

Regulationsmechanismen
des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (HIF-1):
Calpain-vermittelter Proteinabbau
und Induktion der HIF-1 α -mRNA

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Barbara Herr
aus Mannheim

Frankfurt 2009

D30

Vom Fachbereich 14 der
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Stark
Prof. Dr. Brüne

Datum der Disputation: 03.11.2009

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie I am Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Prof. Dr. Bernhard Brüne durchgeführt. Bei ihm möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas und der benötigten Hilfsmittel, vor allem aber für das rege Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holger Stark sowie Herrn Prof. Dr. Bernhard Brüne für die Korrektur und Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Jie Zhou und Dr. Nathalie Dehne für die Betreuung und Diskussionsbereitschaft sowie die stets vorhandene Hilfestellung bei allen Problemen und Fragen.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der AG Brüne bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mich so bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und für die jahrelange Unterstützung.

HIF HIF Hurra!!!

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGEN	VIII
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Hypoxie	4
2.2 Die Rolle von Hypoxie und HIF-1 in der Tumorbilogie	5
2.3 HIF-1	7
2.3.1 Struktur	7
2.3.2 Regulation	9
2.3.2.1 Degradation.....	9
2.3.2.2 Transaktivierung von HIF-1	11
2.3.2.3 Synthese	11
2.3.2.4 ROS und HIF-1-Regulation	12
2.3.2.5 NO und HIF-1-Regulation	13
2.3.2.6 Calcium ²⁺ und HIF-1-Regulation	14
2.4 Das Calpain-System.....	15
2.4.1 Autoproteolyse des Calpains.....	16
2.5 Makrophagen-Polarisierung.....	16
2.5.1 Makrophagen-Phänotypisierung	17
2.5.2 Makrophagen-Polarisierung durch AZ	19
2.5.3 Tumor-assoziierte Makrophagen.....	20
2.6 Sphingosin-1-Phosphat	21
2.6.1 Synthese und Abbau von S1P	22
2.6.1.1 Sphingosin-Kinase.....	23
2.6.2 Die S1P-vermittelte Signaltransduktion	24
2.6.3 Funktionen von S1P.....	25
2.6.3.1 S1P in der Tumorentwicklung	26
2.7 TGF- β	26

2.7.1	TGF- β -Rezeptor.....	27
2.7.2	TGF- β in der Tumorentwicklung.....	28
2.8	NFAT	28
2.8.1	Regulierung der NFAT-Aktivität.....	29
2.9	Zielsetzung.....	31
3	MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1	Material	33
3.1.1	Chemikalien.....	33
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	37
3.1.3	Antikörper.....	41
3.1.4	Oligonukleotide	41
3.1.5	Primersequenzen.....	42
3.1.6	Zelllinien	42
3.1.7	Verbrauchsmaterialien.....	43
3.1.8	Geräte.....	43
3.2	Methoden	44
3.2.1	Zellkultivierung	44
3.2.2	Generierung von RCC4- ρ 0-Zellen.....	45
3.2.3	Isolation primärer humaner Monozyten aus <i>Buffy Coats</i>	45
3.2.4	Isolation der primären Maus Makrophagen aus der Milz	46
3.2.5	Herstellung von konditioniertem Medium AZ (KM _{AZ})	46
3.2.6	Herstellung von konditioniertem Medium polarisierter Makrophagen (KM _{PM}).....	47
3.2.7	Proteinbestimmung nach Lowry	47
3.2.8	Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) und Western Blot Analyse.....	47
3.2.9	<i>Electrophoretic mobility shift assays</i> (EMSA).....	49
3.2.10	Isolation von mRNA aus Zellen.....	49
3.2.11	Reverse Transkription von mRNA in cDNA.....	50
3.2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
3.2.13	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	51
3.2.14	Reporter-Analysen	52

3.2.15	Messung der ROS und RNI mittels durchflusszytometrischer Messung (FACS).....	53
3.2.16	Respirometrie	54
3.2.17	Messung der Calpain-Aktivität.....	54
3.2.18	Calcium ²⁺ -Messung	54
3.2.19	<i>Embryonic Body Assay</i>	55
3.2.20	CD31-Immunfluoreszenzfärbung	55
3.2.21	Statistische Analyse	56
4	ERGEBNISSE	57
4.1	HIF-1 α wird durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies über Calcium ²⁺ /Calpain reguliert	57
4.1.1	Die Expression von HIF-1 α unter Hypoxie und NO in RCC4-Zellen	57
4.1.2	Reaktive Sauerstoffspezies in Kombination mit NO vermindert die Proteinakkumulation von HIF-1 α	58
4.1.3	Oxidierende Substanzen regulieren HIF-1 α	62
4.1.4	NO und O ₂ ⁻ reduzieren die HIF-1 α -Proteinmenge durch Calpain	65
4.2	Makrophagen-Polarisierung durch AZ führt zu einer HIF-1 α -Aktivierung durch TGF- β und S1P	70
4.2.1	AZ induzieren HIF-1 α und aktivieren HIF-1 in Makrophagen	71
4.2.2	Polarisierte Makrophagen steigern die Differenzierung von Stammzellen.	75
4.2.3	Die Rolle von S1P bei der Induktion der HIF-1 α -mRNA	78
4.2.4	TGF- β ist an der Regulation der HIF-1 α -mRNA beteiligt	79
4.2.5	NFAT induziert die Hochregulation der HIF-1 α -mRNA	81
5	DISKUSSION	87
5.1	ROS vermitteln die HIF-1 α Regulierung durch Calcium ²⁺ /Calpain unter Hypoxie und NO	87
5.1.1	NO vermittelter HIF-1 α -Proteinabbau unter Hypoxie.....	88
5.1.2	HIF-1 α wird unter Normoxie durch NO und O ₂ ⁻ beeinflusst	89
5.1.3	HIF-1 α wird durch Calpain abgebaut.....	90
5.1.3.1	NO und O ₂ ⁻ führen zur Aktivierung von Calpain	90
5.1.3.2	NO und O ₂ ⁻ führen zu einer Erhöhung des intrazellulären Calcium ²⁺	92

5.2	Die Polarisierung von Makrophagen durch apoptotische Zellen führt zu einer Aktivierung von HIF-1 α durch TGF- β und S1P.....	94
5.2.1	Apoptotische Zellen induzieren HIF-1 α und aktivieren HIF-1.....	95
5.2.2	S1P und TGF- β sind an der Induktion von HIF-1 beteiligt.....	96
5.2.3	NFAT induziert HIF-1 α -mRNA.....	99
5.2.4	Polarisierte Makrophagen steigern die Differenzierung von Stammzellen	101
5.3	Ausblick	102
6	LITERATUR.....	104
7	PUBLIKATIONEN.....	117
8	CURRICULUM VITAE.....	118

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Proteinstruktur von humanem HIF-1 α und HIF-1 β	8
Abbildung 2: Regulation von HIF-1	10
Abbildung 3: Unterteilung der Makrophagen-Phänotypen nach Mantovani	17
Abbildung 4: Makrophagenklassifizierung nach Mosser und Edwards	19
Abbildung 5: Synthese und Abbau von S1P.....	22
Abbildung 6: Signalvermittlung über S1P-Rezeptoren	24
Abbildung 7: Hypoxie und NO verringern die HIF-1 α -Proteinakkumulation.....	58
Abbildung 8: NO verringert die Oxidation von Hydroethidin unter Hypoxie.....	59
Abbildung 9: SIN-1 und DETA-NO/DMNQ reduzieren die HIF-1 α -Proteinmenge unter Normoxie	59
Abbildung 10: Ethidiumbromid führt zum Verlust einer funktionellen Atmungskette.....	60
Abbildung 11: MitoSox-Oxidation unter Hypoxie in RCC4- vs. RCC4-p0-Zellen	61
Abbildung 12: Akkumulationsverhalten von HIF-1 α -Protein unter Hypoxie und Normoxie in Kombination mit NO/O $_2^-$ in RCC4-p0-Zellen.....	61
Abbildung 13: NO/O $_2^-$ beeinflussen den HIF-1 α -Abbau konzentrationsabhängig.....	62
Abbildung 14: Einfluss von Harnsäure und Methionin auf das Akkumulationsverhalten von HIF-1 α nach NO/O $_2^-$	63
Abbildung 15: Oxidationsverhalten von Dihydrorhodamin durch NO/O $_2^-$	63
Abbildung 16: Harnsäure hat gegensätzliche Effekte in RCC4- vs. RCC4-pVHL-Zellen .	64
Abbildung 17: Der hypoxische Proteinabbau von HIF-1 α ist Calpain-abhängig.....	65
Abbildung 18: NO/O $_2^-$ vermitteln den Calpain-abhängigen HIF-1 α -Abbau.....	66
Abbildung 19: Verändertes HIF-1 α -Akkumulationsverhalten durch NO/O $_2^-$ in HEK293-Zellen.....	67
Abbildung 20: Der HIF-1 α -Proteinabbau durch NO/O $_2^-$ in HEK293-Zellen ist Calpain-abhängig	68
Abbildung 21: Der Einfluss von NO/O $_2^-$ auf die Calpain-Aktivität.....	68
Abbildung 22: Erhöhung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration durch NO/O $_2^-$	69
Abbildung 23: Intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Veränderungen durch DETA-NO/DMNQ und SIN-1 .	70
Abbildung 24: HIF-1 α -Protein akkumuliert in Makrophagen durch KM $_{AZ}$	71
Abbildung 25: HIF-1 α - und HIF-2 α -mRNA nach Inkubation mit KM $_{AZ}$	71

Abbildung 26: HIF-1 α -mRNA nach Inkubation mit Überständen von apoptotischen/ nektrotischen/ lebenden Zellen	72
Abbildung 27: KM _{AZ} erhöht die HIF-1 α -mRNA-Expression in primären Makrophagen ..	72
Abbildung 28: KM _{AZ} aktiviert den HIF-1 α -Promotor	73
Abbildung 29: KM _{AZ} führt zur Erhöhung der HIF-1-Aktivität.....	73
Abbildung 30: KM _{AZ} induziert VEGF und Glut-1 HIF-1-abhängig.....	74
Abbildung 31: KM _{PM} verändert die Morphologie von Stammzellen.....	75
Abbildung 32: KM _{PM} erhöht Differenzierung von Stammzellen zu CD31 ⁺ -Endothelzellen.....	76
Abbildung 33: KM _{PM} erhöht die Differenzierung von Stammzellen zu CD31 ⁺ -Endothelzellen HIF-1 α -abhängig	76
Abbildung 34: Rolle von S1P bei der HIF-1 α -mRNA-Induktion	78
Abbildung 35: TGF- β -Rezeptor-Aktivierung nach KM _{AZ}	79
Abbildung 36: Rolle von TGF- β bei der HIF-1 α -mRNA-Induktion	80
Abbildung 37: NF- κ B ist nicht für die Erhöhung der HIF-1 α -mRNA nach KM _{AZ} verantwortlich.....	81
Abbildung 38: KM _{AZ} induziert NFAT-Aktivität und HIF-1 α -mRNA-Erhöhung ist NFAT-abhängig	82
Abbildung 39: KM _{AZ} erhöht die NFAT Bindung an den HIF-1 α -Promotor.....	82
Abbildung 40: Überexpression von NFAT aktiviert HIF-1 und die HIF-1 α -Promotor-Aktivität	83
Abbildung 41: NFAT Bindung an den HIF-1 α -Promotor nach VPC23019 und TGF- β nAB	84
Abbildung 42: NFAT-Aktivität wird nicht durch S1P und TGF- β beeinflusst	84
Abbildung 43: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die HIF-1 α -mRNA-Induktion durch KM _{AZ}	85
Abbildung 44: STAT3 Bindung an den HIF-1 α -Promotor wird durch KM _{AZ} nicht beeinflusst	86
Abbildung 45: NO und O ₂ ⁻ aktivieren den Calpain-vermittelten HIF-1 α -Abbau	93
Abbildung 46: Regulation von HIF-1 α in Makrophagen durch AZ	100

