix Domäne; PHD = Prolylhydroxylase

2.5.3 Einfluss von HIF-1 auf das Zellüberleben

Während der letzten Jahrzehnte wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, die auf transkriptioneller Ebene von HIF-1 reguliert werden (Semenza, 2003; Bertout *et al.*, 2008). Die meisten der bisher bekannten HIF-1-Zielgene sind in die Sicherung des Zellüberlebens unter hypoxischen Zuständen involviert. So wird z.B. durch die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 die Anpassung des Zellmetabolismus an hypoxische Bedingungen reguliert. Gene, die hierbei eine wichtige Rolle spielen, sind z.B. der Glukosetransporter GLUT-1, der Transferrinrezeptor, die Hexokinasen 1 und 2 sowie das pH-regulierende Enzym Carboanhydrase 9 (Ca9) (Semenza, 2003). Neben diesen Metabolismus-assoziierten Genen reguliert der HIF-1-Signalweg auch die Expression von anti-apoptotischen Genen wie z.B. NOS2, TGF α oder Adrenomedullin (AM) (Semenza, 2003). Der HIF-1-Signalweg regelt jedoch nicht nur die Anpassung der Zellen an ungünstige Mikroumgebungen, sondern auch die Modulation der Mikroumgebung selbst. So induziert der HIF-1-Signalweg die Expression des *Vascular endothelial growth factors* (VEGF) und löst auf diese Weise die Neubildung von Blutgefäßen aus (Liao, Johnson, 2007). Dieser Vorgang wird auch als *Angiogenic-Switch* bezeichnet, durch den die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sichergestellt wird (Brahimi-Horn *et al.*, 2007). Alle beschriebenen HIF-1-regulierten Signalwege tragen letztendlich zur Sicherung des Zellüberlebens unter hypoxischen Bedingungen bei. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass das Ausschalten des HIF-1-Signalweges in verschiedensten

Modellen zur Reduktion des Tumorwachstums und der Vaskularisation des Primärtumors führte (Semenza, 2009). Eine der ersten Versuche hierzu wurde von Maxwell *et al.* durchgeführt (Maxwell *et al.*, 1997), die erstmals zeigen konnten, dass das Ausschalten des HIF-1-Signalwegs in humanen Hepatomzelllinien zur Reduktion des Primärtumorwachstums und der Vaskularisierung des Primärtumors in einem Xenograftmodell führt (Maxwell *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse wurden unter anderem von Kung *et al.* bestätigt, die mit einem anderen experimentellen Ansatz zeigen konnten, dass das Fehlen des HIF-1-Signalwegs in humanen Mamma- und Kolonkarzinomzelllinien zur Reduktion des Tumorwachstums in immunsupprimierten Mäusen führt (Kung *et al.*, 2000).

2.5.4 Die Bedeutung der Hif-1 α Untereinheit bei menschlichen Tumorerkrankungen

Die oben beschriebenen Ergebnisse, die den HIF-1-Signalweg ins Zentrum der zellulären Adaption an Stresssituationen stellten, führten zu weiterführenden Expressionsstudien an menschlichen Tumorgewebe. Vor ungefähr zehn Jahren wurde das erste Mal ein Zusammenhang zwischen der Expression der regulativen α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1 und der Prognose von Krebspatienten beschrieben (Zhong *et al.*, 1999). So wurde in 13 von 19 untersuchten humanen Tumorarten eine Überexpression von Hif-1 α im Vergleich zum umliegenden, normalen Gewebe nachgewiesen (Zhong *et al.*, 1999). Unter diesen Tumorerkrankungen befinden sich mit Lungenkrebs, Dickdarmkrebs und Mammakarzinom diejenigen, durch welche in den USA die meisten Krebspatienten ums Leben kommen (Zhong *et al.*, 1999). So wurde in mehr als der Hälfte der malignen Tumoren eine starke Überexpression von HIF-1 α nachgewiesen. Bei bereits metastasierten Tumoren war dieser Anteil auf über zwei Drittel angewachsen. Innerhalb der Tumoren war die Anzahl der Hif-1 α positiven Zellen am höchsten an der invasiven Front, an den Rändern der nekrotischen Regionen und in Gebieten um durch Angiogenese neugebildete Gefäße. Interessanterweise konnten Zhong *et al.* keine Überexpression von HIF-1 α in den untersuchten benignen, nicht invasiven Tumoren finden. Jedoch konnte eine Überexpression von HIF-1 α bereits in prämaligen Vorstufen detektiert werden. In den letzten zehn Jahren wurden die Ergebnisse von Zhong *et al.* bestätigt und erweitert. So wurde eine Korrelation von erhöhter HIF-1 α Expression mit einer schlechten Prognose bei Dickdarmkrebs (Rajaganeshan *et al.*, 2008), Ovarialkarzinomen (Daponte *et al.*, 2008), Lungenkarzinomen (Swinson *et al.*, 2004) sowie Mammakarzinom (Yamamoto *et al.*,

2008) gefunden. Als Beispiel sind die Ergebnisse von Yamamoto *et al.* in Abbildung 2.6 dargestellt, die einen Zusammenhang zwischen der HIF-1 α Expression und der krankheitsfreien Überlebensrate bzw. der gesamten Überlebensrate bei Mammakarzinompatientinnen zeigen (Yamamoto *et al.*, 2008). So war bei HIF-1 α -positiven Befunden gegenüber HIF-1 α -negativen Befunden die krankheitsfreie Überlebensrate und die generelle Überlebensrate der Patientinnen signifikant reduziert.

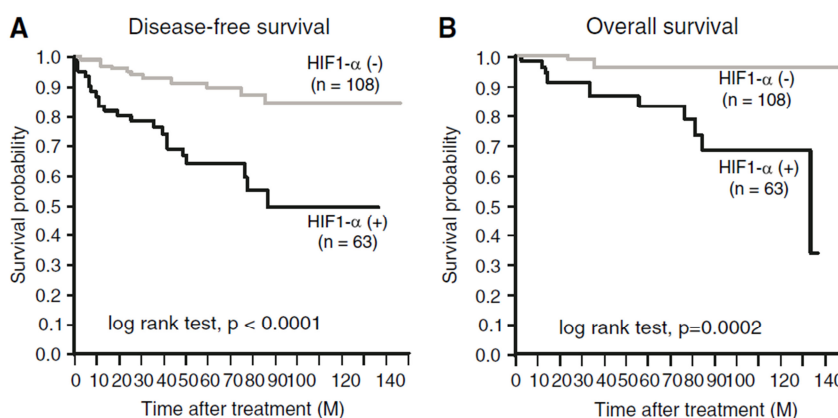


Abbildung 2.6 Überlebensraten von Hif-1 α positiven und negativen Brustkrebspatientinnen: Kaplan Meier Kurven der krankheitsfreien Überlebensrate nach Therapie (A) bzw. der gesamten Überlebensrate nach Therapie (B) bei Mammakarzinompatientinnen bezogen auf den Hif-1 α Status im Primärtumor. p-Werte wurden mittels log-rank-Test ermittelt (aus Yamamoto *et al.* 2008; Breast cancer research and treatment. Reproduziert mit Erlaubnis von SPRINGER NEW YORK LLC via Copyright Clearance Center; Order Detail ID: 50556216).

2.5.5 Einfluss von HIF-1 auf die Invasivität von Tumorzellen

Neben der wichtigen Rolle, die der Transkriptionsfaktor HIF-1 bei der Adaptation an hypoxischen Stress so wie bei der Sicherung des Zellüberlebens spielt, gibt es auch Hinweise auf einen möglichen Einfluss von HIF-1 auf das invasive Potential der Tumorzellen. So deutet die oben beschriebene Korrelation der HIF-1 α -Expression mit einer schlechteren Prognose für Krebspatienten auf eine Rolle von HIF-1 α bei der Bildung von Metastasen hin, da wie bereits erwähnt über 90% der Krebs-assoziierten Todesfälle auf die Bildung von Tochtergeschwülsten zurückzuführen sind (Sporn, 1996). Ebenso deuten einige Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen auf einen Einfluss von HIF-1 α auf die Invasivität von Tumorzellen hin. So konnte gezeigt werden, dass das Invasionsverhalten von Tumorzellen *in vitro* von HIF-1 α beeinflusst wird. In verschiedenen Zellsystemen korrelierte das Ausschalten des HIF-1-Signalwegs durch Reduktion der HIF-1 α -Expression mit der Reduktion der Tumorzellinvasivität unter hypoxischen Zuständen *in vitro* (Krishnamachary *et al.*, 2003; Victor *et al.*, 2006; Fujiwara *et al.*,

2007). Jedoch berücksichtigten weder Krishnamachary *et al.* noch Victor *et al.*, dass das Fehlen von HIF-1 sich auch negativ auf das Überleben der Tumorzellen unter hypoxischen Zuständen auswirkt und somit die Reduktion der Invasivität nur eine Reflektion reduzierten Zellüberlebens sein könnte. Im Gegensatz zu diesen beiden frühen Studien stellten Fujiwara *et al.* unter Berücksichtigung der Zellüberleben-sichernden Funktion von HIF-1 α fest, dass das Fehlen von HIF-1 α in Gliomazellen die Migration und Invasion reduzierte. Jedoch kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass das reduzierte invasive Potential der Tumorzellen allein auf die reduzierte migratorische Aktivität zurückzuführen ist.

Des Weiteren gab es auch aus *in vivo* Studien erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss von HIF-1 α auf das invasive Potential von Tumorzellen. So konnten Liao *et al.* zeigen, dass das Fehlen von Hif-1 α in einem spontanen murinen *polyoma middle T* (PyMT)-Mammakarzinommodell die Tumorentstehung verzögert und das Tumorwachstum reduziert (Liao *et al.*, 2007). Darüber hinaus beobachteten Liao *et al.*, dass das Fehlen von Hif-1 α zu einer Reduktion der vom Primärtumor ausgehenden Lungenmetastasierung führt (Liao *et al.*, 2007). Ferner zeigten Hiraga *et al.*, dass die Expression einer konstitutiv aktiven Form von HIF-1 α in humanen MDA231 Mammakarzinomzellen in einem experimentellen Metastasierungsmodell die Bildung von Knochenmarksmetastasen verstärkt (Hiraga *et al.*, 2007). Jedoch konnte bei beiden Studien nicht zwischen einem Überleben-sichernden Einfluss und einem möglichen direkten Einfluss von HIF-1 auf das metastatische Potential von Tumorzellen unterschieden werden.

Obwohl diese Daten den Verdacht nahe legen, dass HIF-1 α das metastatische Potential von Tumorzellen unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion beeinflusst, wiesen Bertout *et al.* (Bertout *et al.*, 2008) und Ruan *et al.* (Ruan *et al.*, 2009) in ihren Übersichtsartikeln darauf hin, dass bisher nicht klar ist, ob HIF-1 *in vivo* einen direkten Einfluss auf die Invasivität von Tumorzellen ausübt und welche molekularen Mechanismen daran beteiligt sind. Die Schwierigkeit der Beantwortung dieser Frage erwuchs vor allem aus einem Mangel an passenden Modellen, da die meisten Tumorzellen auf den HIF-1-Signalweg angewiesen sind, um unter Stressbedingungen wie Hypoxie zu überleben (Semenza, 2009). Folglich konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, dass die nach Ausschalten des HIF-1-Signalwegs beobachtete Reduktion der Metastasierung auf ein reduziertes Zellüberleben zurückzuführen ist. Um die Frage zu beantworten, ob HIF-1 α die Metastasierung nur durch die Sicherung des Zellüberlebens fördert (Semenza, 2009; Semenza, 2010) oder ob HIF-1 α das metastatische Potential, das ein essentielles Kennzeichen von Krebs darstellt (Hanahan, Weinberg, 2000), direkt beeinflusst, müssen Modelle verwendet werden, bei denen die Tumorzellen für das

Zellüberleben unter Hypoxie nicht auf den HIF-1-Signalweg angewiesen sind. Hierzu scheint sich das L-CI.5s Modell aufgrund seiner oben erwähnten extrem hohen Aggressivität zu eignen. Darüber hinaus gibt es bereits einen weiteren Hinweis auf die Eignung des L-CI.5s Modells zur Beantwortung dieser Fragestellung: Betrachtet man den Verlauf der Kolonisierung der Leber durch L-CI.5s Zellen (siehe Abbildung 2.3), so stellt man fest, dass die massive sekundäre Invasion von Tumorzellen ausgehend von etablierten Metastasen gleichzeitig mit nekrotischen Metastasen an Tag 7 nach Tumorzellinokulation auftritt (Schelter, 2007; Gerg *et al.*, 2008). Die nekrotischen Regionen befinden sich dabei immer im Zentrum der Metastase und werden von einem Ring aus Tumorzellen umgeben (Schelter, 2007). Die Korrelation des Auftretens von nekrotischen Bereichen mit der Induktion der sekundären Metastasierung weist darauf hin, dass L-CI.5s Tumorzellen dem Stress in schnell wachsenden Metastasen durch Flucht entgehen und nicht an diesen Stresssituationen zu Grunde gehen (Schelter, 2007).

2.5.6 Zusammenhang zwischen HIF-1 α und Proteolyse

Einige Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen HIF-1 α und der Expression von metastasierungsfördernden, proteolytischen Enzymen wie den Matrix-Metalloproteasen aufgezeigt. So beobachteten Fujiwara *et al.* z.B., dass Hypoxie zu einer verstärkten Expression von MMP-2 führt und dass diese Induktion durch das Ausschalten des HIF-1-Signalwegs verhindert werden kann (Fujiwara *et al.*, 2007). Zu ähnlich Ergebnissen kommen Shyu *et al.*, die von einer verstärkten Aktivität von MMP-2 durch Aktivierung des HIF-1-Signalwegs berichteten (Shyu *et al.*, 2007). Dies scheint auch klinische Relevanz zu haben, da Furlan *et al.* die Expression von HIF-1 α und MMP-2 in Kolonkarzinomen verglichen und eine Korrelation zwischen der Expression von HIF-1 α und MMP-2 fanden (Furlan *et al.*, 2008). Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem HIF-1-Signalweg und der Expression/Aktivität von proteolytischen Enzymen besitzt hohe Relevanz, da invasive Vorgänge während der Tumorprogression durch Ungleichgewichte im *Protease Web*, dem Netzwerk aus Proteasen, Proteaseinhibitoren und Effektormolekülen (Overall, Kleinfeld, 2006; Krüger, 2009; Krüger *et al.*, 2010) entstehen. Wie einleitend erwähnt, spielt hier neben der Gelatinase MMP-2 vor allem die Gelatinase MMP-9 eine wichtige Rolle, da beide Enzyme in der Lage sind die Basalmembran abzubauen und auf diese Weise den Weg für die Tumorzellen zu bereiten (Björklund, Koivunen, 2005; Gorden *et al.*, 2007). Jedoch scheinen beide Gelatinasen unterschiedliche Funktionen bei der Metastasierung zu haben (Gerg *et al.*, 2008). So zeigten Gerg *et al.*, dass MMP-2 im L-CI.5s Modell eher für das Auswachsen von murinen Lebermetastasen verantwortlich ist und

MMP-9 eine wichtigere Rolle bei den direkt invasiven Vorgängen spielt (Gerg *et al.*, 2008). Jedoch reicht für eine erfolgreiche Metastasierung die Erhöhung der proteolytischen Aktivität alleine nicht aus. Vielmehr müssen intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, die zu einer Mobilisierung der Tumorzellen führen (Hanahan, Weinberg, 2000).

2.5.7 Hypoxie und der Met-Signalweg

Ein zentraler Signalweg, der die Mobilisierung von Tumorzellen induziert, ist der HGF/Met-Signalweg (Birchmeier *et al.*, 2003; Boccaccio, Comoglio, 2006). Ausgelöst wird der Signalweg durch Binden des Liganden HGF an den membrangebundenen Tyrosinkinaserzeptor Met (Naldini *et al.*, 1991). Der Met Signalweg ist ein zentraler Regulator, der sowohl die migratorische als auch die invasive Kapazität von Zellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen regelt (Birchmeier *et al.*, 2003). In Abbildung 2.7 ist der Met-Signalweg dargestellt.

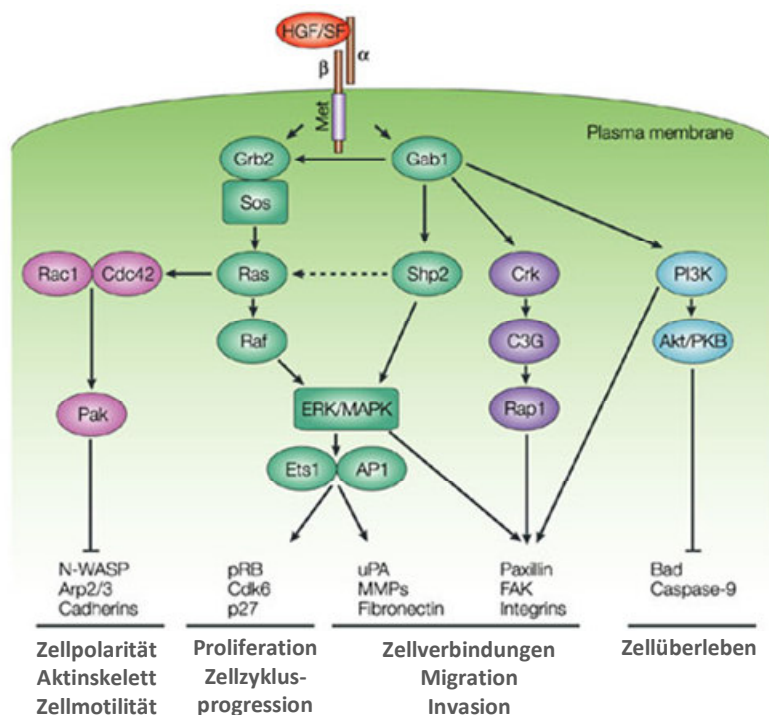


Abbildung 2.7 Übersicht über den Met-Signalweg:

Nach Binden des Liganden HGF an den Met-Rezeptor und dessen Transphosphorylierung werden verschiedene intrazelluläre Signalwege induziert, durch die der Met-Signalweg essenzielle Eigenschaften von Zellen beeinflusst. (aus Birchmeier *et al.* 2003; Nature Reviews Molecular Cell Biology. Reproduziert mit Erlaubnis von NATURE PUBLISHING GROUP via Copyright Clearance Center Order Detail ID: 52105716).

Aufgrund seines Einflusses auf die proliferative Aktivität und die Mobilisierung sowie das invasive Potential von Tumorzellen wird das hoch-komplexe genetische Programm, das durch den Met-Signalweg induziert wird, auch als *Invasive Growth Program* bezeichnet (Boccaccio, Comoglio, 2006).

Normalerweise wird der Ligand HGF hauptsächlich von mesenchymalen Zellen produziert, wohingegen der Met Rezeptor hauptsächlich von epithelialen Zellen exprimiert wird (Di Renzo *et al.*, 1991; Sonnenberg *et al.*, 1993; Zarnegar, DeFrances, 1993). Unter physiologischen Bedingungen ist dieses parakrine System stark reguliert (Birchmeier *et al.*, 2003). In einer Vielzahl von Tumorerkrankungen wurde jedoch eine verstärkte Aktivierung des Met-Signalwegs nachgewiesen (Danilkovitch-Miagkova, Zbar, 2002). Mechanistische Studien konnten zeigen, dass der Met-Signalweg letztendlich einer der zentralen Signalwege ist, der die Invasivität von Tumorzellen und die Bildung von Metastasen fördert (Trusolino *et al.*, 2010). So führt die Zugabe des Liganden HGF *in vitro* zum sogenannten *Tumorzellscattering*, d.h. die Tumorzellen lösen sich aus dem Zellverband und beginnen voneinander weg zu migrieren (Trusolino *et al.*, 2010). Der Ligand HGF wird daher auch als *Scatterfactor* bezeichnet (Naldini *et al.*, 1991).

Im Jahr 2003 beschrieben Pennacchietti *et al.* erstmals einen Zusammenhang zwischen Tumorphoxie und dem Met-Signalweg (Pennacchietti *et al.*, 2003). So fanden Pennacchietti *et al.*, dass eine Überexpression von Met vor allem in hypoxischen Tumorarealen detektiert werden kann. Ebenso zeigten sie *in vitro*, dass die Expression des Met-Rezeptors durch hypoxische Bedingungen verstärkt wird und dass durch diesen Mechanismus die Met-Proteinlevels erhöht werden. Letztendlich resultiert dies in einer erhöhten Aktivität des Met-Signalwegs, die sich positiv auf die Invasivität von Tumorzellen auswirkt. Als verantwortlichen Signalweg konnten sie den HIF-1-Signalweg identifizieren. Folglich verhinderte das Ausschalten von HIF-1 α die Induktion der Met-Expression unter Hypoxie. Weiterhin konnten Pennacchietti *et al.* durch *Knockdown* des Met-Signalwegs in Tumorzellen zeigen, die Hypoxie-induzierte verstärkte Tumorzellinvasivität durch Met vermittelt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle des Met-Signalwegs bei der Hypoxie-verstärkten Tumorzellinvasivität.

Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Metastasierung ist der Met-Signalweg ein attraktives Ziel zur Entwicklung anti-metastatischer Krebstherapien (Stella *et al.*, 2010; Cañadas *et al.*, 2010). Dies spiegelt sich auch in der großen Anzahl an Therapien wider, die sich gerade in der Entwicklung befinden und deren Wirkmechanismus eine Inhibition des Met-Signalwegs darstellt. Neben Tyrosinkinase-Inhibitoren befinden sich vor allem spezifische Antikörper in der Entwicklung, die eine Blockierung des Met-Signalwegs anstreben (Stella *et al.*, 2010). Eine vielversprechende Therapieentwicklung der letzten Jahre ist der monoklonale Antikörper DN30, der das proteolytische Abspalten (*Shedding*) des Met-Rezeptors von der Zelloberfläche induziert (Petrelli *et al.*, 2006). Der Antikörper DN30 bindet hierbei an die extrazelluläre Domäne des Met Rezeptors in der Nähe der *Juxta-membrane-domain*. Durch das darauf er-

folgende *Shedding* wird die Met-Signaltransduktion unterbrochen (Petrelli *et al.*, 2006). Der reduzierende Effekt des Antikörpers auf den Met Signalweg basiert dabei nicht nur auf der Reduktion der Met-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, sondern wird ebenfalls durch die HGF-neutralisierende Funktion der abgespaltenen Rezeptoren verstärkt. Daher werden die abgespaltenen Rezeptoren auch als Ligandenfallen bezeichnet (Trusolino *et al.*, 2010). Die Behandlung von Tumorzellen *in vitro* mit dem Antikörper DN30 führte folglich zu einer Reduktion des Verankerungs-unabhängigen Wachstums sowie zu einer Reduktion des HGF-induzierten *Tumorzellscatterings* (Petrelli *et al.*, 2006). *In vivo* konnte nachgewiesen werden, dass der Antikörper DN30 in der Lage ist, das Primärtumorwachstum sowie die spontane Metastasierung in einem Xenograftmodell zu reduzieren (Petrelli *et al.*, 2006). Der genaue Mechanismus und die beteiligten Moleküle waren jedoch bisher nicht bekannt. Da durch Zugabe des Antikörpers DN30 das *Shedding* des Met-Rezeptors induziert wird, kommt eine Beteiligung von *Sheddases* wie z.B. der ADAMs (*A disintegrin and metalloproteinase*) (Edwards *et al.*, 2008) in Frage. Da die membrangebundenen ADAM Proteasen für ihre wichtige Rolle bei der Regulation von Zellsignalwegen bekannt sind (Murphy, 2008), könnten diese *Sheddases* an der durch den Antikörper DN30 verursachten Met-Reduktion beteiligt sein. Aus der Literatur ist bereits für zwei Mitglieder dieser Proteasefamilie bekannt, dass sie unter physiologischen Umständen am *Shedding* des Met Membranrezeptors beteiligt sein können. So schlugen Kopitz *et al.* vor, dass ADAM-10 an der Regulation der Met-Rezeptorlevels mitwirkt (Kopitz *et al.*, 2007). Ebenso wurde eine Beteiligung von ADAM-17 am Met-*Shedding* nachgewiesen (Foveau *et al.*, 2009).

Da ein Zusammenhang zwischen der Hypoxie-induzierten Tumorzellinvasivität und dem Met-Signalweg besteht, sollte bei der Suche nach einer Interventionsmöglichkeit gegen eine mögliche metastasenfördernde Funktion der α -Untereinheit des HIF-1 Transkriptionsfaktors der nachgeschaltete Met-Signalweg unbedingt mit einbezogen werden.

3 Ziel der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob der HIF-1-Signalweg das metastatische Potential von Tumorzellen unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion verstärkt. Aufgrund der Abhängigkeit vieler Tumorzellen vom HIF-1-Signalweg zum Überleben unter hypoxischen Bedingungen war es bisher nicht möglich, eine Zellüberleben-unabhängige Metastasen-fördernden Funktion von HIF-1 nachzuweisen. Da das L-CI.5s Tumormodell nach allen publizierten Vorerfahrungen und seiner außergewöhnlichen Aggressivität am wahrscheinlichsten einer Zelllinie entspricht, die sich gegenüber wesentlichen Stresszuständen bei der Metastasierung angepasst hat, sollte zunächst Hif-1 α in L-CI.5s Zellen mittels shRNA-Technologie stabil herunter reguliert werden und gezeigt werden, ob diese Manipulation tatsächlich keinen Einfluss auf das Überleben der L-CI.5s Zellen hat. Um einen möglichen direkten Einfluss von HIF-1 auf das metastatische Potential von Tumorzellen nachzuweisen sollten anschließend sowohl experimentelle als auch spontane Metastasierungsassays durchgeführt werden und Metastasierungs-assoziierte Parameter wie Proliferation, Apoptose, Invasion, sowie Kolonisierung des Zielorgans analysiert werden. Hierzu sollten neben molekularbiologischen Analysemethoden vor allem immunhistochemische Methoden angewendet werden. Um mögliche Mechanismen zu identifizieren, sollte die Aktivität von invasionsfördernden Metalloproteasen wie MMP-9, unter zu Hilfenahme von zymographischen Methoden analysiert werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob bei einer möglichen überlebensunabhängigen metastasenfördernden Funktion von HIF-1, der für die invasive Absiedlung von Tumorzellen zentrale Met-Signalweg, von dem bekannt ist, dass er durch Hypoxie induziert wird, eine Rolle spielt.

Abschließend sollte basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen eine therapeutische Interventionsmöglichkeit aufgezeigt werden, die sich gegen HIF-1 oder einen nachgeschalteten Signalweg richtet, die zum Ziel hat, eine mögliche überlebensunabhängige metastasenfördernde Funktion von HIF-1 abzuschwächen.

Das Wissen um die genaue Rolle von HIF-1 bei der Metastasierung und dabei involvierte Mechanismen soll zukünftig zur Entwicklung erfolgreicher anti-metastatischer Therapien und damit zur Verbesserung der Behandlung von malignen Krebserkrankungen beitragen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

293T

293T Zellen stammen aus humanem, embryonalen Nierenepithel und eignen sich aufgrund ihrer guten Transfizierbarkeit als Verpackungszelllinie zur Produktion lentiviraler Partikel, da sie neben den Genen E1A und E1B des humanen Adenovirus 5 auch das SV40 T-Antigen exprimieren. Diese Zellen wurden von der Invitrogen GmbH Deutschland käuflich erworben.

A549

Die Zelllinie A549 wurde 1972 aus einem Lungenkarzinom eines 58-jährigen männlichen Patienten gewonnen (Giard *et al.*, 1973). Die Zelllinie weist eine epitheliale Morphologie auf und ist Keratin-positiv. Diese Zellen wurden von Prof. Carla Boccaccio (IRCC, Turin, Italien) bezogen.

GTL-16

Die GTL-16 Zelllinie ist eine undifferenzierte Magenkarzinomzelllinie (Giordano *et al.*, 1988), die das Met-Onkogen überexprimiert und in der der Met-Signalweg konstitutiv aktiviert ist (Ponzetto *et al.*, 1991). Diese Zellen wurden von Prof. Carla Boccaccio (IRCC, Turin, Italien) bezogen.

Skov-3ip

Die Zelllinie Skov-3ip stammt von der Zelllinie Skov-3 ab, die 1973 aus Aszites einer 64-jährigen Patienten, die an einem Adenokarzinom des Ovars erkrankt war, isoliert wurde. Die Zelllinie hat epithelialen Charakter und ist resistent gegenüber Tumornekrosisfaktor sowie vielen zytotoxischen Substanzen wie Diphtheria Toxin, cis-Platinum und Adriamycin. Diese Zellen wurden von Prof. Peter Altevogt (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) bezogen.

CT-26L

Die Zelllinie CT-26 wurde aus einem N-nitroso-N-methylurethane-induzierten murinen Kolonkarzinom isoliert (Griswold, Corbett, 1975; Brattain *et al.*, 1980). Die Zelllinie wurde analog zur L-CI.5s Zelllinie mit dem bakteriellen *lacZ* Gen transduziert (CT-26L) um einen Nachweis auf Einzelzellebene *in vivo* zu ermöglichen. Die Zelllinie weist eine fibroblastenartige Morphologie auf und ist sowohl im syngenesischen Mausstamm Balb/c als auch in immunsupp-

rimierten Mäusen tumorigen. Nach intravenöser Inokulation bilden CT-26L Zellen Metastasen in der Lunge.

L-CI.5s

L-CI.5s Zellen sind murine T-Zell-Lymphomzellen, die durch Transduktion der Esb T-Zell-Lymphomzelllinie mit dem bakteriellen *lacZ* Gen gewonnen wurden (Krüger *et al.*, 1994a). Das Markergen *lacZ* kodiert für das Enzym β -Galaktosidase, welches in der Lage ist, das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid) unter Verbrauch von Sauerstoff zu Galaktose und Indigo, einem blauen Farbstoff, umzusetzen. Dadurch können die Tumorzellen im Gewebe *post mortem* angefärbt werden. Da das Enzym β -Galaktosidase an einer Stelle im Zytoplasma konzentriert wird, bildet der Farbstoff Indigo nach der X-Gal-Färbung einen blauen Punkt im Zytoplasma und ermöglicht so die Identifizierung einzelner Tumorzellen in Gewebeschnitten. Die Tumorzellen sind sowohl im syngeneten DBA/2-Mausstamm als auch in immunsupprimierten Mäusen tumorigen. Nach intravenöser Inokulation bilden L-CI.5s Zellen Metastasen in der Leber, den Lymphknoten sowie der Milz (Krüger *et al.*, 1994a).

4.1.2 Bakterienstamm Top10

F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*. Dieser Bakterienstamm eignet sich vor allem für die Transformation unmethylierter DNA. Die Bakterien wurde von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland erworben.

4.1.3 Plasmide

shADAM-10 (TRCN0000006672)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCAGGTGGAATTACTTAAATTCTCGAGAATTTAAGTAATTCACCTGGTTTT	
shADAM-10 (TRCN0000006673)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGGCAGTTCTATCTGTGAGAACTCGAGTTTCTCACAGATAGAACCTGCTTTTT	
shADAM-10 (TRCN0000006674)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCCTACAAATCCTTTCCGTTTCTCGAGAAACGGAAAGGATTTGTAGGGTTTT	
shADAM-10 (TRCN0000006675)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGGCTGTGCAGATCATTAGTATCTCGAGATACTGAATGATCTGCACAGCTTTTT	
shADAM-10 (TRCN0000006676)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGGCAGTATTACTTATGGGAATTCTCGAGAATTCCTATAAGTAATACTGCTTTTT	
shADAM17 (TRCN0000052168)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCAGCAGCATTTCGGTAAGAACTCGAGTTTCTTACCGAATGCTGCTGGTTTTTG	
shADAM17 (TRCN0000052169)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGGCAGCGTCAGAATCGTGTTAACTCGAGTTAACACGATTCTGACGCTGCTTTTTG	
shADAM17 (TRCN0000052170)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland

Sequenz: CCGGCCCATGAAGAACACGTGTAAACTCGAGTTTACACGTGTTCTTCATGGGTTTTTG	
shADAM17 (TRCN0000052171)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCTGGTTACAACACTCATGAATTCTCGAGAATTCATGAGTTGTAACCAGGTTTTTG	
shADAM17 (TRCN0000052172)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCTATGTCGATGCTGAACAAACTCGAGTTTGTTCAGCATCGACATAGGTTTTTG	
shHif-1 α (TRCN0000054448)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGGCCACTTTGAATCAAAGAAATCTCGAGATTCTTTGATTCAAAGTGGCTTTTTG	
shHif-1 α (TRCN0000054449)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGGCCGCTCAATTTATGAATATTCTCGAGAATATTCATAAATTGAGCGGCTTTTTG	
shHif-1 α (TRCN0000054450)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCAGTTACGATTGTGAAGTTACTCGAGTAACTTCACAATCGTAACTGGTTTTTG	
shHif-1 α (TRCN0000054451)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCAGTGAATATTGCTTTGATCTCGAGATCAAAGCAATATTACTGGGTTTTTG	
shHif-1 α (TRCN0000054452)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCAAAGTTGAATCAGAGGATACTCGAGTATCTCTGATTCAACTTTGGTTTTTG	
shHIF-1 α (TRCN0000003808)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCGCTGGAGACACAATCATATCTCGAGATATGATTGTGTCTCCAGCGGTTTTT	
shHIF-1 α (TRCN0000003809)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCCAGTTATGATTGTGAAGTTACTCGAGTAACTTCACAATCATAACTGGTTTTT	
shHIF-1 α (TRCN0000003810)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGGTGATGAAAGAATTACCGAATCTCGAGATTCGGTAATCTTTTCATCACTTTTT	
shHIF-1 α (TRCN0000003811)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGCGGCGAAGTAAAGAATCTGAACTCGAGTTCAGATTCTTTACTTCGCCGTTTTT	
shHIF-1 α (TRCN0000010819)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sequenz: CCGGTGCTCTTTGTGGTTGGATCTACTCGAGTAGATCCAACCACAAAGAGCATTTTT	
pLP1 (gag, pol)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pLP2 (rev)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pLP/VSVG (env)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
lentivirales MMP-9-Promotorkonstrukt	(Gerg, 2009)
shNT (SHC202)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland

4.1.4 Antikörper und weitere Proteine

anti ADAM-10 Immunoglobulin (ab1997)	Abcam, Cambridge, UK
anti ADAM-17 Immunoglobulin (#3976)	Cell Signaling Technologies, Danvers USA
anti Caspase-3 Immunoglobulin	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti CD31 Immunoglobulin (Klon MEC 13.3)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti MET Immunoglobulin DL21	IRCC, Prof. C. Boccaccio, Turin, Italien (Prat <i>et al.</i> , 1998)
anti MET Immunoglobulin DN30	IRCC, Prof. C. Boccaccio, Turin, Italien (Prat <i>et al.</i> , 1998)

anti mouse Immunoglobulin G HRP Konjugate	Amersham, Braunschweig, Deutschland
anti PCNA Immunoglobulin	Abcam, Cambridge, UK
anti phospho-Met Immunoglobulin (TK010-E)	Assay Designs, Ann Arbor, USA
anti rabbit ImmunoglobulinG HRP Konjugat	Amersham, Braunschweig, Deutschland
anti rabbit Immunoglobulin Alexa-488	Molecular Probes, Invitrogen. Karlsruhe, Deutschland
anti α -Tubulin ImmunoglobulinG (mouse)	Calbiochem(R), Darmstadt, Deutschland
Avidin (für Avidin/Biotin Block)	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Biotin (für Avidin/Biotin Block)	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
rekombinantes humanes HGF	IRCC, Prof. C. Boccaccio, Turin, Italien
Sepharose-Protein-A	IRCC, Prof. C. Boccaccio, Turin, Italien
Streptavidin-HRP-Komplex	Dianova, Hamburg, Deutschland

4.1.5 Medien, Lösungen für die Zellkultur, Antibiotika

Medien für die Zellkultur:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Medien für die Bakterienkultivierung:

Alle Kulturmedien für Bakterien wurden im Autoklav (20 min bei 120 °C) sterilisiert. Kulturplatten wurden bei 4 °C und Lösungen, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Entsprechende Antibiotika wurden erst kurz vor Verwendung zu den Flüssigmedien gegeben.

LB-Medium	Bacto Tryptone 10 g/l Bacto Yeast Extract 5 g/l NaCl 5 g/l Bacto Agar 15 g/l (nur für Kulturplatten) mit 5 M NaOH auf pH 7,5 einstellen
-----------	---

Zellkulturlösungen:

Arg (55 mM)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Asp (27 mM)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
L-Glu (200 mM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hepes (1 M)	Gibco GmbH, Karlsruhe, Deutschland

β -Mercaptoethanol (50 mM)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
PBS (phosphat buffered saline), pH 7,4	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung, pH 7,4	Biochrom, Berlin, Deutschland

Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in ddH ₂ O (1:1000 zum Medium)
Puromycin (Puro)	1 mg/ml auf 25 μ g/ml Endkonzentration in Zellkulturmedium verdünnt

4.1.6 Standards und Kits

RNA-Gelelektrophoreselösungen

6 x Auftragspuffer:	Bromphenolblau 0,15 % (w/v) H ₂ O ₂ 60 mM Glycerin 60 % (v/v) In nukleasefreiem ddH ₂ O.
---------------------	--

Protein-Größenstandards und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoreselösungen

5 x Laemmli-Auftragspuffer:	Bromphenolblau 100 mg Glycerin 3,5 ml SDS 1,5 g Tris (1 M) 3,2 ml β -Mercaptoethanol 2,5 ml Aliquotieren und bei – 20 °C lagern.
10 x Elektrophoresepuffer:	Tris-Base 30,3 g Glycin 144,2 g SDS 10 g Mit ddH ₂ O auf einen Liter auffüllen. Lagerung bei Raumtemperatur.

Prestained Protein Molecular Weight Marker	Bio-Rad GmbH, Ismaning, Deutschland
--	-------------------------------------

Kits zur DNA und RNA Isolierung

QIAGEN Plasmid Purifikation Kit (Maxi)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pure Yield TM RNA Midiprep System	Promega Corp., Mannheim, Deutschland

Kits zur Reversen Transkription

High capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
---	---

Weitere Kits

BCA TM -Assay von Pierce	Pierce, Rockford, USA
Lumi-Light Kit	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Cell & Tissue Staining Kit	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-
HRP-DAB System	Nordenstadt, Deutschland
HRP-AEC System	
TACS TM Tdt Kit	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-
	Nordenstadt, Deutschland
Hypoxyprobe TM -1 Kit	HPI Inc., Burlington, USA

Reagenzien für die TaqTM-Man Analyse

TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Environmental Master Mix 2.0	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
18S Primer-Probe-Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
muriner Ca-9 Primer-Probe-Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
muriner Hif-1 α Primer-Probe-Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
muriner Mmp2 Primer-Probe-Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
muriner Mmp9 Primer-Probe-Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
muriner Met Primer-Probe-Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
humaner ADAM-10 Primer-Probe-Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
humaner ADAM-17 Primer-Probe-Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
lacZ Primer-Probe-Mix:	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland
Forward Primer 5'-CAAGCCGTTGCTGATTCGA-3',	
Reverse Primer 5'-GCTCATCCATGACCTGACCAT-3',	
Probe 5'-FAM-ACCGTCACGAGCATCAT-nFQ-3'	
Luciferase Primer-Probe-Mix	Applied Biosys., Darmstadt, Deutschland

4.1.7 Puffer und Lösungen

10 x PBS:	Natriumchlorid (NaCl) 80 g
	Kaliumchlorid (KCl) 2 g
	Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 14,4 g
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) 2,4 g
	Der pH- Wert wurde auf 7,4 eingestellt.
	Anschließend wurde mit ddH ₂ O auf einen Liter
	aufgefüllt. Danach wurde die Lösung autoklaviert
	und bei Raumtemperatur gelagert.

10 x TBS:	Tris-Base 500 mM NaCl 1,5 M Der pH- Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde mit ddH ₂ O auf einen Liter aufgefüllt. Danach wurde die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.
1 x TBS-T:	10 x TBS-Puffer 1/10 Tween20 1/1000 ddH ₂ O 9/10 Lagerung bei Raumtemperatur.
Hintergrundreduzierendes Antikörperverdünnungsmedium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mayer's Hämalaun Lösung	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
Eosinlösung, wässrig	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
TAE-Puffer (Agarosegelelektrophorese):	Tris 40 mM Essigsäure 20 mM EDTA 1 mM
<i>Puffer für Western Blot Analyse</i>	
10 x Blottingpuffer:	Tris-Base 3 g Glycin 11,25 g Methanol 10 % (v/v) Mit ddH ₂ O auf einen Liter auffüllen. Lagerung bei Raumtemperatur.
1 x Strippingpuffer:	β-Mercaptoethanol 100 mM SDS 2 % (w/v) Tris-HCl (pH 6,7) 62 mM Mit ddH ₂ O auf einen Liter auffüllen. Lagerung bei Raumtemperatur.
10 x TBS-Puffer:	Tris-Base 500 mM NaCl 1,5 M pH-Wert auf 7,6 einstellen und mit ddH ₂ O auf einen Liter auffüllen. Lagerung bei Raumtemperatur.
1 x TBS-T:	10 x TBS-Puffer 1/10 Tween20 1/1000 ddH ₂ O 9/10 Lagerung bei Raumtemperatur.