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Antikörper.....	41
Tabelle 2: Primer für PCR/qPCR	42
Tabelle 3: PCR-Ansatz	50
Tabelle 4: Reaktionsabfolge bei der PCR.....	51
Tabelle 5: qPCR-Ansatz.....	51
Tabelle 6: Reaktionsabfolge bei der qPCR	52

ABKÜRZUNGEN

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AC	Adenylatcyklase
ADM	Adrenomedullin
ALLM	N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-methioninal
AMF	<i>autocrine motility factor</i>
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARD1	<i>arrest defective 1</i>
ARE	<i>AU rich element</i>
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	apoptotische Zellen
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BH3	Bcl-2 bindende Domäne
bHLH-PAS	<i>basic helix-loop-helix PER-ARNT-SIM</i>
Bcrp	<i>breastcancer resistance protein</i>
BMP	<i>bone morphogenetic proteins</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB binding protein</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat hydrat
c-MET	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
CnA	Untereinheit A von Calcineurin
CnB	Untereinheit B von Calcineurin
CsA	Cyclosporin A
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>
Crm1	<i>chromosome region maintenanc 1</i>
CsA	Cyclosporin A
DAPI	4',6'-Diamin-2-phenylindole

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETA-NO	2,2'-(Hydroxynitroso-hydrazono) bis-ethanimin
DFO	Desferroxamin
DHR	Dihydrorhodamin
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMNQ	2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon
DMOG	Dimethyloxalylglycin
DMS	Dimethylsphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP	<i>decapentaplegic gene product</i>
DTT	Dithiothreitol
EDG	<i>endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Thylenglycole-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
EM	extrazellulär Matrix
EPO	Erythropoetin
ER	endoplasmatisches Retikulum
EGFR	<i>EGF-receptor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorter</i>
Fas	<i>TNF receptor superfamily, member 6 (CD95)</i>
FCCP	Carbonyl-cyanide-p-trifluoro-methoxy-phenylhydrazon
FCS	fötales Kälberserum
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
FLT-1	<i>fms-related tyrosine kinase-1</i>
Glut	Glukosetransporter
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
Gö6976	12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo [2,3-a] pyrrolo[3,4-c]carbazol
HE	Hydroehtidin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HO-1	Hämoxygenase-1
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
HRP	Meerrettichperoxidase

HuR	<i>human protein R</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGF-R	<i>insulin-like growth factor receptor</i>
IK	Immunkomplex
IL	Interleukin
IL-1ra	IL-1-Rezeptor-Antagonisten
IFN- γ	Interferon- γ
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KM _{AZ}	konditioniertes Medium von apoptotischen Zellen
KM _{LZ}	konditioniertes Medium von lebenden Zellen
KM _{NZ}	konditioniertes Medium von nekrotischen Zellen
KM _{PM}	konditioniertes Medium von polarisierten Makrophagen
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
L-NAME	Nitro-L-arginine methylester Hydrochlorid
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharid
LOCC	ligandenabhängigen Ca ²⁺ -Kanäle
LY294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCIP-1	<i>modulatory calcineurin interacting protein 1</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MDR1	<i>multi-drug-resistance transporter 1</i>
MEK1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MG132	Z-Leu-Leu-Leu-al
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i>
MMP2	Matrixmetalloprotease
MR	Manose-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nAK	neutralisierender Antikörper
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NFAT-EP	NFAT Expressionsplasmid
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	<i>nuclear localizaton sequence</i>
NO	Stickstoffmonoxid

NOS	NO-Synthase
nNOS	neuronal NOS
iNOS	induzierbare NOS
eNOS	endotheliale NOS
Oct-4	<i>octamer binding transcription factor 4</i>
ODD	<i>oxygen-dependent degradation domain</i>
p53	p53 Tumorsuppressorprotein
PAF	<i>platelet-activating factor</i>
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PBS	<i>phosphat-buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PHD	Prolinhydroxylase
PI3K	Phosphatidylinositole-3-Kinase
PIM	Proteaseinhibitormix
PKB/AKT	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin
PPAR γ	Peroxisom Proliferator aktivierten Rezeptors γ
pVHL	van Hippel-Lindau-Protein
RCAN1	<i>regulator of calcineurin 1</i>
RCC	<i>renal clearcell carcinoma</i>
RNI	reaktive Stickstoffintermediate
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	S1P-Rezeptor
SB203580	4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>

SEW2871	5-[4-Phenyl-5(trifluoromethyl)-2-thienyl]-3-[3-(trifluoro-methyl)phenyl]-1,2,4-oxadiazole
SIN-1	3-Morpholinsydnonimin Hydrochlorid
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SK1	Sphingosinkinase 1
SK2	Sphingosinkinase 2
SPP	Anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one1,9-pyrazoloanthron
SQ22536	9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amin
SR	<i>scavenger-Rezeptor</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAK1	<i>TGF-β-activated Kinase 1</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAM	Tumor-assoziiertes Makrophage
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRE	<i>TPA response elements</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl) Aminomethan
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TβR	TGF-β Rezeptor
uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
UE	Untereinheit
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v-Src	<i>viral oncogene Src</i>
VHL	van Hippel-Lindau
VOCC	spannungsabhängigen Ca ²⁺ -Kanäle
VPC23019	(R)-Phosphorsäuremono-[2-amino-2(3-octyl-phenylcarbamoyl)- ethyl]ester

1 ZUSAMMENFASSUNG

In vielen Tumorzellen kommt es zu einer Überexpression des Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α (HIF-1 α), was zu einer verbesserten Anpassung des Tumors an die intratumorale Hypoxie sowie zu einer Resistenz gegen Strahlen- und Chemotherapie führt. Je nach Tumor kann HIF-1 α auf verschiedenen Wegen induziert werden. Eine Möglichkeit ist die Hemmung des Abbaus von HIF-1 α über das 26S-Proteasom, wie z.B. beim van Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom aufgrund einer Mutation im VHL Gen. Patienten mit VHL-Syndrom entwickeln häufig *renal clearcell carcinomas* (RCCs). In diesen Karzinomen kann HIF-1 α nicht über den klassischen Weg über das 26S-Proteasom abgebaut werden. Um das Verständnis für alternative Regulationsmechanismen von HIF-1 α zu erweitern, wurde mit RCC4-Zellen gearbeitet. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in RCC4-Zellen das HIF-1 α -Protein unter Hypoxie, in Kombination mit NO, durch die Ca²⁺-abhängige Protease Calpain abgebaut wird. Unter Hypoxie kam es zu einem Anstieg der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien, die mit NO zu Peroxynitrit und weiteren reaktiven Stickstoffintermediaten (RNI) reagierten. Die kombinierte Stimulation der Zellen mit NO und O₂⁻ unter Normoxie löste ebenfalls einen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Gehaltes und der Calpain-Aktivität aus, was gleichzeitig zu einem reduzierten HIF-1 α -Proteingehalt führte. Der Calpain-vermittelte HIF-1 α -Abbau konnte auch in Zellen mit funktionellem VHL-Protein (pVHL) durch NO und O₂⁻ ausgelöst werden, wenn der proteasomale Abbau gehemmt war. Diese Ergebnisse beschreiben einen neuen Regulationsmechanismus für das HIF-1 α -Protein, der unabhängig vom Sauerstoffgehalt und vom 26S-proteasomalen Abbau durch NO/O₂⁻ und Calpain erfolgt. Bisher war noch nicht bekannt, dass HIF-1 α anders als über das 26S-Proteasom abgebaut werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Calpain-vermittelte Abbau neben dem proteasomalen Abbau zur Regulierung von HIF-1 beiträgt.

In Tumorgewebe stellt nicht nur HIF-1, welches in den Tumorzellen aktiviert ist, einen Selektionsvorteil für die Zellen des Tumorgewebes dar. Ebenso tragen die Zellen des Tumorstromas, darunter die Makrophagen, die in den Tumor einwandern, zur Progression des Tumors durch die Anpassung an die hypoxische Umgebung bei. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Regulation von HIF-1 α in den durch konditioniertes Medium von apoptotischen Zellen (KM_{AZ}) aktivierten Makrophagen und der Bedeutung der daraus resultierenden HIF-1-Aktivierung untersucht. Makrophagen, die durch

apoptotische Zellen (AZ) aktiviert werden, stellen einen anti-inflammatorischen, pro-angiogenetischen Phänotyp dar, der vergleichbar mit dem der Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) ist. TAMs infiltrieren in das Tumorgewebe und sind essentiell am Übergang von einem avaskulären zu einem invasiven, vaskularisierten und malignen Tumor beteiligt. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten zeigen, dass Makrophagen zunächst Tumorzellen abtöten, wodurch die apoptotischen Tumorzellen Mediatoren (u.a. Sphingosin-1-Phosphat (S1P)) freisetzen, die eine Polarisierung zu einem alternativen, TAM-ähnlichen-Phänotyp der Makrophagen bewirken. Die Inkubation der Makrophagen mit KM_{AZ} führte zu einer Induktion der HIF-1 α -mRNA und des -Proteins unter Normoxie, was unabhängig von der Proteinstabilität auf eine gesteigerte Proteinsynthese zurückgeführt werden konnte. Weiterhin führte die Induktion von HIF-1 α zu einer gesteigerten HIF-1-Aktivität. Die Differenzierung von Stammzellen zu CD31⁺-Endothelzellen wurde durch die Überstände von den durch KM_{AZ} polarisierten Makrophagen HIF-1-abhängig hervorgerufen und ist ein Indiz für die Ausbildung des HIF-1-vermittelten pro-angiogenetischen Phänotyps der Makrophagen. Als Mediatoren, die von den AZ freigesetzt wurden und an der HIF-1 α -mRNA-Induktion beteiligt sind, konnten S1P und *transforming growth factor- β* (TGF- β) identifiziert werden. Des Weiteren kommt es zu einer Aktivierung des *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), der an den HIF-1 α -Promotor bindet und die Transkription induziert. Aufgrund der verstärkten Synthese kommt es zur Akkumulation von HIF-1 α und zur Aktivierung von HIF-1.

Bisher ist die Aktivierung von HIF-1 in TAMs durch die Lokalisation in hypoxischen Arealen erklärt und nicht weiter untersucht worden. Die Erkenntnisse über die Regulierung von HIF-1 durch AZ beschreiben einen neuen Mechanismus, der zur HIF-1-Aktivierung auch unter Normoxie führt. Dabei vermitteln AZ statt der beschriebenen hypoxischen Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins eine Induktion der HIF-1 α -mRNA. Weiterhin zeigen die Ergebnisse eine Möglichkeit auf, wie TAMs bereits unter Normoxie zur Angiogenese Induktion in Tumoren beitragen können und erweitern damit das Verständnis, wie die Tumor-unterstützende Wirkung der TAMs vermittelt wird.

2 EINLEITUNG

Als Krebs bezeichnet man in der Medizin einen malignen (bösartigen) Tumor. Krebserkrankungen gehören nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Prinzipiell können in jedem Organ des menschlichen Körpers Tumorzellen auftreten. In Deutschland sind häufig weibliche Brustdrüsen, Prostata, Lunge und Dickdarm betroffen. Maligne Tumore unterscheiden sich von benignen (gutartigen) Tumoren durch drei Eigenschaften:

1. Sie infiltrieren, d.h. die Tumorzellen überschreiten Gewebsgrenzen und wachsen in benachbartes Gewebe ein.
2. Sie destruieren, d.h. sie zerstören das umliegende Gewebe.
3. Sie metastasieren, d.h. die Tumorzellen wandern durch Blut- und Lymphgefäße in andere Organe aus und bilden dort weitere Geschwülste.

Tumore entstehen im Allgemeinen aus einzelnen, genetisch transformierten Zellen. Die Veränderungen der Zelle werden durch eine Vielzahl von Noxen ausgelöst, wie z.B. ionisierende Strahlung, Chemikalien, Viren oder chronische Entzündungen. Da die transformierten Zellen oft eine verstärkte Proliferations- und eine verminderte Apoptoserate zeigen, kommt es durch eine Anhäufung der veränderten Zellen schließlich zur Entstehung des Tumorgewebes. Bei Krebserkrankungen unterscheidet man zwischen den soliden Tumoren, die ungefähr 90 % aller Fälle ausmachen, und den Hämoblastosen, wie Leukämien, bei denen es sich um Krebserkrankungen der Zellbestandteile des Bluts und der blutbildenden Organe handelt.¹ Solide Tumore werden oft von Makrophagen infiltriert. Makrophagen sind ein Bestandteil der Immunabwehr des Körpers und sollten daher die Tumorzellen angreifen. Tatsächlich kann jedoch beobachtet werden, dass sie den Tumor in Wachstum und Metastasierung unterstützen. Ein hoher Anteil von TAMs lässt Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumors zu.² Das verstärkte Tumorstadium führt wiederum oft zu einer Unterversorgung des Tumorgewebes mit Blut wodurch es zum Nährstoff- und Sauerstoffmangel (Hypoxie) kommt. Da die Entstehung von Hypoxie zum einen wichtig für die Tumorstadium und zum anderen auch für die Therapierbarkeit von Krebserkrankungen ist, wird im Folgenden die Hypoxie im Allgemeinen und im Bezug auf die Tumorentwicklung im Speziellen näher beleuchtet. Des Weiteren wird die Rolle der TAMs in der Krebsentstehung und -progression vorgestellt.

2.1 Hypoxie

Hypoxie, also der Mangel an Sauerstoff, stellt für den Organismus im Ganzen wie auch für jede einzelne Zelle eine extreme Belastung dar und kann bei längerem Andauern zu Organschäden führen. Sauerstoff spielt eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung. Unter Hypoxie ist die ATP-Gewinnung durch die mitochondriale Atmungskette nicht mehr gewährleistet. Wie wichtig die Anpassung der Zellen auf die jeweiligen Sauerstoffverhältnisse ist, wird dadurch verdeutlicht, dass Sauerstoff-abhängige Reaktionswege in der Evolution stark konserviert sind. Bei Sauerstoffmangel stellen Zellen ihren Stoffwechsel von aerob auf anaerob um, wozu eine große Anzahl von Veränderungen in der Zelle durchgeführt werden müssen. Der Organismus reagiert zunächst mit Hyperventilation und dann erhöhter Erythropoese und Angiogenese, um die O₂-Versorgung langfristig zu verbessern. Unter Hypoxie werden die wesentliche Enzyme der Glykolyse induziert sowie die Glukoseaufnahme (durch Induktion der Glukosetransporter (Glut)-1,-2,-3) erhöht, wodurch die anaerobe Energiegewinnung durch die Glykolyse verstärkt wird. Außerdem wird auch der Sauerstofftransport im Blut unter Hypoxie durch eine Stimulation der Erythropoese und des Eisenstoffwechsels (Ceruloplasmin, Erythropoetin (EPO), Transferrin, Transferrin-Rezeptor) verbessert. Des Weiteren werden auch Gene induziert, deren Produkte der Sauerstoffunterversorgung möglichst schnell entgegenwirken, indem eine Gefäßum- und -neubildung induziert und auch die Regulation des Gefäßtonus verändert wird. Dies sind unter anderem der α 1B-adrenerge-Rezeptor, Endothelin-1, NO-Synthase II (NOS II), *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), Adrenomedullin (ADM), Hämoxxygenase-1 (HO-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder *fms-related tyrosine kinase-1* (FLT-1).³⁻⁵ Die meisten der eben vorgestellten Prozesse werden durch HIF-1 vermittelt. HIF-1 ist ein Sauerstoff-abhängig aktivierter Transkriptionsfaktor.⁶ Neben der Induktion von Genen, die eine Verbesserung der O₂-Versorgung gewährleisten sollen, reguliert HIF-1 die Transkription vieler anti-apoptotischer Proteine, die das Überleben der Zellen und somit letztendlich auch des Organismus ermöglichen sollen. Andererseits kann HIF-1 unter chronisch hypoxischen Bedingungen auch pro-apoptotische Signalwege induzieren. Gelingt es den Zellen nicht, sich an die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen zu adaptieren, kommt es zur Apoptose.⁷

Neben HIF-1 gibt es weitere Transkriptionsfaktoren, die unter hypoxischen Bedingungen aktiviert werden. Hier sind zum Beispiel das *activator protein-1* (AP-1), der *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), und die *cAMP response element binding proteins* (CREB) zu nennen.⁸

AP-1 bindet an die *TPA response elements* (TRE), welche in der Promotorregion vieler Gene lokalisiert sind und die Zellproliferation und Tumorprogression regulieren. Hypoxie erhöht die Affinität von AP-1 an die DNA und somit auch die transkriptionelle der Zielgene, zu denen z.B. auch der HIF-1-induzierte Wachstumsfaktor VEGF gehört.⁹ NF- κ B wird durch Stressfaktoren, wie z.B. Zytokine, virale und bakterielle Infektionen, Oxidantien und auch durch Hypoxie aktiviert. NF- κ B transkribiert Gene wie Interleukin-6 (IL-6) und p53, welche die durch Hypoxie ausgelösten Stressantworten vermitteln. Ein Zielgen von CREB ist beispielsweise der *tumor necrosis factor- α* (TNF- α).⁸

2.2 Die Rolle von Hypoxie und HIF-1 in der Tumorbilogie

In soliden Tumoren kommt es aufgrund des rapiden Gewebezuwachses zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff. Einerseits kann Hypoxie Mechanismen induzieren, die das Wachstum und die Differenzierung der Zellen und somit das Fortschreiten des Tumors hemmen oder Zelltod in Form von Nekrose und Apoptose auslösen.¹⁰⁻¹³ Andererseits werden durch die Hypoxie, vor allem durch die Aktivierung von HIF-1, Gene induziert, welche die Angiogenese, die Glykolyse sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren verstärken und die Apoptose hemmen, was ein autarkes Wachstum der Tumorzellen ermöglicht.^{4,5} Neben der hypoxischen Aktivierung von HIF-1 können die beschriebenen Mechanismen, die dem Organismus eine Anpassung an die Hypoxie ermöglichen, im Tumorgewebe auch Sauerstoff-unabhängig durch Mutationen von Tumorsuppressorgenen (z. B. p53, pVHL) oder Onkogenen (*epidermal growth factor (EGF)-receptor* (EGFR), *viral oncogene rous sarcoma proto-oncogene tyrosine-protein kinase* (v-Src), *insulin-like growth factor receptor* (IGF-R)) die Tumorprogression verstärken.⁴

In Bezug auf die Metastasierung können ebenfalls Einflüsse von Hypoxie und HIF-1 beobachtet werden, da unter Hypoxie Gene induziert, welche die Invasions- und Migrationsfähigkeiten und somit die Aggressivität des Tumors verstärken. Zu Beginn der Metastasierung lösen sich einzelne Zellen vom Tumor ab, durchbrechen die Basallamina, wandern in das umliegende Gewebe ein und gelangen schließlich über den Blutkreislauf oder das Lymphsystem zu anderen Organen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die für die Metastasierung notwendigen Gene durch Hypoxie induziert werden können.^{14,15} Dazu gehören unter anderem Enzyme, die zur Lyse der Basallamina führen und Veränderungen der extrazellulären Matrix herbeiführen (z.B. Matrixmetallo Protease 2 (MMP2), *urokinase-type plasminogen activator receptor* (uPAR), Cathepsin D, *autocrine motility*

factor (AMF), *hepatocyte growth factor receptor* (c-Met).⁵ Des Weiteren kommt es durch Hypoxie zu einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen, was eine erleichterte Ablösung der Zellen vom Tumor ermöglicht.^{16,17}