Lösungen und Puffer für die X-Galfärbung

Fixierlösung (Organe und Kryoschnitte)	2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in 1x PBS
Fixierlösung (Paraffinschnitte):	2 % Formaldehyd in 1x PBS
X-Gal-Stock (40mg/ml):	1 g X-Gal in 25 ml Dimethylformamid gelöst; lichtgeschützt bei -20°C lagern
X-Galfärbelösung:	1,64 g $K_3Fe(CN)_6 = Fe^{3+}$ 2,10 g $K_4Fe(CN)_6 = Fe^{2+}$ 2 ml 1 M $MgCl_2$ 1 ml 10 % Natrium-Deoxycholat 2 ml 10 % NP40 In 900 ml PBS lösen und auf pH 7,1 einstellen. Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
Ready-to-use X-Gal-Färbelösung:	X-Gal-Stock 1:40 in X-Galfärbelösung verdünnen. Unmittelbar vor Färbung lichtgeschützt ansetzen.

4.1.8 Chemikalien

Absolve	NEN™ Life Science Products, Zaventem, Belgien
Agarose, Peq Gold Universal Agarose	PeqLab, Erlangen, Deutschland
alamarBlue®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ampicillin, Ampicillin-Natriumsalz	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Bacto™ Agar	BD, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Tryptone	BD, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ <i>Yeast Extract</i>	BD, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
DAPI	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
D-Glukose, reinst	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
DQ™ Gelatine	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig (Essigssäure), 100%, wasserfrei	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethyldiamintetraacetat (EDTA), reinst	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanol (EtOH), zur Analyse, >99,9 %	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanol 98 % für Immunhistologie	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Formamid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Giemsa-Lösung	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Glutaraldehyd Lsg. 50%	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
HEPES, >99,5 %	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
Isopropanol	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
Kaiser's Glycerin Gelatine	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumferrocyanid	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl x 6 H ₂ O)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Magnesiumsulfatheptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Methanol, zur Analyse, >99,8 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Mowiol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat, zur Analyse, wasserfrei	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumchlorid, reinst	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Natrium Deoxycholat	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumzitrat	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
NP40	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ponceau S	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Roticlear	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
TEMED	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland

Trizol® Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranoside)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

4.1.9 Sonstige Materialien

Superfrost® Plus Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Tissue Tek Einbettmedium	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland

4.2 Tierexperimentelle Methoden

4.2.1 Verwendete Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden zwei Mausstämme verwendet, die zu den jeweiligen Tumorzellen *syngen* sind.

Balb/c

Dieser Albino-Mausstamm wurde 1923 von McDowell durch Inzucht erzeugt. Die in dieser Arbeit verwendeten murinen Kolonkarzinomzellen CT-26 sind *syngen* zu diesem Mausstamm.

DBA/2

Ältester Inzuchtstamm, der 1909 von C.C. Little etabliert wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten murinen T-Zelllymphomzellen L-CI.5s sind *syngen* zu diesem Mausstamm.

Die Versuchstiere beider Stämme wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Versuchstiere waren zwischen 8-10 Wochen alt. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Alle Versuchstiere wurden vor Versuchsbeginn eine Woche unter Standardbedingungen im Zentrum für Präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München gehalten. Alle Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 118/08 genehmigt.

4.2.2 Metastasierungsmodelle

4.2.2.1 Experimentelles Metastasierungsmodell L-CI.5s

Um den Einfluss von Hif-1 α auf die Lebermetastasierung von Tumorzellen zu untersuchen wurden 5×10^3 L-CI.5s Tumorzellen in 200 μ l PBS (pH=7,4) intravenös in die Schwanzvene

von DBA/2 Mäusen inokuliert. Die Zellzahl wurde vor der Inokulation durch zwei Verdünnungsreihen auf genau $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt. Bis zur Inokulation lagerten die Tumorzellen auf Eis. Um die Inokulation der Tumorzellen zu erleichtern wurden die Mäuse vor Inokulation mittels Infrarotwärmelampe aufgewärmt. Dies führte zur Dilatation der Venen und somit zur Erleichterung der Inokulation. Die Mäuse wurden sieben d nach Tumorzellinokulation getötet und die Organe entnommen (3.2.2.4).

Alternativ wurden 2×10^6 Tumorzellen intravenös inokuliert und die Mäuse 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 3h, 6h bzw. 3 d später getötet.

Zum Nachweis von Hypoxie in Lebermetastasen wurden 5×10^3 L-CI.5s Tumorzellen in 200 μ l PBS (pH=7,4) intravenös in die Schwanzvene von DBA/2 Mäusen inokuliert. 7 d später wurden 60 mg/kg Körpergewicht Pimonidazol (in PBS gelöst) in die Schwanzvene inokuliert. 2 h später wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und die Organe entnommen.

4.2.2.2 Experimentelles Metastasierungsmodell CT-26L

Um den Einfluss von Hif-1 α auf die Metastasierung von Tumorzellen zu untersuchen wurden 1×10^6 CT26L-shHif-1 α bzw. shNT in 200 μ l PBS (pH=7,4) intravenös in die Schwanzvene von DBA/2 Mäusen inokuliert. Die Zellzahl wurde vor der Inokulation auf genau 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Bis zur Inokulation lagerten die Tumorzellen auf Eis. Um die Inokulation der Tumorzellen zu erleichtern wurden die Mäuse vor Inokulation mittels Infrarotwärmelampe aufgewärmt. Dies führte zur Dilatation der Venen und somit zur Erleichterung der Inokulation. Die Mäuse wurden 21 d nach Tumorzellinokulation getötet und die Organe entnommen (3.2.2.4).

4.2.2.3 Spontanes Metastasierungsmodell L-CI.5s

Um den Einfluss von Hif-1 α auf die Metastasierung von Tumorzellen zu untersuchen wurden 1×10^6 L-CI.5s-shHif-1 α bzw. shNT in 100 μ l PBS (pH=7,4) intradermal in die rechte Flanke von DBA/2 Mäusen inokuliert. Die Zellzahl wurde vor der Inokulation auf genau 10×10^6 Zellen/ml eingestellt. Bis zur Inokulation lagerten die Tumorzellen auf Eis. Die rechte Flanke wurde vor Inokulation rasiert. Um die intradermale Inokulation problemlos durchzuführen wurde eine leichte Anästhesie mit Isofluran durchgeführt. Anschließend wurden 100 μ l der Tumorzellsuspension intradermal inokuliert. Das Primärtumorwachstum wurde durch Messen des Primärtumordurchmessers mit einer Schieblehre dokumentiert. Die Tiere wurden bei einem Primärtumordurchmesser von 6 mm getötet und die Organe entnommen.

Zum Nachweis von Hypoxie in L-CI.5s Primärtumoren wurden 1×10^6 L-CI.5s Tumorzellen in 100 μ l PBS (pH=7,4) intradermal in die rechte Flanke von DBA/2 Mäusen inokuliert. 14 d später wurden 60 mg/kg Körpergewicht Pimonidazol (in PBS gelöst; pH=7,4) in die Schwanzvene inokuliert. 2 h später wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und die Organe entnommen.

4.2.3 Probengewinnung

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Auftreten einer systemischen Hypoxie beim Töten der Mäuse durch CO₂ zu vermeiden, wurden alle Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und anschließend je nach Modell sofort Primärtumor, Leber, Lunge und Milz entnommen. Die Leber wurde zerteilt und einige Teile sowie der rechte Lungenflügel wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Untersuchung bei -80°C gelagert. Ebenso wurden von jeder Leber zwei Stücke in *Tissue Tek* (Sakura Fine Tek) Einbettmedium für Kryoschnitte eingebettet und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt. Für Paraffinschnitte wurden Leberstücke über Nacht in Fixierlösung (2% Formaldehyd in 1 x PBS) fixiert, paraffinisiert und in Paraffin eingebettet. Die *lobus sinister medialis hepatis* und *lobus dexter medialis hepatis* wurden zur Beurteilung des Metastasierungsmusters mit der X-Gal-Färbung gefärbt. Primärtumoren wurden, falls vorhanden, halbiert. Die eine Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Untersuchung bei -80°C gelagert, die andere Hälfte in *Tissue Tek* (Sakura Fine Tek) Einbettmedium für Kryoschnitte eingebettet und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

4.3 Methoden der Zellkultur

4.3.1 Zellkulturmedien

Zelllinie	Medien und Medienzusätze
293T	DMEM, 10% (v/v) FCS, 2mM L-Glutamin, 100mM Hepes, 0,27mM Arginin, 0,55 mM Asparagin
L-CI.5s	RPMI, 10% FCS (v/v) (PAA Gold), 2mM L-Glutamin, 100mM Hepes, 0,5mM β -Mercaptoethanol
A549	RPMI, 10% FCS (v/v) (PAN), 2mM L-Glutamin
CT-26L	RPMI (Gibco incl. Glucose, Hepes, Glutamin, NaBicarbonat, NaPyruvat), 10% (v/v) FCS (PAN)
GTL-16	RPMI, 10% FCS (v/v) (PAN), 2mM L-Glutamin
Skov3i.p.	DMEM, 10% (v/v) FCS, 2mM L-Glutamin, 100mM Hepes, 0,27mM Arginin, 0,55 mM Asparagin

Tabelle 3.1 Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

4.3.2 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank (*Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator*, Thermo Quest, Egelsbach, Deutschland) kultiviert, um eine optimale Proliferation der Zellen zu gewährleisten.

Hypoxieversuche wurden in einem Hypoxie-Inkubator (*HERAcell150*, Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland) bei 1% O₂, 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt durchgeführt.

4.3.3 Passagieren von adhärennten Zellen

Adhärennte Zelllinien wurden dreimal wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag) bei einer Dichte von ca. 80% der Konfluenz passagiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem bzw. zwei ml Trypsin/EDTA Lösung pro 10 bzw. 20 cm Zellkulturschale nach einer fünfminütigen Inkubationsphase durch Klopfen abgelöst. In der Zwischenzeit wurde je nach Splitverhältnis Medium in eine frische Zellkulturschale vorgelegt. Zu den abgelösten Zellen wurde anschließend je nach Splitverhältnis Medium zugegeben, die Zellen resuspendiert und die dem Split Verhältnis entsprechende Menge an Zellen auf die vorbereitete, frische Zellkulturschale gegeben und die Zellen auf dieser durch kreuzförmiges Schwenken gleichmäßig verteilt.

4.3.4 Passagieren von Suspensionszellen

Die L-CI.5s-Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und dreimal pro Woche passagiert. Das Splitverhältnis richtete sich nach der L-CI.5s Konzentration im Medium. Zuerst wurde in eine neue Zellkulturflasche entsprechend dem Splitverhältnis (1:4 bis 1:10) frisches Medium gegeben. Die L-CI.5s Zellen wurden anschließend resuspendiert, so dass eine Einzelzellsuspension entstand. Entsprechend dem Splitverhältnis wurde die L-CI.5s-Zellsuspension in die vorbereitete, neue Zellkulturflasche überführt und die Zellen durch kreuzförmiges Schwenken gleichmäßig verteilt.

4.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Einstellung der für die Co-Transfektion bzw. die Inokulation nötigen Zellzahlen wurden die adhärennt wachsenden Zellen zuerst von der Schale abgelöst und in Medium aufgenommen. Anschließend wurde von der Zellsuspension 100 µl mit 100 µl Trypanblau-Lösung versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer gebracht. Da von der Trypanblau-Lösung ausschließlich tote Zellen angefärbt werden, konnten so die lebenden von den toten Zellen unter-

schieden werden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Auszählen zweier diagonal gegenüberliegender großer Quadrate der Neubauer-Zählkammer. Da ein Quadrat die Zellzahl in 0,1 µl der Suspension widerspiegelt, die Suspension zuvor aber durch die Zugabe der Trypanblau-Lösung 1:2 verdünnt wurde, entspricht die durch Auszählen zweier Quadrate gewonnene Zahl der Zellzahl in 0,1 µl Suspension. Um die Zellzahl in 1 ml Suspension zu erhalten wurde die Zellzahl in 0,1 µl der Suspension anschließend mit dem Faktor 10^4 multipliziert.

4.3.6 Produktion lentiviraler Zellkulturüberstände

Um einen stabilen *Knockdown* in den zu untersuchenden Zelllinien zu generieren wurden infektiöse lentivirale Partikel produziert. Je shRNA wurden 5×10^6 293T-Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. 24 h später und 3 h vor Beginn der Co-Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Eine Stunde vor Beginn der Co-Transfektion wurden die lentiviralen Plasmide vorbereitet. Die Plasmidlösung setzte sich aus 6,6 µg des Helferplasmids pLP1 (gag und pol), 5 µg des Helferplasmids pLP2 (für den Transport der transfizierten DNA in den Nukleus) und 3 µg des Helferplasmids pLVSVG, welches die für den Tropismus des Virus wichtigen env-Gene trägt zusammen. Vom Transfektionsplasmid wurden je Co-Transfektion 10 µg eingesetzt. Die drei Helferplasmide und das Transfektionsplasmid wurden in 1,5 ml FCS freiem Opti-Mem Medium aufgenommen. Die Plasmidlösungen wurden anschließend mit 1,5 ml Opti-Mem Medium gemischt welches zuvor mit 36 µl Lipofektamin 2000 (Sigma Aldrich) 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die so entstandene Lösung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellkulturschalen mit den 293T-Zellen gegeben, bei welchen zuvor das Medium durch 5 ml Opti-Mem Medium mit 10 % FCS ersetzt wurde. 6 h später wurde das Transfektionsmedium von den 293T Zellen abgenommen und frisches Medium zu den Zellen gegeben.

36 h später wurde das Medium vorsichtig und langsam (zur Vermeidung von Scherkräften) abgenommen. Virusproduzierende 293T Zellen wurden durch Sterilfiltrieren (Sterilfilter 0,45 µm Porengröße, TPP, Trasadingen, Schweiz) abgetrennt. Der Sterilfilter wurde hierzu an der Innenwand eines 10 ml Falcon-Röhrchen angesetzt damit das Filtrat die Röhreninnenwand herunterlaufen kann, damit die Lipidhüllen der Lentiviren nicht zerstört werden. Die lentiviralen Zellkulturüberstände wurden anschließend sofort zur Infektion von Zielzellen benutzt oder aliquotiert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.3.7 Infektion von adhärennten Zellen

Adhärennte Zellen wurden je nach Versuchsaufbau am Vortag auf 6-well Platten im normalen Splitverhältnis ausgesät. Nach Abnahme des Mediums und einem Waschdurchgang mit PBS wurden pro 6-well 250 µl virushaltiger Zellkulturüberstand auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden 750 µl Medium und Polybren (Endkonzentration 8 µg/ml) zugegeben. 24 h später wurde der virushaltige Zellkulturüberstand abgenommen und die Selektion mit 25 µg/ml Puromycin begonnen.

4.3.8 Co-Transfektion

Ziel der Co-Transfektion war die Produktion von Hif-1α *Knockdown* L-CI.5s Zelllinien. Hierzu wurden die L-CI.5s Zellen in einer Co-Transfektion mit Lentiviren infiziert, die von einer Verpackungszelllinie (293T) produziert wurden.

Je shRNA wurden 5×10^6 293T-Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. 24 h später und 3 h vor Beginn der Co-Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Eine Stunde vor Beginn der Co-Transfektion wurden die lentiviralen Plasmide vorbereitet. Die Plasmidlösung setzte sich aus 6,6 µg des Helferplasmids pLP1 (gag und pol), 5 µg des Helferplasmids pLP2 (für den Transport der transfizierten DNA in den Nukleus) und 3 µg des Helferplasmids pLVSVG, welches die für den Tropismus des Virus wichtigen env-Gene trägt zusammen. Vom Transfektionsplasmid wurden je Co-Transfektion 10 µg eingesetzt. Die drei Helferplasmide und das Transfektionsplasmid wurden in 1,5 ml FCS freiem Opti-Mem Medium aufgenommen. Die Plasmidlösungen wurden anschließend mit 1,5 ml Opti-Mem Medium gemischt welches zuvor mit 36 µl Lipofektamin 2000 (Sigma Aldrich) 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die so entstandene Lösung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellkulturschalen mit den 293T-Zellen gegeben, bei denen zuvor das Medium durch 5 ml Opti-Mem Medium mit 10 % FCS ersetzt wurde.

24 h später wurde das Medium von den Verpackungszelllinien abgenommen und $1,5 \times 10^6$ L-CI.5s Zellen in 10 ml L-CI.5s Medium und 10 µl Polybren (Konzentration der Stocklösung: 800 µg/ml) zugegeben, so dass eine Polybrenkonzentration von 8 µg/ml vorlag.

48 h später wurde mit der Selektion der infizierten L-CI.5s Zellen begonnen, indem 2 ml des Überstandes, der die infizierten L-CI.5s Zellen enthielt, in kleine Zellkulturflaschen überführt wurde, in denen 3 ml L-CI.5s Medium vorgelegt war.

4.3.9 Selektion mit Antibiotika

Da die verwendeten lentiviralen Plasmide als Selektionsmarker eine Puromycin-Resistenz tragen, wurden die infizierten Zellen mit Puromycin selektioniert, um sicherzustellen, dass nach Selektion nur noch Zellen vorlagen, die Träger der shRNA-Sequenzen sind. Hierzu wurden die Zelllinien mit einer Puromycinkonzentration von 30 µg/ml selektioniert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen verwendet. Die Zelllinien wurden während der Selektion je nach Dichte gesplittet und in frisches Medium mit einer Puromycinkonzentration von 30 µg/ml passagiert. Die Zelllinien wurden solange selektioniert bis alle Zellen in der Kontrolle abgetötet waren und somit davon ausgegangen werden konnte, dass alle nicht transduzierten Zellen abgetötet waren.

Anschließend wurden die transduzierten Zelllinien passagiert und Aliquots eingefroren.

Zur Kontrolle der *Knockdown*-Effizienz wurde die RNA aus transduzierten Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative RT-PCR Analyse durchgeführt.

4.3.10 Proliferationsassay

Um die Nettoproliferation von Zellen beurteilen zu können wurden zwei Strategien verfolgt. Suspensionszellen (L-CI.5s) wurden in 5 ml Flaschen ausgesät ($0,4 \times 10^6$ Zellen/ml) und die Zellzahl durch Anfärben mit Trypanblau bestimmt.

Die Nettoproliferation adhärenter Zellen (CT-26L) wurde durch Aussäen der Zellen in 96-well Platten mittels alamarBlue® bestimmt. Je Messpunkt wurden zwischen 5 und 7 Kavitäten verwendet. In jede Kavität wurde 90 µl Zellkulturmedium sowie nach 0 h, 24 h und 48 h 10 µl alamarBlue® gegeben. 1 Stunde später wurde die Absorption bei 570 nm 0,1 Sekunden lang gemessen (Wallac Victor, PerkinElmer, Weiterstadt, Deutschland). Die gemessenen Absorptionen wurden auf die Absorption des reinen Zellkulturmediums ohne Zellen normalisiert.

4.3.11 Boyden-Chamber-Invasionsassay

Mit Hilfe des Boyden-Chamber-Invasionsassay kann das Invasionsverhalten von eukaryotischen Zellen untersucht werden. Hierbei müssen die Zellen eine dünne Schicht aus Matrigel™, das eine künstliche Basalmembran darstellt, durchbrechen, um von der oberen in die untere Kammer zu gelangen. Matrigel™ besteht hauptsächlich aus den extrazellulären Proteinen Laminin, Kollagen Typ IV und Entactin.

Zunächst wurden Inserts (Ø 6,5 mm), deren Boden von einer poröser Membran (Porengröße 3 µm für L-CI.5s, 8µm für A549) gebildet wird, mit Matrigel™ unter semi-sterilen Bedin-

gungen (neben einem Bunsenbrenner) beschichtet. Hierzu wurden alle benötigten Lösungen bei 4 °C (steriles 1 x PBS) und alle Materialien (Inserts, Pipettenspitzen) bei -20 °C vorgekühlt. Ein Aliquot Matrigel™ (50 µl) wurde auf Eis aufgetaut und mit 750 µl vorgekühlten 1 x PBS durch dreißigmaliges Auf- und Abpipettieren unter Vermeidung von Luftblasenbildung sorgfältig gemischt. Auf jedes Insert wurden jeweils 50 µl des verdünnten Matrigels blasenfrei pipettiert. Das Matrigel™ wurde danach durch leichtes Klopfen gleichmäßig auf den Membranen der Inserts verteilt. Anschließend wurden die Inserts zur Verfestigung des Matrigels 3 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die Inserts über Nacht unter der ausgeschalteten Sterilbank getrocknet. Die Rehydrierung erfolgte am nächsten Tag mit FCS freiem L-CI.5s Medium, welches 0,5% (w/v) BSA enthielt. Nach 2 h wurde das Medium abgenommen und je Insert entweder 5×10^5 L-CI.5s Lymphomzellen oder 1×10^5 A549 in 300 µl FCS freiem Medium zugegeben. Die Inserts wurden nun in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte gegeben, in die 1 ml FCS-haltiges Medium vorgelegt worden war. Als Chemoattraktants diente FCS bei L-CI.5s Zellen, sowie 20ng/ml HGF bei A549 Zellen.

Nach 24-stündiger (A549) bzw. 48-stündiger (L-CI.5s) Inkubation bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank, wurde die Zellzahl der invadierten Zellen bestimmt.

L-CI.5s Zellen: Hierzu wurden die Zellen in der unteren Kammer resuspendiert und 950 µl der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 300 g abzentrifugiert. Danach wurden 850 µl des Überstandes abgenommen und die Zellpellets in den verbliebenen 100 µl Medium resuspendiert. Die weitere Bestimmung erfolgte durch Bestimmung der Zellzahl, jedoch ohne Zugabe von Trypanblau.

A549 Zellen: Hierzu wurden das Medium aus den Inserts entfernt und das Matrigel sowie nicht invadierte Zellen unter Zuhilfenahme eines Wattestäbchens entfernt. Anschließend wurden die an der unteren Seite der Membran anhaftenden Zellen fixiert und mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden invadierte Zellen in 10 mikroskopischen Sichtfeldern quantifiziert.

4.3.12 Scatterassay

A549-shNT bzw. shADAM-10 Tumorzellen wurden sehr dünn auf 6-well-Platten ausgesät. Sobald sich Kolonien gebildet hatten, wurden 80µg/ml DN30 zugegeben. 5 h später wurde das *Tumorzellscattering* durch Zugabe des *Scatterfactors* HGF (20 ng/ml) induziert. Das *Tumorzellscattering* wurde mikroskopisch (AxioVert 135, Carl Zeiss, Jena Deutschland) mit der AxioVision LE 4.2 Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).dokumentiert.

4.3.13 *Shedding-Assays*

Tumorzellen wurden so ausgesät, dass sie zu Beginn des Met-*Shedding*-Experimentes konfluent waren. Anschließend wurde das Met-*Shedding* durch die Zugabe von 80 µg/ml DN30 für 5 h induziert. Das *Shedding* wurde durch Zugabe von verschiedenen Inhibitoren moduliert. So wurden vor Zugabe von DN30 1000 ng/ml rekombinantes humanes TIMP-1 bzw. rekombinantes humanes TIMP-3 zur Breitspektrum-inhibition von Matrixmetalloproteinasen eingesetzt. Um ADAM-10 spezifisch zu hemmen wurde der ADAM-10-spezifische Inhibitor GI254023X in einer Konzentration von 1 bis 5 µM eingesetzt. Das DN30-induzierte Met-*Shedding* wurde in GTL-16 Zellen darüber hinaus durch die Zugabe von 100 nM PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) verstärkt.

Im Anschluss an die Inkubationen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen, 5 min mit Zellysispuffer (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) inkubiert, mit einem Zellschaber abgelöst. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden die Zellsuspensionen für 3 x 10 s in ein Ultraschallbad gegeben. Nach Zentrifugation (14000g, 10 min, 4°C) wurden die Überstände abgenommen und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Pellets wurden verworfen.

Zur Detektion des *Shedding*-Produktes in Zellkulturüberständen wurden ausschließlich GTL-16 Zellen verwendet, da sich diese aufgrund der großen Menge an Met-Oberflächenrezeptoren besonders gut eignen. Hierzu wurden 10 cm Zellkulturschalen verwendet, die konfluent mit GTL-16 belegt waren. Das Met-*Shedding* wurde durch Zugabe von 80 µg/ml DN30 induziert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Konzentration an abgespalteten Met-Rezeptoren ermittelt.

4.4 *Molekularbiologische Methoden*

4.4.1 Transformation von Bakterien

Zur Transformation von TOP 10 Bakterien mit lentiviralen Plasmiden wurden 50 µl Bakterien-suspension und 100 ng Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze 90 Sekunden lang im Heat-Block auf 42 °C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Zur Erholung wurden die Kulturen in 4 ml LB-Flüssigmedium gegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl der Flüssigkultur auf LB-AMP-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.4.2 Kultivierung und Selektion von Bakterien

Um Einzelkolonien von Bakterienstämmen zu erhalten, wurden diese auf LB-Agar-Kulturplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Ampicillin-Zusatz zum Nährmedium. Die Kulturplatten der Bakterienkolonien wurden bei 4 °C gelagert und konnten maximal 4 Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet werden.

Zur Amplifikation der Plasmide wurden Flüssigkulturen verwendet. Die Volumina betragen 4 ml Medium im 13 ml Kulturröhrchen sowie 250 ml Medium im 1000 ml Erlenmeyerkolben verwendet.

Zum Animpfen von 4 ml Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien von Kulturplatten benutzt, welche anschließend 3 h bei 37 °C inkubiert wurde, bis sie zur Animpfung einer 250 ml Flüssigkultur verwendet werden konnte. Die Bakterien wurden mittels einer Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml auf Plasmide selektioniert. 250 ml Flüssigkulturen wurden über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37 °C inkubiert.

4.4.3 DNA-Maxipräparation

Die Plasmid-DNA wurde aus *E.coli* mittels des Plasmid Purifikation Kits (Maxi) der Firma Qiagen durchgeführt. Hierzu wurden 250 ml Übernachtkultur (siehe 3.2.1) von Bakterien, die das gewünschte Plasmid tragen, verwendet. Die bei der Präparation gewonnene DNA wurde in 250 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

4.4.4 RNA-Gewinnung aus Gewebeproben

Die Extraktion und Aufreinigung der RNA wurde laut Herstellerprotokoll des *Pure YieldTM RNA Midiprep System Kits* durchgeführt. Für die Homogenisierung der Gewebeproben wurde ein Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel; IKA Labortechnik) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Vakuumprotokoll (siehe Herstellerprotokoll des *Pure YieldTM RNA Midiprep System*).

4.4.5 RNA-Gewinnung aus Zellen

Adhärenente Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trizol[®]-Reagenz/10 cm Zellkulturschale zugeben und die Zellen mittels Zellschaber von der Platte gelöst und in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Suspensionszellen wurden in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 300 g und Raumtemperatur 5 min abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes, wurde das Zellpellet mit kaltem PBS resuspen-

diert. Danach wurden die Zellen abermals bei 300 g und Raumtemperatur 5 min lang abzentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 1 ml kaltem Trizol[®]-Reagenz aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Ab hier wurden Adhärente- und Suspensionszellen gleich behandelt. Die Trizol[®]-Zellen-Suspension wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform unter dem Abzug zugegeben und die Suspension 15 Sekunden mit einem Vortexer gemischt. Nach einer 2 – 3-minütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur wurde bei 14000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Währenddessen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 500 µl Isopropanol vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde die obere, farblose Phase abgenommen und in das vorbereitete 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Mischen der Reaktionslösung wurde das Gemisch 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt (14000 g, 4 °C, 10Min) an. Der daraus resultierende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Dem Pellet wurde 1 ml 80 % Ethanol (nukleasefrei) zugegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 7600 rpm und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das RNA-Pellet wurde anschließend 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und abschließend in 30 µl nukleasefreiem ddH₂O resuspendiert.

4.4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde photometrisch durchgeführt, indem die DNA- bzw. RNA-Probe zuerst 1:100 mit ddH₂O verdünnt und anschließend in einer 100 µl Küvette im Photometer bei 260 und 280 nm gemessen wurden. Die Absorption bei 260 nm liefert über die Formel $c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{260} \cdot 40 \cdot 100 / 1000$ die RNA-Konzentration und über die Formel $c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{260} \cdot 50 \cdot 100 / 1000$ die DNA-Konzentration. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} lässt auf die Reinheit der RNA bzw. DNA schließen und sollte 2,5 nicht überschreiten.

4.4.7 Agarosegelelektrophorese

Bevor die RNA durch die Reverse-Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben werden konnte, musste sichergestellt werden, dass die RNA nicht degradiert war. Dazu wurden die RNA, die auf 100 ng/µl eingestellt worden war, auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel ($C_{\text{Ethidiumbromid}} = 1\mu\text{l}/50\text{ ml Agarosegel}$) in TAE-Puffer aufgetragen.

Die Gelgießvorrichtung und der Probenkamm wurden vor Beginn für 30 min in 2 % (v/v) Absolve eingelegt werden, um eine Kontamination des Agarosegels mit RNAsen zu vermeiden, da diese sonst zu einer Degradation der RNA im Agarosegel führen könnten. Anschlie-

ßend wurde die RNA 10 min auf 65 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA durch Denaturierung zu zerstören, da diese sonst den gleichmäßigen Lauf der RNA im Gel und die Bindung der Reversen-Transkriptase bei der Umschrift der RNA in cDNA stören würden. Anschließend wurde die denaturierte RNA für 2 min auf Eis inkubiert. Für die Agarosegelelektrophorese wurden 10 µl der denaturierten RNA mit 2 µl 6 x RNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen der Agarosegele pipettiert. Der Rest der denaturierten RNA wurde bis zur reversen Transkriptionsreaktion bei -20 °C gelagert.

Nach Abschluss der Agarosegelelektrophorese wurden die Gele an einer Imagestation fotografiert. Nicht degradierte RNA zeigt drei deutliche Banden, die die drei ribosomalen RNA-Typen widerspiegeln (28 S, 18 S und 5 S).

4.4.8 Reverse Transkription

Die aus Zellen oder Gewebeproben isolierte RNA wurde mithilfe der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben, da diese für die *Real-time* Polymerasekettenreaktion benötigt wird. Hierzu wurde der High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (Applied Biosystems) verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden 10 µl der zuvor auf eine RNA-Konzentration von 100 ng/µl eingestellten Proben verwendet. Das Reaktionsprodukt wurde bei -20 °C bis zur weiteren Analysierung gelagert.

4.4.9 *Real-time* Polymerasekettenreaktion

Für die Analyse von Expressionslevel einzelner Genen wurde die *Real-time* Polymerasekettenreaktion (RT-PCR bzw. TaqManTM-Analyse) verwendet. Als Ausgangsmaterial diente die aus mRNA gewonnene cDNA. Die RT-PCR ist eine fluoreszenzspektrometrische Methode, da die zum Einsatz kommenden Sonden mit einem Fluoreszenzmolekül (VIC oder FAM) und einem Quencher (TAMRA) gekoppelt sind, welche im Laufe der PCR-Reaktion bei vorliegendem spezifischem Template voneinander getrennt werden und es somit zu einem spezifischen Fluoreszenzsignal kommt, das eine Quantifizierung der untersuchten Gene erlaubt.

Um die Expressionslevel einzelner Gene vergleichen zu können wurden diese auf ein *house-keeping*-Gen, in diesem Fall 18S rRNA, normiert.

Für die TaqManTM-Analyse wurden von den Proben, die das zu untersuchende Gen enthalten, 1:100 und 1:500 Verdünnungen mit nukleasefreiem ddH₂O hergestellt. Alle Ansätze wurden in die Kavitäten einer 96-Opti-well-Platte (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) pipettiert. Für die Messung der endogenen 18S Kontrolle wurden 10µl der 1:500 verdünnten cDNA eingesetzt, für die Messung des zu untersuchenden Gens, 10µl der 1:100 verdünnten

cDNA. Alle Messungen wurden in Triplets durchgeführt. Als Negativkontrollen (NTCs = *non template controls*) wurden je zu bestimmenden Gen in 2 Kavitäten 10 µl nukleasefreies ddH₂O pipettiert. In diesen Kavitäten sollte keine PCR-Reaktion stattfinden, da keine cDNA vorhanden sein sollte. Ein Signal in diesen Kavitäten deutet somit auf eine Verunreinigung der verwendeten PCR-Reagenzien oder des verwendeten nukleasefreien ddH₂O hin.

Danach wurde die PCR-Reaktionslösung hergestellt. Pro Kavität wurden 15 µl PCR-Reaktionslösung eingesetzt, welche aus 12,5 µl Mastermix, 1,25 µl primer-probe-Mix (Applied Biosystems) und 1,25 µl nukleasefreiem ddH₂O bestand. Um bei der Messung der *lacZ*-mRNA falsche Ergebnisse durch eine produktionsbedingte Verunreinigung des Mastermixes zu vermeiden, wurde der speziell gereinigte TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 verwendet. Die Expression aller anderen Gene wurden unter Verwendung des Gene Expression Master Mix analysiert. Je nachdem, ob die Menge an 18S RNA oder einem anderen Gen zu bestimmen war, wurde der entsprechende Primer-Probe-Mix verwendet. Die PCR-Reaktionslösung wurde mittels einer Multipipette zu den in die Kavitäten bereits vorgelegten Proben pipettiert. Nach Hinzufügen der PCR-Reaktionslösung wurde die 96-Opti-well-Platte mit einer Folie versiegelt und die Platten kurz abzentrifugiert um eventuell bestehende Luftblasen zu eliminieren und um eine Konzentration des PCR-Ansatzes im unteren Teil der Kavität zu gewährleisten. Anschließend konnte die versiegelte Platte unter Lichtausschluss einige Tage bei 4 °C gelagert werden. Die Messung erfolgte an einem ABI PRISM 7900HT TaqManTM-Gerät der Firma Applied Biosystems. Anschließend wurden die Daten mittels der Software SDS 2.2 (Applied Biosystems) ausgewertet.

Abschließend wurden die Werte des zu messenden Gens gegen die dazugehörenden 18S RNA Werte normiert und in einem Balkendiagramm dargestellt.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Immunpräzipitation

Zur Konzentrierung der Met-Rezeptoren in GTL-16-Zellkulturüberständen wurden jeweils 2 ml Überstand mit 50 µl Sepharose-Protein-A auf einem Drehrad 2 h bei 4°C in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze bei 600g abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Nach drei Waschschritten mit 1 x PBS (dazwischen jeweils ein Zentrifugationsschritt bei 600g) wurde 50µl 2-fach Laemmli-puffer zugegeben und die Proteine/Sepharose-Protein-A Komplexe bei 100 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels Western-Blot analysiert.

4.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit BCA™ von Pierce

Die Proteinkonzentrationen wurden photometrisch ermittelt. Hierzu wurden die durch Extraktion aus Geweben gewonnenen Proteinlösungen 1:100 mit ddH₂O verdünnt und 10 µl der 1:100 Verdünnungen in je zwei Wells einer 96-Well Platte vorgelegt. Zur Erstellung der Standardgerade wurden folgende Konzentrationen an bovinem Serum Albumin eingesetzt: 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml und 0,06125 mg/ml. Dazu wurden 40 mg BSA in 1 ml 1 x Zellysepuffer aufgenommen und eine 1:10 Verdünnung mit 1 x Zellysepuffer hergestellt. Die oben genannten Konzentrationen wurden ausgehend von der 1:10 Verdünnung durch eine 1:2 Verdünnungsreihe hergestellt. Zur Messung der Konzentrationen der Standardgerade wurden je BSA-Standardlösung 10 µl in je zwei Wells pipetiert.

Anschließend wurden zu den zu untersuchenden Proben und den BSA-Standardlösungen je 200 µl der fertigen BCA-Lösung gegeben, welche zuvor durch Mischen der Lösungen A und B im Verhältnis 1:50 hergestellt wurde.

Nach Zugabe der BCA-Lösung schloss sich eine 30-minütige Inkubationszeit bei 37 °C an. Daraufhin wurde die Absorption bei 590 nm 0,1 Sekunden lang gemessen (Wallac Victor, PerkinElmer, Weiterstadt, Deutschland) und die unbekannt Konzentrationen durch die Erstellung einer Standardgerade und der dazugehörigen Geradengleichung errechnet.

4.5.3 Western Blot

Für die Western Blot Analyse wurden 10 %ige Trenngele verwendet wurden, da die elektrophoretische Mobilität der Proteine maßgeblich durch die Maschenweite des Polyacrylamid-Gels bestimmt wird und große Proteine durch Verwendung weiterer Maschen besser aufgetrennt werden. Hierzu wurden 8,75 ml steriles, ddH₂O, 6,25 ml PAA (40%, 29:1), 5 ml 1,5 M TRIS (pH 8,6 +0,4 % SDS), 115 µl 10 % (w/v) APS und 30 µl TEMED gemischt. Das noch flüssige Gel wurde sofort in zuvor mit 70 %igem Alkohol gereinigte Gelkassetten (Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning, Deutschland) mit einem Glasplatten Abstand von 1,5 mm gegossen und für eine gleichmäßige Oberfläche und zum Schutz gegen Austrocknen mit Isopropanol überschichtet. Die Gele wurden anschließend eine Stunde zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und die Geloberfläche gründlich mit sterilem ddH₂O gewaschen um Isopropanolreste zu vermeiden, da diese den Übertritt der Proteine vom Sammel- in das Trenngel stören könnten.

Danach wurde das Sammelgel, das aus 6,1 ml sterilem, ddH₂O, 1,25 ml PAA (40%, 29:1), 2,5 ml 1,5 M TRIS (pH 6,8) und 10 µl TEMED besteht auf das Trenngel gegossen und die Kämme zur Bildung der Taschen in die Glaskassetten eingesetzt. Nach 45 min konnten die Gelkassetten aus dem Gelgießrahmen genommen, die Kämme entfernt und die Gele verwendet oder zum Schutz vor Austrocknung in mit Elektrophoresepuffer getränkte Papiertücher gewickelt und in einer Plastiktüte bei 4 °C gelagert werden.

Während der Polymerisation des Sammelgels wurden die zu untersuchenden Proben vorbereitet. Die Proben wurden auf einen Gesamtproteingehalt von 60 µg eingestellt und 1:5 mit Laemmli-Puffer versetzt. Die so behandelten Proben wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert, bis sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Mindestinkubationszeit betrug 2 min.

Je 2 Gelkassetten wurden in die Gelelektrophoresekammer eingestellt und die Kammer mit anschließend mit 1 x Gelelektrophoresepuffer gefüllt. Dann konnten die zuvor vorbereiteten Proben auf die Gele aufgetragen werden, wobei pro zu untersuchender Probe maximal 40 µl pro Tasche pipettiert wurden. Pro Gel wurde jeweils in eine Tasche 5µl *prestained Protein Molecular Weight Marker* (BioRad) als Größenmarker aufgetragen und die Gelelektrophorese gestartet. Diese wurde ungefähr 2,5 h bei 40 mA pro Gelelektrophoresekammer durchgeführt. Gegen Ende der Elektrophorese wurde die *Blotting*-Apparatur vorbereitet. Hierzu wurde pro Gel eine 6 x 8 cm Nitrozellulose-Membran (Amersham, Braunschweig, Deutschland) und sechs 6 x 8 cm große *Whatman Paper* in 1 x Blottingpuffer inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug mindestens 10 min. Nach der Inkubation wurden pro Gel auf die untere Platte (Anode) der *Blotting*-Apparatur (*Trans-Blot SD cell*, BioRad) 3 *Whatman Paper* und eine Nitrozellulose-Membran übereinander gelegt.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die Gelkassetten aus der Gelelektrophoresekammer genommen und die Gele vorsichtig aus den Gelkassetten entfernt und auf die *Whatman Paper*/Membran Stapel auf der Anode gelegt. Die restlichen drei *Whatman Paper* wurden nun auf den Stapel gelegt und die zwischen den einzelnen Schichten vorhandenen Luftblasen mittels einer Stabpipette durch Rollen entfernt. Abschließend wurde die Kathode der *Blotting*-Apparatur auf die Stapel gesetzt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte während 1 h 15 min bei 15 V.

Von nun an wurden die Membranen immer mit der Proteinseite nach oben prozessiert. Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen wurden die Membranen, nachdem sie mit Hilfe einer Pinzette aus der *Blotting*-Apparatur genommen wurden, mit Ponceau-S gefärbt. Die rote Färbung der Proteine wurde anschließend mit ddH₂O aus den Membranen gewaschen.