Durch intratumorale Hypoxie wird auch die Behandlung von Krebs erschwert. Dies trifft sowohl auf die Therapie mit Chemotherapeutika als auch auf die Anwendung ionisierender Strahlung zu.¹⁸⁻²³ Ionisierende Strahlung schädigt die Zellen letal durch Doppelstrangbrüche der DNA, die nicht mehr repariert werden können. Die in der Strahlentherapie verwendete ionisierende Strahlung wirkt nur zu einem geringen Teil über einen direkten Einfluss auf die DNA. Der weitaus größere Effekt der Strahlung ist auf die indirekte Wirkung über die Bildung freier Radikale, die mit der DNA reagieren, zurückzuführen. Der initiale Schaden durch die Strahlung wird durch Peroxide verstärkt. Die Doppelstrangbrüche der DNA wiederum haben den Zelltod der geschädigten Zellen zur Folge. Da für die Bildung der Peroxide die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff im Gewebe erforderlich ist, kann dies nur in gut oxygenierten Zellen passieren.²⁴ Aufgrund der Gewebshypoxie im Tumor treten bei der Chemotherapie hauptsächlich zwei Probleme auf. Der schnell wachsende Tumor ist sehr heterogen mit Blutgefäßen durchzogen, wodurch die hypoxischen Bereiche entstehen. Da die Chemotherapeutika meistens intravenös gegeben werden, gelangen die Wirkstoffe nur in stark verringerten Konzentrationen in diese unterversorgten Gebiete des Tumors. Weiterhin werden HIF-1 α -abhängige Gene wie der *multi-drug-resistance transporter* (MDR1) hochreguliert, wodurch es unter Hypoxie zu einem verstärkten Abtransport der Chemotherapeutika aus den Tumorzellen, und somit zu einer Resistenz gegen die Therapeutika, kommt.²⁵⁻²⁸

Wie aus den bereits beschriebenen Mechanismen deutlich wird, ist die Rolle von HIF-1 im Tumorgeschehen vielfältig. Die Art des Tumors und die weiteren genetischen Veränderungen, die das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptischen Stimuli beeinflussen, sind hierbei von entscheidender Bedeutung. Auch wenn in einigen Studien eine Überexpression von HIF-1 α in Tumoren zu einer geringeren Mortalität führte, ist in den meisten Fällen eine Überexpression von HIF-1 α mit einer schlechten Prognose gleichzusetzen. In verschiedenen Tumorarten konnte eine Überexpression von HIF-1 im Vergleich zu untransformiertem Gewebe festgestellt und eine negative Korrelation mit dem Therapieerfolg hergestellt werden.^{29,30} Im Allgemeinen wird Hypoxie im Tumorgewebe heute als Marker für die Malignität angesehen.²² Die dominierende Rolle von HIF-1 in der Tumorbiologie kann auch beim VHL-Syndrom beobachtet werden. Das VHL-Syndrom tritt bei einem von 36.000 Menschen auf.³¹ Typisch für dieses Syndrom ist

die Entwicklung von hypervaskulären Tumoren in verschiedenen Organen, u.a. dem zentralen Nervensystem und den Nieren.³² Eine typische Krebsform für das VHL-Syndrom sind RCCs, die häufigste Form von Nierenkrebs. Das VHL-Tumorsuppressor-Gen ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese von RCCs, in deren Zellen das VHL-Gen auf beiden Allelen inaktiviert ist. Mutationen des VHL-Gens treten in den VHL-Syndrom assoziierten RCCs genauso wie in sporadisch auftretenden RCCs auf. Das Genprodukt des VHL-Gens ist das in der Regulation von HIF-1 beschriebene wichtige VHL-Protein (pVHL), das essentiell für den Abbau von HIF-1 α und somit für die Regulierung von HIF-1 ist. Mutationen des pVHL führen entweder zu einer verminderten Bindung an das HIF-1 α -Protein oder an die weiteren Komponenten des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, was zu einer Akkumulation von HIF-1 α und einer damit gesteigerten HIF-1-Aktivität in führt.³¹ In RCCs kommt es, vermutlich durch die Überaktivierung von HIF-1, zu einer Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie,^{31,33} was verdeutlicht, wie wichtig die Forschung nach neuen Ansätzen für die Krebstherapie auf diesem Gebiet ist.

Nachdem die Rolle von Hypoxie und HIF-1 in der Tumorbilogie vorgestellt wurde, wird im Folgenden auf die Regulation und Struktur des Transkriptionsfaktor HIF-1 näher eingegangen.

2.3 HIF-1

HIF-1 ist ein Sauerstoff-regulierter Transkriptionsfaktor, der nach derzeitigem Stand die Transkription von mehr als 70 Proteinen induziert.⁶ Die durch HIF-1 regulierten Gene haben alle ein *hypoxia responsive element* (HRE) mit der Sequenz 5'-RCGTG-3' in ihrer Promotor- oder Enhancerregion, das dem Transkriptionsfaktor HIF-1 als Bindestelle an der DNA dient.³⁴

2.3.1 Struktur

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer 120 kDa α - und einer 94 kDa β -Untereinheit (UE) besteht. Nur als Heterodimer kann HIF-1 als Transkriptionsfaktor fungieren. Die β -UE ist auch unter *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) bekannt. Beide UE sind Mitglieder einer großen Familie von Transkriptionsfaktoren, der *basic helix-loop-helix* PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS)-Proteinfamilie, und die Struktur der α - und β -UE sind sich sehr ähnlich (Abbildung 1).³⁴ Neben HIF-1 sind auch die beiden Isoformen HIF-2 und HIF-3 bekannt. Diese

unterscheiden sich einerseits strukturell durch die beteiligte α -UE (HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α), andererseits durch ihrer Funktion und Gewebesdistribution.³⁵⁻³⁷ In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf HIF-1 und daher wird im Folgenden nur dessen Struktur und Regulation dargestellt.

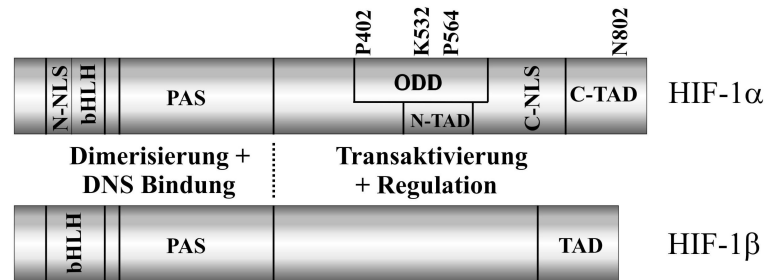


Abbildung 1: Proteinstruktur von humanem HIF-1 α und HIF-1 β

HIF-1 α und HIF-1 β besitzen am N-Terminus eine bHLH-Domäne, die in Verbindung mit der PAS-Domäne die Dimerisierung und DNS-Bindung von HIF-1 vermittelt. Eine TAD in HIF-1 β und zwei TADs (N-TAD und C-TAD) in HIF-1 α dienen der Rekrutierung von Kofaktoren. Des Weiteren besitzt die α -Untereinheit die ODD, einen Bereich der die Regulation des Proteins durch Sauerstoff vermittelt sowie zwei Kernlokalisationssequenzen (N-NLS und C-NLS). Die α -Untereinheit unterliegt verschiedenen posttranslationalen Modifikationen. P402 und P564 werden Sauerstoff-abhängig durch die PHD hydroxyliert und dienen als Bindungsstellen für pVHL. Die Acetylierung von K532 durch ARD1 erleichtert diese Interaktion. Eine weitere Hydroxylierung an N803 durch die FIH verhindert die Bindung der Kofaktoren und diente so der Regulation der Aktivität.

Das N-terminale Ende enthält bei beiden UE die bHLH-Domäne gefolgt von der PAS-Domäne. Die bHLH- und die PAS-Domäne werden für die Dimerisierung der Untereinheiten benötigt und die bHLH Domäne dient zusätzlich der Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA.^{34,38}

C-Terminal ist bei der HIF-1 β -UE eine Transaktivierungsdomäne (TAD) zur transkriptionellen Aktivierung und Regulation lokalisiert. HIF-1 α enthält neben der C-terminalen (C-TAD) noch eine N-terminale Aktivierungsdomäne (N-TAD) und eine *oxygen-dependent degradation domain* (ODD), die mit der N-TAD überlappt. Die ODD fungiert als Sauerstoffsensoren und bestimmt die Proteinstabilität.^{38,39} Zusätzlich befinden sich noch *nuclear localisation signals* (NLS) am N- und C-terminalen Ende (Abbildung 1).⁴⁰ Neben der beschriebenen HIF-1 α Untereinheit (HIF1 α 826) gibt es noch drei weitere HIF-1 α *splice*-Varianten unterschiedlicher Länge, nämlich HIF-1 α 516, HIF-1 α 557 und HIF-1 α 735. Bei diesen deutlich kürzeren Aminosäuresequenzen fehlen entweder die N-TAD und die C-TAD bzw. nur die C-TAD.³⁹ Die biologische Bedeutung dieser Isoformen ist im Detail noch nicht geklärt.

2.3.2 Regulation

HIF-1 α und -1 β werden beide konstitutiv exprimiert, aber HIF-1 α unterliegt einer strengen posttranslationalen Regulation. Während HIF-1 β im Kern lokalisiert ist, befindet sich HIF-1 α im Zytosol, wo es unter normoxischen Bedingungen einem ständigen Abbau ausgesetzt ist. Fällt dagegen der Sauerstoffpartialdruck ab, so wird HIF-1 α stabilisiert, kann in den Kern translozieren und dort mit HIF-1 β den aktiven Transkriptionsfaktor HIF-1 bilden.³⁴ Wenn auch die Degradation von HIF-1 α der Hauptregulierungspunkt ist (Halbwertszeit von HIF-1 α unter Normoxie ca. 10 min⁴¹), so gibt es auch Faktoren, welche die Synthese der HIF-1 α -UE beeinflussen. Eine weitere Ebene der Regulierung liegt in der Kontrolle der Dimerisierung der beiden UE und der Aktivität des Transkriptionsfaktors. Die einzelnen Schritte der HIF-1-Aktivierung sind in Abbildung 2 zusammengefasst und werden nun im Detail vorgestellt.

2.3.2.1 Degradation

HIF-1 α wird unter Normoxie kontinuierlich durch das 26S-Proteasom abgebaut.⁴² Vermittelt wird dieser Abbau der α -UE durch die ODD, die unter Normoxie durch das pVHL erkannt wird. pVHL ist ein Teil eines aus mehreren Untereinheiten bestehenden E3-Ubiquitin-Proteinligase-Komplexes aus Elongin B, Elongin C, Rbx und Cullin-2. Hierdurch wird HIF-1 α polyubiquitiniert und dadurch für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert.^{39,43} pVHL kann nur an HIF-1 α binden, wenn dieses an den Prolinresten 564 und 402 in der ODD hydroxyliert ist (Abbildung 1). Diese Hydroxylierung erfolgt durch Mitglieder der Prolin-4-Hydroxylase-Familie, die HIF-1 α -Prolylhydroxylasen (PHD) 1-3. Von den humanen Isoformen ist für die Regulation von HIF-1 α vermutlich nur die PHD2 von Bedeutung, die wiederum auch durch HIF-1 transkriptionell induziert wird.⁴⁴ PHDs gehören zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.^{45,46} Sie können in der Zelle als Sauerstoffsensoren angesehen werden, da sie für die vollständige Aktivität neben 2-Oxoglutarat und zweiwertigem Eisen auch noch molekularen Sauerstoff benötigen.⁴⁴ Aufgrund der fehlenden Hydroxylierung kann unter Hypoxie pVHL nicht an HIF-1 α binden, die Polyubiquitinierung bleibt aus und HIF-1 α akkumuliert und transloziert in den Kern. Im Zellkern können dann die α - und die β -UE von HIF-1 dimerisieren und an die HRE in den Promotoren der Zielgene binden (Abbildung 2).