Nach Verblässen der Ponceau-S-Färbung Die Membranen wurden 4 mal 5 min mit 1 x TBS-T gewaschen und anschließend in eine 5 %ige BSA-Lösung in TBS-T gegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde lang geschwenkt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden die Membranen erneut 4 mal 5 min mit frischem TBS-T gewaschen.

Anschließend wurden die Membranen mit den entsprechenden Primärantikörpern in 5%-BSA TBS-T über Nacht bei 4 °C inkubiert. An die Primärkörperinkubation schlossen sich wiederum 4 jeweils 5-minütige Waschschrte an. Im Anschluss wurde die Membran mit dem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 2 h und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Um die nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen wurden die Membranen nach der Inkubation viermal jeweils fünf min mit 1 x TBS-T gewaschen.

Abschließend erfolgte die Auswertung mittels Lumi-Light, einem Detektionsreagenz, welches als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase fungiert. Hierzu wurde je 0,5 ml der Lösung 1 und 2 auf eine transparente Folie pipettiert, gemischt und die Membran mit der proteinhaltigen Seite nach unten aufgelegt. Die Folie wurde nun so gefaltet, dass die Membran unten und oben von der Folie umschlossen wurde und auf eine Kodak Imagestation (440 CF) gelegt, um die antikörpermarkierten Proteinbanden zu dokumentieren. Je nach Signalstärke wurden die Membranen zwischen 20 s und 12 min belichtet.

Nach der Dokumentation konnten die Membranen mehrere Wochen bei 4°C in 1 x TBS-T aufbewahrt werden.

Densitometrische Auswertung

Die Intensität der Banden wurde densitometrisch unter Zuhilfenahme der Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) bestimmt. Hierbei wurde die Expression des zu untersuchenden Proteins auf die α -Tubulin Werte normiert und in einem zweidimensionalen Plot dargestellt. Durch die Normierung der Werte auf das *House-Keeping*-Gen α -Tubulin konnten der Gehalt an zu untersuchenden Protein in verschiedenen Proben verglichen werden.

Strippen von Membranen

Zur erneuten Detektion konnten die auf den mit Proteinen beladenen Membranen gebundenen primären und sekundären Antikörper entfernt werden. Dieser Vorgang wird als *Strippen* bezeichnet. Hierzu wurden die Membranen bei 50 °C für 0,5 h in 1x Strippingpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Membranen vier mal fünf min mit großen Volumen an 1 x TBS-T gewaschen und danach die unspezifischen Bindungsstellen auf den Membranen geblockt und das Färbeprotokoll wie oben beschrieben nach dem Blocken fortgesetzt.

4.6 Immunhistochemische Methoden

4.6.1 Herstellung von Kryo-Schnitten

Die Leber wurde nach Entnahme zerteilt und Stücke sogleich in Tissue-Tek einbettgebettet und auf Trockeneis eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die Leberproben bei -70°C gelagert.

Zur Gewinnung von 8 µm dicken Kryoschnitten wurden die eingebetteten Lebern bei -17°C mit einem Kryotom (Microm HM560) geschnitten, mit Superfrost Objektträgern aufgenommen und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

4.6.2 IHC Protokoll Kryoschnitte (phospho-Met)

Die Kryoschnitte wurden 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in eiskaltem Aceton für 10 min fixiert. Daraufhin wurden die Schnitte erneut für 15 min getrocknet. Die Rehydrierung erfolgte 10 min in TBS. Anschließend wurden die Objektträger aus der Lösung genommen und anhaftende Lösung durch Schütteln aus dem Handgelenk entfernt. Danach wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift eingekreist, um das Austrocknen durch Ablaufen der Lösungen während der folgenden Schritte zu verhindern.

Die Färbung wurde mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Hierzu wurde der anti-phospho-Met-Primärantikörper in TBS-T 1:50 verdünnt und 150 µl der Verdünnung auf die Schnitte gegeben. Als Kontrolle verwendet wurde TBS-T ohne Primärantikörper verwendet.

Nach der Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper wurden diese zwei Mal je 10 min in einer Standküvette mit TBS gewaschen.

Zur Detektion des Primärantikörpers wurden die Schnitte mit der Sekundärantikörperlösung 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend nach Entfernen der Sekundärantikörperlösung zwei Mal je 10 min in einer Standküvette mit TBS gewaschen. Die Sekundärantikörperlösung bestand aus einer 1:200 Verdünnung des ALEXA488-gekoppelten anti-rabbit Antikörpers sowie 0,6 µg/ml DAPI.

Abschließend wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (AxioVert 135, Carl Zeiss, Jena Deutschland) mit der AxioVision LE 4.2 Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

4.6.3 Immunzytochemische Färbung phospho-Met

GTL-16 Zellen wurden im Voraus auf *Culture-Slides* (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen auf den Objektträgern 10 min in eiskaltem Aceton fixiert. Daraufhin wurden die Schnitte erneut für 15 min getrocknet. Die Rehydrierung erfolgte durch 10-minütige Inkubation in TBS. Anschließend wurden die Objektträger aus der Lösung genommen und anhaftende Lösung durch Schütteln aus dem Handgelenk entfernt. Danach wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift eingekreist, um das Austrocknen durch Abfließen der Lösungen während der folgenden Schritte zu verhindern.

Die Färbung wurde mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Hierzu wurde der anti-phospho-Met-Primärantikörper in TBS-T 1:50 verdünnt und 150 µl der Verdünnung auf die Schnitte gegeben. Als Kontrolle verwendet wurde TBS-T ohne Primärantikörper verwendet.

Nach der Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper wurden diese zwei Mal je 10 min in einer Standküvette mit TBS gewaschen.

Zur Detektion des Primärantikörpers wurden die Schnitte mit der Sekundärantikörperlösung 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend nach Entfernen der Sekundärantikörperlösung zwei Mal je 10 min in einer Standküvette mit TBS gewaschen. Die Sekundärantikörperlösung bestand aus einer 1:200 Verdünnung des ALEXA488-gekoppelten anti-rabbit Antikörpers sowie 0,6 µg/ml DAPI.

Abschließend wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (AxioVert 135, Carl Zeiss, Jena Deutschland) mit der AxioVision LE 4.2 Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

4.6.4 *In situ* Zymography

Kryoschnitte wurden 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde je Objektträger 178 µl 1%iger Agarose aufgekocht und anschließend im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt. Zur flüssigen Agarose wurde daraufhin 22 µl einer DQ-Gelatine-(20 µl der 0,1 mg/ml Stocklösung) DAPI-(2 µl der 100 µl/ml Stocklösung) Lösung gegeben. Nach zügigem auf- und abpipettieren wurde die Agarose-DQ-Gelatine-DAPI-Lösung auf die Schnitte pipettiert und ein Deckgläschen auf die Schnitte gelegt. Anschließend wurden die Schnitte lichtgeschützt bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für 12 h inkubiert. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (AxioVert 135, Carl Zeiss, Jena Deutschland) mit der AxioVision LE 4.2 Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

4.6.5 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Leber wurde sofort nach Entnahme in kleine Stücke geschnitten und über Nacht bei 4°C in Fixierlösung fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet (durchgeführt vom Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München).

Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden je nach Bedarf unter Zuhilfenahme eines elektrischen Rotationsmikrotoms (*Thermo Scientific*, Walldorf, Deutschland) auf eine Dicke von 3,5 bis 5 µm geschnitten, mittels eines in Wasser getränkten Seidenpapiers aufgenommen und zur Glättung in ein mit Wasser gefülltes Paraffinstreckbad (44°C) überführt. Die geglätteten Schnitte wurden anschließend auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40°C getrocknet.

4.6.6 IHC Protokoll Paraffinschnitte

Zur Entparaffinisierung wurden die Paraffinschnitte unmittelbar vor der immunhistologischen Färbung nacheinander in drei Roticlear-Bäder (Roth), zwei Alkoholbäder (100%) und zwei Alkoholbäder (90%) für je 3 min gegeben und abschließend in TBS (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH=7,6) rehydriert.

Die entparaffinisierten und rehydrierten Paraffinschnitte wurden zur Antigendemaskierung 15 min in einer Mikrowellenküvette (Dako) mit Citrat-Puffer (10 mM Zitronensäure, 0,05% Tween 20, pH 6,0) gekocht, und nach einer Abkühlphase von 15 min 5 min mit TBS gewaschen.

Die endogenen Peroxidasen wurden durch eine fünfminütige Inkubationsphase in einer 3%-igen H₂O₂-Lösung in TBS inaktiviert. Anschließend wurden die Objektträger aus der Lösung genommen und anhaftende Lösung durch Schütteln aus dem Handgelenk entfernt. Danach wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift eingekreist, um das Austrocknen durch Ablauen der Lösungen während der folgenden Schritte zu verhindern.

Darauf wurde ein Serumblock für 15 min mit Serum Block-Lösung aus R&D Kit (CTS006) in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Serum Block-Lösung wurde abgekippt und die endogenen Avidinbindungsstellen mit der Avidin Block-Lösung (R&D Kit CTS006; Inkubationszeit = 15 min in einer feuchten Kammer) abgesättigt. Anschließend wurden die Objektträger in einer Standküvette 5 min mit TBS gewaschen. Die endogenen Biotinbindungsstellen wurden durch Verwendung der Biotin Block-Lösung (R&D Kit CTS006; Inkubationszeit = 15 min in einer feuchten Kammer) blockiert. Alle Blockierungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Schnitte wurden anschließend 5 min in TBS inkubiert. Die Färbung wurde mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Hierzu wurde der Primärantikörper in TBS-T verdünnt (Caspase-3: 1:1000; CD31: 1:2000; PCNA: 1:2000) und 150 µl der Verdünnung auf die Schnitte gegeben. Als Kontrolle verwendet wurde TBS-T ohne Primärantikörper verwendet. Nach der Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper wurden diese zwei Mal je 10 min in einer Standkuvette mit TBS gewaschen.

Zur Detektion des Primärantikörpers wurden die Schnitte mit der zugehörigen Sekundärantikörperlösung (R&D Detektionskits) 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend nach Entfernen der Sekundärantikörperlösung zwei Mal je 10 min in einer Standkuvette mit TBS gewaschen.

Da für die Detektion des Primärantikörpers ein Verstärkersystem verwendet wurde, wurden die Schnitte mit einer Streptavidin-HRP-Komplex-Lösung (R&D Kit CTS006; Inkubationszeit = 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer) behandelt und anschließend drei Mal je zwei min mit TBS gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte mittels DAB (Diaminobenzidin). Hierzu wurde die DAB Substratlösung (Dako K3467, 1 Tropfen/ml Puffer) auf die Schnitte getropft und mit ddH₂O gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend 5 min in TBS gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun. Die Objektträger wurden 5 min in die Hämalaunlösung gegeben, 3 Mal mit Leitungswasser gewaschen und anschließend für 10 min in Leitungswasser gebläut (leichter Wasserstrahl in die Kuvette fließen lassen). Abschließend wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

4.6.7 IHC Protokoll zur Detektion von Hypoxie mittels Pimonidazol

Zur Entparaffinisierung wurden die Paraffinschnitte unmittelbar vor der immunhistologischen Färbung nacheinander in drei Roticlear-Bäder (Roth), zwei Alkoholbäder (100%) und zwei Alkoholbäder (90%) für je 3 min gegeben und abschließend in TBS rehydriert.

Die entparaffinisierten und rehydrierten Paraffinschnitte wurden zur Antigendemaskierung 15 min in einer Mikrowellenkuvette (Dako) mit Citrat-Puffer (10 mM Zitronensäure, 0,05% Tween 20, pH 6,0) gekocht, und nach einer Abkühlphase von 15 min 5 min mit TBS-T gewaschen.

Die entparaffinisierten und rehydrierten Paraffinschnitte wurden zur Antigendemaskierung 40 min bei 40 °C mit einer 0,01 %igen Pronaselösung behandelt und danach 5 min mit TBS-T gewaschen.

Die endogenen Peroxidasen wurden durch eine fünfminütige Inkubationsphase in einer 3%-igen H₂O₂-Lösung in TBS inaktiviert. Anschließend wurden die Objektträger aus der Lö-

sung genommen und anhaftende Lösung durch Schütteln aus dem Handgelenk entfernt. Danach wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift eingekreist, um das Austrocknen durch Abfließen der Lösungen während der folgenden Schritte zu verhindern.

Die Schnitte wurden anschließend fünf min in TBS-T inkubiert. Die Färbung wurde mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Hierzu wurde der Hypoxyprobe-1 monoklonale Antikörper 1:50 in TBS-T verdünnt und 150 µl der Verdünnung auf die Schnitte gegeben. Als Kontrolle verwendet wurde TBS-T ohne Primärantikörper verwendet. Nach der Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper wurden diese zwei Mal je 10 min in einer Standküvette mit TBS gewaschen.

Zur Detektion des Primärantikörpers wurden die Schnitte mit einem IgG, F(ab)₂-Fragment 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend nach Entfernen der Sekundärantikörperlösung zwei Mal je 10 min in einer Standküvette mit TBS-T gewaschen.

Da für die Detektion des Primärantikörpers ein Verstärkersystem verwendet wurde, wurden die Schnitte mit einer Streptavidin-HRP-Komplex-Lösung (Dianova) behandelt und anschließend drei Mal je zwei min mit TBS-T gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte mittels DAB (Diaminobenzidin). Hierzu wurde die DAB Substratlösung (Dako K3467, 1 Tropfen/ml Puffer) auf die Schnitte getropft und mit ddH₂O gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend 5 min in TBS gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun. Die Objektträger wurden 5 min in die Hämalaunlösung gegeben, 3 Mal mit Leitungswasser gewaschen und anschließend für 10 min in Leitungswasser gebläut (leichter Wasserstrahl in die Küvette fließen lassen). Abschließend wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

4.6.8 TUNEL-Assay

Die Durchführung des TUNEL-Assays erfolgt in DNase-freien Lösungen und Gefäßen. Die zu untersuchenden Paraffinschnitte werden analog zur Immunhistochemischen Färbung entparaffinisiert und rehydriert. Der TUNEL-Assay wurde unter Zuhilfenahme des TACS 2 TdT-DAB *In Situ* Apoptosis Detection Kit durchgeführt. Zur Antigendemaskierung wurde die Proteinase K aus dem Kit 1:50 in ddH₂O verdünnt. Von der Verdünnung wurden anschließend 30 µl auf jeden Schnitt pipettiert und mit einem Parafilm-Blättchen abgedeckt. Anschließend wurden die Schnitte 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde zwei mal 2 min mit ddH₂O gewaschen. Für die Positivkontrolle wurde die TACS-Nuklease 1:50 mit TACS-Nuklease-Puffer verdünnt und 30 µl auf einen Schnitt gegeben und zur Induktion von DNA-Strangbrüchen 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit PBS

gestopt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 5 min in 3%-iger H_2O_2 Lösung inkubiert und anschließend 5 min in PBS gewaschen.

Im Anschluss wurde der TdT-Labeling Buffer 1:10 in ddH_2O verdünnt. Für den Master Mix wurde die entsprechende Menge entnommen und die Schnitte im restlichen 1x TdT-Labeling Puffer 5 min inkubiert. Vom Master Mix bestehend aus TdT-dNTP (1/53), $50 \times \text{Co}^{2+}$ (1/53), TdT-Enzym (1/53) und 1 x TdT-Labeling Buffer (50/53) wurden 30 μl pro Schnitt eingesetzt. Für die Negativkontrolle wurde das TdT-Enzym nicht zum Master Mix gegeben. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Paraffinblättchen abdeckt und 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte 5 min in 1 x TdT-Stopp Puffer inkubiert. Anschließend wurde 2 x mit PBS gewaschen.

Zur Farbentwicklung wurde der Streptavidin-HRP-Komplex aus dem Kit 1:50 in PBS verdünnt und 30 μl auf jeden Schnitt pipettiert. Die Schnitte wurden mit einem Parafilm-Blättchen abdeckt und 10 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 2 x 2 min mit PBS gewaschen. Abschließend wurde das DAB-Substrat zugeben und je nach Geschwindigkeit der Farbentwicklung die Reaktion nach spätestens 4 min mit ddH_2O abgestoppt. Gegenfärbung wurde mit Mayers Hämalaun durchgeführt. Eindecken erfolgte mit Kaisers Glycerin Gelatine.

4.7 X-Galfärbung

4.7.1 X-Galfärbung von Organen

Die Organe wurden sofort nach Entnahme aus dem Tier durch kurzes Schwenken in PBS gewaschen und in ein mit Fixierlösung (2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS) gefülltes Greiner Töpfchen gegeben und für 1 bis 2 h fixiert. Anschließend wurden die Organe dreimal mit PBS gewaschen und 10 ml *ready-to-use* X-Gal-Färbelösung zugegeben. Die Greiner Töpfchen wurden anschließend mit lose aufgelegtem Deckel für 3 bis 7 h bei 37°C inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Organe einmal mit PBS gewaschen und abschließend zur Lagerung in 10 ml Fixierlösung gegeben.

4.7.2 X-Galfärbung von Gewebeschnitten

Kryoschnitte wurden 10 min in Fixierlösung (siehe 4.7.1) fixiert und 10 min in einer Detergenzlösung (2 mM MgCl_2 , 0,01 % (m/V) Natriumdeoxycholat, 0,02 % (V/V) Nonidet-P40)

inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in *ready-to-use* X-Gal-Färbelösung 3-5 h bei 37 °C inkubiert. Nach 2 Waschschrinen (OBS) wurden die Schnitte mit Mayers Hämalaun und Eosin gegengefärbt. Nach Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine wurden die Schnitte unter dem Mikroskop analysiert.

4.8 Statistische Analyse

Daten wurden, wenn normalverteilt mit dem *student's t test* analysiert, ansonsten wurde der *Mann-Whitney rank sum test* angewendet. Daten wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der *student's t test* oder der *Mann-Whitney rank sum test* *p*-Werte kleiner als 0,05 lieferten. Die Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware *Sigma Stat* (Systat, Erkrath, Deutschland).

5 Ergebnisse

5.1 Unabhängigkeit der Nettoproliferation von L-CI.5s Zellen unter Normoxie und Hypoxie von Hif-1 α

Zur Beantwortung der Frage, ob HIF-1 eine überlebensunabhängige, metastasenfördernde Rolle in Tumorzellen ausübt, wurde in einem ersten Schritt die Eignung des *syngenen* L-CI.5s Modells untersucht. Zunächst wurde deshalb die Expression von Hif-1 α durch lentiviral vermittelte shRNA Technologie reduziert. Hierzu wurden fünf verschiedene shRNA Sequenzen getestet, wobei die effizienteste Sequenz verwendet wurde (TRCN0000054450). Die *Knock-down* Effizienz betrug in diesem Fall 90% im Vergleich zur *Non-target*-Kontrolle (L-CI.5s-shNT). Anschließend wurde der Einfluss von Hif-1 α auf die Nettoproliferation der Tumorzellen *in vitro* untersucht: Unter normoxischen Bedingungen wurde kein Einfluss von Hif-1 α auf die Proliferation der Tumorzellen festgestellt (Abbildung 5.1 A, Halbgewachs 2010). Um zu untersuchen, ob Hif-1 α einen Einfluss auf die Proliferation von L-CI.5s Zellen unter hypoxischen Bedingungen aufweist, wurden beide Zelllinien unter Hypoxie kultiviert (Abbildung 5.1 B). Auch hier konnte zwischen der shNT-Kontrolle und der Hif-1 α *Knockdown*-Zelllinie kein Unterschied bezüglich der Nettoproliferation im untersuchten Zeitraum von 48 h detektiert werden. Daher kann man die L-CI.5s Tumorzelllinie bezüglich der Nettoproliferation als hypoxietolerant bezeichnen.

Vergleicht man die oben beschriebenen Eigenschaften des L-CI.5s Modells mit einem anderen *syngenen* Tumormodell, dem murinen Kolonkarzinommodell CT-26 so stellt man fest, dass zwar auch hier die Nettoproliferation unter normoxischen Bedingungen unabhängig von Hif-1 α war (Abbildung 5.1.C), jedoch wurde unter hypoxischen Gegebenheiten eine signifikante Reduktion der Nettoproliferation beobachtet (Abbildung 5.1 C), die durch das Fehlen von Hif-1 α verursacht wurde. Die Effizienz des Hif-1 α *Knockdowns* betrug im Fall der CT-26 Tumorzellen 91% im Vergleich zur *Non-target*-Kontrolle.

Aufgrund dieser Ergebnisse kommt zur Beantwortung der Frage nach der Rolle von Hif-1 α bei den invasiven Prozessen der Metastasierung als Tumormodell nur das L-CI.5s Modell in Frage, weil im Gegensatz zum CT-26 Model die Tumorzelllinie L-CI.5s nicht auf den Hif-1-Signalweg zum Überleben unter Hypoxie angewiesen war.

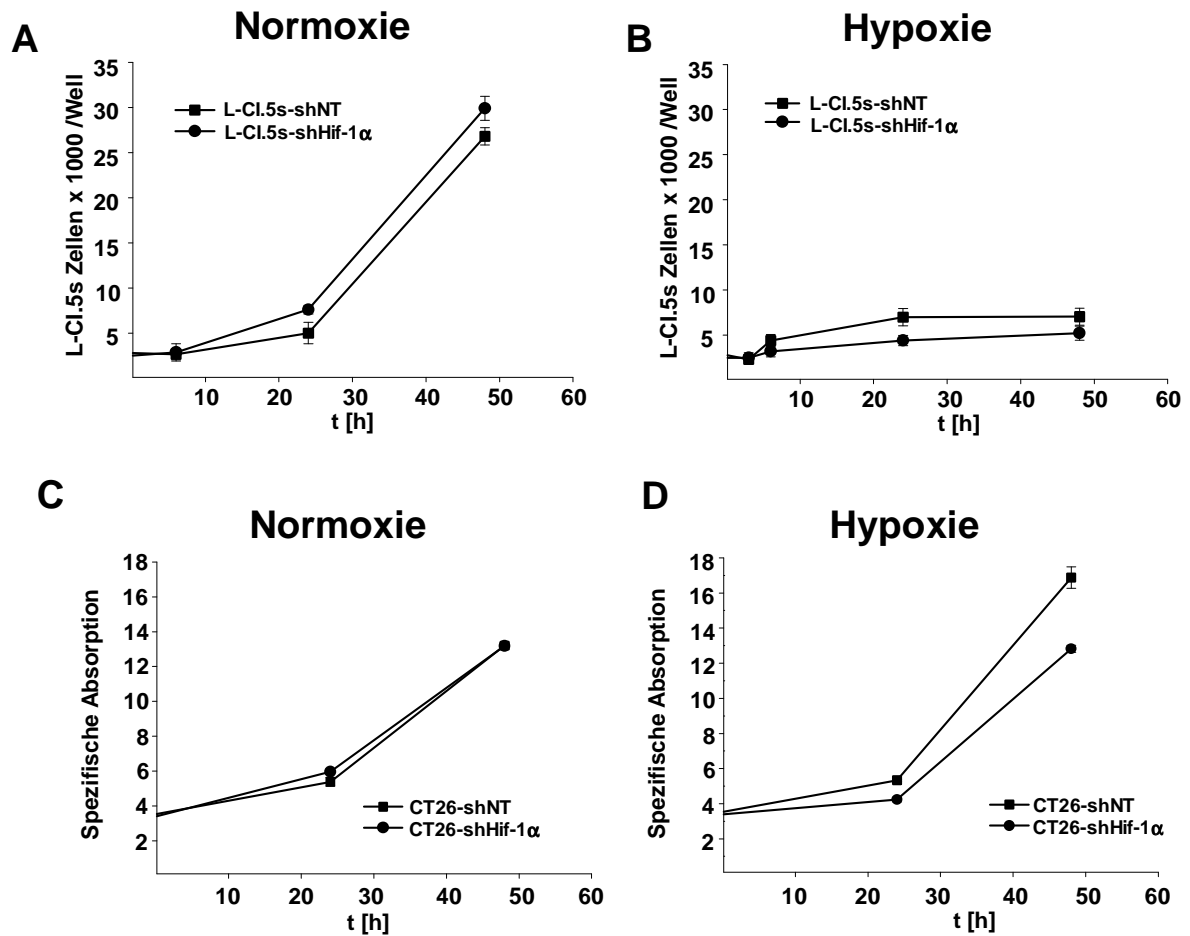


Abbildung 5.1: Hif-1 α Knockdown wirkte sich in L-CI.5s Tumorzellen im Gegensatz zu CT-26 Tumorzellen nicht auf die Proliferation *in vitro* aus

A. und B. Nettotumorzellproliferation von L-CI.5s-shNT und shHIF-1 α Zellen unter normoxischen (A) und hypoxischen (1% (v/v) O₂) (Halbgewachs 2010) (B) Bedingungen dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler. Die Nettoproliferation beider Zelllinien wurde unter hypoxischen Bedingungen reduziert, jedoch wirkte sich der *Knockdown* von Hif-1 α weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen auf die Proliferation von L-CI.5s Tumorzellen aus. C. und D. Nettotumorzellproliferation von CT26-shNT und shHIF-1 α Zellen unter normoxischen (C) und hypoxischen (1% (v/v) O₂) (D) Bedingungen dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler. Das Fehlen von Hif-1 α reduzierte die Nettoproliferation der CT-26 Tumorzellen nur unter Hypoxie.

5.2 Reduktion der Invasivität von L-CI.5s Tumorzellen *in vitro* durch Knockdown von Hif-1 α

Um eine erste Idee zu bekommen, welche Rolle Hif-1 α bei invasiven Prozessen der Metastasierung spielt, wurde zunächst *in vitro* untersucht, ob Hif-1 α für die Invasivität von L-CI.5s Tumorzellen nötig ist. Hierzu wurde das invasive Verhalten von L-CI.5s Tumorzellen in einem Boyden-Chamber-Invasionsassay untersucht. Unter normoxischen Bedingungen führte der *Knockdown* von Hif-1 α zu einer Reduktion der Invasivität der Tumorzellen um ca. 25%

(Abbildung 5.2 A). Dieser Effekt wurde unter Hypoxie verstärkt. So war die Invasivität von L-CI.5s Tumorzellen um über 60% im Vergleich zur shNT Kontrolle verringert.

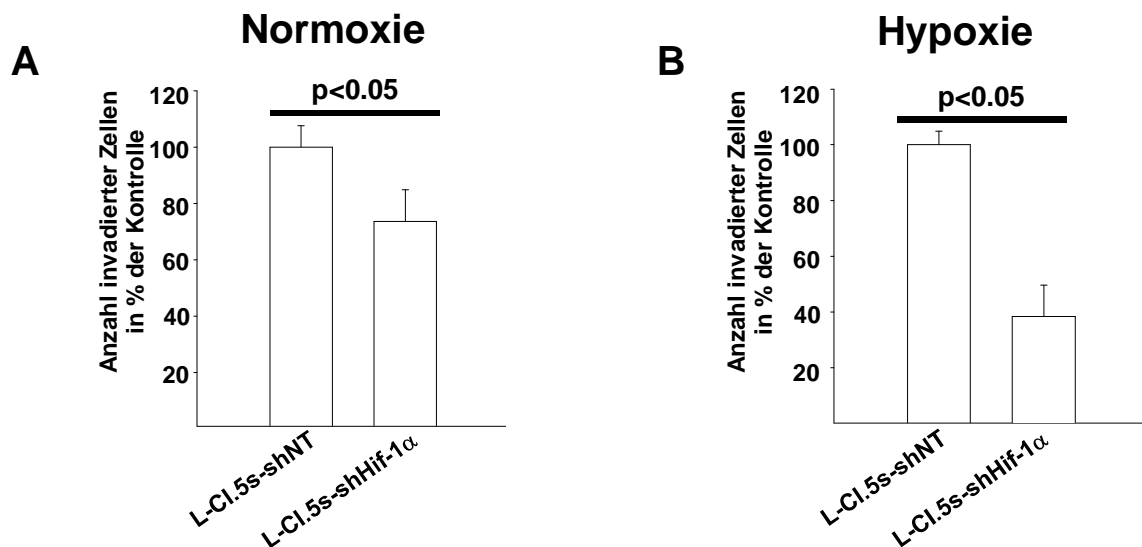


Abbildung 5.2: Reduktion der Invasivität von L-CI.5s Tumorzellen *in vitro* durch Hif-1α Knock-down

A. und B. Boyden-Chamber-Invasionsassay unter Normoxie (**A**) und Hypoxie (**B**): Dargestellt sind die Durchschnittswerte invadierter Zellen \pm Standardfehler unter normoxischen und hypoxischen (1% (v/v) O₂) Bedingungen relativ zur Kontrollgruppe L-CI.5s-shNT; n = 4. L-CI.5s-shNT/Normoxie: 100,0 % \pm 7,6 %; L-CI.5s-shHIF-1 α /Normoxie: 73,6 % \pm 11,2 %; L-CI.5s-shNT/Hypoxie: 100,0 % \pm 2,8 %; L-CI.5s-shHIF-1 α /Hypoxie: 38,4 % \pm 5,6 %.

Da sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie kein Einfluss von Hif-1 α auf die Nettoproliferation beobachtet werden konnte (Abbildung 5.1), das Fehlen von Hif-1 α aber die Invasivität der Tumorzellen sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie reduzierte, scheint Hif-1 α einen überlebensunabhängigen Einfluss auf die Invasivität von L-CI.5s Tumorzellen auszuüben.

5.3 Auftreten hypoxischer Zustände im L-CI.5s-Modell

Da bekannt ist, dass Hypoxie ein häufig auftretendes Phänomen bei menschlichen Tumorerkrankungen ist (Yotnda *et al.*, 2010; Goethals *et al.*, 2006; Vaupel *et al.*, 1991) wurde zunächst überprüft werden, ob Tumorzellen im L-CI.5s Modell hypoxische Zustände durchlaufen. Zum Nachweis der Hypoxie wurde das *Hypoxyprobe*TM System gewählt. Die immunhistochemische Analyse ergab, dass hypoxische Zustände in etablierter Lebermetastasen (Abbildung 5.3 oben) und in intradermalen Primärtumoren (Abbildung 5.3 unten) auftreten. In der

Leber wurde Hypoxie jedoch erst in größeren Lebermetastasen nachgewiesen. Kleinere Metastasen zeigten keine positive Färbung.

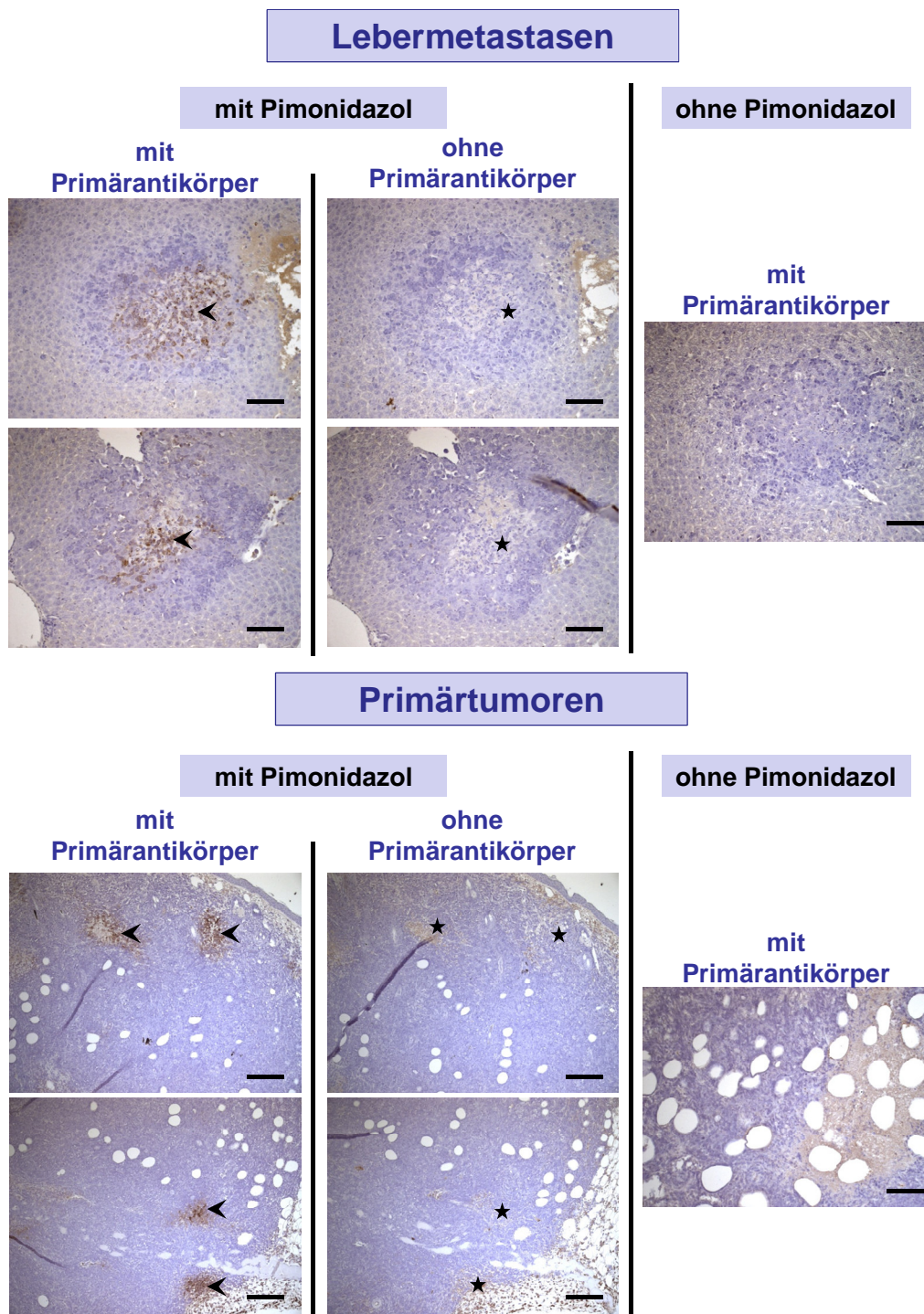


Abbildung 5.3: Auftreten von Hypoxie in Lebermetastasen und Primärtumoren im L-CI.5s Modell

Immunhistochemische Analyse basierend auf der Pimonidazol-Färbung. Lebermetastasen-tragenden DBA/2 Mäusen wurden 7 d nach intravenöser Tumorzellinokulation 60mg/kg Pimonidazol i.v. inokuliert und die Mäuse zwei h später getötet (oben). Analog wurden Primärtumore durch intradermale Inokulation von L-CI.5s Tumorzellen generiert und 14 d später 60 mg/kg Pimonidazol i.v. inokuliert und die Mäuse 2 h später getötet. Es konnten sowohl in Lebermetastasen als auch in Primärtumoren hypoxische Bereiche (Pfeile) nachgewiesen werden. Korrespondierende Bereiche der Antikörperkontrolle sind mit Sternen markiert. Maßstabsbalken = 100µm

Hiermit stimmen Vorergebnisse überein, die zeigten, dass HIF-1 α -Protein vor allem im Zentrum von etablierten Lebermetastasen lokalisiert ist (Schelter, 2007). Ebenso konnte in Vorversuchen durch eine Kombination von einer immunhistologischen Färbung von HIF-1 α sowie der X-Galfärbung, die eine hochspezifische Identifikation der L-CI.5s Tumorzellen *in vivo* erlaubt, nachgewiesen werden dass der HIF-1-Signalweg während der Kolonisierung der Leber in Tumorzellen aktiviert ist (Schelter, 2007).

Diese Ergebnisse bestätigen die Eignung des L-CI.5s Modells zu Untersuchung der Frage inwieweit Hif-1 α als Hypoxie-induzierbarer Faktor eine Rolle bei der Metastasierung spielt.

5.4 Notwendigkeit von Hif-1 α zur Erhöhung des metastatischen Indexes im L-CI.5s Primärtumormodell

Um die Rolle von Hif-1 α während der einzelnen Phasen der Metastasierung näher zu charakterisieren, wurden murine T-Zelllymphomzellen (L-CI.5s) intradermal in *syngene* DBA/2 Mäuse inokuliert. Der *Knockdown* von Hif-1 α auf Tumorzellseite wirkte sich hierbei weder auf die Tumorinitiation noch auf das Primärtumorwachstum aus (Abbildung 5.4 A). Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern die oben beschriebene Unabhängigkeit der L-CI.5s Tumorzellen vom Hif-1-Signalweg zur Sicherung des Zellüberlebens. 9 d nach Tumorzellinokulation wurden die Lebern entnommen und der Grad der Metastasierung anhand des metastatischen Indexes bestimmt. Der Metastatische Index, der die Metastasenlast der Leber auf die Größe des Primärtumors normiert, war durch den *Knockdown* von Hif-1 α auf Tumorzellseite (-90% im Vergleich zur *Non-target*-Kontrolle) um über 80% reduziert (Abbildung 5.4 B). Dies ist der erste Hinweis auf einen direkten Einfluss des Hif-1-Signalweges auf das metastatische Potential unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion.

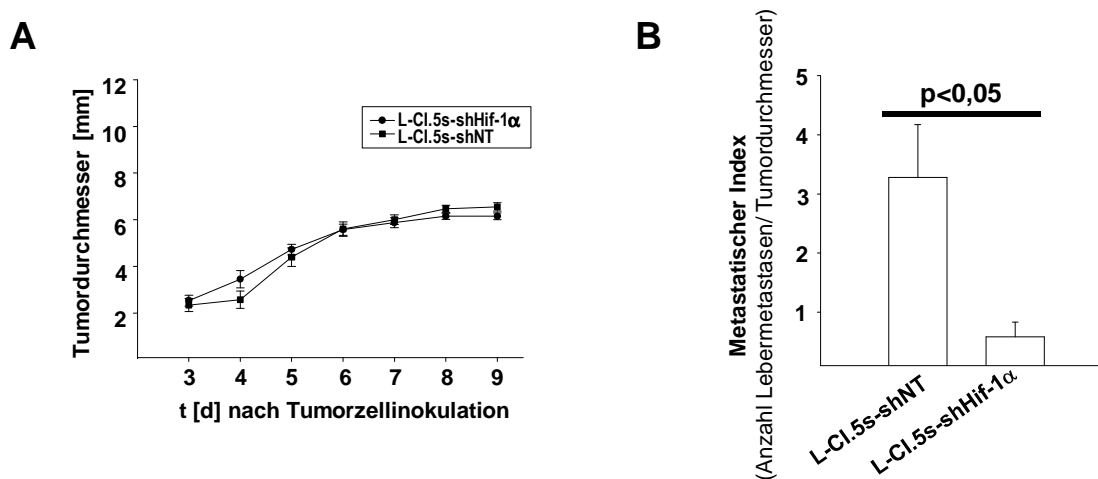


Abbildung 5.4: Reduktion der spontanen Metastasierung von L-CI.5s Tumorzellen *in vivo* durch *Knockdown* von Hif-1 α

A. Mittelwerte \pm Standardfehler der Primärtumordurchmesser von L-CI.5s-shNT und shHIF-1 α Tumorzellen: Das Fehlen von HIF-1 α änderte das Primärtumorwachstum nicht. **B.** Metastatischer Index: Anzahl der nach intradermalen Inokulation spontan gebildeten Lebermetastasen normalisiert auf die Primärtumorgröße. Dargestellt sind die Durchschnittswerte \pm Standardfehler. $n = 7$ Mäuse: L-CI.5s-shNT: $3,3 \pm 0,9$; L-CI.5s-shHIF-1 α : $0,6 \pm 0,3$. *Knockdown* von HIF-1 α reduziert die spontane Metastasierung.

5.5 Unabhängigkeit der Vaskularisierung von intradermalen L-CI.5s Primärtumoren von Hif-1 α

Da auch die Durchblutung von Tumoren einen großen Einfluss auf die Dissemination von Tumorzellen haben kann, wurde der Einfluss von Hif-1 α in L-CI.5s Tumorzellen auf die Bildung von Gefäßen im Primärtumor untersucht. Der immunhistochemische Nachweis des Endothelzell-spezifischen Oberflächenmoleküls CD31 (PECAM-1) mit anschließender Quantifizierung ergab eine geringe, jedoch nicht signifikante Reduktion der Blutgefäße im Primärtumor (Abbildung 5.5 A und B) nach *Knockdown* von Hif-1 α in Tumorzellen.

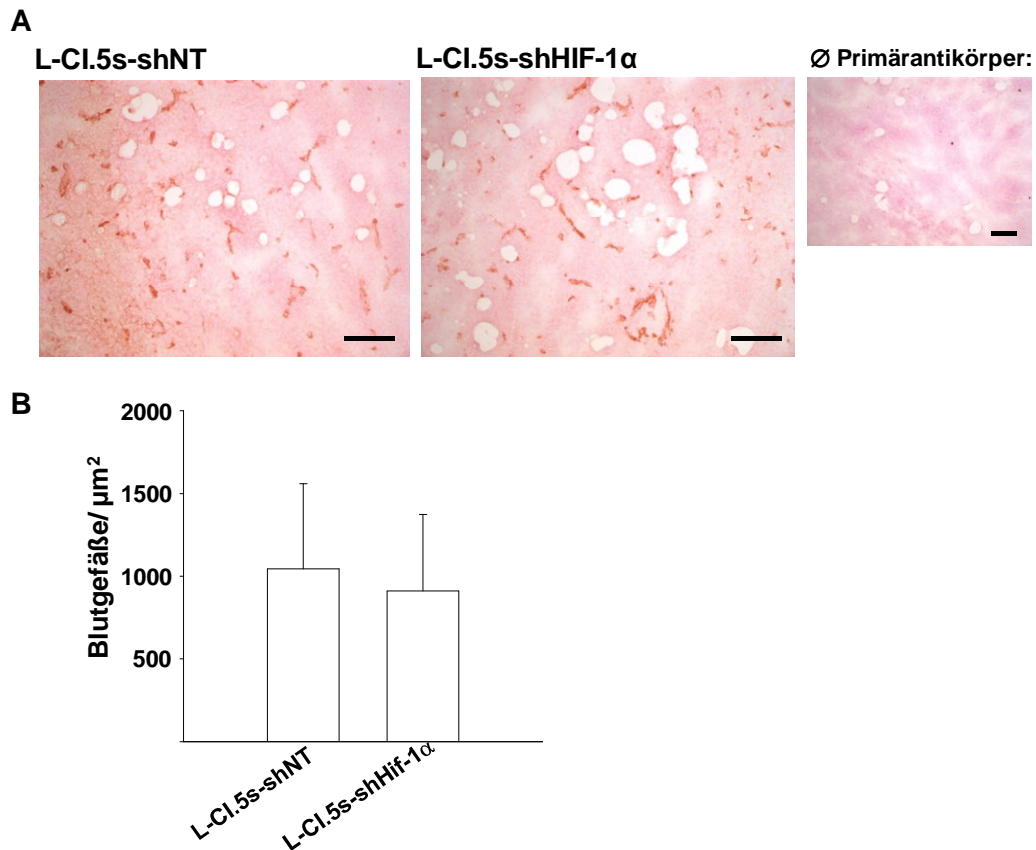


Abbildung 5.5: Unabhängigkeit der Vaskularisierung des Primärtumors von Hif-1 α

A. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen einer immunhistochemischen CD31-Färbung von L-CI.5s-shNT und L-CI.5s-shHIF-1 α Primärtumoren sowie der Kontrolle ohne Primärantikörper. Maßstabsbalken = 100 μ m B. Quantifizierung der Gefäße im Primärtumor normiert auf die Fläche (Mittelwerte \pm Standardfehler). L-CI.5sshNT und shHIF-1 α : Das Fehlen von HIF-1 α änderte die Durchsetzung der Primärtumoren mit Blutgefäßen nicht.

Da Hif-1 α in L-CI.5s Zellen weder für das Überleben *in vitro* unter Hypoxie noch für die Ausbildung und Vaskularisierung des Primärtumors nötig ist, scheint das L-CI.5s Modell für die Klärung der Frage, ob Hif-1 α die Invasivität von Tumorzellen in einer überlebensunabhängigen Art und Weise beeinflusst, geradezu ideal zu sein. Erste Hinweise hierzu lieferten die oben beschriebenen Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass das metastatische Potential *in vitro* sowie *in vivo* (Metastatischer Index) durch den *Knockdown* von HIF-1 α reduziert war. Da bei Verwendung eines Primärtumormodells im Finalversuch jedoch weder eine Aussage über den Zeitpunkt der Tumorzell dissemination noch deren Umfang gemacht werden kann, wurde zur genaueren Analyse der Rolle von Hif-1 α bei den einzelnen Schritten der Metastatischen Kaskade ein experimentelles Metastasierungsmodell verwendet.

5.6 Notwendigkeit von Tumorzell-Hif-1 α für die Kolonisierung der Leber durch L-CI.5s Tumorzellen

Wie Vorversuche zeigten, (Schelter, 2007) führte der *Knockdown* von Hif-1 α in L-CI.5s Tumorzellen zu einer drastisch verringerten Kolonisierung der Leber. So war durch den *Knockdown* von Tumorzell-Hif-1 α die Anzahl von L-CI.5s Tumorzellen 3 und 6 h nach Tumorzellinokulation im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert. Dies spiegelte sich auch 3 d nach Tumorzellinokulation wider, da die Tumorzelllast durch den *Knockdown* von HIF-1 α zu diesem Zeitpunkt um 60% reduziert war (Abbildung 5.6 B). Des Weiteren war, wie aus Vorversuchen bekannt, die Anzahl an Makrometastasen sieben d nach Tumorzellinokulation in der Leber (Metastasen auf der Leberoberfläche mit einem Durchmesser größer gleich 0,2 mm) signifikant um über 80% im Vergleich zur shNT-Kontrolle reduziert (Schelter, 2007). Um einen Off-target Effekt der verwendeten shRNA-Sequenz auszuschließen, wurde eine zweite shRNA Sequenz verwendet, die sich gegen einen anderen Bereich in der murinen Hif-1 α mRNA richtet. Die *Knockdown*-Effizienz war in diesem Fall mit -80% auf mRNA Ebene etwas geringer. Intravenöse Inokulation dieser Zelllinie in *syngene* Mäuse verringerte die Anzahl der Makrometastasen in der Leber um 60% (Abbildung 5.6 C und D) und bestätigt somit das Ergebnis der ersten shRNA. Die Reduktion der Metastasierung kann daher auf Tumorzell-Hif-1 α zurückgeführt werden.

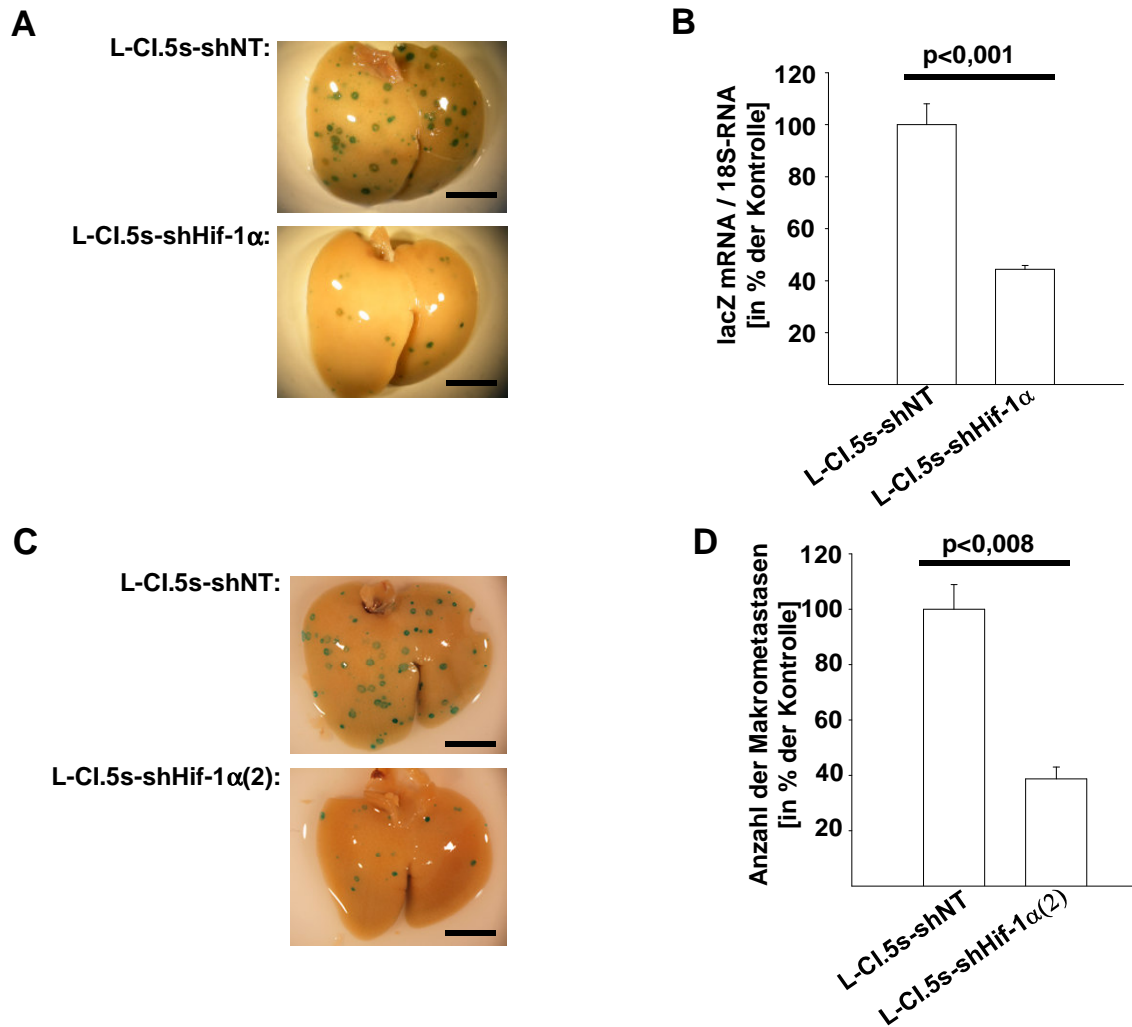


Abbildung 5.6: Reduktion der experimentelle Metastasierung von L-CI.5s Tumorzellen durch Knockdown von Hif-1 α

A. Repräsentative Aufnahmen von X-Gal-gefärbten Lebern (*lobus sinister medialis hepatis* und *lobus dexter medialis hepatis facies diaphragmatica*) 7 d nach intravenöser Inokulation von 5×10^3 Tumorzellen. Knockdown von HIF-1 α in L-CI.5s Zellen reduzierte die experimentelle Metastasierung. **B.** Quantifizierung der Tumorzelllast durch Messen der lacZ-mRNA Expression 3 d nach intra venöser Inokulation von 2×10^6 Tumorzellen. Knockdown von HIF-1 α in L-CI.5s Zellen reduzierte die experimentelle Metastasierung. **C.** und **D.** Bestätigung des unter A gezeigten Effektes mit einer zweiten shRNA Sequenz gegen HIF-1 α . **C.** Repräsentative Aufnahmen von X-Gal-gefärbten Lebern (*lobus sinister medialis hepatis* und *lobus dexter medialis hepatis facies diaphragmatica*) 7 d nach intra venöser Inokulation von 5×10^3 Tumorzellen. **D.** Anzahl der Makrometastasen auf den Oberflächen der Lebern (*lobus sinister medialis hepatis* und *lobus dexter medialis hepatis*) aus DBA/2 Mäusen 7 d nach intravenöser Inokulation von 5×10^3 Tumorzellen.

5.7 Unabhängigkeit des Überlebens von L-CI.5s Tumorzellen in vivo von Hif-1 α

Zwar gab es in den vorangegangenen Experimenten Hinweise darauf, dass das Überleben der L-CI.5s Tumorzellen nicht vom HIF-1-Signalweg abhängt, jedoch bezogen sich die oben be-

schriebenen Ergebnisse zum einen auf die Situation *in vitro*, zum anderen auf das Primärtumorzellwachstum. Um auszuschließen, dass die verringerte Anzahl an Makrometastasen in der Leber durch ein reduziertes Überleben der Tumorzellen aufgrund des *Knockdowns* von Hif-1 α verursacht wurde, wurden nähere Analysen zur Proliferation, sowie Apoptose und Nekrose der L-CI.5s Tumorzellen *in vivo* durchgeführt.

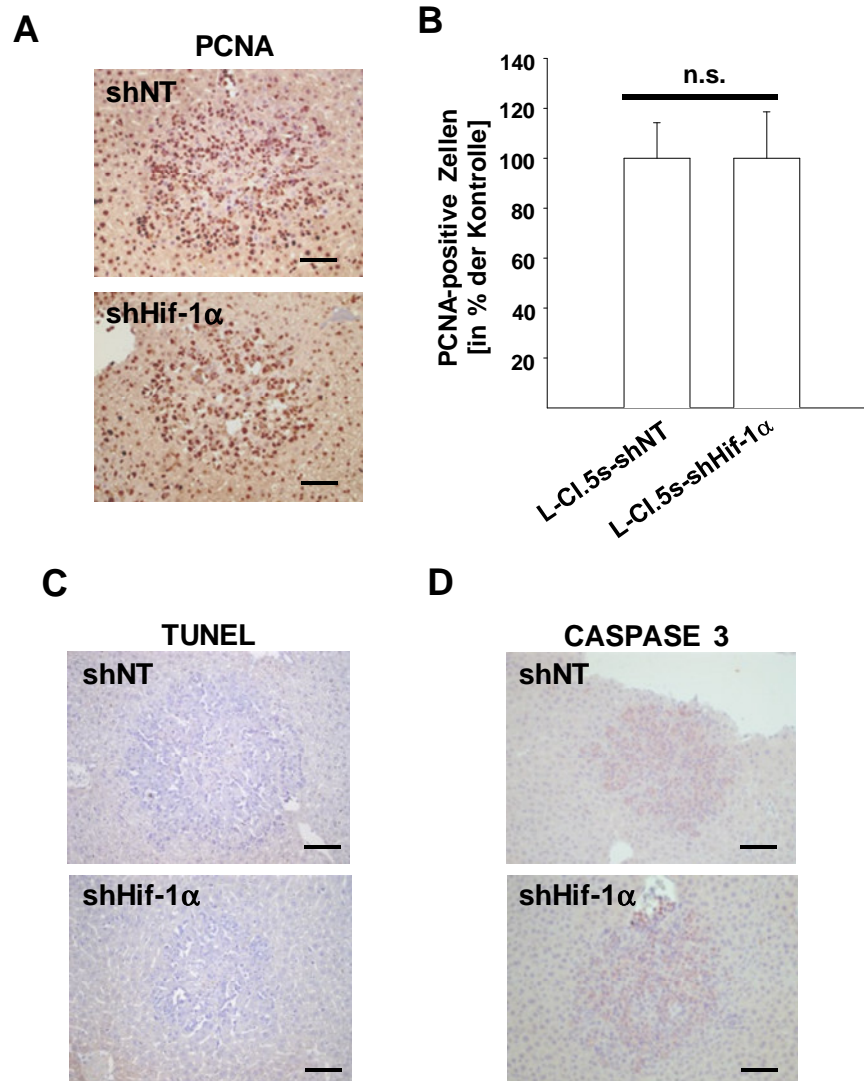


Abbildung 5.7: Unabhängigkeit des Zellüberlebens von L-CI.5s Tumorzellen von Hif-1 α *in vivo*
A. und **B.** Immunhistochemische PCNA-Färbung (braunes Signal) von Lebermetastasen 7 d nach i.v. Tumorzellinokulation von 5×10^3 L-CI.5s-shNT oder L-CI.5s-shHIF-1 α Tumorzellen. **A.** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen. Maßstabsbalken: 25 μ m. **B.** PCNA-positive Zellen pro Metastase normiert auf die Metastasenfläche. Durchschnittswerte \pm Standardfehler relativ zur Kontrollgruppe L-CI.5s-shNT. n = 4 Mäuse. L-CI.5s-shNT: 100,0 % \pm 14,9 %; L-CI.5s-shHIF-1 α : 101,4 % \pm 18,6 %. **C.** TUNEL-Assay von Lebermetastasen 7 d nach i.v. Tumorzellinokulation von 5×10^3 L-CI.5s-shNT oder L-CI.5s-shHIF-1 α Tumorzellen. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen. Maßstabsbalken: 25 μ m. **D.** Immunhistochemische Caspase-3-Färbung von Lebermetastasen 7 d nach i.v. Tumorzellinokulation von 5×10^3 L-CI.5s-shNT oder L-CI.5s-shHIF-1 α Tumorzellen.. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen. Maßstabsbalken: 25 μ m.

Um die proliferative Aktivität der L-CI.5s Tumorzellen *in vivo* beurteilen zu können, wurden zunächst Leberschnitte von metastasenträgenden Tieren angefertigt und der Proliferationsmarker PCNA (*Proliferating Cellular Nuclear Antigen*) immunhistochemisch angefärbt (Abbildung 5.7 A). Quantifizierung und Normierung von proliferativ aktiven Zellen (PCNA-positiven Zellen) in Metastasen auf die Metastasenfläche ergab, dass sich der *Knockdown* von Hif-1 α nicht auf die Proliferationsrate in Metastasen auswirkte (Abbildung 5.7 B). Da somit analog zu den *in vitro* Ergebnissen aus 5.1 kein Unterschied in der proliferativen Aktivität der Tumorzellen *in vivo* festgestellt werden konnte, wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob der *Knockdown* von HIF-1 α das Überleben der L-CI.5s Tumorzellen beeinflusst. Um diese Frage zu beantworten wurden zwei immunhistochemische Analysen durchgeführt: Durch die TUNEL-Analyse (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* Analyse) können Strangbrüche in der DNA detektiert werden, wie sie vor allem in nekrotischen Zellen vorliegen. Immunhistochemisches Anfärben der Caspase 3 erlaubt eine Aussage über die Apoptose von Zellen *in vivo*. Jedoch konnte weder durch die Durchführung des TUNEL-Testes (Abbildung 5.7 C) noch das Anfärben des Apoptosemarkers Caspase 3 (Abbildung 5.7 D) ein Unterschied zwischen der Hif-1 α *Knockdown*-Gruppe und der shNT-Kontroll-Gruppe festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass Hif-1 α die Metastasierung von L-CI.5s Zellen in einer überlebensunabhängigen Weise beeinflusst.

5.8 Regulation der Expression der pro-invasiven Matrix-Metalloproteinase-9 (Mmp-9) durch Hif-1 α

Um invasiv wachsen zu können, müssen Tumorzellen in der Lage sein die extrazelluläre Matrix im Allgemeinen und die Basalmembran im Speziellen abzubauen. Von Bedeutung sind hierbei vor allem die Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und -9, da diese in der Lage sind die Hauptkomponente der Basalmembran, Kollagen Typ IV, abzubauen und den Tumorzellen so einen Durchbruch durch die Basalmembran ermöglichen. Da die Invasivität der L-CI.5s Tumorzellen im Wesentlichen von Mmp-9 abhängt und ein *Knockdown* dieser Protease zu einer drastisch reduzierten Metastasierung in der Leber führt (Gerg *et al.*, 2008), wurde zunächst überprüft, ob Expression und Aktivität dieser Protease vom HIF-1-Signalweg gesteuert wird. Um die gelatinolytische Aktivität in Lebermetastasen beurteilen zu können, wurde eine *in situ* Zymographie durchgeführt. Das Fehlen von Hif-1 α in den Tumorzellen führte *in vivo* zu einer starken Reduktion der gelatinolytischen Aktivität in Lebermetastasen (Abbildung 5.8 A).

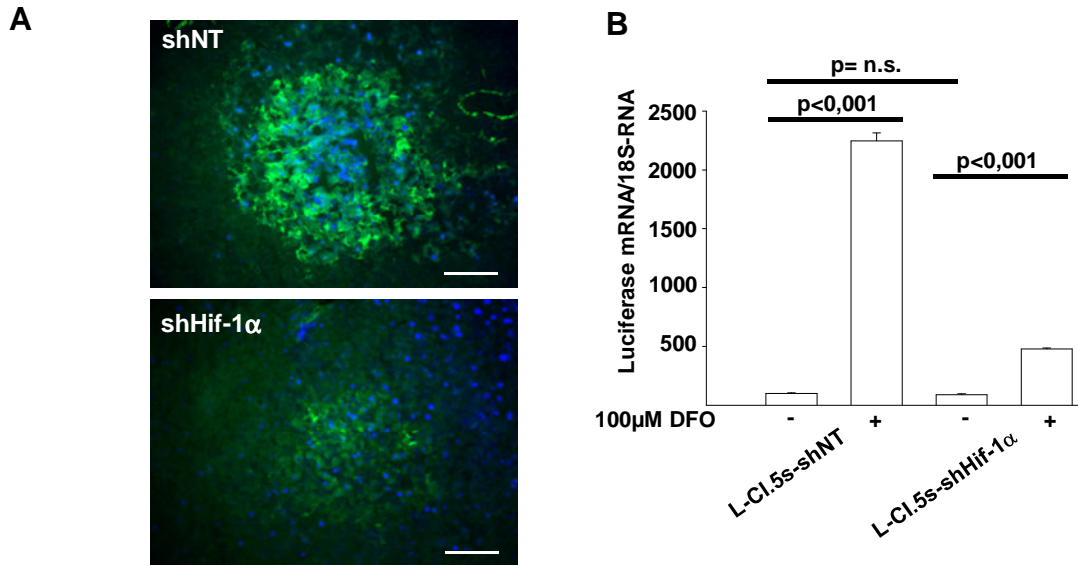


Abbildung 5.8: Reduktion der gelatinolytischen Aktivität *in vivo* und der Mmp-9-Promotoraktivität *in vitro* durch Knockdown von HIF-1 α

A. *In situ* Zymography (grünes Signal) von Lebermetastasen 7 d nach i.v. Inokulation von 5×10^3 L-CI.5s Tumorzellen. Gegenfärbung: DAPI (blau). Maßstabsbalken: $25 \mu\text{m}$. Knockdown von HIF-1 α auf Tumorzellseite reduzierte die gelatinolytische Aktivität *in vivo*. **B.** Mittelwerte der Luciferase mRNA Expression \pm Standardfehler in L-CI.5s-shNT und L-CI.5s-shHIF-1 α Tumorzellen, kultiviert mit oder ohne $100 \mu\text{M}$ DFO. Luciferase-mRNA Levels wurden auf die Expression von 18S normiert und die shNT Kontrollgruppe gleich 100% gesetzt; $n = 3$. L-CI.5s-shNT/ohne DFO: $100,0 \% \pm 4,7 \%$; L-CI.5s-shNT/mit DFO: $2246,2 \% \pm 69,2 \%$; L-CI.5s-shHIF-1 α /ohne DFO: $90,4 \% \pm 8,4 \%$; L-CI.5s-shHIF-1 α /mit DFO: $479,4 \% \pm 8,9 \%$.

Um zu überprüfen, ob der HIF-1-Signalweg die Expression von Mmp-9 direkt beeinflusst, wurde ein Mmp-9-Promotorreporterkonstrukt verwendet. Induktion des HIF-1-Signalwegs mit $100 \mu\text{M}$ DFO führte zu einem starken Anstieg der Mmp-9 Promotoraktivität (Abbildung 5.8 B). Die Promotoraktivität (gemessen durch Luciferase mRNA, die im eingebrachten Promotorkonstrukt unter der Kontrolle des Mmp-9-Promotors steht). Eine Reduktion der Hif-1 α mRNA Expression um 90% durch lentiviral-vermittelte shRNA-Technologie und die Induktion des Hif-1-Signalwegs durch DFO führte zu einer starken Reduktion der Mmp9-Promotoraktivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 5.8 B).

Um einen Offtarget-Effekt der verwendeten shRNA auszuschließen, wurde auch hier eine zweite shRNA Sequenz verwendet, die die oben beschriebenen Ergebnisse bestätigte. So war auch hier die gelatinolytische Aktivität *in vivo* stark reduziert (Abbildung 5.9 A). Ebenso konnte gezeigt werden, dass auch hier die HIF-1-induzierte Mmp-9-Promotoraktivität abhängig von der Präsenz von HIF-1 α war (Abbildung 5.9 B).

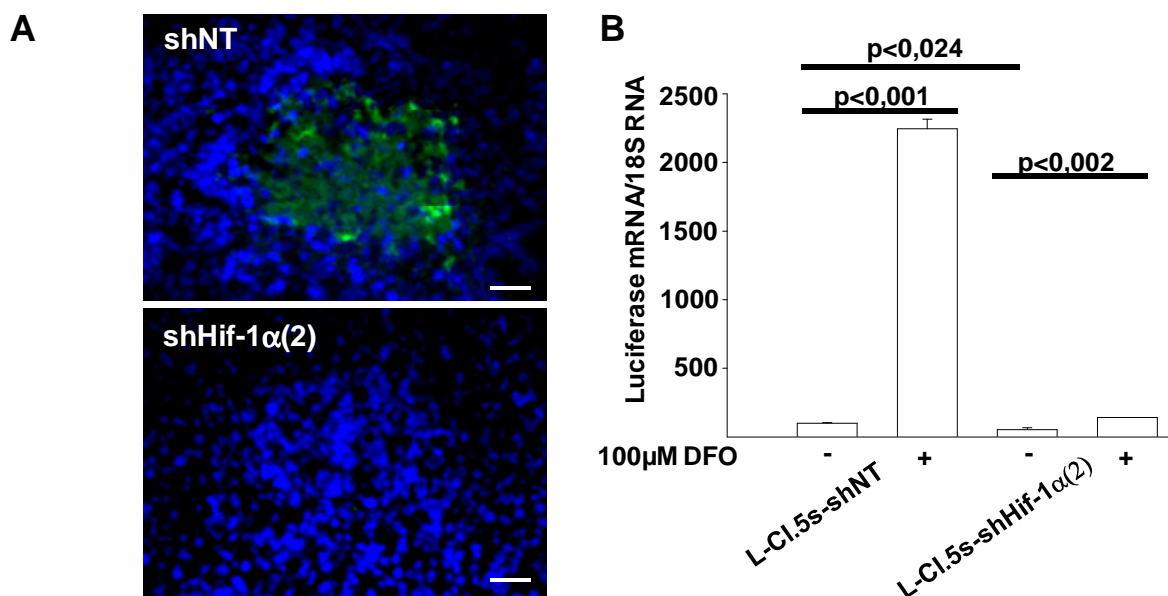


Abbildung 5.9: Bestätigung des unter 5.8 gezeigten Effektes von HIF-1α auf die gelatinolytische Aktivität *in vitro* und die MMP-9 Promotoraktivität *in vivo* mit einer zweiten shRNA Sequenz gegen HIF-1α

A. *In situ* Zymography (grünes Signal) von Lebermetastasen 7 d nach i.v. Inokulation von 5×10^3 L-CI.5s Tumorzellen. Gegenfärbung: DAPI (blau). Maßstabsbalken: 25µm. *Knockdown* von HIF-1α auf Tumorzellseite reduzierte die gelatinolytische Aktivität *in vivo*. **B.** Mittelwerte der Luciferase mRNA Expression Standardfehler in L-CI.5s-shNT und L-CI.5s-shHIF-1α(2) Tumorzellen, kultiviert mit oder ohne 100 µM DFO. Luciferase-mRNA Level wurden auf die Expression von 18S normiert und die shNT Kontrollgruppe gleich 100% gesetzt; $n = 3$. L-CI.5s-shNT/ohne DFO: 100,0 %±4,7 %; L-CI.5s-shNT/mit DFO: 2246,2 %±69,2 %; L-CI.5s-shHIF-1α(2)/ohne DFO: 53,6 %±12,2 %; L-CI.5s-shHIF-1α(2)/mit DFO: 140,6 %±1,1 %.

Ein weiteres Indiz für die Regulation von Mmp-9 durch den HIF-1-Signalweg und damit durch HIF-1α ist die Tatsache, dass die Expression von HIF-1α sowie von Ca9, eines Markergens für die Aktivierung des HIF-1-Signalwegs (Wykoff *et al.*, 2000), mit der Expression von Mmp-9 während der frühen Phasen der Leberkolonisierung (0-6h nach Tumorzellinokulation) korrelierte und während der ersten 6 h nach Tumorzellinokulation anstieg (Abbildung 5.10).

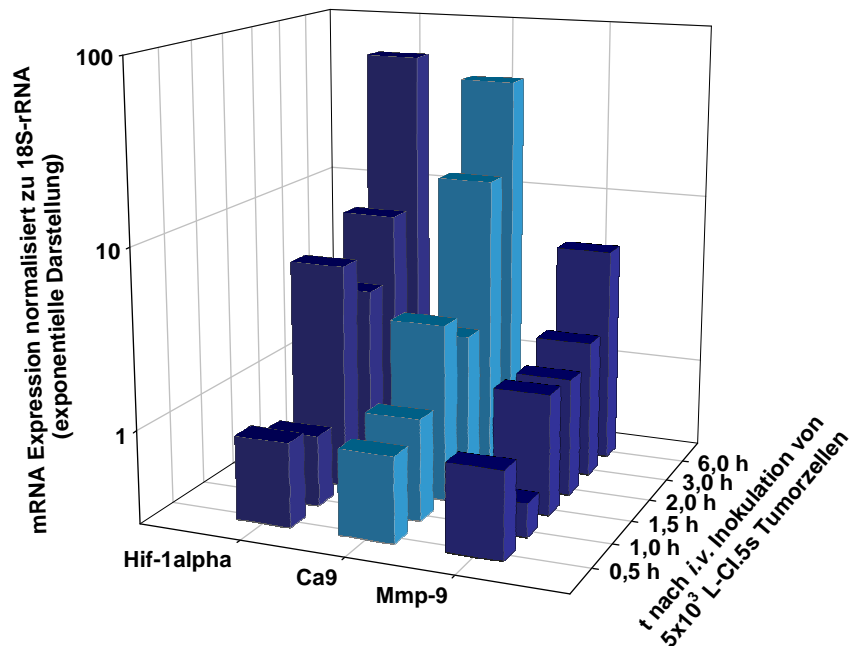


Abbildung 5.10: Korrelation der Expression von HIF-1 α , Carboanhydrase 9 (Ca9) und Mmp-9 während der frühen Phasen der Leberkolonisierung

Dargestellt sind die Mittelwerte der Expression von Hif-1 α , Ca9 sowie Mmp-9 während der frühen Phasen der Leberkolonisierung im Zeitraum von 0,5 h bis 6 h nach i.v. Tumorzellinokulation von 2×10^6 L-CI.5s Tumorzellen (n=4 Mäuse). Die Expression von Hif-1 α , Ca9 und Mmp-9 korrelierte im beobachteten Zeitraum.

Da die Expression von Mmp-9 wie oben gezeigt von Hif-1 α reguliert wurde, sollte dieser Effekt auch im unter 5.4 beschriebenen Primärtumormodell zu beobachten sein. Daher wurde eine gelatinolytische Analyse der Primärtumoren durchgeführt. Wie Abbildung 5.11 A zeigt, war die gelatinolytische Aktivität im Primärtumor ebenso wie in Lebermetastasen (vgl. Abbildungen 5.8 und 5.9) abhängig von der Präsenz von Hif-1 α . Um zu überprüfen ob die Reduzierung der gelatinolytischen Aktivität auf einer verminderten Expression basiert, wurde aus L-CI.5s-shNT bzw. shHif-1 α Primärtumoren mRNA isoliert und die Expressionslevel von Mmp-9 nachgewiesen (Abbildung 5.11 B). Hierbei bestätigte sich, dass Hif-1 α die Expression von Mmp-9 *in vivo* regulierte. So war die Expression von Mmp-9 im Primärtumor signifikant reduziert, wenn Hif-1 α in den Tumorzellen reduziert war (Abbildung 5.11 B).

Da neben Mmp-9 auch die zweite Gelatinase Mmp-2 eine wichtige Rolle bei der Invasivität von Tumorzellen spielt (Gerg *et al.*, 2008), wurde überprüft, ob auch die Expression dieser Gelatinase im Primärtumor durch den *Knockdown* von Hif-1 α in Tumorzellen reduziert wird. Quantitative Analyse der mRNA Expression ergab, dass der *Knockdown* von Hif-1 α die Expression von Mmp-2 analog zu Mmp-9 im Primärtumor reduzierte (Abbildung 5.11 C). Im

Gegensatz zu Mmp-9 war die Reduktion von Mmp-2 nicht signifikant, jedoch ein starker Trend.

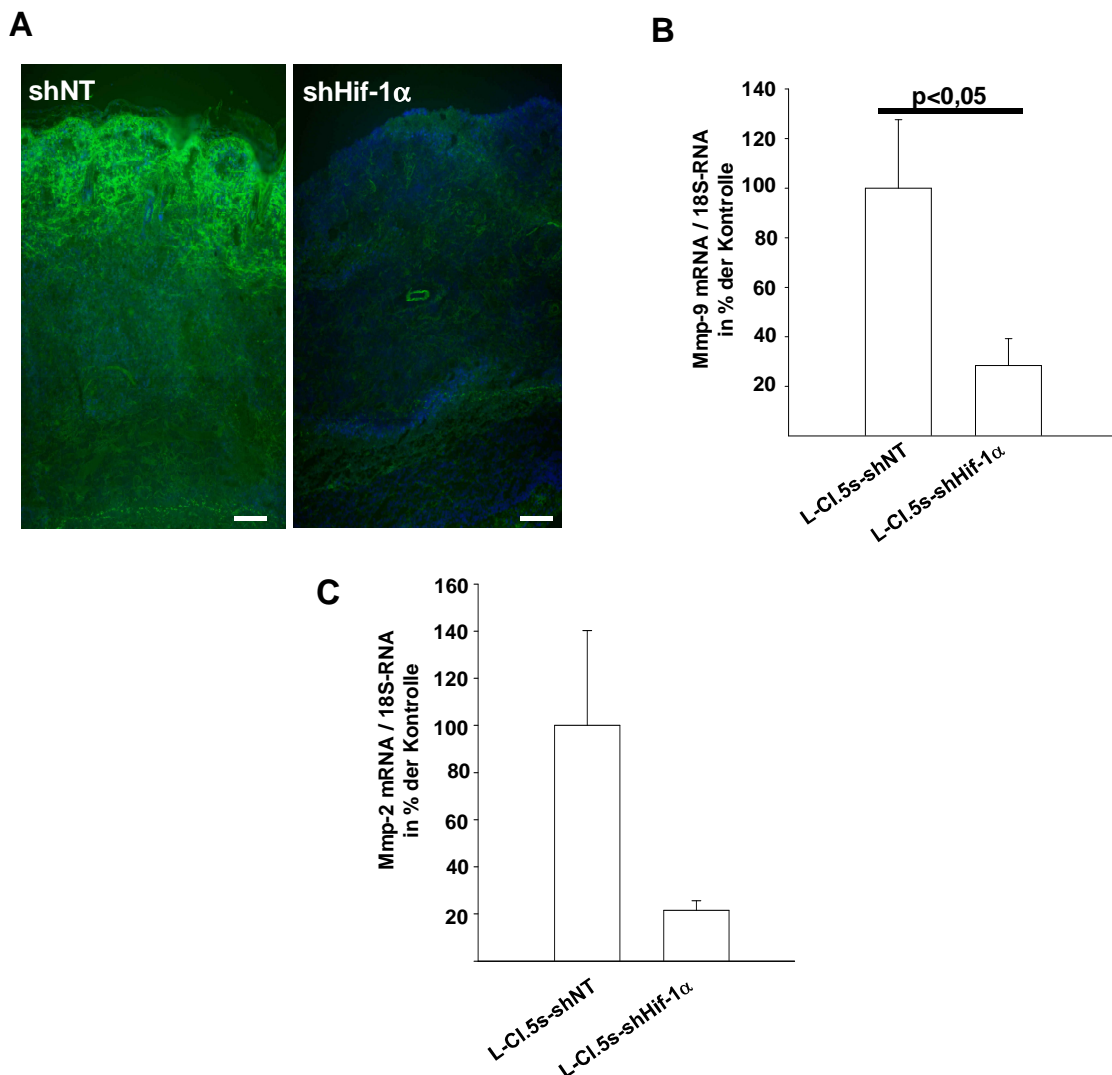


Abbildung 5.11: Hif-1α Knockdown reduzierte die gelatinolytische Aktivität sowie die Expression der Gelinasen A und B (Mmp2 und-9) in Primärtumoren

A. *In situ* Zymography von intradermalen Primärtumoren. Die gelatinolytische Aktivität (grünes Signal) wurde durch den *Knockdown* von Hif-1α *in vivo* reduziert. Gegenfärbung: DAPI (blaues Signal), Maßstabsbalken: 100µm. **B.** Mmp9 mRNA Expression im Primärtumor nach intradermaler Inokulation von 1×10^5 L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1α. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Mmp-9 mRNA Level wurden normalisiert auf die 18S-Expression. n = 4 Mäuse. L-CI.5s-shNT: 100,0 % \pm 7,6 %; L-CI.5s-shHif-1α: 28,8 % \pm 10,7 %. **C.** Mmp-2 mRNA Expression im Primärtumor nach intradermaler Inokulation von 1×10^5 L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1α. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Mmp-2 mRNA Level wurden normalisiert auf die 18S-Expression. n = 4 Mäuse. L-CI.5s-shNT: 100,0 % \pm 40,3 %; L-CI.5s-shHif-1α: 21,5 % \pm 4,1 %.

Um zu überprüfen, ob die im Primärtumor beschriebenen Effekte (Abbildung 5.11) auf das Fehlen von Hif-1α zurückzuführen waren, wurde die Expression von Hif-1α sowie von Ca9 auf mRNA-Ebene analysiert. Im Vergleich zur Kontrolle war im Mittel die Hif-1α Expression

in Primärtumoren der *Knockdown* Gruppe um 87% reduziert (Abbildung 5.12). Durch die Analyse der Ca9 mRNA Expression konnte nachgewiesen werden, dass der *Knockdown* von Hif-1 α den Hif-1-Signalweg um 75% *in vivo* reduzierte (Abbildung 5.12).

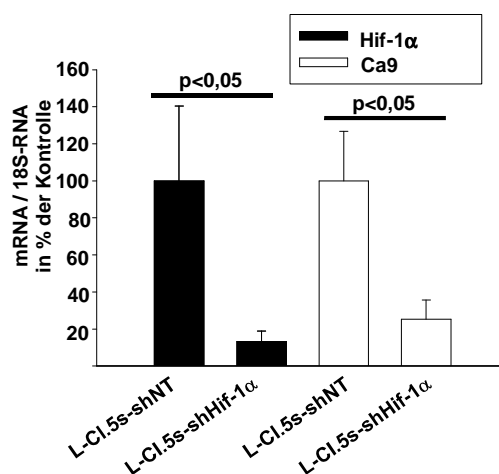


Abbildung 5.12: Detektion des Hif-1 α Knockdowns im Primärtumor

Hif-1 α und Ca9 mRNA Expression im Primärtumor nach intradermaler Inokulation von 1×10^5 L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1 α . Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Hif-1 α mRNA Level wurden normalisiert auf die 18S-Expression. n = 4 Mäuse. Hif-1 α : L-CI.5s-shNT: 100,0 % \pm 40,4 %; L-CI.5s-shHif-1 α : 13,1 % \pm 5,8 %. Ca9: L-CI.5s-shNT: 100,0 % \pm 26,7 %; L-CI.5s-shHif-1 α : 25,3 % \pm 10,3 %.

5.9 Erhöhung der gelatinolytische Aktivität in CT-26L-Lungenmetastasen durch Hif-1 α

Da sowohl in L-CI.5s-Primärtumoren als auch in L-CI.5s-Lebermetastasen eine Reduktion der gelatinolytischen Aktivität nach *Knockdown* von Tumorzell-Hif-1 α beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob sich dieser Effekt auch in CT-26L-Lungenmetastasen zeigt. Daher wurden CT-26L-Tumorzellen intravenös in *syngene* Balb/c Mäuse inokuliert und die Organe 21 d später entnommen. Analog zum L-CI.5s Modell wurde auch hier durch den *Knockdown* von Hif-1 α auf Tumorzellseite die experimentelle Metastasierung signifikant reduziert (Abbildung 5.13 A). Jedoch lässt sich hier im Gegensatz zum L-CI.5s Modell die Reduktion der Metastasierung nicht auf einen direkten Einfluss von Hif-1 α auf das metastatische Potential zurückführen, da das Fehlen des HIF-1-Signalwegs in CT-26L Tumorzellen, im Gegensatz zu L-CI.5s Tumorzellen, die Proliferation unter Hypoxie negativ beeinflusst (siehe 5.1). Den-

noch konnte auch in diesem Modell eine Reduktion der gelatinolytischen Aktivität in Metastasen nach *Knockdown* von Tumorzell-Hif-1 α beobachtet werden (Abbildung 5.13 B).