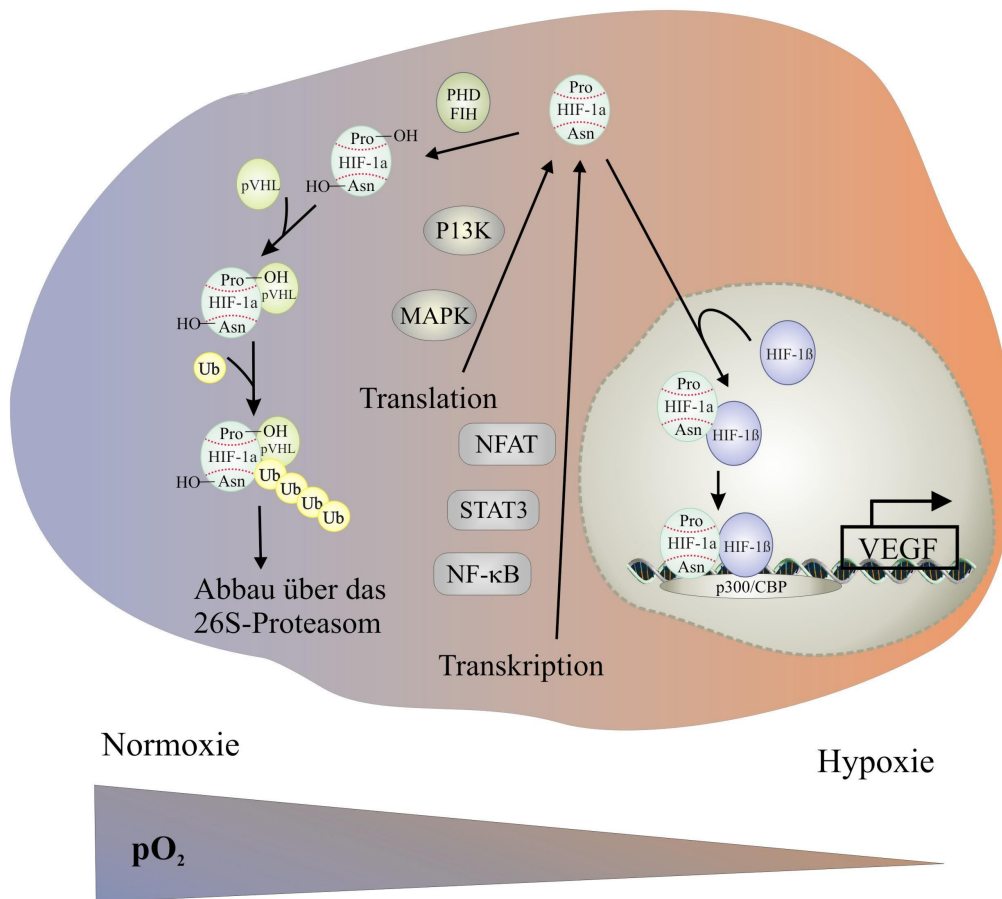


Abbildung 2: Regulation von HIF-1

Unter Normoxie wird HIF-1 α durch die PHD und FIH hydroxyliert. Dadurch kann zum einen p300/CBP nicht an HIF-1 binden und zum anderen führt die Bindung von pVHL an HIF-1 α zu einer Polyubiquitinierung und dem anschließenden Proteinabbau über das 26S-Proteasom. Unter Hypoxie sind sowohl die PHD als auch FIH inhibiert, HIF-1 α transloziert in den Zellkern, dimerisiert mit HIF-1 β und rekrutiert Kofaktoren wie p300/CBP. Durch die Bindung von HIF-1 an die DNA kommt es zur Expression der Zielgene, z.B. VEGF. Sauerstoff-unabhängig kann über NFAT, STAT3 und NF- κ B die Transkription und über MAPK/PI3K-Signalwege die Translation von HIF-1 α erhöht werden.

Es gibt noch zwei weitere posttranslationelle Modifikationen, denen die HIF-1 α -UE unterliegt. Zum einen wird ein spezifischer Lysinrest innerhalb der ODD (K532) durch die Acetyltransferase *arrest-defective 1* (ARD1) acetyliert, wodurch die Bindung von pVHL an HIF-1 α verbessert wird (Abbildung 1). Unter Hypoxie wird ARD1 inhibiert, was wiederum die hypoxische Stabilisierung von HIF-1 α unterstützt.⁴⁷ Zum anderen konnte im Maus-Modell beobachtet werden, dass eine Nitrosylierung am Cystein 533 (humanes Analog C520) in der ODD nach Interaktion von Tumorzellen mit TAMs zu finden war. Hierdurch wurde der Abbau der HIF-1 α -UE blockiert und die Aktivierung von HIF-1 ermöglicht.⁴⁸ Obwohl die Nitrosylierung bisher nur im Maus-Modell festgestellt wurde, könnte dieser Mechanismus auch in humanen Zellen stattfinden.

Neben Hypoxie können auch andere Stimuli zur Akkumulation von HIF-1 α führen. Diese Agenzien werden auch Hypoxie-Mimetika genannt, weil sie eine ähnliche Wirkung wie der Sauerstoffmangel auf die Stabilität von HIF-1 α haben. Da PHDs neben Sauerstoff auch 2-Oxoglutarat und zweiwertiges Eisen benötigen, können auch CoCl₂ oder Desferoxamin (DFO) die PHD inhibieren. Co²⁺ konkurriert mit Fe²⁺ um seine Bindungsstelle an den PHDs, während DFO Fe²⁺ komplexiert und es für die PHD unzugänglich macht.^{49,50} Auf die Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO), das ebenfalls die Aktivität der PHD modulieren kann, wird in Abschnitt 2.3.2.5 eingegangen.

2.3.2.2 Transaktivierung von HIF-1

Selbst wenn unter Hypoxie die beiden HIF-1-UE dimerisieren können, bedarf es noch einiger anderer Faktoren für die Aktivierung der Transkription. Zum einen muss HIF-1 α erst durch Kinasen der *mitogen activated phosphorylase kinase* (MAPK)-Familie phosphoryliert werden, bevor es zur Dimerisierung und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors kommen kann.⁵¹ Zum anderen muss der Ko-Aktivator p300/*CREB binding protein* (CBP) an einen Sequenzabschnitt innerhalb der C-TAD von HIF-1 α binden.⁵² Damit p300/CBP überhaupt an HIF-1 α binden kann, darf ein bestimmter Aparaginrest (Asn 803) in der C-TAD nicht hydroxyliert sein (Abbildung 1). Diese Hydroxylierung geschieht durch eine weitere Eisen- und Sauerstoff-abhängige Dioxygenase, die auch *factor inhibiting HIF* (FIH) genannt wird. Unter Normoxie hydroxyliert FIH HIF-1 α , p300/CBP kann nicht binden und HIF-1 kann nicht als Transkriptionsfaktor aktiv werden.⁵³

2.3.2.3 Synthese

Die Regulation von HIF-1 geschieht vor allem über den Abbau von HIF-1 α . Jedoch kann die HIF-1 α -Expression zusätzlich über weitere Faktoren moduliert werden. Der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) Weg und die Aktivität der Proteinkinase B (PKB/AKT) sind z.B. an der Regulation des HIF-1 α -Gehalts unter Normoxie wie auch Hypoxie beteiligt, indem sie die Translation der HIF-1 α -mRNA induzieren.^{54,55} Auch die Mitglieder der MAP-Kinase-Familie haben einen stimulierenden Einfluss auf den HIF-1 α -Proteingehalt. Dies konnte schon für die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38 MAP-Kinase gezeigt werden.^{56,57} Stimuliert wird die Erhöhung der Synthese durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder andere mitogene Signale, was in einer erhöhte

Genexpression von HIF-1-Zielgenen auch unter Normoxie resultiert.^{38,58,59} Außerdem ist den letzten Jahren deutlich geworden, dass es unter bestimmten Bedingungen ebenfalls zu einer Induktion von HIF-1 α -mRNA kommt. NF- κ B war der erste Transkriptionsfaktor, für den gezeigt wurde, dass er die HIF-1 α -mRNA induziert.^{60,61} Für so unterschiedliche Stimulanzen wie Lipopolysaccharide (LPS),⁶¹ depolymerisierte Mikrotubuli,⁶² TNF- α ,^{63,64} ROS⁶⁵ und IL-18⁶⁶ wurde gezeigt, dass sie in der Lage sind, die mRNA von HIF-1 α NF- κ B-abhängig zu induzieren. NF- κ B kann HIF-1 α -mRNA auch unter Hypoxie induzieren und neuste Arbeiten zeigen, dass NF- κ B auch an der basalen mRNA-Expression beteiligt ist.⁶⁷⁻⁶⁹ Weiterhin wurde gezeigt, dass *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3) die HIF-1 α -mRNA Src-Kinase-abhängig induzieren kann.⁷⁰ NFAT induziert in Mastzellen nach Inkubation der Zellen mit Ionomycin und Substanz P, einem Mastzell-Aktivator, die HIF-1 α -mRNA. Beide Reagenzien erhöhen die intrazellulären Ca²⁺ Konzentration, wodurch es zu einer Aktivierung von Calcineurin und dadurch auch von NFAT kommt.⁷¹ Weiterhin wurde auch gezeigt, dass endoplasmatisches Retikulum (ER)-Stress die HIF-1 α -mRNA Ca²⁺-unabhängig erhöhen kann, wobei hier der beteiligte Transkriptionsfaktor ungeklärt blieb.⁷² Wird Sauerstoff-unabhängig die Transkriptions- oder Translationsrate der HIF-1 α -mRNA erhöht, so ist die Syntheserate höher als die Abbaurate und es kommt zur Akkumulation und Aktivierung von HIF-1.