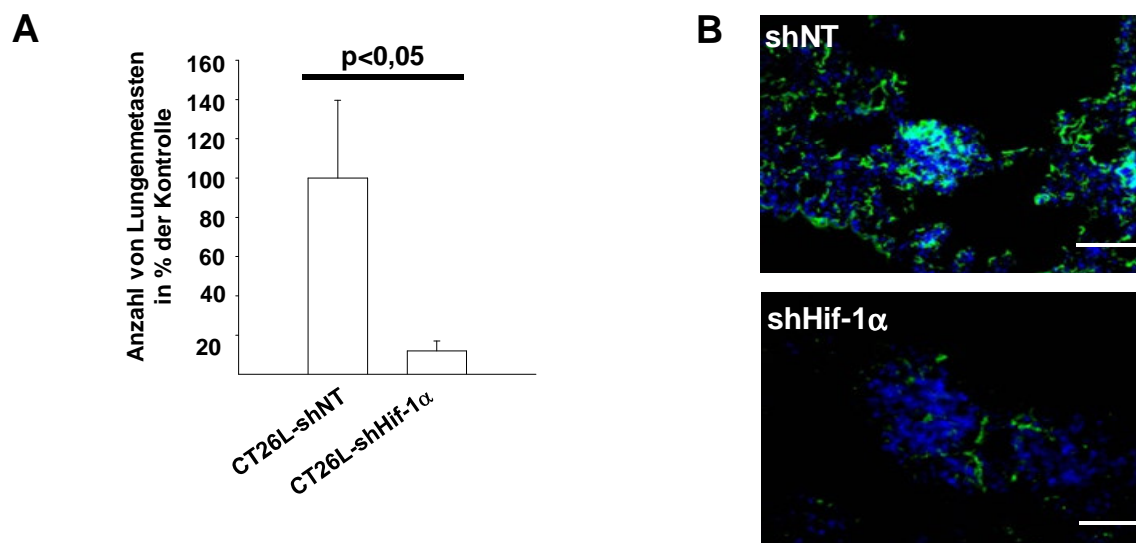


Abbildung 5.13: Reduktion der experimentellen Metastasierung von murinen Kolonkarzinomzellen und der gelatinolytischen Aktivität in Lungenmetastasen durch Hif-1 α Knockdown

A. *Knockdown* von Hif-1 α reduzierte die Kolonisierung der Lunge durch murine CT-26L Kolonkarzinomzellen 20 d nach intravenöser Inokulation von 1×10^6 Kolonkarzinomzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Lungenmetastasen $> 0,2 \text{ mm} \pm$ Standardfehler. CT26L-shNT: 100,0 % \pm 39,6 %, $n = 5$ Mäuse; CT26L-shHif-1 α : 11,9 % \pm 5,2 %, $n = 7$ Mäuse. **B.** In situ Zymography von CT-26L Lungenmetastasen 20 d nach intravenöser Inokulation von 1×10^6 Kolonkarzinomzellen. Gegenfärbung: DAPI (blaues Signal). Maßstabsbalken: 25 μm . *Knockdown* von Hif-1 α reduzierte die gelatinolytische Aktivität (grünes Signal) in Lungenmetastasen.

Da sich das CT-26L Modell, im Gegensatz zum L-CI.5s Modell, aufgrund des Einflusses auf die Proliferation nicht zur Beantwortung der Frage eignet, ob Hif-1 α einen direkten Einfluss auf das metastatische Potential von Tumorzellen ausübt, wurde daher im Weiteren das L-CI.5s Modell eingesetzt.

5.10 Notwendigkeit von Hif-1 α für das Auswachsen von L-CI.5s Lebermetastasen

Nähere Untersuchungen des Metastasierungsphänotyps ergaben, dass die Lebermetastasen auf der Leberoberfläche in der HIF-1 α *Knockdown* Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant kleiner waren (Abbildung 5.14 A). Jedoch erschienen die Metastasen auf der Leberoberfläche kompakter (Abbildung 5.14 C). Um zu untersuchen, ob die Architektur der Metastasen durch einen *Knockdown* von Hif-1 α auf Tumorzellseite beeinflusst wurde, wurde eine histologische Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die *lacZ*-markierten Tumorzellen mittels X-Gal-Färbung in histologischen Schnitten der Leber sichtbar gemacht. Anschließend

wurde die Tumorzellichte in Metastasen ermittelt: Durch den *Knockdown* von HIF-1 α auf Tumorzellseite kam es zu einer Akkumulation von Tumorzellen in Metastasen (Abbildung 5.14 B). Die Tumorzellen mit Hif-1 α *Knockdown* waren dichter gepackt, d.h. die Tumorzellichte pro Fläche war in den Metastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 5.14 B). Gleichzeitig wurde in der Hif-1 α *Knockdown* Gruppe eine Reduktion des *Tumorzell-scatterings*, der sogenannten sekundären Invasion ausgehend von etablierten Metastasen in das Leberparenchym, beobachtet (Abbildung 5.14 C). So konnten in der HIF-1 α *Knockdown*-Gruppe keine sekundär invadierten Tumorzellen auf der Leberoberfläche detektiert werden, während in der Kontrollgruppe eine starke sekundäre Invasion zu verzeichnen war (Abbildung 5.14 C).

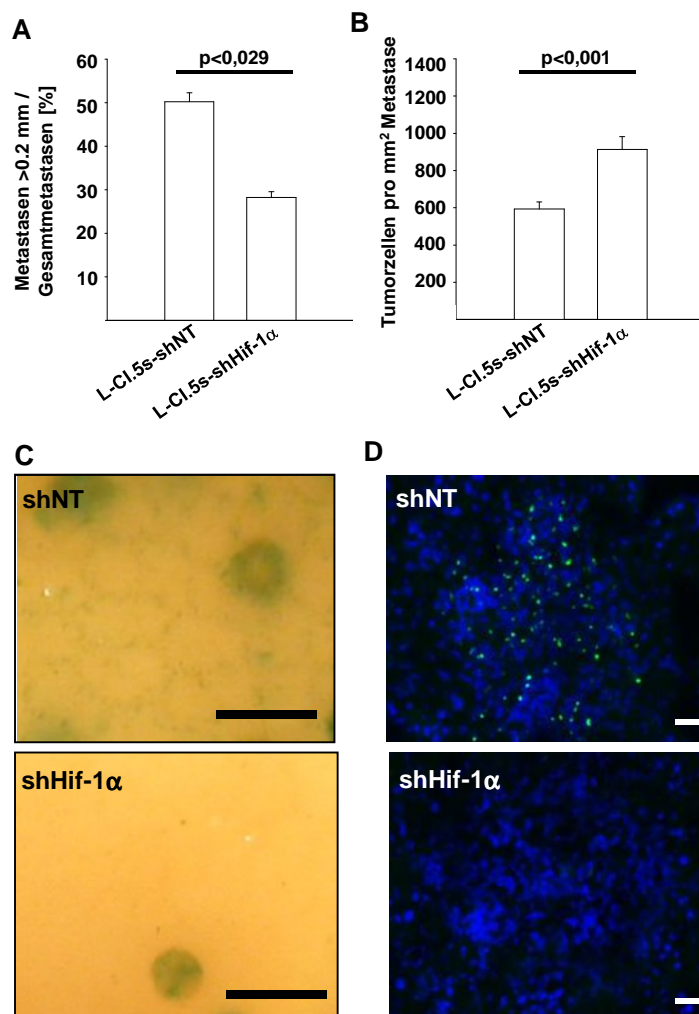


Abbildung 5.14: Reduktion des Auswachsens von L-CI.5s Lebermetastasen sowie der sekundären Invasion und der Aktivierung des Met-Signalweges durch *Knockdown* von Hif-1 α

A. Anteil der Metastasen > 0,2 mm in % der Gesamtmetastasenzahl \pm Standardfehler 7 d nach intravenöser Tumorzellinokulation von 5×10^3 L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1 α ; n=4 Mäuse. L-CI.5s-shNT: 50,3 % \pm 2,1 %; L-CI.5s-shHIF-1 α : 28,3 % \pm 1,2 %. **B.** Anzahl Tumorzellen pro Metastase normiert auf die Metastasengröße \pm Standardfehler 7 d nach intravenöser Tumorzellinokulation von 5×10^3 L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1 α ; n=3 Mäuse. L-CI.5s-shNT: 592,8 \pm 39,2; L-CI.5s-shHIF-1 α : 913,2 \pm 69,3. **C.** Repräsentative Nahaufnahmen von X-Gal-gefärbten (indigoblaues Signal) Leberoberflächen 7 d nach intravenöser Inokulation von 5×10^3 L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1 α Tumorzellen. Maßstabsbalken: 1 mm. **D.** Immunhistochemische Färbung des phosphorylierten Met-Rezeptors (grünes Signal) in Lebermetastasen 7 d nach intravenöser Inokulation von 5×10^3 L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1 α Tumorzellen. Gegenfärbung: DAPI (blaues Signal). Maßstabsbalken: 50 μ m.

Ein wichtiger Signalweg, der das *Scattering* von Tumorzellen induziert und von dem bekannt ist, dass er vom Hif-1-Signalweg induziert werden kann, ist der HGF/Met-Signalweg (Pennacchietti *et al.*, 2003). Da durch den *Knockdown* von HIF-1 α das *Tumorzellscattering* inhibiert wurde, sollte überprüft werden, ob dies mit einer verminderten Aktivierung des HGF/Met-Signalweges *in vivo* korreliert. Immunhistologisches Anfärben des aktivierten Met-Rezeptors mit einem Antikörper, der die Phosphorylierung der Tyrosinkinase-domäne des Met-Rezeptors detektiert, zeigte eine stark verminderte Phosphorylierung der Tyrosinkinase-domäne und somit eine stark verringerte Aktivierung des HGF/Met-Signalweges in Metastasen der HIF-1 α *Knockdown* Gruppe (Abbildung 5.14 C).

Um auch hier einen Off-target-Effekt der verwendeten shRNA auszuschließen, wurde die gleiche Analyse mit Metastasen tragenden Leber-Proben durchgeführt. Hierbei wurde in den Tumorzellen eine zweite shRNA zum *Knockdown* von HIF-1 α verwendet. Auch hier wurde in der HIF-1 α *Knockdown* Gruppe eine starke Reduktion des *Tumorzellscatterings* und eine stark verringerte Aktivierung des Met-Rezeptors detektiert (Abbildung 5.15).

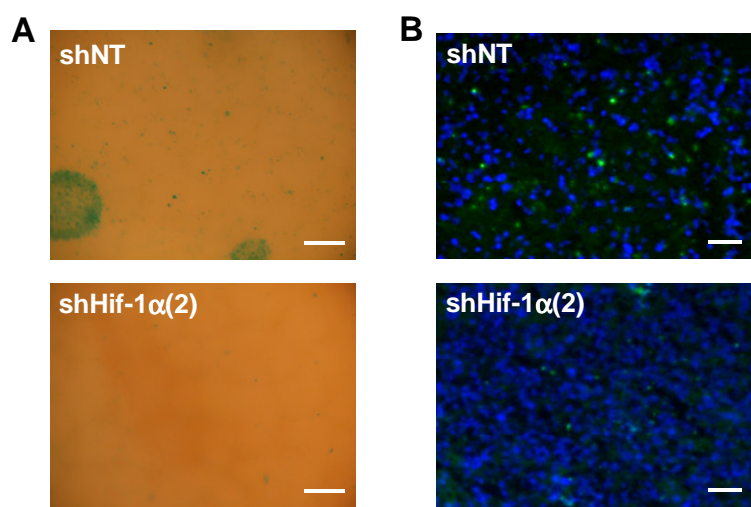


Abbildung 5.15: Bestätigung des unter 5.14 gezeigten Einflusses von Hif-1 α auf das *Tumorzellscattering* und die Aktivierung des Met-Rezeptors *in vivo*

A. Repräsentative Nahaufnahmen von X-Gal-gefärbten (indigoblaues Signal) Leberoberflächen 7 d nach intravenöser Inokulation von 5×10^3 L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1 α (2) Tumorzellen. Maßstabsbalken: 1 mm. **B.** Immunhistochemische Färbung des phosphorylierten Met-Rezeptors (grünes Signal) in Lebermetastasen 7 d nach intravenöser Inokulation von 5×10^3 L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1 α (2) Tumorzellen. Gegenfärbung: DAPI (blaues Signal). Maßstabsbalken: 50 μ m.

Wie Pennacchietti *et al.* 2003 zeigten, kann der Met-Signalweg durch Hypoxie aktiviert werden. Vermittelt wird dies transkriptional durch den Hif-1-Signalweg (Pennacchietti *et al.*, 2003). Da die Metastasierung in die Leber durch den *Knockdown* von Hif-1 α um über 80% reduziert wurde, können Genexpressionsänderungen in Tumorzellen in der Leber nicht mehr

detektiert werden. Um zu überprüfen, ob der *Knockdown* von Hif-1 α die Expression des Met-Rezeptors *in vivo* beeinflusst, wurde die Met mRNA-Expression im Primärtumor untersucht (Abbildung 5.16). Durch den *Knockdown* von Tumorzell-Hif-1 α war die Expression des Met-Rezeptors signifikant um 71% im Vergleich zur shNT-Kontrolle reduziert. Dies bestätigt die Ergebnisse von Pennacchietti *et al.* und unterstreicht den Einfluss des Hif-1-Signalweges auf die Expression des metastasenfördernden HGF/Met-Signalwegs.

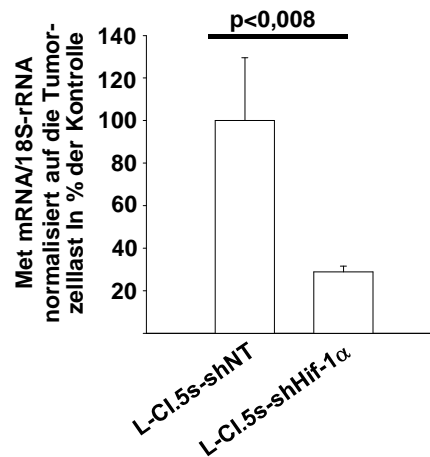


Abbildung 5.16: Hif-1 α Knockdown reduzierte die Expression des Met-Rezeptors in intradermalen Primärtumoren

Met mRNA-Expression normiert auf die lacZ mRNA-Expression und 18S-rRNA in L-CI.5s-shNT bzw. L-CI.5s-shHif-1 α Primärtumoren. Dargestellt sind die Mittelwerte der Expression \pm Standardfehler, n=4 Mäuse. L-CI.5s-shNT: 100,0 % \pm 29,6 %; L-CI.5s-shHIF-1 α : 28,8 % \pm 2,8 %.

5.11 Eignung des HGF/Met-Signalweges als Ziel einer gegen die durch Hif-1-gesteigerten Invasivität gerichteten Therapie

Aufgrund der oben aufgezeigten überlebensunabhängigen, metastasenfördernden Rolle von Hif-1 α und der schon bekannten überlebensfördernden Eigenschaften des Hif-1-Signalweges scheint Hif-1 α ein nahezu ideales Ziel einer therapeutisch motivierten Intervention darzustellen. Aus verschiedenen Gründen ist eine direkte therapeutische Intervention gegen Hif-1 α jedoch als problematisch einzustufen: 1. HIF-1 α spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr (Cramer *et al.*, 2003). 2. Ein therapeutisches Ausschalten des Hif-1-Signalweges könnte einen starken Selektionsdruck auf die Tumorzellpopulation in Tumoren durch Inhibition der Angiogenese ausüben (Michieli, 2009). 3. HIF-1 α spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Stammzeleigenschaften (Mazumdar *et al.*, 2009; Eliasson, Jönsson, 2010). Ein Hinweis auf eine zentrale Funktion von HIF-1 α in Stammzellen ist die hohe Expression der regu-

lativen α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1 in hämatopoetischen, mesenchymalen und adulten Stammzellen (Abbildung 4.17; rote Markierung).

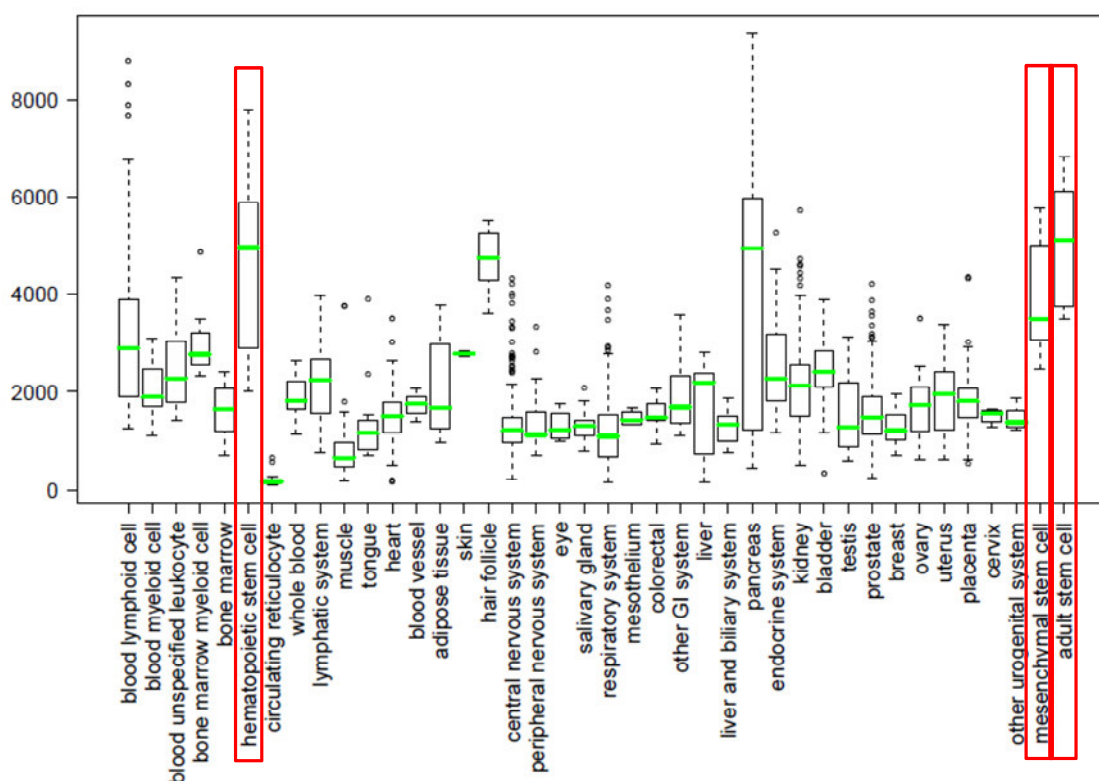


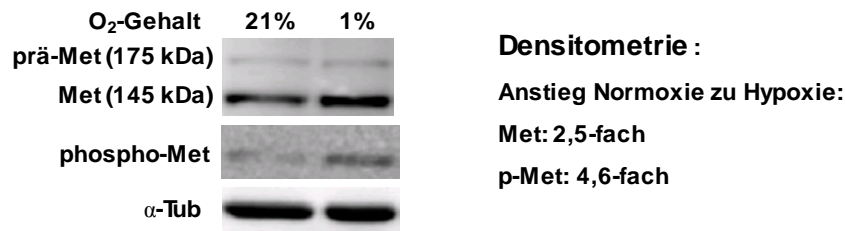
Abbildung 5.17: HIF-1 α -Expressionslevel in menschlichen Geweben

Dargestellt sind die relativen HIF-1 α -Expressionslevel in den unterschiedlichen Kompartimenten des humanen Körpers. Auffällig sind die hohen Expressionslevel in hämatopoetischen, mesenchymalen und adulten Stammzellen. Die Übersicht wurde mit Hilfe der Gene Sapiens Database (www.genesapiens.org) erstellt (Kilpinen *et al.*, 2008).

Da der HIF-1-Signalweg eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen physiologischen Prozessen spielt, sollte von einer direkten therapeutischen Intervention abgesehen werden. Vielmehr sollten daher Signalwege als Ziel einer Therapie in Betracht gezogen werden, die dem HIF-1-Signalweg nachgeschaltet sind. Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Metastasierung (Bocaccio, Comoglio, 2006; Trusolino *et al.*, 2010) und der Tatsache, dass seine Aktivität von Hif-1 α reguliert wird (Pennacchietti *et al.*, 2003), erscheint der Met-Signalweg als ideales Ziel einer gegen die metastasenfördernden Eigenschaften von Hif-1 α gerichteten Therapie. Wie Abbildung 5.18 zeigt, führt die Kultivierung von humanen Lungenkarzinomzellen unter Hypoxie zu einer verstärkten Aktivierung des Met-Signalwegs. So war die Anzahl der Met-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (145kDa) unter Hypoxie um den Faktor 2,5 erhöht. Stimulation mit dem Met-Liganden HGF führte unter diesen Bedingungen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen zu einer 4,6-fach verstärkten Phosphorylierung des Met-Signalwegs (Abbildung 5.18 A). Wie von Pennacchietti *et al.* 2003 gezeigt, ist dieses Phäno-

men auf den Sauerstoffpartialdruck-regulierten Transkriptionsfaktor HIF-1 zurückzuführen. Dies zeigen auch die Ergebnisse, die in Abbildung 5.18 B dargestellt sind. Induktion des HIF-1-Signalwegs mit DFO führte zur verstärkten Expression des Met-Rezeptors. Dies konnte durch den *Knockdown* von HIF-1 α verhindert werden (Abbildung 5.18 B).

A



B

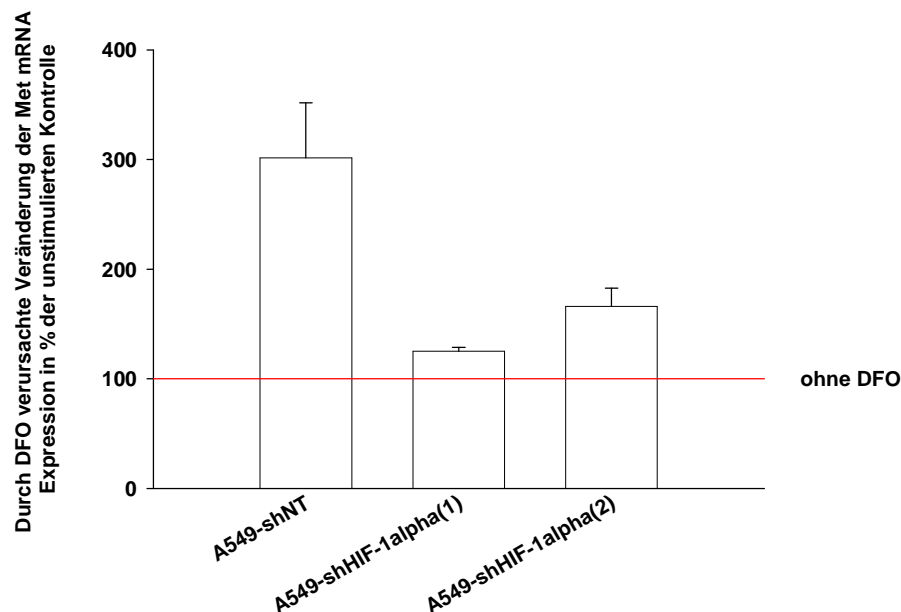


Abbildung 5.18: Induktion der Expression des Met-Rezeptors und der Suszeptibilität von A549 Tumorzellen gegenüber dem Met-Liganden HGF durch Hypoxie

A Repräsentativer Western Blot: Humane A549 Lungenkarzinomzellen wurden 24 h unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert und anschließend 10 min mit 20 ng/ml HGF stimuliert. Angefärbt wurden der Met-Rezeptor, sowie die phosphorylierte Form des Rezeptors und als Ladungskontrolle α -Tubulin. Densitometrische Analyse wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Normalisierung: α -Tubulin. **B** Met mRNA Expression normalisiert auf die 18S RNA Expression in A549 Zellen. Der HIF-1-Signalweg wurde durch Inkubation mit 100 μ M DFO induziert. Abschalten des HIF-1-Signalwegs verhinderte diesen Anstieg.

5.12 Zeitabhängige Reduktion der Met-Oberflächenlevel durch den monoklonalen anti-Met-Antikörper DN30

Da bei menschlichen Tumorerkrankungen häufig hypoxische Zustände auftreten und der pro-invasive HIF-1-Signalweg unter diesen Umständen den für die Metastasierung zentralen Met-

Signalweg aktiviert, erscheint dieser als lohnendes Ziel einer gegen die proinvasive Funktion von Hif-1 α gerichteten Therapie.

Einer der vielversprechendsten Therapieansätze gegen den humanen Met-Rezeptor ist eine Antikörper-basierte (DN30) Interventionsstrategie. Bisher war jedoch nur bekannt, dass der anti-Met-Antikörper an den extrazellulären Part des Met-Rezeptors bindet und daraufhin das *Shedding* des Rezeptors induziert. Um die Eignung dieses Therapieansatzes gegen die metastasenfördernde Funktion von Hif-1 α zu untersuchen, muss die Antikörper-basierte anti-Met-Therapie zunächst genau charakterisiert werden. Wie bereits erwähnt, löst der monoklonale anti-Met-Antikörper DN30 das *Shedding* des Met-Oberflächenrezeptors aus und schränkt auf diese Weise die Aktivität des Met-Signalweges ein (Petrelli *et al.*, 2006). Der genaue Mechanismus und die ausführende *Sheddase* waren bisher jedoch unbekannt. Abbildung 5.18 zeigt den Einfluss des Antikörpers DN30 auf die zelluläre Met-Rezeptor Konzentration. Zugabe des Antikörpers DN30 zu humanen Lungenzellkarzinomzellen (A549) bewirkte eine zeitabhängige Reduktion der Met-Level. So verringerte der Antikörper die Met-Oberflächenlevel binnen 3 h um 70% (Abbildung 5.19).

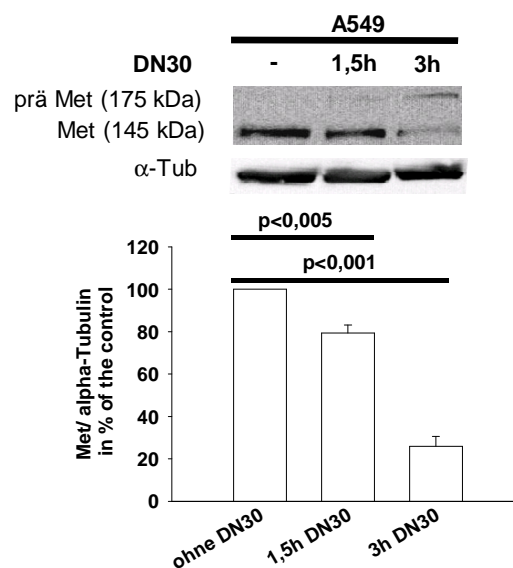


Abbildung 5.19: Zeitabhängige Reduktion der Met-Konzentration in A549 Zellen durch DN30
 Repräsentativer Western Blot: Humane A549 Lungenzellkarzinomzellen wurden ohne bzw. für 1,5 h und 3 h mit 80 μ g/ml DN30 inkubiert. Anfärbt wurden der Met-Rezeptor und als Ladungskontrolle α -Tubulin. Die densitometrische Analyse wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Normalisierung: α -Tubulin. n=3, Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler: w/o DN30: 100,00%, 1,5h DN30: 79,4 % \pm 3,7 %, 3h DN30: 25,9 % \pm 4,7 %

5.13 Hemmung der DN30-induzierten Reduktion der Met-Oberflächenrezeptoren durch die endogenen Breitspektruminhibitoren TIMP-1 und TIMP-3

Wie oben gezeigt basiert die anti-Met-Therapie durch DN30 auf einer Reduktion der Zelloberflächenlevel des Met-Rezeptors. Seit 2006 war bekannt, dass der Antikörper das *Shedding* des Met-Rezeptors induziert. Unklar blieb bislang jedoch, welche Protease für das *Shedding* verantwortlich ist. Daher sollte zunächst in humanen Zellsystemen näher untersucht werden, ob und durch welche *Sheddase(n)* die therapeutische Wirkung des Antikörpers DN30 vermittelt wird. Als wahrscheinlichste Kandidaten erscheinen die *Sheddasen* ADAM-10 sowie ADAM-17. Für beide ist bekannt, dass sie prinzipiell in der Lage sind das *Shedding* verschiedener Oberflächenrezeptoren, darunter Met (Kopitz *et al.*, 2007; Foveau *et al.*, 2009), zu induzieren. Um in einem ersten Schritt die in Frage kommenden Proteasen einzugrenzen, wurden zunächst zwei endogene Metalloproteaseinhibitoren mit unterschiedlichem Inhibitionsspektrum verwendet. Die gewonnenen Ergebnisse sind in Abbildung 5.20 dargestellt. So konnte die DN30 induzierte Reduktion der Met-Level durch die Zugabe des endogenen Breitspektruminhibitors TIMP-1 verhindert werden (Abbildung 5.20 A). Des Weiteren kam es bei der Zugabe von TIMP-1 zu einer zwar nicht signifikanten, jedoch erkennbaren Erhöhung der Met-Oberflächenlevel (Abbildung 5.20 A, Spur 1 und 3). Durch Zugabe des endogenen Breitspektruminhibitors TIMP-3 konnte ebenfalls die DN30 induzierte Reduktion der Met-Level eingeschränkt werden (Abbildung 5.20 B). Im Vergleich zu TIMP-1 konnte hier die Reduktion nicht gänzlich verhindert werden. Ebenso wurde kein Anstieg der Met-Level durch Inkubation von A549 Zellen mit TIMP-3 beobachtet (Abbildung 5.20 B).

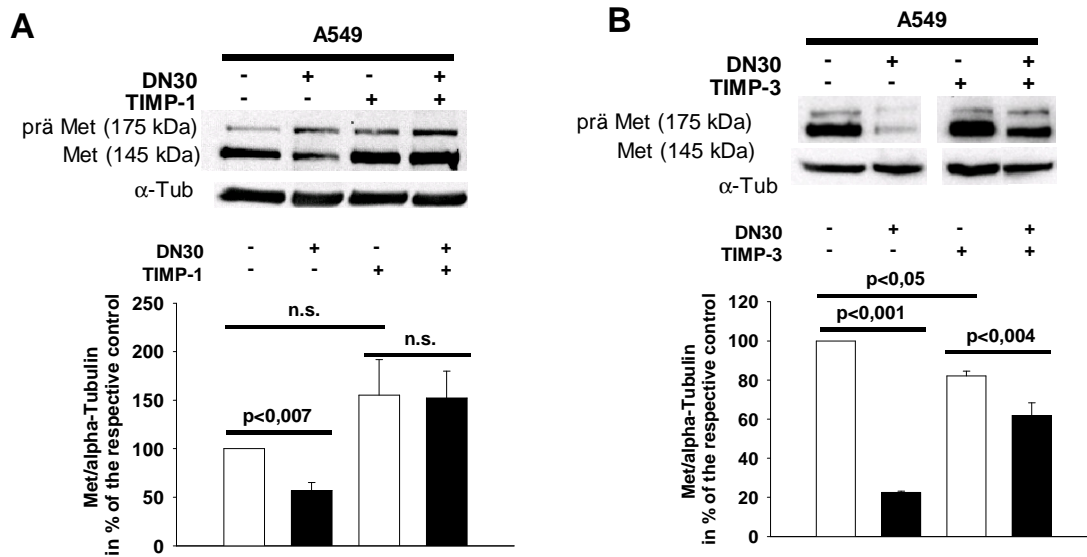


Abbildung 5.20: Inhibition der DN30-induzierten Met-Reduktion durch TIMP-1 und TIMP-3

A. Repräsentativer Western Blot: Humane A549 Lungenkarzinomzellen wurden ohne bzw. mit 1 µg/ml rekombinatem Timp-1 für 1 h inkubiert. Anschließend wurden 80 µg/ml DN30 zugegeben und die Zellen weitere 5 h inkubiert. Angefärbt wurden der Met-Rezeptor und als Ladungskontrolle α-Tubulin. Die densitometrische Analyse wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Normalisierung: α-Tubulin. n=3. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler: ohne DN30 ohne TIMP-1: 100,0 %, mit DN30 ohne TIMP-1: 56,8 % ± 8,4 %, ohne DN30 mit TIMP-1: 155,2 % ± 36,5 %, mit DN30 mit TIMP-1: 152,4 % ± 27,5 %. **B.** Repräsentativer Western Blot: Humane A549 Lungenkarzinomzellen wurden ohne bzw. mit 1 µg/ml rekombinatem Timp-3 für 1 h inkubiert. Anschließend wurden 80 µg/ml DN30 zugegeben und die Zellen weitere 5 h inkubiert. Angefärbt wurden der Met-Rezeptor und als Ladungskontrolle α-Tubulin. Die densitometrische Analyse wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Normalisierung: α-Tubulin. n=3. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler: ohne DN30 ohne TIMP-3: 100,0 %, mit DN30 ohne TIMP-3: 22,5 % ± 0,7 %, ohne DN30 mit TIMP-3: 82,1 % ± 2,4 %, mit DN30 mit TIMP-3: 61,8 % ± 6,6 %.

Legt man die Inhibitionsspektren beider Inhibitoren übereinander, so zeigt sich, dass als verantwortliche *Sheddase* eigentlich nur ADAM-10 in Frage kommt, da diese *Sheddase* im Gegensatz zu ADAM-17 sowohl von TIMP-1 als auch von TIMP-3 gehemmt wird (Amour *et al.*, 2000). ADAM-17 wird nur von TIMP-3 und nicht von TIMP-1 gehemmt (Amour *et al.*, 1998).

Ein weiterer Hinweis auf die Involvierung von ADAM-10 oder ADAM-17 ist die in Abbildung 4.21 gezeigte Induktion des DN30-induzierten Met-*Shedding* durch den Phorboldiester PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*). GTL-16 Zellen, die sich aufgrund ihrer großen Menge an Met zur Detektion des Met-*Shedding*produktes im Zellkulturüberstand eignen, wurden mit 100nM PMA inkubiert, wodurch eine Zunahme der abgespaltenen Met-Rezeptoren im Zellkulturüberstand detektiert wurde (Abbildung 4.21). Durch die Zugabe von PMA, das die Aktivität der ADAM-*Sheddases* erhöht (Amour *et al.*, 1998; Kohutec *et al.*, 2009), konnte somit die Effizienz des Antikörpers DN30 verdoppelt werden.

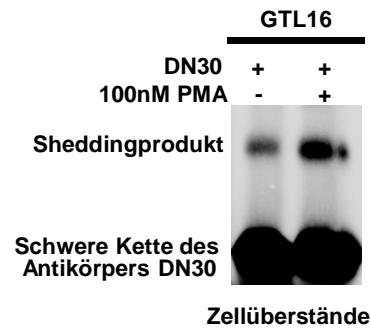


Abbildung 5.21: Verstärkung der DN30-induzierten Met-Reduktion durch PMA

Repräsentativer Western Blot: Humane Magenkarzinomzellen (GTL 16) wurden mit 80 µg/ml DN30 und ohne bzw. mit 100nM PMA für 4 h inkubiert. Anschließend wurde der Gehalt an abgespaltenen Met-Rezeptoren in Zellkulturüberständen mittels Western Blot analysiert. Die densitometrische Analyse, durchgeführt mit dem Programm *ImageJ*, ergab eine Verdopplung an abgespaltenen Met-Rezeptoren im Zellkulturüberstand durch PMA.

5.14 Vermittlung des DN30-induzierten Met-Rezeptor Shedding durch ADAM-10 nicht aber ADAM-17

Um die Involvierung von ADAM-10 im oben beschriebenen *Shedding*prozess nachzuweisen und auszuschließen, dass auch ADAM-17 eine Rolle spielt, wurde mittels shRNA-Technologie ein spezifischer *Knockdown* von ADAM-10 bzw. ADAM-17 in A549 Lungenkarzinomzellen erzeugt. Hierzu wurden je fünf verschiedene shRNA Sequenzen getestet, wobei die jeweils effizienteste Sequenz verwendet wurde (ADAM-10: TRCN0000006672; ADAM-17: TRCN0000052168). Hierbei zeigte sich, dass im Gegensatz zum *Knockdown* von ADAM-17 nur der *Knockdown* von ADAM-10 zu einer Inhibition des DN30-induzierten Met-*Shedding* führte. Im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen (vgl. Abbildung 5.18) zeigte die shNT-Kontrolle keine Unterschiede bezüglich des DN30-induzierten Met-Rezeptor-*Sheddings*. Auch hier wurde der Gehalt an Met durch den Antikörper DN30 reduziert (Abbildung 5.22). Der spezifische *Knockdown* von ADAM-17 war nicht in der Lage, die DN30 verursachte Met-Reduktion zu verhindern (Abbildung 5.22), obwohl die *Knockdown* Effizienz in diesem Fall nahezu 100% betrug (Abbildung 5.22). Im Gegensatz dazu wurde die DN30 induzierte Met-Reduktion durch den *Knockdown* von ADAM-10 vollständig inhibiert (Abbildung 5.22).

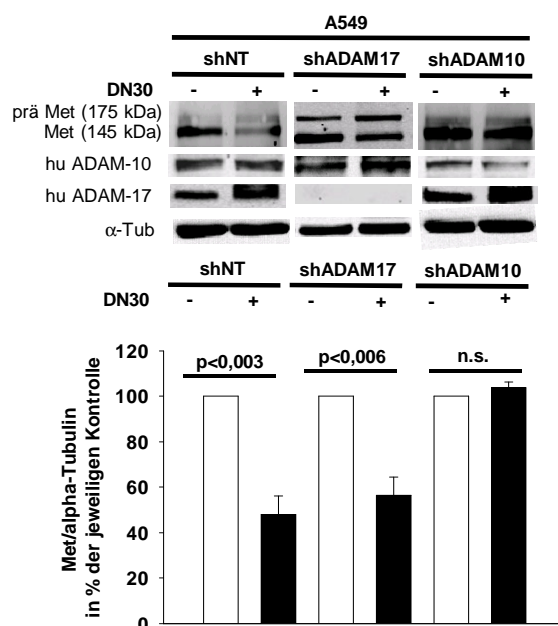


Abbildung 5.22: Verhinderung der DN30-induzierten Met-Reduktion durch *Knockdown* von ADAM-10 aber nicht durch *Knockdown* von ADAM-17 in A549 Zellen

Western Blot Analyse: Humane Lungenkarzinomzellen (A549) ADAM-10 und ADAM-17 *Knockdown* Zelllinien sowie die shNT Kontrollzelllinie wurden mittels lentiviraler shRNA-Technologie hergestellt. Anschließend wurden die Zellen für 5h mit 80 µg/ml DN30 inkubiert. Dargestellt ist die Western Blot Analyse für Met, ADAM-10, ADAM-17 und α -Tubulin als Ladungskontrolle. Die densitometrische Analyse wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt: n= 3 Western Blots; A549shNT: ohne DN30: 100,0 %, mit DN30: 48,0 % \pm 8,2 %; shADAM17: ohne DN30: 100,0 %, mit DN30: 56,3 % \pm 8,1 %; shADAM10: ohne DN30: 100,0%, mit DN30: 103,7 % \pm 2,6 %.

Um einen zelllinienspezifischen Effekt auszuschließen, wurden neben der A549 Lungenkarzinomzelllinie auch eine humane Magenkarzinomzelllinie (GTL16) sowie eine humane Ovarialkarzinomzelllinie (Skov-3i.p.) verwendet. In beiden Zelllinien konnten die Ergebnisse, die mit Hilfe der A549 Zelllinie gewonnen wurden, bestätigt werden. So konnte gezeigt werden, dass der Antikörper in beiden Tumorzelllinien in der Lage ist, die beschriebene Reduktion der Met-Rezeptoren auszulösen (Abbildung 5.23). Darüber hinaus führte der *Knockdown* von ADAM-10 sowohl in GTL-16 als auch in Skov3ip Zellen zu einer Inhibition des Met-*Shedding* (Abbildung 5.23). Analog zu A549 Zellen wurde in beiden Zelllinien keine Inhibition des DN30-induzierten Met-*Shedding* durch den *Knockdown* von ADAM-17 beobachtet (Abbildung 5.23). Des Weiteren wurde wie auch in A549 Zellen eine Erhöhung der ADAM-17 Proteinlevel nach Zugabe von ADAM-17 detektiert (Abbildung 5.22 und 5.23). Ebenso führte der *Knockdown* von ADAM-10 zu einem Anstieg der ADAM-17 Proteinlevel.

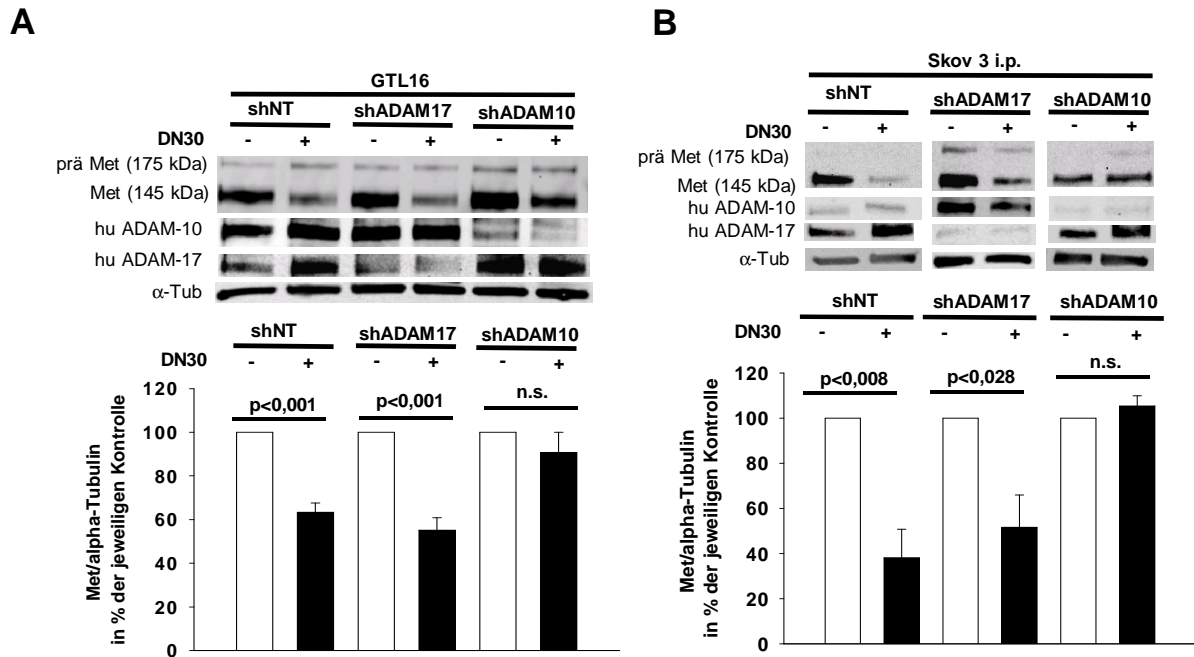


Abbildung 5.23: Verhinderung der DN30-induzierten Met-Reduktion in GTL16 und Skov3i.p. Zellen durch ADAM-10 nicht aber ADAM-17 Knockdown

Western Blot Analyse: Humane Magenkarzinomzellen (GTL16) sowie humane Ovarialkarzinomzellen (Skov3ip) ADAM-10 und ADAM-17 Knockdown Zelllinien sowie die shNT Kontrollzelllinie wurden mittels lentiviraler shRNA-Technologie hergestellt. Anschließend wurden die Zellen für 5h mit 80 μ g/ml DN30 inkubiert. Dargestellt ist die Western Blot Analyse für Met, ADAM-10, ADAM-17 und α -Tubulin als Ladungskontrolle. Die densitometrische Analyse wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt: **A.** n= 3 Western Blots; GTL16shNT: ohne DN30: 100,0 %, mit DN30: 63,4 % \pm 4,2 %; shADAM17: ohne DN30: 100,0 %, mit DN30: 55,2 % \pm 5,6 %; shADAM10: ohne DN30: 100,0%, mit DN30: 90,8 % \pm 9,2 %. **B.** n= 3 Western Blots; GTL16shNT: ohne DN30: 100,0 %, mit DN30: 38,1 % \pm 12,7 %; shADAM17: ohne DN30: 100,0 %, mit DN30: 51,6 % \pm 14,3 %; shADAM10: ohne DN30: 100,0%, mit DN30: 105,3 % \pm 4,6 %.

Wie bereits erwähnt, eignet sich die GTL16 Zelllinie aufgrund ihrer großen Anzahl an Met-Rezeptoren besonders zur Detektion des Sheddingproduktes in Zellkulturüberständen und somit zur Analyse der Sheddingrate. Durch den Einsatz dieser Zelllinie konnte somit auch der Einfluss von ADAM-10 auf das DN30-induzierte Met-Shedding analysiert werden. Wie oben beschrieben wurde ADAM-10 als ausführende *Sheddase* identifiziert. Daher sollte nun überprüft werden, ob durch den *Knockdown* von ADAM-10 auch das *Shedding* reduziert wird: Der Gehalt an Met-Rezeptoren wurde in GTL16-Zellkulturüberständen überprüft und auch hier reduzierte der *Knockdown* von ADAM-10 die Menge des abgespaltenen Rezeptors im Vergleich zur shNT Kontrollzelllinie (Abbildung 5.24).



Abbildung 5.24: Reduktion des DN30-induzierten Met-Shedding durch Knockdown von ADAM-10

Repräsentativer Western Blot von Zellkulturüberständen bzw. immunpräzipitierten Proteinen aus Zellkulturüberständen. ADAM-10 *Knockdown* bzw. shNT Kontrolle GTL16-Magenkarzinomzellen wurden durch lentivirale shRNA-Technologie generiert. GTL-16 Zelllinien wurden für 5h mit 80 μ g/ml DN30 inkubiert.

Um ADAM-10 zweifelsfrei als verantwortliche *Sheddase* zu identifizieren, wurde anschließend neben den beiden Breitspektrum-inhibitoren TIMP-1 und TIMP-3 sowie den spezifischen *Knockdown* von ADAM-10 und -17 auch ein ADAM-10 spezifischer Inhibitor eingesetzt. Durch Zugabe des ADAM-10-spezifischen Inhibitors GI254023X wurde die DN30-verursachte Met-Reduktion in konzentrationsabhängiger Art und Weise inhibiert (Abbildung 5.25).

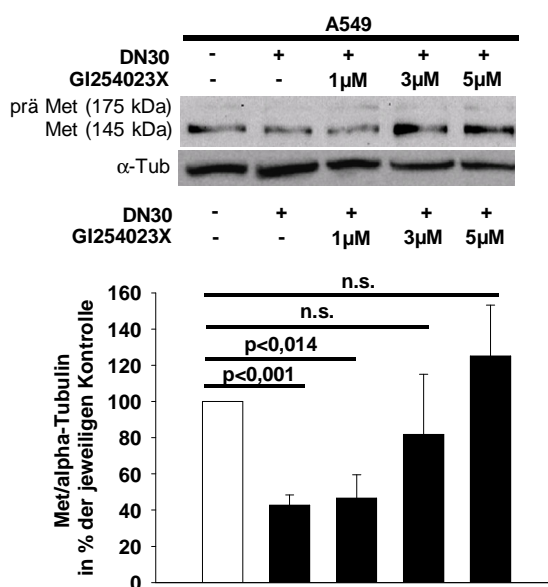


Abbildung 5.25: Inhibition der DN30-induzierten Met-Reduktion durch den ADAM-10 spezifischen Inhibitor GI254023X

Western Blot Analyse: Humane Lungenkarzinomzellen (A549) wurden für 5h mit 80 μ g/ml DN30 und ansteigenden Konzentrationen des ADAM-10-spezifischen Inhibitors GI254023X inkubiert. Dargestellt ist die Western Blot Analyse für Met und α -Tubulin als Ladungskontrolle. Die densitometrische Analyse von Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt: n= 3 Western Blots; ohne DN30 ohne GI254023X: 100,0 %, mit DN30 ohne GI254023X: 42,7 % \pm 5,6 %; mit DN30 1 μ M GI254023X: 46,6 % \pm 12,8 %; mit DN30 3 μ M GI254023X: 81,8 % \pm 33,2 %; mit DN30 5 μ M GI254023X: 125,1 % \pm 28,2 %.

Somit konnte durch die Verwendung von Breitspektrum-Inhibitoren mit unterschiedlichen Inhibitionsspektren und einem spezifischen synthetischen Inhibitor sowie durch Verwendung der shRNA-Technologie ADAM-10 zweifelsfrei als *Sheddase* identifiziert werden, die die Met-reduzierenden Eigenschaften des Antikörpers DN30 vermittelt. Um die Eignung einer DN30-basierten anti-Met-Therapie gegen die metastasenfördernde Funktion von Hif-1 α zu überprüfen, muss im Folgenden geklärt werden, ob die DN30-induzierte Reduktion des Met-Signalweges auch von ADAM-10 vermittelt wird.

5.15 Vermittlung der DN30-induzierte Reduktion der Aktivierung des Met-Signalweges durch ADAM-10

Da ADAM-10 in den vorangegangenen Abschnitten als *Sheddase* des Met-Rezeptors identifiziert wurde, stellt sich nun die Frage ob ADAM-10 die therapeutische Wirkung des DN30 Antikörpers, die Reduktion des Met-Signalweges, vermittelt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden erneut GTL-16 Magenkarzinomzellen als Modellsystem verwendet. Neben ADAM-10 wurde auch ADAM-17 mittels shRNA-Technologie herunterreguliert (Abbildung 5.26). Die Zugabe von DN30 zur Kontrollzelllinie GTL16shNT *in vitro* führte zu einer starken Reduktion der Met-Phosphorylierung. So konnte nach 5-stündiger Inkubation nahezu keine Met-phosphorylierung mittels Western Blot Analyse mehr nachgewiesen werden. Ebenso war der Antikörper DN30 in der Lage, die Met-phosphorylierung in ADAM-17 *Knockdown* Zellen stark zu reduzieren (Abbildung 5.26). Einzig der *Knockdown* von ADAM-10 konnte die durch den Antikörper verursachte Reduktion der Met-Phosphorylierung verhindern (Abbildung 5.26).

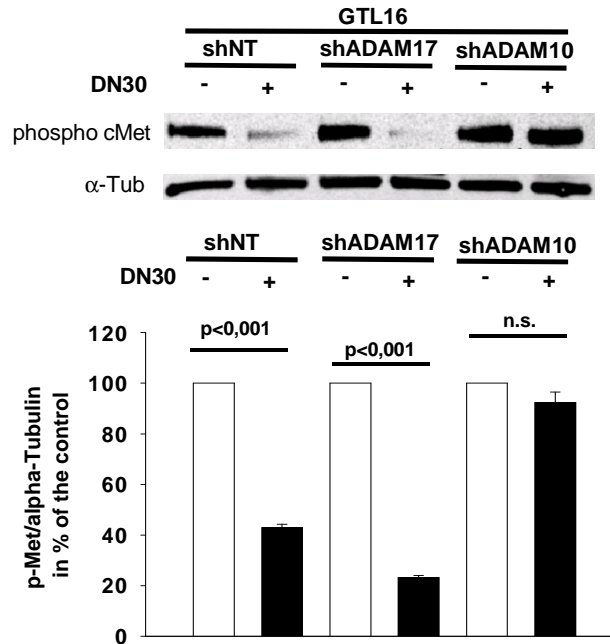


Abbildung 5.26: Verhinderung der DN30-induzierten Reduktion der Met-Phosphorylierung *in vitro* durch *Knockdown* von ADAM-10

Repräsentative Western Blot-Analyse der Met-Phosphorylierung in GTL-16 Zellen kultiviert mit oder ohne 80 μ g/ml DN30. α -Tubulin wurde als Ladungskontrolle benutzt. *Knockdown* Zelllinien (shADAM-17 und shADAM-10) sowie die shNT-Kontrollzelllinie wurden mittels shRNA-Technologie generiert. Dargestellt ist die Western Blot Analyse für phospho-Met sowie α -Tubulin als Ladungskontrolle. Die densitometrische Analyse von Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt: n= 3 Western Blots; GTL16shNT ohne DN30: 100,0 %, mit DN30: 42,9 % \pm 1,3 %; GTL16shADAM-17 ohne DN30: 100,0 %, mit DN30: 21,9 % \pm 0,9 %; GTL16shADAM-10 ohne DN30: 100,0 %, mit DN30: 97,1 % \pm 4,4 %.

Um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung des Met-Rezeptors in allen Zellen gleichermaßen durch den Antikörper herunterreguliert wurde oder ob nur einzelne Zellen betroffen waren, wurde der phosphorylierte Met-Rezeptor in GTL-16 Zellen immunzytochemisch angefärbt. Darüber hinaus sollte nochmals der zentrale Beitrag von ADAM-10 zur DN30-induzierten Reduktion des Met-Signalwegs überprüft werden. Wie Abbildung 5.26 zeigt, waren die phosphorylierten Met-Rezeptoren gleichmäßig über die Tumorzellpopulation verteilt (shNT-DN30). Die Zugabe von DN30 reduzierte den Gehalt von phosphorylierten Rezeptoren gleichmäßig in der gesamten Tumorzellpopulation. Durch den *Knockdown* von ADAM-10 konnte bei Abwesenheit von DN30 im Vergleich zur shNT-Kontrolle keine signifikante Änderung festgestellt werden. Einzig die Verteilung auf der Tumorzelloberfläche schien geändert zu sein. Im Gegensatz zur shNT-Kontrolle, bei der die Konzentration von Rezeptoren in bestimmten Bereichen konzentriert zu sein schien, waren in den ADAM-10 *Knockdown* Zellen die phosphorylierten Met-Rezeptoren über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Die Zuga-

be von DN30 zu ADAM-10-defizienten Zellen änderte den Gehalt an phosphorylierten Met-Rezeptoren nicht (Abbildung 5.27).

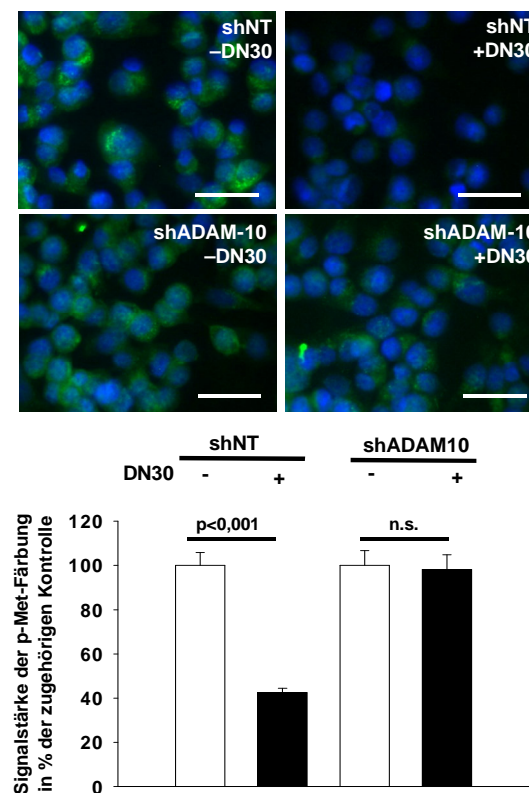


Abbildung 5.27: Immunzytochemische Analyse: Verhinderung der DN30-induzierten Verringerung der Met-phosphorylierung durch *Knockdown* von ADAM-10

Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der immunzytochemischen Analyse der Met-Phosphorylierung (grünes Signal) in GTL-16 Zellen kultiviert mit oder ohne 80µg/ml DN30. *Knockdown* Zelllinien (shADAM-10) sowie die shNT-Kontrollzelllinie wurden mittels shRNA-Technologie generiert. Gegenfärbung: DAPI (blaues Signal). Maßstabsbalken: 50µm. Densitometrische Analyse wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler Fluoreszenzintensität der phospho-Met-Färbung. GTL16shNT ohne DN30: 100,0 % ± 5,8 %, mit DN30: 42,5 % ± 2,0 %; GTL16shADAM-10 ohne DN30: 100,0 % ± 6,7 %, mit DN30: 98,2 % ± 6,6 %. *n* jeweils 15 Zellen.

Anschließend wurde mit der gleichen Analysemethode überprüft, ob analog zur Inhibition der DN30-induzierten Met-Reduktion auch die Reduktion der Met-phosphorylierung durch die endogenen Breitspektrum-inhibitoren TIMP-1 und TIMP-3 verhindert werden kann. Hierzu wurden GTL-16 Zellen *in vitro* kultiviert. Zugabe von DN30 reduzierte die Met-Phosphorylierung (Abbildung 5.28). Wurden die Zellen jedoch gleichzeitig mit dem endogenen Breitspektrum-inhibitor TIMP-1 inkubiert, so war der Antikörper DN30 nicht mehr in der Lage, die Phosphorylierung des Met-Rezeptors zu reduzieren (Abbildung 5.28). Ebenso verhinderte die Zugabe von TIMP-3 die durch den Antikörper DN30 ausgelöste Reduktion der

Met-Phosphorylierung. Zusammengefasst bestätigen diese Inhibitionsexperimente die zentrale Rolle der *Sheddase* ADAM-10 bei der DN30-verursachten Met Reduktion.

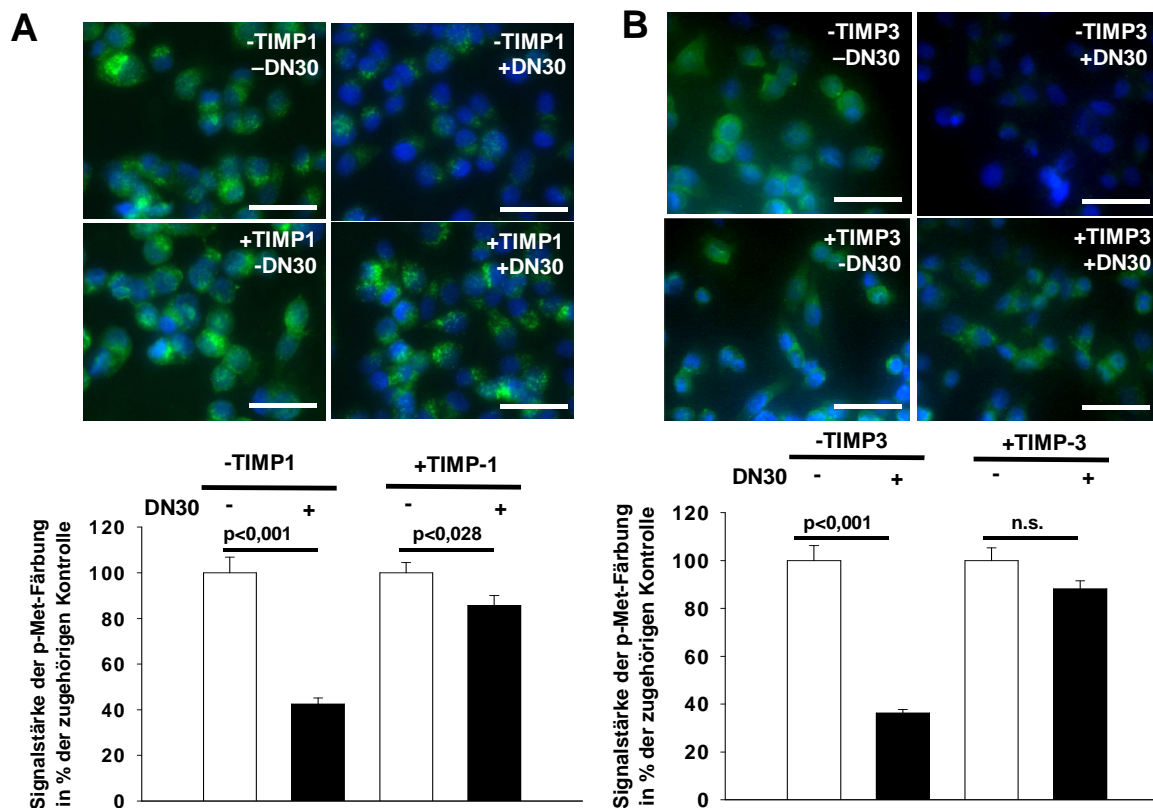


Abbildung 5.28: Immunzytochemische Analyse: Verhinderung der DN30-induzierte Verringerung der Met-phosphorylierung durch TIMP-1 und TIMP-3

Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der immunzytochemischen Analyse der Met-phosphorylierung (grünes Signal) in GTL-16 Zellen kultiviert mit oder ohne 80µg/ml DN30 sowie mit oder ohne 1 µg/ml TIMP-1 (A) bzw. 1 µg/ml TIMP-3 (B). Gegenfärbung: DAPI (blaues Signal). Maßstabsbalken: 50µm. Densitometrische Analyse wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler Fluoreszenzintensität der phospho-Met-Färbung. **A.** GTL16 ohne DN30 ohne TIMP-1: 100,0 % ± 6,9 %, mit DN30 ohne TIMP-1: 42,6 % ± 2,6 %; ohne DN30 mit TIMP-1: 100,0 % ± 4,4 %, mit DN30 mit TIMP-1: 85,6 % ± 4,3 %. *n* jeweils 15 Zellen. **B.** GTL16 ohne DN30 ohne TIMP-3: 100,0 % ± 6,3 %, mit DN30 ohne TIMP-3: 36,3 % ± 1,5 %; ohne DN30 mit TIMP-3: 100,0 % ± 5,3 %, mit DN30 mit TIMP-1: 88,2 % ± 3,4 %. *n* jeweils 15 Zellen.

5.16 Notwendigkeit von ADAM-10 für die DN30-verursachte Reduktion des HGF-induzierten Tumorzellscatterings

Die Bindung des Liganden HGF an den Met-Rezeptor ist der erste Schritt zur Auslösung einer komplexen Signalkaskade (Trusolino *et al.*, 2010). Nach HGF-Bindung und Dimerisierung zweier Met-Rezeptoren werden die Tyrosine Tyr 1234 und Tyr 1235 in der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors phosphoryliert (Trusolino *et al.*, 2010). Dies wiederum löst eine Transphosphorylierung und damit Aktivierung verschiedenster Signalmoleküle aus. Das daraufhin

initiierte genetische Programm wird als *Invasive growth program* bezeichnet (Boccaccio, Comoglio, 2006). Dieses komplexe genetische Programm löst die Mobilisierung von Tumorzellen aus und wird daher als zentraler Signalweg bei der Metastasierung angesehen. *In vitro* führt die Zugabe des Liganden HGF zum sogenannten *Tumorzellscattering*, d.h. die Tumorzellen lösen sich aus dem Zellverband und beginnen voneinander weg zu migrieren. Daher wird der Ligand HGF auch als *Scatterfactor* bezeichnet. Mithilfe des Antikörpers DN30 können die Met-Oberflächenlevels reduziert und auf diese Weise die Aktivierung des Met-Signalwegs verhindert werden. Letztendlich führt dies zur Reduktion des *Tumorzellscattering* und letztendlich zur Reduktion der Metastasierung (Petrelli *et al.*, 2006). Um zu überprüfen, ob die *Scattering*-inhibierende Eigenschaft des monoklonalen Antikörpers DN30 auch durch die *Sheddase* ADAM-10 vermittelt wird, wurde die Expression von ADAM-10 mittels lenti-viraler shRNA-Technologie reduziert und *in vitro* ein *Scatterassay* durchgeführt (Abbildung 5.29).

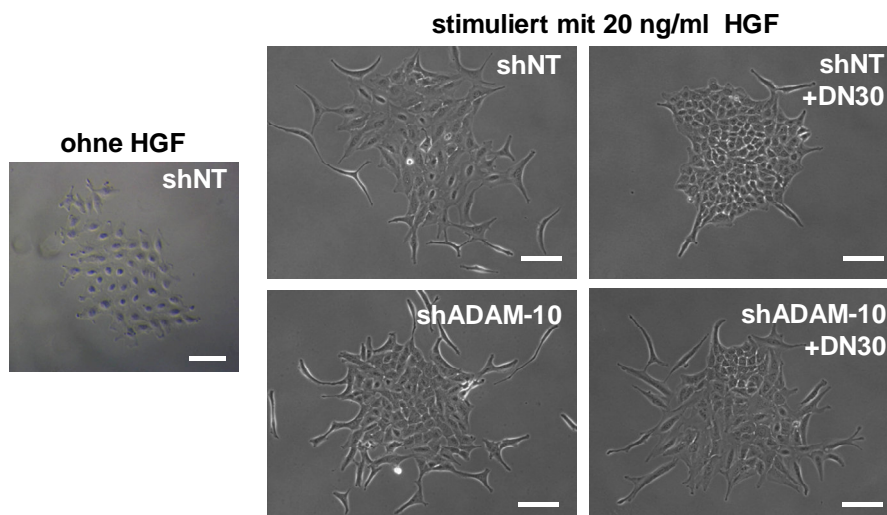


Abbildung 5.29: Notwendigkeit von ADAM-10 für die DN30-verursachten Reduktion des HGF-induzierten *Tumorzellscatterings*

Repräsentative mikroskopische Aufnahme von A549shNT bzw. shADAM-10 Zellen in Kultur. Die Tumorzellen wurden mit geringer Dichte ausgesät. Nach Koloniebildung wurden die Tumorzellen 5h mit oder ohne 80µg/ml DN30 inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe des Met-Liganden HGF (20ng/ml) das *Tumorzellscattering* induziert. Da ohne HGF-Stimulation kein Unterschied zwischen der ADAM-10 *Knockdown* Zelllinie sowie der shNT Kontrollzelllinie detektiert werden konnte, wurde exemplarisch ein Bild der A549shNT Zelllinie als Ausgangspunkt gezeigt.

Die Zugabe von HGF führte zur Lösung der A549 Tumorzellen aus dem Zellverband und zum *Scattering* der Tumorzellen (vgl. Abbildung 5.29: *ohne HGF* mit *shNT* stimuliert mit 20 ng/ml HGF). Ebenso konnte das *Tumorzellscattering* in ADAM-10 *Knockdown* Zellen durch

HGF induziert werden. Im Gegensatz dazu verhinderte die Zugabe des Antikörpers DN30 zur shNT-Kontrollzelllinie das HGF-induzierte *Tumorzellscattering*. (Abbildung 5.29, shNT+DN30). Dies war jedoch nicht der Fall in der ADAM-10 *Knockdown* Zelllinie. So war der Antikörper DN30 durch das Fehlen von ADAM-10 nicht mehr in der Lage, das HGF-induzierte *Tumorzellscattering* zu unterbinden (Abbildung 5.29, shADAM10+DN30).

5.17 Notwendigkeit von ADAM-10 für die DN30-verursachte Reduktion der HGF-induzierten Tumorzellinvasivität

Der HGF/Met-Signalweg wird letztendlich für die Mobilisierung von Tumorzellen und die Bildung von Metastasen verantwortlich gemacht. Der entscheidende Schritt ist hierbei die Überwindung der Basalmembran. Zugabe von HGF zu Tumorzellen *in vitro* erhöht die Fähigkeit der Tumorzellen, eine künstliche Basalmembran-artige Matrix zu durchbrechen. Dies kann durch den anti-Met-Antikörper DN30 verhindert werden (Petrelli *et al.*, 2006). Um zu überprüfen, ob ADAM-10 die Fähigkeit von DN30 vermittelt, die HGF-induzierte Invasion von Tumorzellen zu reduzieren, wurden A549 Zellen mit modulierter ADAM-10 Expression in einem Boyden-Chamber-Invasionsassay untersucht (Abbildung 5.30). Hierbei wurde die Invasivität der Tumorzellen durch Zugabe von HGF in die untere Kammer stimuliert. Die Zugabe von DN30 führte zu einer signifikanten Reduktion der HGF-induzierten Tumorzellinvasivität. Somit konnten die Ergebnisse von Petrelli *et al.* bestätigt werden. Wurde jedoch die Expression von ADAM-10 in den Tumorzellen durch shRNA-Technologie reduziert, so war der monoklonale Antikörper nicht mehr fähig, die HGF-induzierten Tumorzellinvasivität zu reduzieren (Abbildung 5.30).

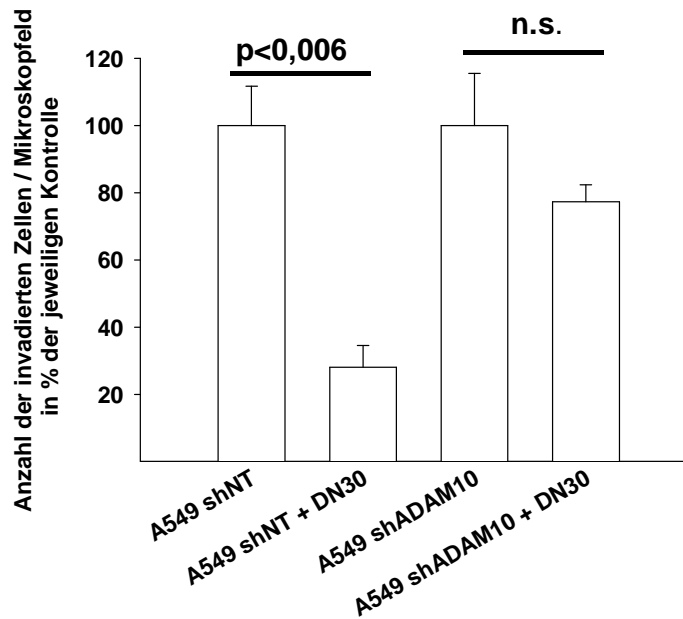


Abbildung 5.30: Notwendigkeit von ADAM-10 für die DN30-verursachte Inhibition der HGF-abhängigen Tumorzellinvasivität

Boyden-Chamber-Invasionsassay: A549-shNT bzw. shADAM-10 Tumorzellen wurden 5 h mit 80 µg/ml DN30 inkubiert und das invasive Potential *in vitro* in einem Boyden Chamber-Invasionsassay untersucht. Die Invasivität der Zellen wurde durch Zugabe von 20 ng/ml HGF in die untere Kammer des Invasionsassays stimuliert. Die Anzahl an invadierten Zellen wurde 24 h später analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler: A549-shNT: 100,0 % ± 20,2 %; A549-shNT + DN30: 28,1 % ± 11,1 %; A549-shADAM-10 100,0 % ± 27,0 %; A549-shADAM-10 + DN30 77,3 % ± 7,3 %. *n* = jeweils 3.

5.18 Induktion der ADAM-10 Expression in A549 Lungenkarzinomzellen durch den HIF-1-Signalweg

Da der Met Rezeptor eine zentrale Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen spielt und seine Expression maßgeblich durch den HIF-1-Signalweg verstärkt wird, wurde anschließend überprüft, ob die DN30-basierte Therapiestrategie gegen die im ersten Abschnitt beschriebene invasionsfördernde Rolle des HIF-1-Signalwegs in Frage kommt. Zuerst wurde überprüft, ob die Expression der verantwortlichen *Sheddase* ADAM-10 von HIF-1α negativ reguliert wird, da dies gegen einen Einsatz einer DN30-basierten Therapie sprechen würde. Hierzu wurde erneut das A549 Modellsystem verwendet. Um den HIF-1-Signalweg gezielt zu induzieren, wurden die Tumorzellen mit DFO inkubiert (Abbildung 5.31). In A549-shNT Tumorzellen konnte eine Verstärkung der ADAM-10 mRNA Expression beobachtet werden. Wurde die Induktion des HIF-1-Signalwegs durch das Fehlen von HIF-1α verhindert (A549-shHIF-1α (1) und (2)) konnte die Expression von ADAM-10 nicht mehr durch DFO verstärkt werden

(Abbildung 5.31). Dies zeigt, dass der HIF-1-Signalweg die Expression von ADAM-10 in A549 Zellen induziert.

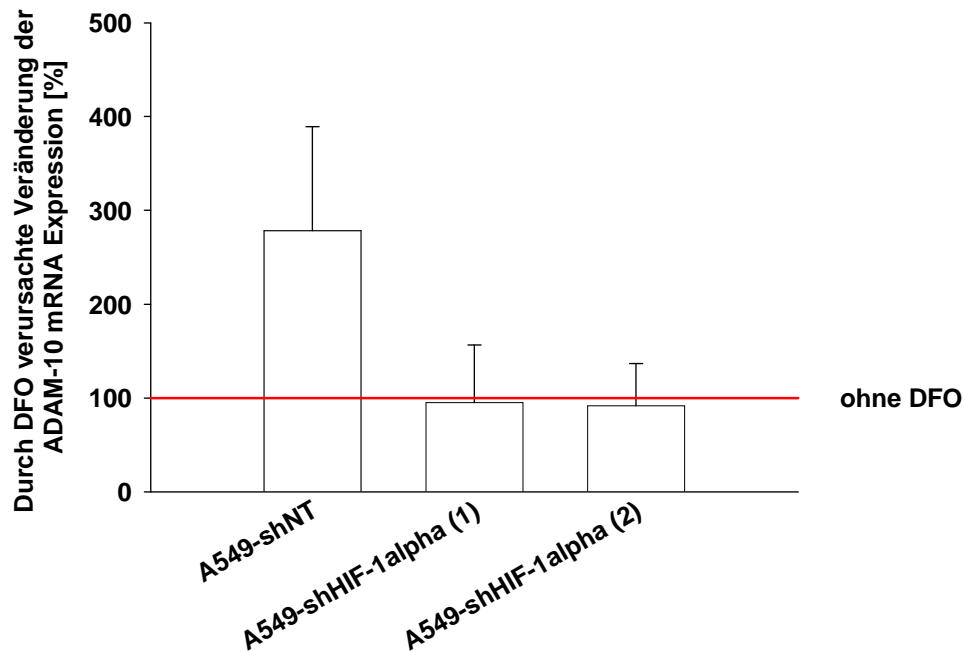


Abbildung 5.31: Induktion der ADAM-10 mRNA Expression in A549 Lungenkarzinomzellen durch den HIF-1-Signalweg

Die Aktivität des HIF-1-Signalwegs wurde in A549-shNT bzw. shHIF-1 α (1) und shHIF-1 α (2) Tumorzellen durch Inkubation mit 100 μ M DFO für 24 h induziert. ADAM-10 Expression wurde nur in den Kontrollzellen induziert.

5.19 Reduktion des Met-Signalwegs durch DN30 unter Hypoxie

Da durch die Hemmung des Met-Rezeptors indirekt die HIF-1 α vermittelte Invasivität der Tumorzellen reduziert werden soll und der HIF-1-Signalweg hauptsächlich unter hypoxischen Zuständen aktiviert ist, wurde abschließend überprüft, ob der monoklonale Antikörper DN30 auch unter solchen Zuständen (Hypoxie) die Met-Oberflächenlevel reduzieren kann. Hierzu wurden A549 Zellen 24 h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend mit 80 μ g/ml DN30 für 5 h behandelt (Abbildung 5.32). Da die Expression von ADAM-10, wie oben gezeigt, durch den HIF-1-Signalweg nicht negativ beeinflusst wird, sollte der Antikörper auch unter hypoxischen Bedingungen eine Met-Reduktion induzieren können. Die Zugabe des monoklonalen Antikörpers DN30 zu A549 Zellen *in vitro* bestätigte diese Hypothese. So wurde auch unter hypoxischen Bedingungen eine Reduktion der Met-Level durch den Antikörper DN30 beobachtet (Abbildung 5.32).

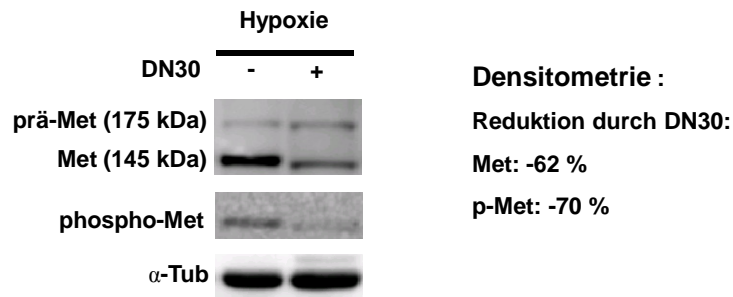


Abbildung 5.32: Reduktion der Met-Level sowie der Suszeptibilität von A549 Zellen gegenüber dem Met-Liganden HGF durch DN30 unter Hypoxie

Repräsentativer Western Blot: Humane A549 Lungenkarzinomzellen wurden 24 h unter Hypoxie kultiviert und anschließend 3 h mit 80 µg/ml DN30 inkubiert sowie 10 min mit 20 ng/ml HGF stimuliert. Angefärbt wurden der Met-Rezeptor, sowie die phosphorylierte Form des Rezeptors und als Ladungskontrolle α-Tubulin. Die densitometrische Analyse wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Normalisierung: α-Tubulin.

Um zu überprüfen, ob in gleichem Maße die Suszeptibilität der Tumorzellen gegenüber dem Met-Liganden HGF abnimmt, wurde die Aktivierung des Met-Rezeptors durch Zugabe von 20 ng/ml HGF induziert. Analog zu vorangegangenen Ergebnissen konnte der monoklonale Antikörper DN30 die Aktivierung (Phosphorylierung) der Met-Rezeptoren stark reduzieren (Abbildung 5.32).

5.20 Reduktion des HGF-induzierten Tumorzellscatterings durch DN30 unter Hypoxie

Da durch die Zugabe von DN30 auch unter Hypoxie die Met-Oberflächenlevel sowie die Suszeptibilität der Tumorzellen gegenüber HGF reduziert wurde, wurde abschließend überprüft, ob der Antikörper auch unter sauerstoffarmen Bedingungen das HGF-induzierte *Tumorzellscattering* inhibieren kann. Daher wurde ein *Scatterassay* unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Abbildung 5.33 zeigt, dass durch Zugabe des Antikörpers DN30 auch unter hypoxischen Bedingungen das HGF-induzierte *Tumorzellscattering* inhibiert wurde. Ebenso war auch unter Hypoxie ADAM-10 für die Inhibition des *Tumorzellscatterings* durch DN30 von Nöten, da durch das Fehlen von ADAM-10 der Antikörper DN30 nicht mehr in der Lage war, das HGF-induzierte *Tumorzellscattering* zu unterbinden (Abbildung 5.33).

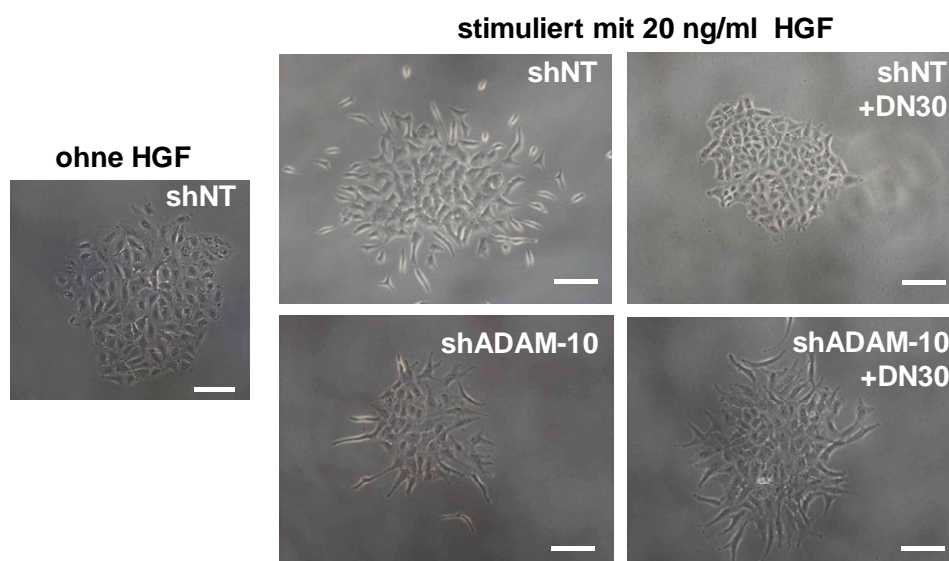


Abbildung 5.33: Inhibition des HGF-abhängigen *Tumorzellscatterings* unter Hypoxie durch DN30

Repräsentative mikroskopische Aufnahme von A549shNT bzw. shADAM-10 Zellen kultiviert unter Hypoxie. Die Tumorzellen wurden mit geringer Dichte ausgesät. Nach Koloniebildung wurden die Tumorzellen 5h mit oder ohne 80µg/ml DN30 unter Hypoxie (1% O₂) inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe des Met-Liganden HGF (20ng/ml) das *Tumorzellscattering* induziert. Neun h später wurde die Auswirkung des Met-Stimulierung dokumentiert. Da ohne HGF-Stimulation kein Unterschied zwischen der ADAM-10 *Knockdown* Zelllinie sowie der shNT Kontrollzelllinie detektiert werden konnte, wurde exemplarisch ein Bild der A549shNT Zelllinie als Ausgangspunkt gezeigt.

6 Diskussion

6.1 HIF-1 fördert die Metastasierung unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein direkter metastasenfördernder Einfluss des Transkriptionsfaktors HIF-1 nachgewiesen werden, der nicht durch die Zellüberleben-sichernde Funktion des HIF-1-Signalwegs vermittelt wird.

In den letzten Jahren wurden erste Hinweise auf einen direkten Einfluss des Transkriptionsfaktors HIF-1 auf das metastatische Potential von Tumorzellen, unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion, gefunden. Jedoch konnte diese Frage nicht abschließend geklärt werden, wie Bertout *et al.* (Bertout *et al.*, 2008) und Ruan *et al.* (Ruan *et al.*, 2009) in ihren Reviews hervorhoben. Bertout *et al.* sprechen daher sogar von einem unerwarteten Einfluss von HIF-1 α auf das metastatische Potential von Tumorzellen. Die Schwierigkeit der Beantwortung dieser Frage erwächst aus der Abhängigkeit vieler Tumorzelllinien vom HIF-1-Signalweg zum Überleben unter hypoxischen Stresssituationen. Daher führt ein Ausschalten des HIF-1-Signalwegs in diesen Tumorzellen zu einem reduzierten Überleben der Tumorzellen unter zwangsläufig auftretenden Stresssituationen *in vivo* (Carmeliet *et al.*, 1998; Hosokawa, Asaka, *et al.*, 2001; Chen, Yu, 2009). Obgleich vermutet, konnte deshalb bisher ein möglicher Einfluss von HIF-1 α auf das metastatische Potential von Tumorzellen nicht gezeigt werden, da dieser von der Zellüberleben-sichernden Funktion des HIF-1-Signalwegs überlagert wird. Da sich die in dieser Arbeit verwendeten hoch-aggressiven L-CI.5s Tumorzellen als unabhängig vom HIF-1-Signalweg zur Sicherung des Zellüberlebens erwiesen, konnte erstmals ein direkter Einfluss des HIF-1-Signalwegs auf das metastatische Potential von Tumorzellen *in vivo* in einem immunkompetenten, *syngen*en Modellsystem nachgewiesen werden.