2.3.2.4 ROS und HIF-1-Regulation

ROS sind Teil der intrazellulären Kommunikation. Unter Stress, beispielsweise Sauerstoffmangel, produzieren Zellen, insbesondere in den Mitochondrien, verstärkt ROS. Dies geschieht durch erhöhte NAD(P)H Oxygenase I-Aktivität bei gleichzeitiger Inhibition der mitochondrialen Atmungskette aufgrund der Abwesenheit des finalen Elektronenakzeptors O₂.⁷³ Während ROS in niedrigen Konzentrationen Rezeptoren, Enzyme und Transkriptionsfaktoren beeinflussen und somit als Signalstoffe fungieren, führen sie in höheren Konzentrationen zu Zellschäden, Mutagenese, Apoptose und Nekrose. Die Wirkung von ROS auf HIF-1 ist unterschiedlich unter Normoxie und Hypoxie. Ansätze zeigen, dass ROS HIF-1 unter Hypoxie inhibieren. ROS, im Speziellen H₂O₂, konnten die Akkumulation des HIF-1-Zielgens EPO unter Hypoxie reduzieren.⁷⁴ Weiterhin wird durch einen Anstieg der ROS unter Hypoxie die Bindung von HIF-1 an die DNA verschlechtert.⁷⁵ Während unter Anoxie der nicht vorhandene Sauerstoff zur Inhibition der PHD führt, wird dieser Effekt unter Hypoxie nicht nur durch den Sauerstoffmangel sondern auch durch die erhöhte, vermutlich aus den Mitochondrien

stammende, ROS-Konzentration erreicht.⁷⁶ ROS beeinflussen neben der Wirkung unter Hypoxie die HIF-1 α -Aktivität auch unter Normoxie. In einigen Zellen konnte festgestellt werden, dass ein Anstieg von ROS mit einem Anstieg der HIF-1 α -Proteinmenge korreliert.⁷⁷ Die Zytokin-vermittelte Stabilität von HIF-1 α scheint ebenfalls über einen ROS-sensitiven Weg zu erfolgen. Mechanistisch oxidieren ROS Fe²⁺ zu Fe³⁺, wodurch die PHD und damit auch die Degradation von HIF-1 α inhibiert wird.⁷⁸

2.3.2.5 NO und HIF-1-Regulation

NO ist ein Radikal, das bei der Regulation vieler biologischer Funktionen eine Rolle spielt. Es induziert beispielsweise Vasodilatation, reguliert Blutplättchenadhäsion, fungiert als Neurotransmitter und ist auch Mediator bei Zellwachstum und Apoptose. NO ist ein kleines, fast unpolares Molekül, das daher ohne Probleme durch Zellmembranen diffundiert. Zusätzlich kann NO zu Nitrit und Nitrat oxidiert werden, wodurch es neutralisiert werden kann, ohne dass ein zusätzlicher Entsorgungsmechanismus gebraucht wird.⁷⁹ NO reagiert intrazellulär mit molekularem Sauerstoff, Superoxidanionen, Metallionen und auch Thiolen weiter zu z.B. NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O₃, N₂O₄ und zu Peroxynitrit (ONOO⁻), die als RNI zusammengefasst werden.^{80,81} NO wird durch die NOS gebildet. Diese setzt L-Arginin zu NO und L-Citrullin um, wobei NADPH, FAD und Tetrahydrobiopterin (BH₄) als Kofaktoren benötigt werden.⁸² Es gibt 3 Isoformen der NOS: die neuronale NOS (nNOS oder NOS I), die induzierbare NOS (iNOS oder NOS II) und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS III). Während die nNOS und eNOS konstitutiv exprimiert werden, unterliegt die iNOS-Expression einer strengen Regulierung und spielt vor allem bei Entzündungsreaktionen und immunologischen Prozessen eine Rolle.⁸² NO hat zwei unterschiedliche biochemische Wirkungen. Einerseits kann es an eine Hämgruppe der Guanylatcyklase binden und diese dadurch aktivieren, wodurch cGMP gebildet wird und untergeordnete Signalwege aktiviert werden. Andererseits kann NO Proteine modifizieren und dadurch ihre Funktionen verändern. Die vaskuläre Relaxierung durch NO wird beispielsweise über cGMP reguliert, wogegen durch Nitrosylierung NF- κ B inhibiert wird.⁷⁹

Die Wirkung von NO auf HIF-1 ist komplex. Einerseits scheint NO HIF-1 α unter Normoxie zu stabilisieren, indem es das Eisenbindezentrum der PHD kompetitiv blockiert.⁸³ Andererseits wurde auch gezeigt, dass es unter Hypoxie in Kombination mit dem NO-Donor SNP zu einer Inhibierung der HIF-1 Bindung an die DNA kommt⁸⁴ und dass die Hemmung der mitochondrialen Respiration durch NO zum Abbau von HIF-1 α

unter Hypoxie führt.⁸⁵ Dabei besetzt NO die Bindestelle für O₂ an der Cytochrom C Oxidase, die Teil der mitochondrialen Atmungskette ist. Dadurch steht das O₂ nun wieder verstärkt der PHD zur Verfügung, wodurch HIF-1 α hydroxyliert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass HIF-1 α unter Hypoxie und NO nicht weniger synthetisiert, sondern verstärkt abgebaut wird.⁸⁵ Ein anderer Ansatz erklärt die inhibierende Wirkung von NO unter Hypoxie mit der Wirkung von NO auf die ROS-Produktion. In HepG2-Zellen wurde unter Hypoxie eine verminderte ROS-Produktion im Vergleich zur Normoxie gemessen. Durch Zugabe von DETA-NO konnte die ROS-Konzentration wieder auf Normoxie-Level erhöht und eine Aktivierung der PHD beobachtet werden, wodurch es, wie unter Normoxie, zum HIF-1 α -Abbau kam.⁸⁶ Neben dem Einfluss, den NO auf den Abbau von HIF-1 α hat, kann es auch dessen Synthese und die Transaktivierung modulieren. Steigende NO-Konzentrationen können weiterhin die monomere GTPase Ras aktivieren, welche wiederum die MAPK- und PI3K-Wege stimuliert. Diese können dann die Sauerstoff-unabhängige Synthese von HIF-1 verstärken.^{79,87} Ebenfalls scheint eine verstärkte Bindung von p300/CBP an HIF-1 möglich zu sein, wenn durch NO ein Cystein (Cys 800) in der C-TAD nitrosyliert wurde.⁸⁸

2.3.2.6 Calcium²⁺ und HIF-1-Regulation

Ca²⁺ ist ein wichtiger intrazellulärer *second messenger*. Einige Studien zeigen, dass sich unter Hypoxie in vielen Zellen der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel erhöht. Hierbei wird nicht nur Ca²⁺ aus dem ER⁸⁹ und den Mitochondrien⁹⁰ freigesetzt, sondern strömt auch aus dem Extrazellulärraum in die Zelle.⁹¹ In erregbaren Zellen, wie z.B. den Neuronen, findet der Ca²⁺-Einstrom vor allem über die spannungsabhängigen (VOCC) und die ligandenabhängigen Ca²⁺-Kanäle (LOCC) statt. Die *transient receptor potential* (TRP) Kanäle, die in fast allen Zellen vorkommen, sind somit in den nicht-erregbaren Zellen im Wesentlichen für den Ca²⁺-Einstrom verantwortlich.⁸⁹

Es gibt einige widersprüchliche Ergebnisse, was zum einen den Effekt von Hypoxie auf die Ca²⁺-Konzentration und zum anderen die Wirkung des Ca²⁺ auf HIF-1 betrifft. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mit dem Ca²⁺-Ionophor A23187 verstärkte die Neusynthese und Akkumulation von HIF-1 α über eine Aktivierung der MAPK und der PI3K/PKB.⁹² Andererseits führt die Reduktion des intrazellulären Ca²⁺ durch BAPTA-AM zu dem gleichen Effekt, was durch eine Inhibition der PHD-Aktivität erklärt wird.^{92,93} Während einige Ergebnisse eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch Hypoxie zeigen, wird auch diskutiert, dass Ca²⁺ unter Hypoxie

vielmehr eine Verschiebung vom Zytosol in den Zellkern mitmacht. Da die PHD2 im Zytosol lokalisiert ist, wird ihr, unter der Annahme, dass Ca^{2+} für ihre Aktivität notwendig ist, somit unter Hypoxie das Ca^{2+} regelrecht entzogen.⁹³ Andererseits scheint im speziellen Fall von VEGF die Expression nicht durch Ca^{2+} beeinflusst zu werden.⁹⁴

2.4 Das Calpain-System

Calpaine sind eine Familie von Ca^{2+} -abhängigen Cysteinproteasen, die in vielen intrazellulären Prozessen, wie z.B. die Umsetzung von Zytoskelettproteinen und der Regulation von Kinaseaktivitäten und Transkriptionsfaktoren involviert sind. Ihre am häufigsten genannten Mitglieder sind die mikro (μ)- und milli (m)-Calpaine, die nach den zur benötigten Ca^{2+} -Konzentrationen benannt worden sind.⁹⁵ Als zusätzliche Regulationsebene exprimieren Zellen Calpastatin, das mit dem Calpain in der Zelle kolokalisiert ist und als natürlich vorkommender Inhibitor die proteolytische Aktivität der Calpaine hemmt.⁹⁶ Auch wenn der Mensch nur ein Gen für Calpastatin besitzt, so liegt es in Isoformen zwischen 17.5 kDa und 84 kDa vor. Dies wird auf verschiedene Promotoren oder auch alternatives *Splicing* zurückgeführt. Mindestens acht verschiedene Isoformen konnten bisher aus Geweben isoliert werden, wobei pro Gewebe mehr als eine Isoform vorkommen kann. Es gibt keine Hinweise darauf, dass die Isoformen eine Spezifität für die verschiedenen Calpaine aufweisen.⁹⁷

Im Menschen konnten bisher 12 verschiedene Calpain-mRNAs isoliert werden, die starke Homologien zu den bereits untersuchten Calpainen aufweisen.⁹⁷ Die Expression der einzelnen Calpaine sind je nach Gewebetyp und Organismus sehr unterschiedlich.⁹⁸ Es gibt Ansätze, die vermuten lassen, dass Calpaine aufgrund noch ungeklärter Signale, möglicherweise einem Ca^{2+} -Einstrom, zur Zellmembran wandern, während Calpastatin weiterhin im gesamten Zytosol verteilt bleibt.⁹⁷ Die Translokation zur Membran könnte für die Aktivierung des Calpains notwendig sein, da gezeigt werden konnte, dass die benötigte Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung der Calpaine durch die Gabe von Phospholipiden herabgesetzt wurde.^{95,99-101} Substrate der Calpaine sind u.a. Zytoskelettproteine wie Fodrin, Talin, Filamin, eine Reihe von Membranproteinen einschließlich Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (z.B. der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF)), Adhäsionsmoleküle wie Integrin und Cadherin und auch Iontentransporter.⁹⁷