Bereits seit längerem ist bekannt, dass der HIF-1-Signalweg eine zentrale Rolle in der Adaptation an Stresssituationen wie Sauerstoffmangel einnimmt (Gatenby, Gillies, 2004). Jedoch legen die Ergebnisse einiger Studien nahe, dass der HIF-1-Signalweg nicht nur die Anpassung von Tumorzellen an ungünstige Mikroumgebungen regelt, sondern auch das invasive Potential von Tumorzellen direkt beeinflusst (Krishnamachary *et al.*, 2003; Victor *et al.*, 2006; Fujiwara *et al.*, 2007) und damit ein wichtiges Merkmal von Tumorzellen (Hanahan, Weinberg, 2000) maßgeblich beeinflussen würde. Bei genauer Betrachtung der Studienergebnisse fällt jedoch auf, dass die Reduktion der Invasivität *in vitro* auch auf ein reduziertes Überleben der Tumorzellen zurückzuführen sein könnte, da im Gegensatz zu Fujiwara *et al.* weder

Krishnamachary *et al.* noch Victor *et al.* die Zellüberleben-sichernde Funktion von HIF-1 α in ihren Experimenten berücksichtigten. Jedoch konnten auch Fujiwara und Kollegen die aufgeworfene Frage nicht klären, da in ihrem verwendeten Zellsystem die Invasivität im gleichen Maße wie die Migration reduziert war und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass das reduzierte invasive Potential der Tumorzellen auf die reduzierte migratorische Aktivität zurückzuführen ist. Somit konnten auch Fujiwara *et al.* keine abschließende Aussage über den Einfluss von HIF-1 α auf das metastatische Potential von Tumorzellen machen.

Betrachtet man die bisherigen Hinweise auf eine metastasenfördernde Rolle von HIF-1 α , die unter Verwendung von *in vivo* Modellen gewonnen wurden, so stellt man auch hier fest, dass sich ähnliche Probleme wie bei oben beschriebenen *in vitro* Studien ergeben. Sowohl Liao *et al.*, als auch Hiraga *et al.* und Dikmen *et al.* beschrieben einen möglichen Einfluss von HIF-1 α auf das metastatische Potential von Tumorzellen (Liao *et al.*, 2007; Hiraga *et al.*, 2007; Dikmen *et al.*, 2008). Jedoch konnte in keiner dieser Studien die Frage nach einem direkten Einfluss von HIF-1 α auf das metastatische Potential abschließend geklärt werden, da sich alle Ergebnisse auch durch ein reduziertes Zellüberleben nach Ausschalten des HIF-1-Signalwegs erklären lassen. So fanden z.B. Dikmen *et al.*, dass eine Inhibition des HIF-1-Signalwegs durch den Inhibitor RX-0047 zu einer Reduktion von Lungenmetastasen nach intravenöser Inokulation von humanen Lungenkarzinomzellen führte (Dikmen *et al.*, 2008). Sie beobachteten jedoch nach Absetzen des Inhibitors ein erneutes Auswachsen von Lungenmetastasen, was auf eine Wachstums-inhibierende Wirkung von RX-0047 hinweist und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass die beobachtete Reduktion der Metastasierung auf das Ausschalten der Zellüberleben-sichernden Funktion von HIF-1 zurückzuführen ist. Die Probleme der vorangegangenen Studien zeigen, dass ein möglicher Einfluss des HIF-1-Signalwegs auf das metastatische Potential von Tumorzellen nur unter Verwendung eines geeigneten Modells nachgewiesen werden kann. In diesem Modell dürfen die Tumorzellen zum einen nicht auf den HIF-1-Signalweg zur Sicherung des Zellüberlebens angewiesen sein, zum anderen sollte das Modell den Prozess der Metastasierung möglichst genau abbilden und durch eine möglichst exakte Quantifizierung der Metastasierung eine Beurteilung des Einflusses von HIF-1 α auf das metastatische Potential zulassen. Da die Bildung von Metastasen auf einigen wenigen Zellen mit besonders hohem metastatischem Potential in der heterogenen Tumorzellpopulation des Primärtumors zu beruhen scheint (Nguyen, 2011) und L-CI.5s Tumorzellen dieses Potential besitzen (Krüger *et al.*, 1994a; Gerg *et al.*, 2008), sollte sich dieses Modell besonders eignen, um einen eventuellen direkten Einfluss von HIF-1 auf das metastatische Potential von Tumorzellen nachzuweisen. Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorzelllinien, die auf den

HIF-1-Signalweg zur Sicherung des Überlebens unter hypoxischen Zuständen angewiesen sind (Carmeliet *et al.*, 1998; Hosokawa, Asaka, *et al.*, 2001; Chen, Yu, 2009) (vgl. auch die in dieser Arbeit verwendeten CT-26L Kolonkarzinomzellen), stellte sich heraus, dass das Überleben von L-CI.5s Tumorzellen unter Hypoxie nicht vom HIF-1-Signalweg abhängt.

Im Hinblick auf das invasive Verhalten von L-CI.5s Tumorzellen *in vitro* waren L-CI.5s Tumorzellen absolut vergleichbar zu anderen Tumorzellen, die nach Ausschalten des Hif-1-Signalwegs eine reduzierte Invasivität unter hypoxischen Bedingungen *in vitro* zeigen (Krishnamachary *et al.*, 2003; Victor *et al.*, 2006). L-CI.5s Tumorzellen zeigten ebenso wie Tumorzellen in anderen Modellen (Liao *et al.*, 2007) eine Reduktion der Metastasenbildung ausgehend vom Primärtumor nach Ausschalten des Hif-1-Signalwegs. Im Gegensatz zum von Liao *et al.* verwendeten Modell wirkte sich das Fehlen von Hif-1 α jedoch weder auf das Anwachsen des Primärtumors noch auf das Tumorwachstum aus. Somit scheinen L-CI.5s Tumorzellen auch *in vivo* zur Sicherung des Zellüberlebens nicht auf Hif-1 α angewiesen zu sein. Diese Ergebnisse konnten auch nach intravenöser Inokulation von L-CI.5s Tumorzellen in der Leber bestätigt werden, da sich das Fehlen von Tumorzell-Hif-1 α weder auf die Proliferation noch auf die Apoptose in Lebermetastasen auswirkte. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Reduktion der experimentellen Metastasierung auf ein reduziertes Überleben der Tumorzellen nach Hif-1 α *Knockdown* zurückzuführen war. Somit konnte erstmals in einem immunkompetenten Modell *in vivo* gezeigt werden, dass Hif-1 α das metastatische Potential direkt, also unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion beeinflusst.

Interessanterweise konnte im L-CI.5s Modell eine Korrelation des Auftretens von nekrotischen Metastasen und der Induktion der sekundären Invasion beobachtet werden (Schelter, 2007; Gerg *et al.*, 2008). Da wie in dieser Arbeit gezeigt, hypoxische Zustände in etablierten Lebermetastasen auftreten und dies mit der Aktivierung des Hif-Signalwegs in Metastasen korreliert (Schelter, 2007), liegt der Verdacht nahe, dass Tumorzellen auf diese Stresssituationen mit Flucht reagieren und dass dieser Mechanismus durch den Hif-1-Signalweg reguliert wird. Das Ausbleiben der sekundären Invasion nach Ausschalten des Hif-1-Signalwegs in L-CI.5s Zellen zeigt deutlich, dass der Hif-1-Signalweg tatsächlich die Flucht von Tumorzellen vor Stress in Form von Hypoxie induziert. Diese Ergebnisse können erklären, warum ein höherer Grad an Hypoxie im Primärtumor mit einer schlechten Prognose für Krebspatienten korreliert (Brizel *et al.*, 1996; Hockel *et al.*, 1996; Brizel *et al.*, 1997).

6.2 Pro-metastatische HIF-1-regulierte Mechanismen

6.2.1 Der HIF-1-Signalweg reguliert die Expression der pro-metastatischen Protease MMP-9

Interessanterweise korrelierte die Expression von Hif-1 α und Ca9, einem bekannten Zielgen des Hif-1-Signalwegs (Wykoff *et al.*, 2000), mit der invasionsfördernden Protease Mmp-9 (Björklund, Koivunen, 2005; Gerg *et al.*, 2008) während der frühen Phasen der Leberkolonisierung. Konsequenterweise führte das Ausschalten des Hif-1-Signalwegs zur Reduktion der Fähigkeit der Tumorzellen sich in der Leber festzusetzen. Ebenso war die Expression von Hif-1 α von Tag 7 bis 9, der Phase der sekundären Invasion, erhöht (Schelter, 2007) und korrelierte mit der Expression der pro-invasiven Protease Mmp-9 (Gerg *et al.*, 2008). Durch Ausschalten des Hif-1-Signalwegs in den Tumorzellen konnte keine sekundäre Invasion ausgehend von etablierten Metastasen mehr beobachtet werden. Da Gerg *et al.* im L-CI.5s Modell den gleichen Effekt nach *Knockdown* der Protease Mmp-9 beobachten konnten, liegt der Verdacht nahe, dass zumindest ein Teil der metastasenfördernden Eigenschaften von Hif-1 α über die Gelatinase Mmp-9 vermittelt wird. Zum einen konnte dies durch die reduzierten gelatino-lytische Aktivität *in vivo* sowohl im L-CI.5s-Modell im Primärtumor und in Lebermetastasen als auch im CT-26L-Modell in Lungenmetastasen bestätigt werden. Da dieser Effekt in drei verschiedenen Mikroumgebungen *in vivo* zu beobachten war, ist anzunehmen, dass die Reduktion der Aktivität der Gelatinasen auf die Regulation durch Tumorzell-Hif-1 α zurückzuführen ist. Funktionelle Studien *in vitro* in L-CI.5s Tumorzellen konnten dies bestätigen, da die Aktivierung des HIF-1-Signalwegs durch DFO zu einer starken Aktivierung des Mmp-9 Promotors führte, die durch den *Knockdown* von Hif-1 α verhindert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die pro-invasive Gelatinase Mmp-9 durch den Hif-1-Signalweg reguliert wird. Da jedoch im MMP-9 Promotor keine HREs vorhanden sind, scheint die Regulation indirekt abzulaufen. Eine Möglichkeit ist die Ansteuerung des MMP-9 Promotors durch den HIF-1-Signalweg-nachgeschalteten Met-Signalweg (Harvey *et al.*, 2000).

Ebenso scheint auch die zweite Gelatinase Mmp-2 eine Rolle bei der metastasenfördernden Eigenschaft von Hif-1 α zu spielen. Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass die Expression der Gelatinase MMP-2 durch der HIF-1-Signalweg reguliert wird (Shyu *et al.*, 2007). Interessanterweise beschrieben Gerg *et al.*, dass das Fehlen von Mmp-2 in L-CI.5s Zellen das Auswachsen von Lebermetastasen beeinträchtigt (Gerg *et al.*, 2008). Der in dieser Arbeit gezeigte Einfluss von Hif-1 α auf das Auswachsen von Lebermetastasen ist somit höchstwahrscheinlich auf einer Reduktion der Expression und Aktivität von Mmp-2 zurückzuführen.

6.2.2 Der HIF-1-Signalweg reguliert die Aktivität des Met-Signalwegs

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass der für die Metastasierung zentrale Met-Signalweg wie von Pennacchietti *et al.* beschrieben (Pennacchietti *et al.*, 2003), durch den HIF-1-Signalweg reguliert wird. So wurde nach *Knockdown* von Hif-1 α in L-CI.5s Tumorzellen eine starke Reduktion der Met-Signalwegsaktivierung (Phosphorylierung des Met-Rezeptors) in Lebermetastasen beobachtet. Gleichzeitig war die sekundäre Invasion von Tumorzellen ins umliegende Parenchym stark reduziert. Der gleiche Effekt konnte auch durch den *Knockdown* von Met in L-CI.5s Tumorzellen beobachtet werden (Schelter *et al.*, 2011). Hier führte der *Knockdown* von Met zu einer reduzierten Aktivität des Met-Rezeptors in Lebermetastasen und konsequenterweise zu einer Reduktion des *Tumorzellscatterings* ausgehend von etablierten Metastasen (Schelter *et al.*, 2011).

Da die Expression von MMP-9 durch den Met-Signalweg induziert werden kann (Harvey *et al.*, 2000), scheint es wahrscheinlich, dass *in vivo* die Expression von MMP-9 sowohl durch HIF-1 direkt als auch durch die HIF-1-abhängige verstärkte Aktivierung des Met-Signalwegs induziert wird. Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Met-Signalweg und der Mmp-9 Expression ist, dass durch das Ausschalten des Met-Signalwegs in L-CI.5s Tumorzellen die gelatinolytische Aktivität in Lebermetastasen reduziert wird (Bäumler, 2007).

Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle, die der Met Signalweg bei der metastasenfördernden Funktion von HIF-1 α einnimmt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Mechanismen sind in Abbildung 6.1 zusammengefasst. So konnte hier gezeigt werden, dass der HIF-1-Signalweg das invasive Potential direkt, unabhängig von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion über die Expression von Proteasen (insbesondere MMP-9 und -2) sowie über den bei der Metastasierung zentralen Met-Signalweg beeinflusst.

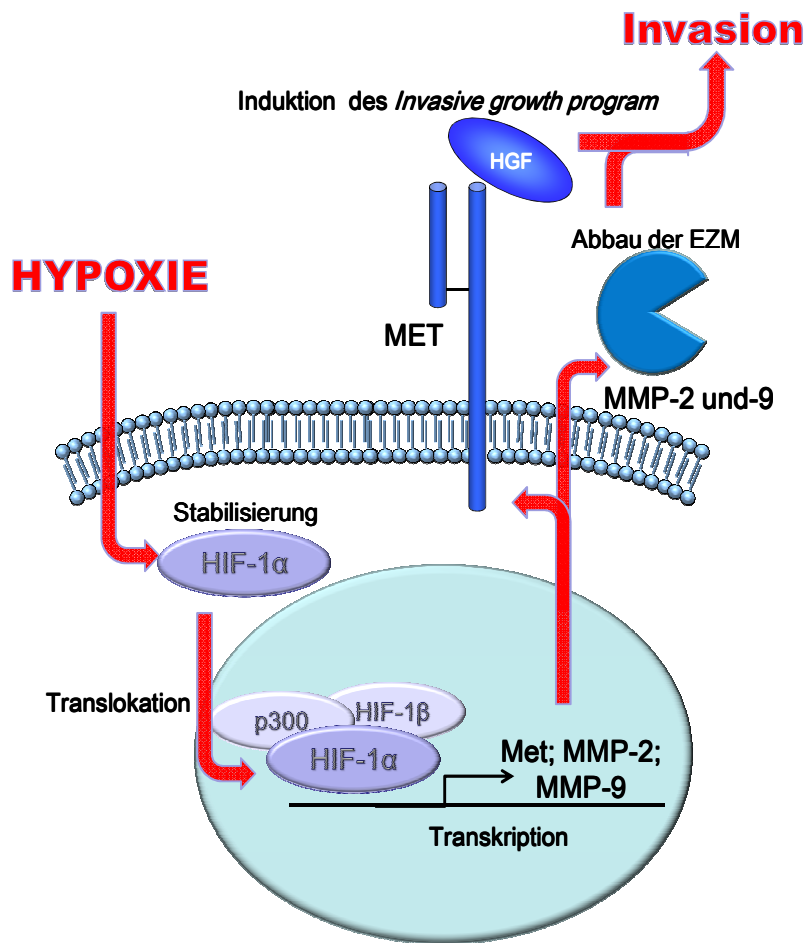


Abbildung 6.1: Einfluss von HIF-1 auf das invasive Potential

Stress in Form von Hypoxie führt zur Stabilisierung von HIF-1- α auf Proteinebene und zu einer Translokation in den Nukleus, wo HIF-1 α gemeinsam mit HIF-1 β und Ko-aktivatoren wie p300 an HREs bindet und die Expression von Met, MMP-2 und -9 induziert. Durch diese verstärkte Expression wird der Abbau der Extrazellulären Matrix (EZM) verstärkt und das *Invasive growth program* durch verstärkte Aktivität des Met-Signalwegs induziert. Auf diese Weise wirkt HIF-1 einen von seiner Zellüberleben-sichernden Funktion unabhängigen Einfluss auf das invasive Potential von Tumorzellen aus.

6.2.3 Der HIF-1-Signalweg als Sensor für Veränderungen im Protease-Netz – Konsequenzen für die prometastatische Nische

Im Jahr 2007 beschrieben Kopitz *et al.* erstmals, dass hohe Level des endogenen Breitspektrum-inhibitors der Matrix-Metalloproteinasen TIMP-1 die Suszeptibilität der Leber gegenüber zirkulierenden Tumorzellen erhöht (Kopitz *et al.*, 2007). Dieses Ungleichgewicht im Protease-Netz führte zu einer Aktivierung des Met-Signalwegs in der Leber und der Induktion einer prometastatischen Genexpressionssignatur (Kopitz *et al.*, 2007). Bei der Aufdeckung des dahinterstehenden Mechanismus fokussierten sich Kopitz *et al.* vor allem auf die Wirtseite. So schlugen sie vor, dass durch die Inhibition der membranständigen *Sheddase* ADAM-10 durch TIMP-1 das *Shedding* des Met-Rezeptors unterbleibt und es somit zu einer Aktivierung des Met-Signalwegs kommt. Dies scheint vor allem auch durch eine gleichzeitige Infiltration von Neutrophilen Granulozyten (Schrözlmaier *et al.*, 2010) verstärkt zu werden,

die unter anderem HGF, den Liganden des Met-Rezeptors, durch Degranulation freisetzen können (Grenier *et al.*, 2002).

Interessanterweise reichen bereits hohe Level an TIMP-1 *in vitro* in der Mikroumgebung von L-CI.5s Tumorzellen aus, um den HIF-1-Signalweg unabhängig vom umgebenden Sauerstoffpartialdruck zu induzieren (Halbgewachs, 2010; Schelter *et al.*, 2011). Durch Zugabe von HGF kann die Invasivität von L-CI.5s in diesem experimentellen Aufbau gesteigert werden (Schelter *et al.*, 2011). Dieser Effekt tritt nicht mehr auf, wenn die Induktion des Hif-1-Signalwegs durch den *Knockdown* der regulativen α -Untereinheit verhindert wird (Schelter *et al.*, 2011). Gleiches gilt für die Situation *in vivo* (Halbgewachs, 2010). Diese Ergebnisse unterstreichen somit erneut die oben beschriebene zentrale Rolle des Met-Signalwegs bei der metastasenfördernden Funktion des HIF-1-Signalwegs. Ferner geben sie einen neuen Einblick in die Biologie der TIMP-1-induzierten prometastatischen Nische. So kommt es nicht nur auf Veränderungen in der Mikroumgebung von Organen an, sondern mindestens ebenso wichtig scheint die Fähigkeit von Tumorzellen zu sein, auf diese Veränderungen zu reagieren um diese nutzen zu können. Im Falle der prometastatischen Nische, die durch erhöhte Spiegel an TIMP-1 in der Leber induziert wird, ist dies der HIF-1-Signalweg, der den Tumorzellen einen entscheidenden Vorteil verschafft (Halbgewachs, 2010; Schelter *et al.*, 2011).

6.3 HIF-1 – ein riskantes therapeutisches Ziel

Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Adaption von Tumorzellen an ungünstige Mikroumgebungen und seiner daraus resultierenden zentralen Rolle bei der Sicherung des Zellüberlebens, wird der HIF-1-Signalweg häufig als ideales Ziel einer Anti-Krebs-Therapie angesehen (Semenza, 2003; Semenza, 2009). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des direkten Einflusses von HIF-1 auf das invasive Potential von Tumorzellen führen in Versuchung, diese These zu unterstützen. Bei genauerer Betrachtung gibt es jedoch durchaus zahlreiche Gründe, die gegen eine direkte therapeutische Intervention gegen HIF-1 sprechen: So spielen alle HIFs eine wichtige Rolle bei der Regulation von Stammzeleigenschaften (Mazumdar *et al.*, 2009). Seit längerem ist bekannt, dass sich Stammzellnischen häufig durch einen geringen Sauerstoffpartialdruck auszeichnen (Mazumdar *et al.*, 2009; Li, Rich, 2010). Folglich wird den sauerstoffabhängigen HIF-Signalwegen eine wichtige Rolle in der Stammzellbiologie zugeschrieben. So ist z. B. vor allem HIF-1 α für die Hypoxie-induzierte Mobilisierung von mesenchymalen Stammzellen von zentraler Bedeutung (Liu *et al.*, 2011). Daher

ist es auch nicht verwunderlich, dass die höchsten Expressionen von HIF-1 α in Stammzellpopulationen detektiert wurden.

Neben der Regulation von Stammzeleigenschaften besitzt der HIF-1-Signalweg noch wichtige Funktionen im Bereich des Immunsystems (Imtiyaz, Simon, 2010). So wird zum Beispiel die entzündliche Antwortreaktion von HIF-1 α reguliert (Cramer *et al.*, 2003). Das Fehlen von HIF-1 α führte daher in Neutrophilen Granulozyten zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion *in vivo* (Cramer *et al.*, 2003). Da Zellen wie Neutrophile Granulozyten oder Makrophagozyten häufig in ungünstigen Mikroumgebungen wie z.B. Wunden, die durch einen geringen Sauerstoffpartialdruck, eine geringe Nährstoffverfügung und Azidose geprägt sind, operieren müssen, verwundert es nicht, dass der HIF-1-Signalweg bei der Regulation dieser Zellen eine wichtige Rolle einnimmt (Strieter, 2003). Vor allem im Hinblick auf die häufig geschwächten Abwehrkräfte von Krebspatienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Shimizu *et al.*, 2005) erscheint eine Hemmung von HIF-1 und einer damit einhergehenden Schwächung der innate Immunantwort als wenig sinnvoll.

Betrachtet man die von HIF-1-regulierten Gene und Prozesse, so stellt man fest, dass der HIF-1-Signalweg einer der zentralen Regulatoren der Angiogenese ist. Hierbei übt HIF-1 seinen Einfluss über die transkriptionale Regulation von VEGF aus. Zwar gehen viele Forscher davon aus, dass eine Inhibition der Angiogenese eine Erfolg versprechende Strategie im Kampf gegen Krebserkrankungen darstellt (Cook, Figg, 2010), jedoch blieben durchschlagende Erfolge bisher aus (Cai *et al.*, 2011). Ein möglicher Grund könnte sein, dass sich anti-angiogene Therapien zwar negativ auf das Primärtumorwachstum auswirken, gleichermaßen aber das Vorkommen von hypoxischen Bedingungen fördern. Auf diese Weise setzen sie die heterogene Tumorzellpopulation einem Selektionsdruck aus. Dieser könnte im Sinne Darwins zu Subpopulationen führen, die besonders aggressiv sind und den ungünstigen Bedingungen im Primärtumor mit „Flucht“ begegnen. Da sich aggressive Tumorzellen vor allem durch ihre Fähigkeit nach Absiedlung vom Primärtumor erfolgreich Metastasen zu bilden auszeichnen, würde die Erhöhung des Selektionsdrucks im Primärtumor letztendlich die Progression von malignen Krebserkrankungen fördern. Erste Hinweise auf ein solches Szenario wurden bereits geliefert. So konnte die Gruppe um den Onkologen und Mathematiker Robert Gatenby zeigen, dass eine Erhöhung des Selektionsdruckes durch Gabe klinikrelevanter Mengen an Chemotherapeutika zu einer Regression von Tumoren im Mausmodell führte (Gatenby *et al.*, 2009). Jedoch kam es nach einem Rückfall zu einer beschleunigten Progression einhergehend mit verstärkter Metastasenbildung und somit zu einem frühen Tod der Versuchstiere. Im Gegensatz dazu führte die moderate Behandlung mit Dosierungen, die den Primärtumor nicht

zurückdrängen, sondern nur das weitere Auswachsen verhindern zu einem verlängerten Überleben der Versuchstiere. Daher fordert Gatenby ein Umdenken in der Behandlung von Krebserkrankungen: Ziel sollte es nicht mehr sein den Patienten zu heilen, sondern die Erkrankung vielmehr in eine chronische Form zu überführen und den Patienten so ein längeres Leben zu ermöglichen (Gatenby, 2009).

Ebenso schlägt Paolo Michieli vor Abstand von anti-angiogenen Therapien zu nehmen, um den Selektionsdruck auf die Tumorzellpopulation nicht zu erhöhen. So beschreibt er, dass immer mehr klinische und experimentelle Studien auf einen negativen Effekt bezüglich der Tumorprogression hinweisen (Michieli, 2009). So wird zwar häufig die Primärtumorgröße reduziert, aber es kommt auch auffallend häufig zu Rückfällen, die sich oft durch eine aggressivere Tumorzellpopulation auszeichnen (Michieli, 2009). Durch Überexpression von Myoglobin in Tumorzellen, einem intrazellulärem Sauerstoffspeicher, der hauptsächlich in Muskelzellen vorkommt (Fordel *et al.*, 2004), wurde die Tumoroxygenierung verbessert und der hypoxische Stress für Tumorzellen reduziert (Galluzzo *et al.*, 2009). Interessanterweise kam es dadurch zu einer signifikanten Reduktion der Metastasierung (Galluzzo *et al.*, 2009). Die Erkenntnisse dieser Arbeit deuten in eine ähnliche Richtung. Da HIF-1 α das metastatische Potential direkt erhöht und der HIF-1-Signalweg durch Hypoxie induziert wird, scheint es nur folgerichtig, dass eine Verbesserung der Tumoroxygenierung die Metastasierung reduzieren kann.

6.4 HIF-1-nachgeschaltete Moleküle als therapeutische Interventionsmöglichkeiten

Aufgrund obiger Ausführungen erscheint eine gegen HIF-1 gerichtete Therapie als zu riskant weshalb HIF-1 selbst nicht als Zielmolekül einer therapeutischen Intervention in Betracht gezogen werden sollte. Vielmehr müssen daher HIF-1-regulierte Gene bzw. Signalwege in den Fokus rücken, die die prometastatische Wirkung von HIF-1 vermitteln.

6.4.1 Kritische Bewertung der HIF-1-nachgeschalteten Gelatinasen MMP-2 und -9 als therapeutische Interventionsmöglichkeiten

Da die Gelatinasen MMP-2 und -9 eine wichtigen Rolle bei der Invasivität von Tumorzellen einnehmen und beide wie hier für MMP-9 gezeigt und für MMP-2 schon bekannt (Shyu *et al.*, 2007) vom HIF-1-Signalweg reguliert werden, kommen beide als Zielmoleküle in Frage. Aufgrund des Scheiterns von Proteaseinhibitoren erster Generation in der Klinik und den darauf folgenden Forschungen, die ein komplexes, die Gewebemöostase regelndes Zusam-

menspiel von Proteasen, Inhibitoren und Substraten aufdeckten ((Overall, Dean, 2006); siehe auch: (Krüger, 2009; Krüger *et al.*, 2010)), sollte bei der Anwendung von Proteaseinhibitoren äußerst vorsichtig vorgegangen werden (Krüger *et al.*, 2010). Zwar scheinen hochspezifische Inhibitoren ein geringeres Risiko aufzuweisen (Arlt *et al.*, 2002; Krüger *et al.*, 2005), dennoch ist durchaus vorstellbar, dass eine Inhibition der Gelatinasen gleichzeitig auch zu einer Inhibition der Angiogenese und somit wieder zu einer Erhöhung des Selektionsdrucks führen würde, da beide Proteasen auch eine wichtige Rolle bei der Neubildung von Blutgefäßen spielen (Sounni *et al.*, 2003; van Hinsbergh *et al.*, 2006).

6.4.2 Der Met-Signalweg als vielversprechendes Ziel einer gegen den HIF-1-Signalweg gerichteten Therapie

Eine durchaus vielversprechende Möglichkeit ist die Inhibition des Met-Signalwegs, da der Met-Signalweg auf transkriptionaler Ebene durch HIF-1 reguliert wird (Pennacchiotti *et al.*, 2003). Ferner wurden aufgrund seiner zentrale Rolle bei der Metastasierung (Boccaccio, Comoglio, 2006; Trusolino *et al.*, 2010) in den letzten Jahren bereits enorme Anstrengungen unternommen, um gegen den Met-Signalweg gerichtete Therapien zu entwickeln (Stella *et al.*, 2010; Cañadas *et al.*, 2010). Aufgrund ihrer hohen Spezifität sind Antikörper-basierte Anti-Met Therapien im Fokus der Entwicklung (Stella *et al.*, 2010). Eine der vielversprechendsten Ansätze ist der monoklonale Antikörper DN30, der durch seine hohe Spezifität geringe Nebenwirkungen erwarten lässt (Petrelli *et al.*, 2006).

Um die Eignung des monoklonalen Antikörpers als therapeutische Intervention bezüglich des HIF-1-Signalwegs beurteilen zu können, musste zuerst der dahinterstehende Mechanismus näher charakterisiert werden.

Die Beobachtung, dass das DN30-induzierte Met-Rezeptor-*Shedding* durch PMA, einem Aktivator der ADAM Proteasen (Amour *et al.*, 1998; Kohutek *et al.*, 2009), verstärkt wurde, deutete auf eine Beteiligung von ADAM Proteasen hin. Zwei Proteasen dieser Familie, ADAM-10 und ADAM-17 sind bekannt für ihr überlappendes Substratspektrum (Amour *et al.*, 1998; Hikita *et al.*, 2009; Le Gall *et al.*, 2009) zu dem auch der Met-Rezeptor gehört (Kopitz *et al.*, 2007; Foveau *et al.*, 2009). Durch spezifischen *Knockdown* von ADAM-10 und ADAM-17 konnte in dieser Arbeit zweifelsfrei ADAM-10 als verantwortliche *Sheddase* der DN30-induzierten Met-Reduzierung identifiziert werden. Da dies in drei Karzinomzelllinien unterschiedlicher Herkunft gezeigt werden konnte, kann von einem konservierten Mechanismus ausgegangen werden. Obwohl beide *Sheddasen* wie erwähnt ein überlappendes Substratspektrum besitzen, scheint der DN30-induzierte Mechanismus selektiv ADAM-10 zu

betreffen, da der *Knockdown* von ADAM-17 diesen nicht verhindern konnte. Dies bestätigte auch die Verwendung des endogenen Breitspektrum-inhibitors TIMP-1, der zwar ADAM-10 jedoch nicht ADAM-17 inhibiert (Amour *et al.*, 1998; 2000). Gleiche Ergebnisse lieferte zudem der pharmakologische ADAM-10 Inhibitor GI254023X (Hundhausen *et al.*, 2003). Vervollständigt werden konnte das Bild durch den endogenen Breitspektrum-inhibitor TIMP-3, der sowohl ADAM-10 als auch ADAM-17 inhibiert (Amour *et al.*, 1998; 2000), dessen Anwendung im Vergleich zu TIMP-1 jedoch keinen zusätzlichen Effekt brachte. Interessanterweise konnte durch die Zugabe von DN30 eine Erhöhung der ADAM-17 Levels beobachtet werden, jedoch wurde dadurch nicht der *Knockdown* von ADAM-10 kompensiert, der das DN30-induzierte Met-*Shedding* verhinderte. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle von ADAM-10 bei der DN30-induzierten Met-Reduktion.

Obwohl ADAM-10 und ADAM-17 gemeinsame Substrate prozessieren (Murphy, 2008) und der molekulare Mechanismus der Substraterkennung noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Takeda, 2009) existiert ein gewisser Grad an Substratspezifität zwischen den Mitgliedern der ADAM Proteasefamilie (Murphy, 2008). Zum einen scheint hierfür vor allem eine hochvariable Region in der Cystein-reichen Domäne verantwortlich zu sein (Smith *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2005), die sich zwischen Membran und Metalloproteasedomäne befindet. Zum anderen bedingen auch Unterschiede in der proteolytischen Domäne Unterschiede in der Substratspezifität (Caescu *et al.*, 2009). Da für Met bekannt ist, dass der Rezeptor prinzipiell von ADAM-10 (Kopitz *et al.*, 2007) und von ADAM-17 (Foveau *et al.*, 2009) abgespalten werden kann, scheint es wahrscheinlich, dass das Binden des Antikörpers DN30 zu Änderungen in der Tertiärstruktur des Rezeptors führt, wodurch die Spaltung durch ADAM-10 forciert wird. So ist seit längerem bekannt, dass das Binden eines Antikörpers an sein Antigen, selbst in Regionen, die entfernt von der Bindungsstelle liegen, zu Änderungen in der Konformation führen können (Benjamin *et al.*, 1992). Auf diese Weise könnten durch die Bindung des DN30 Antikörpers an die extrazelluläre Domäne des Met-Rezeptors bestimmte Strukturen freigelegt werden, die von ADAM-10 besonders gut erkannt werden und auf diese Weise zu einer effizienten Prozessierung durch ADAM-10 führen.

Der in dieser Arbeit aufgedeckte Wirkmechanismus des monoklonalen Antikörpers DN30 ist in Abbildung 6.1 dargestellt.

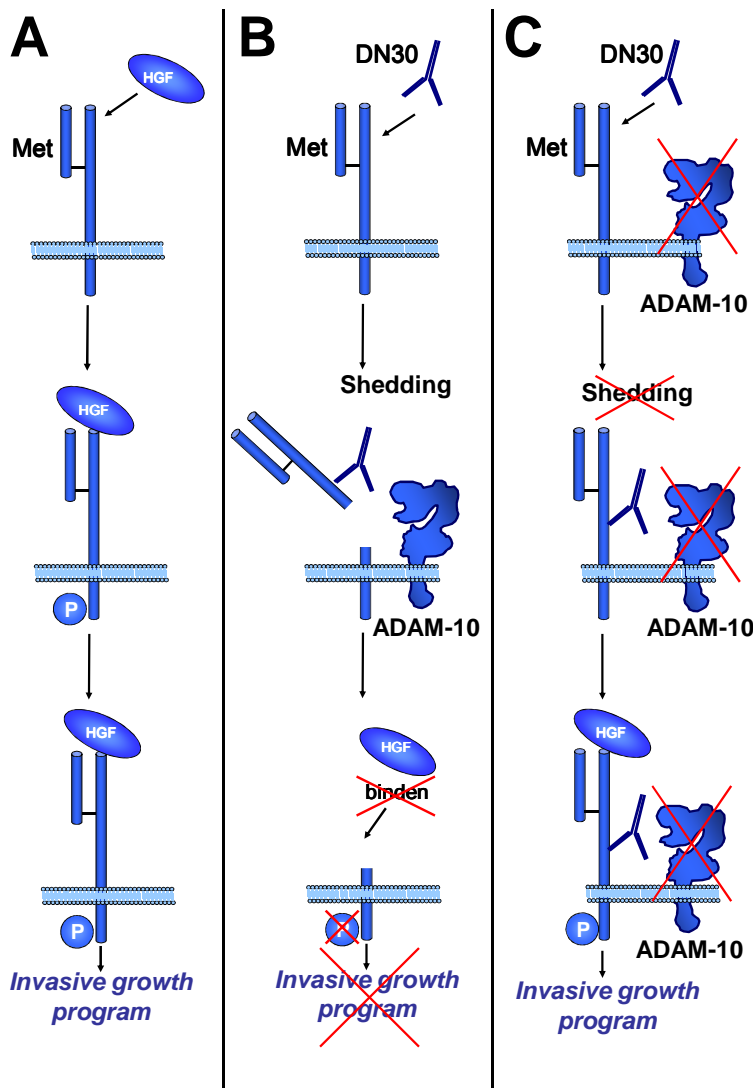


Abbildung 6.2: ADAM-10 vermittelt die DN30-induzierte Reduktion des Met-Rezeptors

A. Binden des Liganden HGF an seinen Rezeptor Met löst eine Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne aus. Durch Transphosphorylierung anderer Signalmoleküle wird das pro-invasive und Metastasenfördernde komplexe genetische *Invasive growth program* in Gang gesetzt. **B.** Binden von DN30 an die extrazelluläre Met Domäne induziert das *Shedding* durch ADAM-10 wodurch das Binden von HGF an Met und damit die Induktion des *Invasive growth program* verhindert wird. **C.** Durch das Fehlen von ADAM-10 wird das DN-30-induzierte Met-*Shedding* verhindert. Somit kann HGF weiter an den Met-Rezeptor binden und das *Invasive growth program* auslösen.

Durch den monoklonalen Antikörper DN30 kann die Induktion des Met-Signalwegs (Abbildung 6.2) verhindert werden. Im Gegensatz hierzu verhindert das *Shedding* des Met Oberflächenrezeptors durch die *Sheddase* ADAM-10 nach Antikörperzugabe das Binden von HGF an zellgebundene Rezeptoren und somit die Induktion des Met-Signalwegs (Abbildung 6.2 B). Da die abgespaltenen Rezeptoren als sogenannte Ligandenfallen fungieren (Trusolino *et al.*, 2010), d.h. sie binden frei verfügbares HGF, das dann nicht mehr zur Induktion des Met-Signalwegs zur Verfügung steht, erhöhen sie die Effizienz des Antikörpers DN30. Darüber hinaus können die abgespaltenen Met-Rezeptoren auch mit der extrazellulären Domäne von intakten Met-Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren und auf diese Weise die Signalinduktion verhindern (Trusolino *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ADAM-10 für diese Effekt nötig ist, da der Antikörper DN30 durch das Fehlen von ADAM-10 nicht mehr in der Lage ist die Met-Signalwegs Aktivierung durch HGF zu verhindern (Ab-

bildung 6.2 C). Dies bedeutet, dass für eine effiziente Intervention mit dem ersten Schritt der Met-Signalwegs-Induktion ein Zusammenspiel des Antikörpers DN30 und der membrangebundenen *Sheddase* ADAM-10 nötig ist.

ADAM-10 wird jedoch auch in bestimmten Situationen prometastatische Funktionen zugeschrieben. Daher wird ADAM-10 auch als Zielmolekül einer Krebstherapie diskutiert (Moss *et al.*, 2008; Crawford *et al.*, 2009). Aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen wichtigen Rolle von ADAM-10 im DN30-basierten anti-Met Therapieansatz, sollte eine Anti-ADAM-10 Therapie nicht mit der DN30-basierten anti-Met Therapie kombiniert werden. Ebenso sollte eine DN30-basierte Therapie nicht in Patienten eingesetzt werden, die hohe Levels an natürlichen ADAM-10 Inhibitoren wie zum Beispiel TIMP-1 oder TIMP-3 aufweisen. Daher sollte die Eignung von Patienten durch Analyse der Levels an ADAM-10 und seinen natürlichen Inhibitoren überprüft werden.

Da die Induktion des Met-Signalwegs *in vivo* hauptsächlich durch Hypoxie ausgelöst wird (Pennacchietti *et al.*, 2003) und als HIF-1-nachgeschalteter Signalweg zu einem großen Teil die metastasenfördernde Wirkung von HIF-1 vermittelt, muss der Antikörper DN30 auch unter solchen Bedingungen aktiv sein, damit eine erfolgreiche DN30-basierte Therapie gegen den HIF-Signalweg entwickelt werden kann. Die Regulation der ausführenden *Sheddase* ADAM-10 unter hypoxischen Bedingungen war noch nicht abschließend geklärt. Bisher existieren relativ wenige Untersuchungen zu diesem Thema. So war bekannt, dass es in einem bestimmten Zelltyp zur Reduktion der ADAM-10 Levels unter hypoxischen Bedingungen kommt (Webster *et al.*, 2004). In A549 Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die ADAM-10 Expression durch den HIF-1-Signalweg, der hauptsächlich unter Hypoxie induziert ist (Wang *et al.*, 1995), verstärkt wird. Konsequenterweise war der Antikörper DN30 auch unter Hypoxie in der Lage die Met-Level sowie die Suszeptibilität des Rezeptors gegenüber dem Liganden HGF zu reduzieren. Ebenso deuten bisherige Daten aus *in vivo* Versuchen darauf hin, dass der Antikörper DN30 auch unter komplexen Bedingungen *in vivo* funktioniert (Petrelli *et al.*, 2006; Pacchiana *et al.*, 2010), die hypoxische Zustände inkludieren. Der in dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Assay (*Scatterassay*) bestätigt die Anwendbarkeit einer DN30-basierten Therapie gegen das durch den HIF-1-Signalweg verstärkte metastatische Potential von Tumorzellen.

6.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals eine metastasenfördernde Rolle von HIF-1 α *in vivo* nachgewiesen werden, die nicht von der Zellüberlebens-sichernden Funktion des HIF-1-Signalwegs abhängig ist. Als zentrale Moleküle wurden hierbei die Gelatinase MMP-9 und der Met-Signalweg identifiziert. Diese Ergebnisse erweitern das Wissen um die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 bei der Metastasierung von Tumorzellen und können daher in Zukunft zur Entwicklung neuer anti-metastatischer Therapien beitragen.

Die Hemmung des HIF-1-nachgeschalteten Met-Signalwegs bietet die Chance die HIF-1-vermittelte Metastasierung zu unterbinden, ohne unkontrolliert in die Vielzahl HIF-1-regulierter physiologischer Prozesse einzugreifen. Eine Therapiestrategie, die den Met-Signalweg einschließt, ist die DN30-basierte anti-Met Therapie. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Mediator des therapeutischen Effekts die *Sheddase* ADAM-10 ist und die DN30-basierte Met-Therapie auch unter solchen Umständen angewendet werden kann, unter denen der HIF-1-Signalweg aktiviert ist. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen zusammen mit den Ergebnissen aus der Präklinik (Petrelli *et al.*, 2006; Pacchiana *et al.*, 2010), dass basierend auf dem Antikörper DN30 zukünftig neue Therapie entwickelt werden können, die gute Chancen haben erfolgreich gegen die HIF-1-vermittelte Metastasierung eingesetzt zu werden.

7 Literaturverzeichnis

- Allen, M; Louise Jones, J (2011): Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol.* 223 (2), 162-176.
- Amour, A; Knight, C G; Webster, A; Slocombe, P M; Stephens, P E; Knäuper, V; Docherty, A J; Murphy, G (2000): The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett.* 473 (3), 275-279.
- Amour, A; Slocombe, P M; Webster, A; Butler, M; Knight, C G; Smith, B J; Stephens, P E; Shelley, C; Hutton, M; Knäuper, V; Docherty, A J; Murphy, G (1998): TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* 435 (1), 39-44.
- Arlt, M; Kopitz, C; Pennington, C; Watson, K L M; Krell, H W; Bode, W; Gansbacher, B; Khokha, R; Edwards, D R; Krüger, A (2002): Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res.* 62 (19), 5543-5550.
- Bäumler, Petra (2007): Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen MMP-9 und cMet auf Tumorzellseite bei der Lebermetastasierung im L-CI.5s-T-Zell-Lymphom-Modell. Masterarbeit. Technische Universität München.
- Benjamin, D C; Williams, D C; Smith-Gill, S J; Rule, G S (1992): Long-range changes in a protein antigen due to antigen-antibody interaction. *Biochemistry.* 31 (40), 9539-9545.
- Bertout, J A; Patel, S A; Simon, M C (2008): The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer.* 8 (12), 967-975.
- Birchmeier, C; Birchmeier, W; Gherardi, E; Vande Woude, G F (2003): Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4 (12), 915-925.
- Björklund, M; Koivunen, E (2005): Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1755 (1), 37-69.
- Boccaccio, C; Comoglio, P M (2006): Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer.* 6 (8), 637-645.
- Bosman, F T; Havenith, M; Cleutjens, J P (1985): Basement membranes in cancer. *Ultrastruct Pathol.* 8 (4), 291-304.
- Brahimi-Horn, M C; Chiche, J; Pouyssegur, J (2007): Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl).* 85 (12), 1301-1307.
- Brahimi-Horn, M. C; Pouyssegur, J (2007): Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 581 (19), 3582-3591.
- Brattain, M G; Strobel-Stevens, J; Fine, D; Webb, M; Sarraf, A M (1980): Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res.* 40 (7), 2142-2146.

- Brizel, D M; Scully, S P; Harrelson, J M; Layfield, L J; Bean, J M; Prosnitz, L R; Dewhirst, M W (1996): Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 56 (5), 941-943.
- Brizel, D M; Sibley, G S; Prosnitz, L R; Scher, R L; Dewhirst, M W (1997): Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 38 (2), 285-289.
- Brown, J M; Giaccia, A J (1998): The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 58 (7), 1408-1416.
- Butler, T P; Gullino, P M (1975): Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 35 (3), 512-516.
- Cañadas, I; Rojo, F; Arumí-Uría, M; Rovira, A; Albanell, J; Arriola, E (2010): C-MET as a new therapeutic target for the development of novel anticancer drugs. *Clin Transl Oncol.* 12 (4), 253-260.
- Caescu, C I; Jeschke, G R; Turk, B E (2009): Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J.* 424 (1), 79-88.
- Cai, J; Han, S; Qing, R; Liao, D; Law, B; Boulton, M E (2011): In pursuit of new anti-angiogenic therapies for cancer treatment. *Front Biosci.* 16 , 803-814.
- Carmeliet, P; Dor, Y; Herbert, J M; Fukumura, D; Brusselmans, K; Dewerchin, M; Neeman, M; Bono, F; Abramovitch, R; Maxwell, P; Koch, C J; Ratcliffe, P; Moons, L; Jain, R K; Collen, D; Keshert, E; Keshet, E (1998): Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 394 (6692), 485-490.
- Chen, C; Yu, Z (2009): siRNA targeting HIF-1alpha induces apoptosis of pancreatic cancer cells through NF-kappaB-independent and -dependent pathways under hypoxic conditions. *Anticancer Res.* 29 (4), 1367-1372.
- Cook, K M; Figg, W D (2010): Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin.* 60 (4), 222-243.
- Cramer, T; Yasanishi, Y; Clausen, B E.; Förster, I; Pawlinski, R; Mackman, N; Haase, V H.; Jaenisch, R; Corr, Mt; Nizet, V; Firestein, G .; Gerber, H P; Ferrara, N; Johnson, R S (2003): HIF-1[alpha] Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation. *Cell.* 112 (5), 645-657.
- Crawford, H C; Dempsey, P J; Brown, G; Adam, L; Moss, M L (2009): ADAM10 as a therapeutic target for cancer and inflammation. *Curr Pharm Des.* 15 (20), 2288-2299.
- Dang, C V; Semenza, G L (1999): Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 24 (2), 68-72.
- Danilkovitch-Miagkova, A; Zbar, B (2002): Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest.* 109 (7), 863-867.

- Daponte, A; Ioannou, M; Mylonis, I; Simos, G; Minas, M; Messinis, I E; Koukoulis, G (2008): Prognostic significance of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 alpha) expression in serous ovarian cancer: an immunohistochemical study. *BMC Cancer*. 8 , 335.
- De Ridder, M; Van Esch, G; Engels, B; Verovski, V; Storme, G (2008): Hypoxic tumor cell radiosensitization: role of the iNOS/NO pathway. *Bull Cancer*. 95 (3), 282-291.
- Deryugina, EI; Quigley, JP (2006): Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 25 (1), 9-34.
- Di Renzo, M F; Narsimhan, R P; Olivero, M; Bretti, S; Giordano, S; Medico, E; Gaglia, P; Zara, P; Comoglio, P M (1991): Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene*. 6 (11), 1997-2003.
- Dikmen, Z Gunnur; Gellert, Ginelle C; Dogan, Pakize; Yoon, Heejeong; Lee, Young Bok; Ahn, Chang Ho; Shay, Jerry W (2008): In vivo and in vitro effects of a HIF-1alpha inhibitor, RX-0047. *J Cell Biochem*. 104 (3), 985-994.
- Edwards, Dylan R.; Handsley, Madeleine M.; Pennington, Caroline J. (2008): The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. 29 (5), 258-289.
- Egeblad, Mikala; Werb, Zena (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2 (3), 161-174.
- Eliasson, Pernilla; Jönsson, Jan-Ingvar (2010): The hematopoietic stem cell niche: Low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*. 222 (1), 17-22.
- Fidler, I J (1990): Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res*. 50 (19), 6130-6138.
- Fidler, I J (1970): Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. 45 (4), 773-782.
- Fidler, I J (2003): The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 3 (6), 453-458.
- Fingleton, Barbara (2007): Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des*. 13 (3), 333-346.
- Fordel, E; Geuens, E; Dewilde, S; De Coen, W; Moens, L (2004): Hypoxia/ischemia and the regulation of neuroglobin and cytoglobin expression. *IUBMB Life*. 56 (11-12), 681-687.
- Foveau, Bénédicte; Ancot, Frédéric; Leroy, Catherine; Petrelli, Annalisa; Reiss, Karina; Vingtdoux, Valérie; Giordano, Silvia; Fafeur, Véronique; Tulasne, David (2009): Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol Biol Cell*. 20 (9), 2495-2507.
- Fujiwara, Satoshi; Nakagawa, Kou; Harada, Hironobu; Nagato, Shigeyuki; Furukawa, Koji; Teraoka, Mikio; Seno, Toshimoto; Oka, Keizo; Iwata, Shinji; Ohnishi, Takanori (2007): Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int J Oncol*. 30 (4), 793-802.

- Furlan, Daniela; Sahnane, Nora; Carnevali, Ileana; Cerutti, Roberta; Bertoni, Francesco; Kwee, Ivo; Uccella, Silvia; Bertolini, Valentina; Chiaravalli, Anna Maria; Capella, Carlo (2008): Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. *Hum Pathol.* 39 (10), 1483-1494.
- Galluzzo, Maria; Pennacchietti, Selma; Rosano, Stefania; Comoglio, Paolo M; Michieli, Paolo (2009): Prevention of hypoxia by myoglobin expression in human tumor cells promotes differentiation and inhibits metastasis. *J Clin Invest.* 119 (4), 865-875.
- Gatenby, Robert A. (2009): A change of strategy in the war on cancer. *Nature.* 459 (7246), 508-509.
- Gatenby, Robert A; Gillies, Robert J (2004): Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 4 (11), 891-899.
- Gatenby, Robert A; Silva, Ariosto S; Gillies, Robert J; Frieden, B Roy (2009): Adaptive therapy. *Cancer Res.* 69 (11), 4894-4903.
- Geiger, Thomas R.; Peeper, Daniel S. (2009): Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1796 (2), 293-308.
- Gerg, Michael (2009): Bestimmung der unterschiedlichen Beiträge von Wirtzell- und Tumorzell-MMP-9 zur Metastasierung der Leber. Dissertation. Technische Universität München.
- Gerg, Michael; Kopitz, Charlotte; Schaten, Susanne; Tschukes, Alexander; Kahlert, Christoph; Stangl, Manfred; von Weyhern, Claus W Hann; Brücher, Björn L D M; Edwards, Dylan R; Brand, Karsten; Krüger, Achim (2008): Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases. *Mol Cancer Res.* 6 (3), 341-351.
- Giard, D J; Aaronson, S A; Todaro, G J; Arnstein, P; Kersey, J H; Dosik, H; Parks, W P (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 51 (5), 1417-1423.
- Gillies, R J; Robey, I; Gatenby, R A (2008): Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers. *J Nucl Med.* 49 (Suppl_2), 24S-42.
- Giordano, S; Di Renzo, M F; Ferracini, R; Chiadò-Piat, L; Comoglio, P M (1988): p145, a protein with associated tyrosine kinase activity in a human gastric carcinoma cell line. *Mol Cell Biol.* 8 (8), 3510-3517.
- Goethals, L; Debucquoy, A; Perneel, C; Geboes, K; Ectors, N; De Schutter, H; Penninckx, F; McBride, W H; Begg, A C; Haustermans, K M (2006): Hypoxia in human colorectal adenocarcinoma: comparison between extrinsic and potential intrinsic hypoxia markers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 65 (1), 246-254.
- Gorden, D L; Fingleton, B; Crawford, H C; Jansen, D E; Lepage, M; Matrisian, L M (2007): Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. *Int J Cancer.* 121 (3), 495-500.
- Graeber, T G; Osmanian, C; Jacks, T; Housman, D E; Koch, C J; Lowe, S W; Giaccia, A J (1996): Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* 379 (6560), 88-91.

- Grenier, A; Chollet-Martin, S; Crestani, B; Delarache, C; El Benna, J; Boutten, A; Andrieu, V; Durand, G; Gougerot-Pocidallo, M A; Aubier, M; Dehoux, M (2002): Presence of a mobilizable intracellular pool of hepatocyte growth factor in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*. 99 (8), 2997-3004.
- Griswold, D P; Corbett, T H (1975): A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer*. 36 (6 Suppl), 2441-2444.
- Halbgewachs, Birgit (2010): Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) als prometastatischer Faktor: Identifizierung von Hypoxia-inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha) und Neutrophilen Granulozyten als wichtige Mediatoren. Dissertation. Ludwig Maximilians Universität München.
- Hanahan, D; Folkman, J (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 86 (3), 353-364.
- Hanahan, D; Weinberg, R A (2000): The hallmarks of cancer. *Cell*. 100 (1), 57-70.
- Hanahan, D; Weinberg, R A (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144 (5), 646-674.
- Harvey, P; Clark, I M; Jaurand, M C; Warn, R M; Edwards, D R (2000): Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the invasion of mesothelioma cell lines and the expression of matrix metalloproteinases. *Br J Cancer*. 83 (9), 1147-1153.
- Hedley, B D; Chambers, A F (2009): Tumor dormancy and metastasis. *Adv Cancer Res*. 102, 67-101.
- Hikita, A; Tanaka, N; Yamane, S; Ikeda, Y; Furukawa, H; Tohma, S; Suzuki, R; Tanaka, S; Mitomi, H; Fukui, N (2009): Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Cell Biol*. 87 (4), 581-593.
- van Hinsbergh, V W M; Engelse, M A; Quax, P H A (2006): Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26 (4), 716-728.
- Hiraga, T; Kizaka-Kondoh, S; Hirota, K; Hiraoka, M; Yoneda, T (2007): Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res*. 67 (9), 4157-4163.
- Hirota, K; Semenza, G L (2005): Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*. 338 (1), 610-616.
- Hockel, M; Schlenger, K; Aral, B; Mitze, M; Schaffer, U; Vaupel, P (1996): Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*. 56 (19), 4509-4515.
- Hon, W C; Wilson, M I; Harlos, K; Claridge, T D W; Schofield, C J; Pugh, C W; Maxwell, P H; Ratcliffe, P J; Stuart, D I; Jones, E Y (2002): Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature*. 417 (6892), 975-978.

- Hosokawa, M; Asaka, M, with Akakura, N; Kobayashi, M; Horiuchi, I; Suzuki, A; Wang, J; Chen, J; Niizeki, H; Kawamura Ki (2001): Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res.* 61 (17), 6548-6554.
- Hundhausen, C; Misztela, D; Berkhout, T A; Broadway, N; Saftig, P; Reiss, K; Hartmann, D; Fahrenholz, F; Postina, R; Matthews, V; Kallen, K J; Rose-John, S; Ludwig, A (2003): The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood.* 102 (4), 1186-1195.
- Imtiyaz, H Z; Simon, M C (2010): Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 345 , 105-120.
- Jain, R K (2005): Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 307 (5706), 58-62.
- Jiang, B H; Rue, E; Wang, G L; Roe, R; Semenza, G L (1996): Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 271 (30), 17771-17778.
- Kilpinen, S; Autio, R; Ojala, K; Iljin, K; Bucher, E; Sara, H; Pisto, T; Saarela, M; Skotheim, R I; Björkman, M; Mpindi, J P; Haapa-Paananen, S; Vainio, P; Edgren, H; Wolf, M; Astola, J; Nees, M; Hautaniemi, S; Kallioniemi, O (2008): Systematic bioinformatic analysis of expression levels of 17,330 human genes across 9,783 samples from 175 types of healthy and pathological tissues. *Genome Biol.* 9 (9), R139.
- Kim, J W; Tchernyshyov, I; Semenza, G L; Dang, C V (2006): HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3 (3), 177-185.
- Kohutek, Z A; diPierro, C G; Redpath, G T; Hussaini, I M (2009): ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci.* 29 (14), 4605-4615.
- Kopitz, C; Gerg, M; Bandapalli, O R; Ister, D; Pennington, C J; Hauser, S; Flechsig, C; Krell, H W; Antolovic, D; Brew, K; Nagase, H; Stangl, M; von Weyhern, C W H; Brücher, B L D M; Brand, K; Coussens, L M; Edwards, D R; Krüger, A (2007): Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res.* 67 (18), 8615-8623.
- Krüger, A; Schirmacher, V; von Hoegen, P (1994a): Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of lacZ-labeled metastasized lymphoma cells. *Int J Cancer.* 58 (2), 275-284.
- Krüger, A; Soeltl, R; Lutz, V; Wilhelm, O G; Magdolen, V; Rojo, E E; Hantzopoulos, P A; Graeff, H; Gänsbacher, B; Schmitt, M (2000): Reduction of breast carcinoma tumor growth and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer Gene Ther.* 7 (2), 292-299.

- Krüger, A; Umansky, V; Rocha, M; Hacker, H J; Schirmmacher, V; von Hoegen, P (1994b): Pattern and load of spontaneous liver metastasis dependent on host immune status studied with a lacZ transduced lymphoma. *Blood*. 84 (9), 3166-3174.
- Krüger, A (2009): Functional genetic mouse models: promising tools for investigation of the proteolytic internet. *Biol Chem*. 390 (2), 91-97.
- Krüger, A; Arlt, M J E; Gerg, M; Kopitz, C; Bernardo, M M; Chang, M; Mobashery, S; Fridman, R (2005): Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res*. 65 (9), 3523-3526.
- Krüger, A; Kates, R E; Edwards, D R (2010): Avoiding spam in the proteolytic internet: future strategies for anti-metastatic MMP inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 1803 (1), 95-102.
- Krishnamachary, B; Berg-Dixon, S; Kelly, B; Agani, F; Feldser, D; Ferreira, G; Iyer, N; LaRusch, J; Pak, Br; Taghavi, P; Semenza, G L (2003): Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*. 63 (5), 1138-1143.
- Kung, A L; Wang, S; Klco, J M; Kaelin, W G; Livingston, D M (2000): Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med*. 6 (12), 1335-1340.
- Le Gall, S M; Bobé, P; Reiss, K; Horiuchi, K; Niu, X D; Lundell, D; Gibb, D R; Conrad, D; Saftig, P; Blobel, C P (2009): ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell*. 20 (6), 1785-1794.
- Lee, E Y H P; Muller, W J (2010): Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2 (10), a003236.
- Lee, J W; Bae, S H; Jeong, J W; Kim, S H; Kim, K W (2004): Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 36 (1), 1-12.
- Li, Z; Rich, J N (2010): Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance. *Curr Top Microbiol Immunol*. 345 , 21-30.
- Liao, D; Corle, C; Seagroves, T N; Johnson, R S (2007): Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res*. 67 (2), 563-572.
- Liao,; Johnson, R S. (2007): Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 26 (2), 281-290.
- Liu, L; Yu, Q; Lin, J; Lai, X; Cao, W; Du, K; Wang, Y; Wu, K; Hu, Y; Zhang, L; Xiao, H; Duan, Y; Huang, H (2011): HIF-1 α is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem Cells Dev*. Epub 2011 Mar 30.
- Masson, N; Willam, C; Maxwell, P H; Pugh, C W; Ratcliffe, P J (2001): Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*. 20 (18), 5197-5206.

- Maxwell, P H; Dachs, G U; Gleadle, J M; Nicholls, L G; Harris, A L; Stratford, I J; Hankinson, O; Pugh, C W; Ratcliffe, P J (1997): Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (15), 8104-8109.
- Mazumdar, J; Dondeti, V; Simon, M C (2009): Hypoxia-Inducible Factors in Stem cells and Cancer. *J Cell Mol Med.* 13 (11-12), 4319-4328.
- Michieli, P (2009): Hypoxia, angiogenesis and cancer therapy: to breathe or not to breathe? *Cell Cycle.* 8 (20), 3291-3296.
- Moss, M L; Stoeck, A; Yan, W; Dempsey, P J (2008): ADAM10 as a target for anti-cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 9 (1), 2-8.
- Murphy, G (2008): The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 8 (12), 932-941.
- Nagase, H; Visse, R; Murphy, G (2006): Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69 (3), 562-573.
- Naldini, L; Weidner, K M; Vigna, E; Gaudino, G; Bardelli, A; Ponzetto, C; Narsimhan, R P; Hartmann, G; Zarnegar, R; Michalopoulos, G K (1991): Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10 (10), 2867-2878.
- Nguyen, D X (2011): Tracing the origins of metastasis. *J Pathol.* 223 (2), 195-204.
- Overall, C M; Dean, R A (2006): Degradomics: Systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25 (1), 69-75.
- Overall, C M; Kleinfeld, O (2006): Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 6 (3), 227-239.
- Pacchiana, G; Chiriaco, C; Stella, M C.; Petronzelli, F; De Santis, R; Galluzzo, M; Carminati, P; Comoglio, P M.; Michieli, P; Vigna, E (2010): Monovalency Unleashes the Full Therapeutic Potential of the DN-30 Anti-Met Antibody. *J Biol Chem.* 285 (46), 36149 - 36157.
- Pennacchietti, S; Michieli, P; Galluzzo, M; Mazzone, M; Giordano, S; Comoglio, P M (2003): Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell.* 3 (4), 347-361.
- Petrelli, A; Circosta, P; Granziero, L; Mazzone, M; Pisacane, A; Fenoglio, S; Comoglio, P M; Giordano, S (2006): Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (13), 5090-5095.
- Ponzetto, C; Giordano, S; Peverali, F; Della Valle, G; Abate, M L; Vaula, G; Comoglio, P M (1991): c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene.* 6 (4), 553-559.

- Prat, M; Crepaldi, T; Pennacchietti, S; Bussolino, F; Comoglio, P M (1998): Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J Cell Sci.* 111 (Pt 2) , 237-247.
- Rajaganeshan, R; Prasad, R; Guillou, P J; Poston, G; Scott, N; Jayne, D G (2008): The role of hypoxia in recurrence following resection of Dukes' B colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 23 (11), 1049-1055.
- Ruan, K; Song, G; Ouyang, G (2009): Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem.* 107 (6), 1053-1062.
- Schelter, Florian (2007): Die Rolle von Hif-1 α bei den invasiven Prozessen der Lebermetastasierung. Diplomarbeit. Wissenschaftszentrum Weihenstephan. Technische Universität München.
- Schelter, F; Halbgewachs, B; Bäuml, P; Neu, C; Görlach, A; Schrözlmaier, F; Krüger, A (2011): Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Clin Exp Metastasis.* 28 (2), 91-99.
- Schirmacher, V (1985): Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. *Adv Cancer Res.* 43 , 1-73.
- Schrözlmaier, F; Kopitz, C; Halbgewachs, B; Lu, F; Algül, H; Brünner, N; Gänsbacher, B; Krüger, A (2010): Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by host-derived urokinase-type plasminogen activator. *J Cell Mol Med.* 14 (12), 2760-2770.
- Semenza, G L (2009): Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 29 (5), 625-634.
- Semenza, G L (2010): HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 20 (1), 51-56.
- Semenza, G L (2003): Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3 (10), 721-732.
- Serrano, S M T; Jia, L G; Wang, D; Shannon, J D; Fox, J W (2005): Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. *Biochem J.* 391 (1), 69.
- Sevenich, L; Werner, F; Gajda, M; Schurigt, U; Sieber, C; Müller, S; Follo, M; Peters, C; Reinheckel, T (2011): Transgenic expression of human cathepsin B promotes progression and metastasis of polyoma-mid-T-induced breast cancer in mice. *Oncogene.* 30 (1), 54-64.
- Shimizu, H; Ito, H; Kimura, F; Togawa, A; Yoshidome, H; Ohtsuka, M; Kato, A; Nukui, Y; Miyazaki, M (2005): Decreased cell-mediated immune status in colorectal cancer patients with hepatic metastasis. *Hepatogastroenterology.* 52 (64), 1106-1109.
- Shyu, K G; Hsu, F L; Wang, M J; Wang, B W; Lin, S (2007): Hypoxia-inducible factor 1 α regulates lung adenocarcinoma cell invasion. *Exp Cell Res.* 313 (6), 1181-1191.

- Smith, K M; Gaultier, A; Cousin, H; Alfandari, D; White, J M; DeSimone, D W (2002): The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo. *J Cell Biol.* 159 (5), 893 - 902.
- Sonnenberg, E; Meyer, D; Weidner, K M; Birchmeier, C (1993): Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol.* 123 (1), 223-235.
- Sounni, N E; Janssen, M; Foidart, J M; Noel, A (2003): Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol.* 22 (1), 55-61.
- Sporn, M B (1996): The war on cancer. *The Lancet.* 347 (9012), 1377-1381.
- Stella, G M; Benvenuti, S; Comoglio, P M (2010): Targeting the MET oncogene in cancer and metastases. *Expert Opin Investig Drugs.* 19 (11), 1381-1394.
- Strieter, R M (2003): Mastering innate immunity. *Nat Med.* 9 (5), 512-513.
- Swinson, D E B; Jones, J L; Cox, G; Richardson, D; Harris, A L; O'Byrne, K J (2004): Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *Int J Cancer.* 111 (1), 43-50.
- Takeda, S (2009): Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol.* 20 (2), 146-152.
- Tang, N; Wang, L; Esko, J; Giordano, F J; Huang, Y; Gerber, H P; Ferrara, N; Johnson, R S (2004): Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell.* 6 (5), 485-495.
- Tanimoto, K; Makino, Y; Pereira, T; Poellinger, L (2000): Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* 19 (16), 4298-4309.
- Trusolino, L; Bertotti, A; Comoglio, P M. (2010): MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11 (12), 834-848.
- Vaupel, P; Schlenger, K; Knoop, C; Höckel, M (1991): Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* 51 (12), 3316-3322.
- Victor, N; Ivy, A; Jiang, B H; Agani, F H (2006): Involvement of HIF-1 in invasion of Mum2B uveal melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 23 (1), 87-96.
- Visse, R; Nagase, H (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92 (8), 827-839.
- Visvader J E; Lindeman G J (2008): Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* (8) 755-768

- Wang, G L; Jiang, B H; Rue, E A; Semenza, G L (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (12), 5510-5514.
- Wang, G L; Semenza, G L (1995): Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 270 (3), 1230-1237.
- Webster, N J; Green, K N; Settle, V J; Peers, C; Vaughan, P F T (2004): Altered processing of the amyloid precursor protein and decreased expression of ADAM 10 by chronic hypoxia in SH-SY5Y: no role for the stress-activated JNK and p38 signalling pathways. *Brain Res Mol Brain Res.* 130 (1-2), 161-169.
- Weinberg, R A (2008): Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis.* 29 (6), 1092 - 1095.
- Weinberg, R A (2006): *The Biology of Cancer.* 1. ed. Garland Science. ISBN: 0815340761
- Wykoff, C C; Beasley, N J; Watson, P H; Turner, K J; Pastorek, J; Sibtain, A; Wilson, G D; Turley, H; Talks, K L; Maxwell, P H; Pugh, C W; Ratcliffe, P J; Harris, A L (2000): Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60 (24), 7075-7083.
- Yamamoto, Y; Ibusuki, M; Okumura, Y; Kawasoe, T; Kai, K; Iyama, K; Iwase, H (2008): Hypoxia-inducible factor 1alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 110 (3), 465-475.
- Yotnda, P; Wu, D; Swanson, A M (2010): Hypoxic tumors and their effect on immune cells and cancer therapy. *Methods Mol Biol.* 651 , 1-29.
- Zarnegar, R; DeFrances, M C (1993): Expression of HGF-SF in normal and malignant human tissues. *Exs.* 65 , 181-199.
- Zhong, H; De Marzo, A M; Laughner, E; Lim, M; Hilton, D A; Zagzag, D; Buechler, P; Isaacs, W B; Semenza, G L; Simons, J W (1999): Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 59 (22), 5830-5835.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 2.1 Die metastatische Kaskade	4
Abbildung 2.2 Aufbau der Basalmembran	5
Abbildung 2.3 Zeitlicher Verlauf der Metastasierung im L-CI.5s Modell.....	8
Abbildung 2.4 Physiologische und pathophysiologische Sauerstoffpartialdrücke	10
Abbildung 2.5 Regulation der Hif-1 α Untereinheit	14
Abbildung 2.6 Überlebensraten von Hif-1 α positiven und negativen Brustkrebspatientinnen.....	16
Abbildung 2.7 Übersicht über den Met-Signalweg	19
Tabelle 3.1 Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.....	34
Abbildung 5.1: Hif-1 α <i>Knockdown</i> wirkte sich in L-CI.5s Tumorzellen im Gegensatz zu CT-26 Tumorzellen nicht auf die Proliferation <i>in vitro</i> aus.....	56
Abbildung 5.2: Reduktion der Invasivität von L-CI.5s Tumorzellen <i>in vitro</i> durch Hif-1 α <i>Knockdown</i>	57
Abbildung 5.3: Auftreten von Hypoxie in Lebermetasten und Primärtumoren im L-CI.5s Modell	58
Abbildung 5.4: Reduktion der spontanen Metastasierung von L-CI.5s Tumorzellen <i>in</i> <i>vivo</i> durch <i>Knockdown</i> von Hif-1 α	60
Abbildung 5.5: Unabhängigkeit der Vaskularisierung des Primärtumors von Hif-1 α	61
Abbildung 5.6: Reduktion der experimentelle Metastasierung von L-CI.5s Tumorzellen durch <i>Knockdown</i> von Hif-1 α	63
Abbildung 5.7: Unabhängigkeit des Zellüberlebens von L-CI.5s Tumorzellen von Hif-1 α <i>in vivo</i>	64
Abbildung 5.8: Reduktion der gelatinolytischen Aktivität <i>in vivo</i> und der Mmp-9- Promotoraktivität <i>in vitro</i> durch <i>Knockdown</i> von HIF-1 α	66
Abbildung 5.10: Korrelation der Expression von HIF-1 α , Carboanhydrase 9 (Ca9) und Mmp-9 während der frühen Phasen der Leberkolonisierung.....	68
Abbildung 5.11: Hif-1 α <i>Knockdown</i> reduzierte die gelatinolytische Aktivität sowie die Expression der Gelatinasen A und B (Mmp2 und-9) in Primärtumoren	69
Abbildung 5.12: Detektion des Hif-1 α <i>Knockdowns</i> im Primärtumor	70
Abbildung 5.13: Reduktion der experimentelle Metastasierung von murinen Kolonkarzinomzellen und der gelatinolytische Aktivität in Lungenmetastasen durch Hif-1 α <i>Knockdown</i>	71

Abbildung 5.14: Reduktion des Auswachsens von L-CI.5s Lebermetastasen sowie der sekundären Invasion und der Aktivierung des Met-Signalweges durch <i>Knockdown</i> von Hif-1 α	72
Abbildung 5.15: Bestätigung des unter 5.14 gezeigten Einflusses von Hif-1 α auf das <i>Tumorzellscattering</i> und die Aktivierung des Met-Rezeptors <i>in vivo</i>	73
Abbildung 5.16: Hif-1 α <i>Knockdown</i> reduzierte die Expression des Met-Rezeptors in intradermalen Primärtumoren	74
Abbildung 5.17: HIF-1 α -Expressionslevel in menschlichen Geweben	75
Abbildung 5.18: Induktion der Expression des Met-Rezeptors und der Suszeptibilität von A549 Tumorzellen gegenüber dem Met-Liganden HGF durch Hypoxie	76
Abbildung 5.19: Zeitabhängige Reduktion der Met-Konzentration in A549 Zellen durch DN30.....	77
Abbildung 5.20: Inhibition der DN30-induzierten Met-Reduktion durch TIMP-1 und TIMP-3.....	79
Abbildung 5.21: Verstärkung der DN30-induzierten Met-Reduktion durch PMA.....	80
Abbildung 5.22: Verhinderung der DN30-induzierten Met-Reduktion durch <i>Knockdown</i> von ADAM-10 aber nicht durch <i>Knockdown</i> von ADAM-17 in A549 Zellen.....	81
Abbildung 5.23: Verhinderung der DN30-induzierten Met-Reduktion in GTL16 und Skov3i.p. Zellen durch ADAM-10 nicht aber ADAM-17 <i>Knockdown</i>	82
Abbildung 5.24: Reduktion des DN30-induzierten Met- <i>Shedding</i> durch <i>Knockdown</i> von ADAM-10	83
Abbildung 5.25: Inhibition der DN30-induzierten Met-Reduktion durch den ADAM-10 spezifischen Inhibitor GI254023X.....	83
Abbildung 5.26: Verhinderung der DN30-induzierten Reduktion der Met-Phosphorylierung <i>in vitro</i> durch <i>Knockdown</i> von ADAM-10.....	85
Abbildung 5.27: Immunzytochemische Analyse: Verhinderung der DN30-induzierten Verringerung der Met-phosphorylierung durch <i>Knockdown</i> von ADAM-10.....	86
Abbildung 5.28: Immunzytochemische Analyse: Verhinderung der DN30-induzierte Verringerung der Met-phosphorylierung durch TIMP-1 und TIMP-3	87
Abbildung 5.29: Notwendigkeit von ADAM-10 für die DN30-verursachten Reduktion des HGF-induzierten <i>Tumorzellscatterings</i>	88
Abbildung 5.30: Notwendigkeit von ADAM-10 für die DN30-verursachte Inhibition der HGF-abhängigen Tumorzellinvasivität.....	90

Abbildung 5.31: Induktion der ADAM-10 mRNA Expression in A549
Lungenkarzinomzellen durch den HIF-1-Signalweg 91

Abbildung 5.32: Reduktion der Met-Level sowie der Suszeptibilität von A549 Zellen
gegenüber dem Met-Liganden HGF durch DN30 unter Hypoxie 92

Abbildung 5.33: Inhibition des HGF-abhängigen *Tumorzellscatterings* unter Hypoxie
durch DN30..... 93

Abbildung 6.1: Einfluss von HIF-1 auf das invasive Potential 99

Abbildung 6.2: ADAM-10 vermittelt die DN30-induzierte Reduktion des Met-Rezeptors.. 105

9 Abkürzungsverzeichnis

Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
BCA	Bizinkoniniksäure
bHLH	basic helix-loop-helix
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	codogene DNA
CT	reshold cycle
CXCR-4	Chemokinrezeptor 4
d	d
ddH ₂ O	doppelt destiliertes H ₂ O
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DN30	monoklonaler muriner Antikörper gegen MET
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
env	envelope Proteine (virale Hüllproteine)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetal Calf Serum
FIH	factor-inhibiting Hif-1 α
FITC	Flourescein
g	Erdbeschleunigung
gag	gruppenspezifisches Antigene
Glu	Glutaminsäure
GLUT-1	Glukosetransporter 1
h	h
HEK-Zellen	human embryonic kidney-Zellen
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hif-1	Hypoxia-inducible factor 1
Hif-1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α
Hif-1 β	Hypoxia-inducible factor 1 β
HRP	Horse Radish Peroxidase
IMEM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium

MET	Met Rezeptortyrosinkinase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
NTC	non template control
OD	optische Dichte
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	Phosphat buffered saline
pg	Pikogramm
pol	virale Polymerasen und weitere virale Proteine neben env und pol
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA-Interferenz
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	real time Polymerasekettenreaktion
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin RNA
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	TBS mit Tween
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
v/w	Masse pro Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor receptor
VHL	Von Hippel-Lindau Protein
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Achim Krüger* für die Möglichkeit diese Dissertation unter seiner Anleitung durchzuführen. Seine außerordentliche Betreuung, seine vielfältige Unterstützung, gerade auch beim Erstellen der Manuskripte für Veröffentlichungen, und die vielen fruchtbaren Diskussionen trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Ebenso möchte ich ihm für die Inokulation der Tumorzellen danken. Besonders möchte ich mich bei ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit, die er mir in Bezug auf meine Forschungen zugestanden hat, bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. Dirk Haller* für seine Unterstützung und seine Betreuung auf Seiten des Wissenschaftszentrums Weihenstephan bedanken, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit am Klinikum rechts der Isar der TU München nicht möglich gewesen wäre. Ebenso möchte ich mich bei Frau *Prof. Dr. Hannelore Daniel* für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und bei Herrn *Prof. Dr. Jonathan Sleeman* (Universität Heidelberg) für die schriftliche Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Darüber hinaus gilt mein besondere Dank Frau *Prof. Carla Boccaccio* und Herrn *Prof. Paolo Comoglio* für die vielfältige Unterstützung, die großzügige Bereitstellung des anti-Met-Antikörpers und die vielen fruchtbaren Diskussionen, die das Gelingen dieser Arbeit enorm gefördert haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn *Dr. David Becherer* (Glaxo Smith Kline) für die Bereitstellung des pharmakologischen ADAM-10 Inhibitors und bei Frau *Prof. Dr. Agnes Görlach* für die Bereitstellung des Hypoxie-Detektionskits sowie für die Erlaubnis Experimente in der Hypoxiebank ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen.

Frau *Dr. Susanne Schaten* bin ich für die exzellente Einführung in die Techniken der Immunhistologie, sowie für ihre fachlichen Ratschläge und ihre Unterstützung bei der Durchführung immunhistochemischer Experimente sehr dankbar.

Mein Dank gilt insbesondere auch Frau *Katja Honert* und Frau *Mareike Lehnhoff* für ihre Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Dr. Michael Gerg*, der mir durch die Betreuung meiner Diplomarbeit einen guten Start in meine Doktorandenzeit ermöglicht hat. Von seinem Wissen in Bezug auf die experimentelle Onkologie und seinen Erfahrungen im Laboralltag konnte ich in vielfältiger Weise profitieren.

Frau *Dr. Stephanie „Pipi“ Hauser* und Frau *Dr. Birgit Halbgewachs* danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der *in vivo* Versuche sowie für die vielen Diskussionen, die diese Arbeit bereicherten.

Bei Herrn *Florian Schrözlmaier* möchte ich für die kritische Begleitung und Mithilfe bei der Verfassung der Publikationen bedanken.

Stellvertretend für die Praktikanten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanke ich mich bei *Sabrina Steiert*, *Martina Grandl* sowie *Julia Kobuch* für die Unterstützung bei der Durchführung verschiedenster Experimente.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Krüger für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt vor allem auch Herrn *Dr. Anton Steger*, Herrn *Dr. Gerd Zimmermann* und Herrn *Josef „Sepp“ Strassmeier* sowie allen Sekretärinnen des Instituts für die Hilfe bei allen organisatorischen Problemen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. Gänsbacher* für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen bedanken. Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für die freundliche Aufnahme und gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Besonders bin ich meinen Eltern *Christa* und *Werner Schelter* für ihre Unterstützung dankbar, ohne die mein bisheriger Weg nicht möglich gewesen wäre.

Für ihre liebevolle Unterstützung, ihr grenzenloses Verständnis, ihre Rücksichtnahme und das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Frau *Anne Schelter* bedanken.

Anhang

Lebenslauf

Name: Schelter
Vornamen: Florian Peter
Geburtsdatum: 01.06.1982
Geburtsort: Nürnberg
Familienstand: verheiratet

11.2007 - 3.2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapiefor-
schung des Klinikums rechts der Isar der Techni-
schen Universität München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Achim
Krüger zur Vorbereitung der Dissertation

2002-2007 Studium „Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel“ an der
Technischen Universität München

2001-2002 Zivildienst Bund Naturschutz in Bayern e.V.

1992-2001 Pirckheimer Gymnasium Nürnberg,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1988-1992 Grundschule Kornburg

Auszeichnungen und Preise:

Award for best scientific presentation. 24th Winter School on Proteinases and Their Inhibi-
tors Recent Developments, Tiers, Italy, 24. Februar – 28. Februar 2010

Publikationsverzeichnis

Schelter, F., Gerg, M., Halbgewachs, B., Schaten, S., Görlach, A., Schrötzlmair, F., and Krüger, A. (2010). Identification of a survival-independent metastasis-enhancing role of hypoxia-inducible factor-1 α with a hypoxia-tolerant tumor cell line. *J Biol Chem*, Aug 20;285(34):26182-9

Schelter, F., Kobuch, J., Moss, M. L., Becherer, J. D., Comoglio, P. M., Boccaccio, C., and Krüger, A. (2010). A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced *Shedding* of the met surface receptor. *J Biol Chem*, Aug 20;285(34):26335-40

Schelter, F., Halbgewachs, B., Bäumler, P., Neu, C., Görlach, A., Schrötzlmair, F., and Krüger, A. (2011). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by Hypoxia-inducible factor-1 α . *Clin Exp Metastasis*, Feb;28(2):91-9

Hauser, S., Bickel, L., Weinspach, D., Gerg, M., Schäfer, M.K., Pfeifer, M, Hazin, J., **Schelter, F.**, Weidle U.h., Ramser, J., Meindl, A., Schmitt, M., Schrötzlmair, F., Altevogt, P., and Krüger, A. (2011). Full-length L1CAM and Not Its $\Delta 2\Delta 27$ Splice Variant Promotes Metastasis through Induction of Gelatinase Expression. *PLoS ONE*, 2011 Apr 25;6(4):e18989

Schelter, F., Grandl, M., Seubert, S., Schaten, S., Hauser, S., Gerg, M., Boccaccio, C., Comoglio, P., Krüger, A. (2011). Tumor cell-derived Timp-1 is necessary for maintaining metastasis-promoting Met-signaling via inhibition of Adam-10. *Clin Exp Metastasis*, 2011 Jul 26. [Epub ahead of print]