2.4.1 Autoproteolyse des Calpains

In Gegenwart hoher Ca^{2+} -Spiegel autoproteolysieren m- und μ -Calpain. Dadurch sinkt die Ca^{2+} -Menge, die zur Aktivierung benötigt wird und die Affinität zu Calpastatin wird erhöht.⁹⁵ Die kleine UE wird bei beiden Calpainen auf 18 kDa verkleinert und die große UE des μ -Calpains wird auf 76 kDa, die des m-Calpains auf 78 kDa reduziert. Die nicht autoproteolysierten Calpaine sind keine Proproteine, sondern weisen bereits eine, wenn auch deutlich schwächere, Aktivität auf.^{97,102} Die Bedeutung der Autoproteolyse wird kontrovers diskutiert. Es wird deshalb vermutet, dass die abgespaltenen Peptide eine wichtige Rolle bei Regulationsprozessen innehaben, die bis jetzt noch nicht bekannt ist. Vergleichsweise lässt sich der vasokonstriktive Effekt der Peptide, die durch Spaltung des Fibrinogens bei der Produktion von Fibrin zu Blutgerinnung freigesetzt werden, heranziehen.¹⁰³ Alternativ wird vermutet, dass durch die Autoproteolyse die Halbwertszeit der Calpaine herabgesetzt wird und dies als zusätzlicher Regulationsmechanismus dienen könnte.¹⁰⁴

2.5 Makrophagen-Polarisierung

Makrophagen gehören zu den CD11b^+ -Leukozyten und sind ein Teil des kongenitalen Immunsystems. Sie differenzieren im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen zu Monozyten, die in den Blutkreislauf auswandern und somit im Körper zirkulieren. Kommt es z.B. aufgrund einer Verletzung zu einer Bakterienansammlung im Gewebe, so wandern die Monozyten ins Gewebe ein und differenzieren dort zu Makrophagen.¹⁰⁵ Makrophagen sind, abhängig von ihrer Mikroumgebung, in der Lage, ein breites Spektrum von Phänotypen auszubilden.¹⁰⁶

Die Hauptaufgabe von Makrophagen ist, zwischen körpereigenen und körperfremden (z.B. Bakterien oder Viren) oder auch körpereigenen, aber entarteten Zellen (z.B. Tumorzellen oder auch apoptotische und nekrotische Zellen) zu unterscheiden und die letzteren zu eliminieren, um damit die Immunantwort zu regulieren. Bei soliden Tumoren wurde jedoch beobachtet, dass sich das Verhalten der Makrophagen in unmittelbarer Nähe zu den Tumorzellen umkehrt. Die Makrophagen wandern in den Tumor ein und verstärken die Aggressivität der Krebszellen, indem sie z.B. die Metastasierung des Tumors fördern. Wie die Krebszellen die Makrophagen für ihre Zwecke umprogrammieren, ist noch unklar. Es konnte gezeigt werden, dass wenn Makrophagen in den Tumor einwandern, sie einen veränderten Makrophagen-Phänotyp ausbilden im Vergleich zu Makrophagen, die z.B. bei

Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen. Um den vielfältigen Funktionen, die durch Makrophagen vermittelt werden, gerecht zu werden, werden die wichtigsten Phänotypen nachfolgend vorgestellt.

2.5.1 Makrophagen-Phänotypisierung

Makrophagen haben ein breites Spektrum an Differenzierungsmustern. Der so genannte „klassische“ Makrophagen-Phänotyp wird in Infektionen oder Verletzungen gefunden. *Toll-like receptor* (TLR)-Liganden wie TNF- α , Interferon- γ (INF- γ) und LPS sind hierbei die Hauptmediatoren, welche die Makrophagen aktivieren. In der ersten Phase der Entzündung sezernieren die Makrophagen ROS, NO und pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-12 und präsentieren Antigene über *major histocompatibility complex II* (MHC II), um die Pathogene zu bekämpfen und weitere Immunzellen zu aktivieren.¹⁰⁷ Allerdings werden nicht nur die Pathogene angegriffen, sondern als Nebeneffekt auch das umliegende Gewebe geschädigt. Daher ist es wichtig, dass die Entzündungsreaktion schnell beendet wird, sobald die Pathogene eliminiert sind.

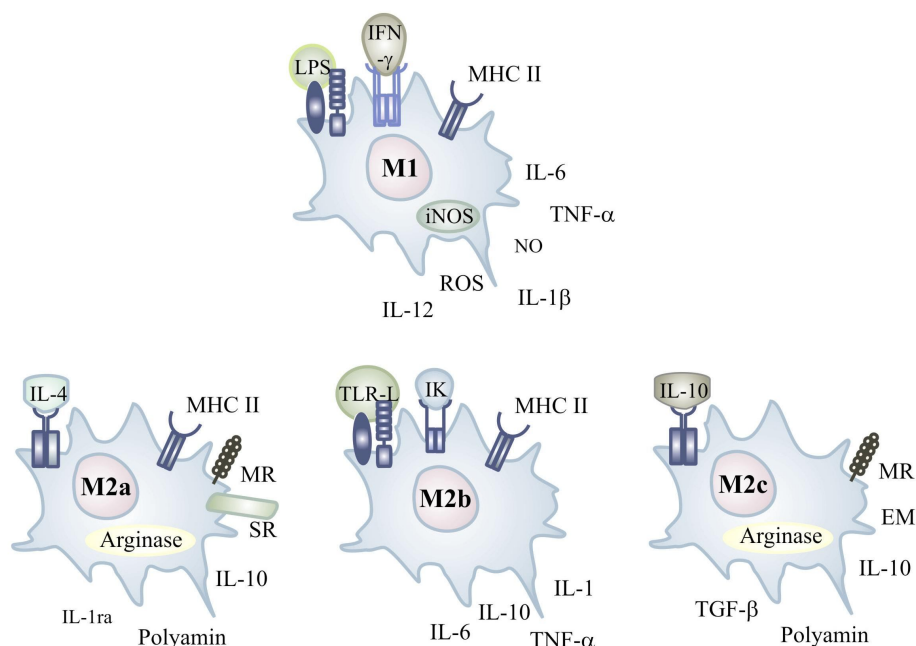


Abbildung 3: Unterteilung der Makrophagen-Phänotypen nach Mantovani

Die M1-Polarisierung wird über LPS und INF- γ induziert. M1-Makrophagen produzieren TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 sowie NO über die iNOS und ROS. Die Antigenpräsentation erfolgt über MHC II. Die M2a-Makrophagen werden durch IL-4 induziert. In ihnen ist die Arginase induziert, wodurch Polyamin freigesetzt wird. Es werden IL-1ra und IL-10 freigesetzt. Sie exprimieren ebenfalls MHC II, aber auch MR und SR. M2b wird durch TLR-L und IK aktiviert und es werden IL-6, IL-10, IL-1 und TNF- α sezerniert und sie exprimieren ebenfalls MHC II. Der M2c wird durch IL-10 induziert und produziert Polyamin, IL-10 und Bestandteile der EM und MR werden exprimiert.¹⁰⁶

Die zweite Phase der Entzündung wird durch Makrophagen vermittelt, die AZ phagozytieren und gleichzeitig zur Wundheilung beitragen. Die Makrophagen sekretieren nun z.B. Wachstumsfaktoren, anti-inflammatorische Zytokine (z.B. IL-10 und TGF- β) sowie pro-angiogenetische wie auch Matrix-restrukturierende Faktoren. Zusätzlich ist in diesen Makrophagen die ROS und NO Bildung unterdrückt. Dieser Makrophagen-Phänotyp wird zur Gruppe der „alternativ aktivierten“ Makrophagen gezählt.¹⁰⁸ Diese Gruppe umschließt wiederum verschiedenste Stimuli und Ausprägungen der Makrophagen, so dass Mantovani *et al.* die Klassifizierung in M1 (der klassische Phänotyp) und M2 (die alternativ aktivierten Phänotypen) vornehmen.¹⁰⁶ Der M2-Phänotyp wird dann je nach aktivierendem Stimulus und anschließender Ausprägung in M2a, M2b und M2c unterteilt (Abbildung 3). Der M2a-Phänotyp wird durch IL-4 und IL-13 aktiviert und ist vor allem bei allergischen Reaktionen und Parasitenbeseitigung beteiligt. Er sezerniert Polyamin, IL-10 und IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra) und exprimiert ebenfalls MHC II, sowie Manose-Rezeptoren (MR) und *scavenger*-Rezeptoren (SR). Der M2b-Typ hingegen wird durch Immunkomplexe (IK) und TLR-Liganden oder IL-1-Rezeptor-Liganden aktiviert. Er sezerniert verstärkt IL-10, allerdings auch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6, IL-1 sowie reduzierte Mengen von IL-12, exprimiert ebenfalls MHC II und ist vor allem an der Immunregulation von Entzündungen beteiligt. Der M2c-Makrophagentyp wird durch IL-10 aktiviert und exprimiert ebenfalls den MR. Außer TGF- β und IL-10 sezerniert dieser Typ auch verstärkt Bestandteile der extrazellulären Matrix (EM) und ist daher neben der Immunregulation auch vor allem an der Matrix- und Gewebs-Restrukturierung beteiligt.¹⁰⁶

Bei dieser Klassifizierung der Makrophagen ist zu beachten, dass es sich um einzelne, isoliert betrachtete Stimuli handelt, die dann den jeweils beschriebenen Makrophagen-Phänotyp hervorrufen. Im Gewebe hingegen sind gleichzeitig eine Vielzahl von unterschiedlichen Stimuli gegeben, sodass die Darstellung von Mosser und Edwards ein physiologischeres Model für die Makrophagen-Phänotypisierung bietet (Abbildung 4).¹⁰⁹ In dieser Darstellung wird nach den Funktionen der Makrophagen, also dem klassisch aktivierten, dem regulatorischen und dem an der Wundheilung beteiligten Phänotyp unterschieden. Die klassisch aktivierten Makrophagen entsprechen dem M1-Phänotyp. Weder die an der Wundheilung beteiligten noch die regulatorischen Makrophagen lassen sich den M2-Phänotypen eindeutig zuordnen und stellen eher Mischformen der M2a-, M2b- und M2c-Typen dar. Besonders hervorzuheben ist, dass nach Mosser und Edwards die Makrophagen-Subtypen ineinander übergehen und somit auch Platz bieten für

Übergangs-Phänotypen, die in der strikten M1/M2-Klassifizierung nicht auftauchen würden. TAMs beispielsweise stellen einen solchen Misch-Phänotyp dar.¹⁰⁹

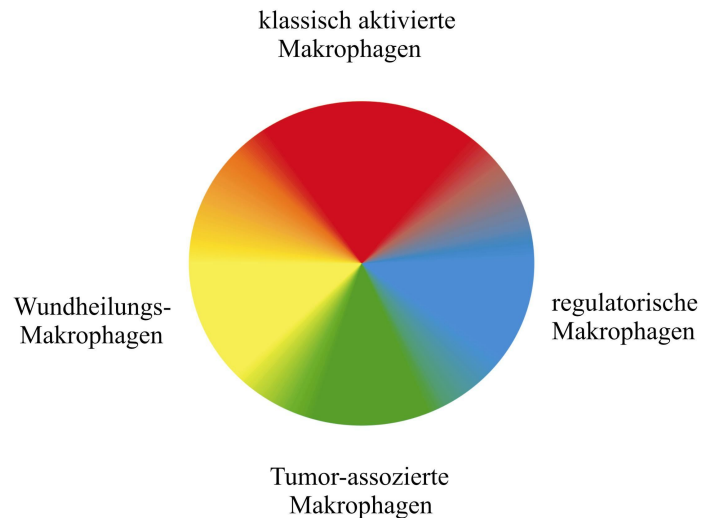


Abbildung 4: Makrophagenklassifizierung nach Mosser und Edwards

Die Unterteilung der Makrophagen erfolgt nach ihren Funktionen. Die Wundheilungs-Makrophagen sind gelb dargestellt, die regulatorischen blau und die klassisch aktivierten Makrophagen werden durch Rot repräsentiert. Die Farbverlauf zeigt an, dass in diesem Schema Mischformen der Makrophagen vorkommen. Zwischen den Wundheilungs- und den regulatorischen Makrophagen ordnen sich in Grün die TAMs an.¹⁰⁹

2.5.2 Makrophagen-Polarisierung durch AZ

Es ist schon länger bekannt, dass AZ nicht nur durch Phagozytose entfernt werden, sondern dabei auch eine anti-inflammatorische Wirkung auf die Immunzellen des angeborenen Immunsystems ausüben. Erste Arbeiten zeigten, dass die LPS-induzierte TNF- α - und IL-1 β -Induktion nach Kokultivierung von humanen Monozyten mit AZ inhibiert war. Dieser Makrophagen-Phänotyp, der durch AZ hervorgerufen wurde, zeichnet sich durch die erhöhte Produktion von TGF- β , Prostaglandin E₂ (PGE₂) und *platelet-activating factor* (PAF) und eine reduzierte Bildung von NO und ROS aus. Weiterhin konnte in Mäusen gezeigt werden, dass auch wenn die Makrophagen nicht mehr in der Lage waren, die AZ zu phagozytieren, es trotzdem zu einer Erhöhung der TGF- β -Produktion und einer Inhibition der TNF- α -Sekretion kam. Das Erkennen von externalisiertem Phosphatidylserin ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Makrophagen/AZ-Interaktion und scheint essentiell für die TGF- β -Induktion in den Makrophagen zu sein. Die Inhibition der NO-Produktion in den Makrophagen wird der erhöhten Expression von Arginase1 bzw. Arginase2 zugeschrieben, wodurch weniger

L-Arginin, das gemeinsame Substrat der Arginase und der iNOS, für die NO-Produktion zur Verfügung steht. Für beide Arginase-Isoformen wurde gezeigt, dass sie durch AZ induziert werden.^{110,111} Neben NO wird auch die ROS-Produktion der Makrophagen durch AZ inhibiert. Durch die Aktivierung des Peroxisom Proliferator aktivierten Rezeptors γ (PPAR γ) wird die Proteinkinase C α (PKC α) gehemmt. Dies führt wiederum zu einer Hemmung der ROS-Produktion, weil die PKC α für die Bildung des NADPH-Oxidase-Komplexes notwendig ist.^{112,113} Die fehlende Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine wird vor allem durch eine Hemmung von NF- κ B in den Makrophagen nach Kontakt mit AZ erklärt. Während die durch AZ-vermittelte NF- κ B-Inhibierung in isolierten Makrophagen mit der Aktivierung von PPAR γ in Verbindung gebracht wird, konnte für TAMs gezeigt werden, dass ein p50 Homodimer NF- κ B inhibiert. Neben den Signalen, die eine Erkennung der AZ durch die Makrophagen voraussetzen, werden auch immer mehr lösliche Faktoren bekannt, die von AZ freigesetzt werden und zur Makrophagen-polarisierung beitragen, z.B. IL-10, TGF- β und S1P.¹¹⁴⁻¹¹⁸ Viele Stimuli, denen die Makrophagen nach Kontakt mit AZ ausgesetzt sind, sind ähnlich denjenigen, denen die Makrophagen im Tumorgewebe begegnen. AZ scheinen somit zur Ausprägung des TAM-Phänotyps beizutragen, da Makrophagen weniger zytotoxisch gegen lebende Tumorzellen waren, wenn sie zuvor mit apoptotischen Tumorzellen kokultiviert wurden.^{111,119-121} *In vivo* war die Tumorenstehung inhibiert, wenn die Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen oder auch dendritische Zellen gestört war.¹²² Weiterhin lassen sich beim Vergleich von TAMs mit Makrophagen, die durch apoptotische Zellen polarisiert wurden, auch bei der Ausprägung des Phänotyps Parallelen erkennen. Daher wird im Folgenden noch näher auf den Phänotyp der TAMs eingegangen.

2.5.3 Tumor-assoziierte Makrophagen

TAMs werden zu den alternativ aktivierten Makrophagen gezählt und ordnen sich von ihrer Phänotyp-Ausprägung zwischen den regulatorischen und den an der Wundheilung beteiligten Makrophagen ein (Abbildung 4).

Im frühen Stadium der Tumorentstehung sind die Makrophagen vermutlich klassisch aktiviert und können zur Entstehung des Tumors beitragen. DNS-Schädigungen, die aufgrund der erhöhten ROS-Produktion der Makrophagen erfolgen, können z.B. zu onkogenen Mutationen führen.¹²³ Während der Tumorprogression verändern sich die Makrophagen im Tumorgewebe und man spricht von TAMs. Die Mechanismen, die zur Polarisierung der TAMs beitragen, sind noch nicht vollständig geklärt, aber die

Tumorumgebung scheint eine entscheidende Rolle dabei zu spielen. Von den Tumorzellen freigesetzte Prostaglandine, extrazelluläre Nukleotide, AZ, IgG-Komplexe, intratumorale Hypoxie und Zytokine, wie IL-4, IL-10 und TGF- β , beeinflussen die TAMs.^{106,124-126} TAMs produzieren hohe Spiegel an IL-10, unterdrücken die Immunantwort gegen die Tumorzellen und sind zusätzlich in der Lage, auch immunsuppressiv auf andere Zellen des Immunsystems zu wirken.¹²⁷⁻¹³⁰

Der Anteil und die Verteilung der TAMs sind je nach Krebsart sehr unterschiedlich. In einigen Ausnahmen, insbesondere bei Brustkrebs, können TAMs bis zu über 50 % der Tumormasse beitragen. Oft lässt sich eine Korrelation zwischen Makrophagen-Dichte und schlechter Prognose für den Patienten feststellen. Viele von den TAMs sezernierte Produkte, wie z.B. EGF, TGF- β , VEGF, IL-1 β und MMPs, tragen zur Invasion, Migration und zur Tumorangiogenese bei.¹³¹⁻¹³³ In Kokultur-Versuchen mit Tumorzellen und Makrophagen wurde die Invasion der Tumorzellen durch eine TNF- α -abhängige MMP-Induktion in den Makrophagen erhöht.¹³⁴ Im Maus-PyMT-Modell konnte gezeigt werden, dass es nach Depletion der Makrophagen zu einer starken Reduktion des Tumorwachstums und zum anderen zu einer verminderten Ausbildung von Blutgefäßen im Tumor kommt.¹³⁵

2.6 Sphingosin-1-Phosphat

S1P ist ein möglicher Immunmodulator im Tumorgewebe. Es ist der Phosphorsäureester des Sphingosins und ein wichtiges Gewebshormon aus der Klasse der Lipidmediatoren des tierischen Organismus. S1P gehört zu den wasserlöslichen Lysophospholipiden und kommt im menschlichen Organismus ubiquitär vor.¹³⁶ Unter den unterschiedlichen Zelltypen, die S1P bilden und freisetzen, sind die wichtigsten Produzenten Thrombozyten und Mastzellen.^{137,138} S1P wird von diesen Zellen durch Mitglieder der *ATP binding cassette* (ABC)-Transporter-Familie exportiert.^{139,140} Die S1P-Konzentration (freies und gebundenes S1P) im Blut liegt zwischen 100-1000 nM, in der Lymphe zwischen 30-300 nM und im Lymphknoten und anderen Geweben zwischen 5-20 nM.^{137,141} S1P und seine Vorstufen, zu denen als wichtigste Vertreter Ceramid und Sphingosin gehören, wirken vielfältig auf die Apoptoseregulation, die Zellhomöostase, Migration und Seneszenz von Zellen und spielen ebenfalls bei inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle.¹⁴²

2.6.1 Synthese und Abbau von S1P

S1P wird aus Ceramid gebildet. Ceramid selbst wird entweder aus Sphingomyelin, einem in der Plasmamembran enthaltenen Phospholipid, freigesetzt oder im Zuge einer intrazellulären de-novo-Synthese im ER aus Palmitoyl-CoA und Serin gebildet.¹⁴³

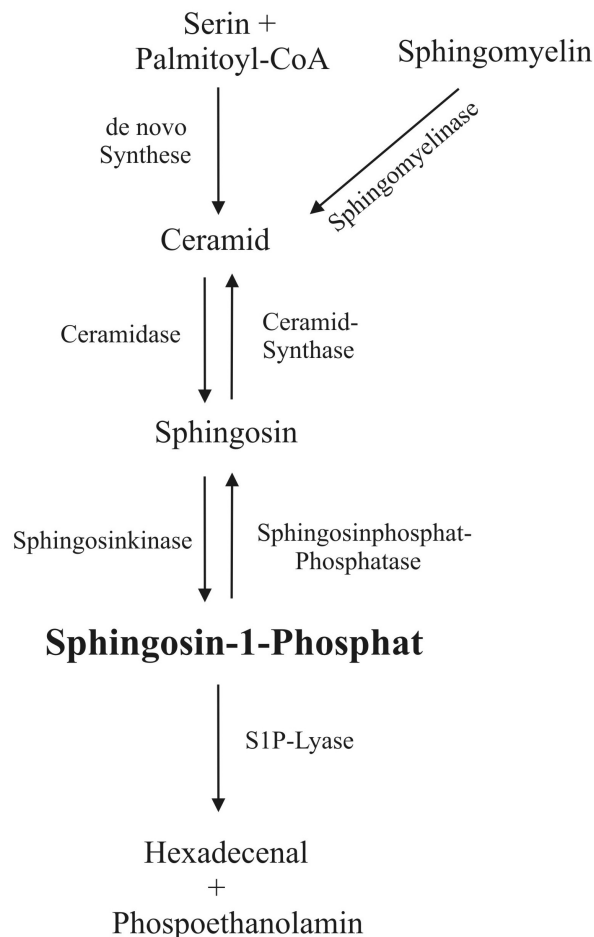


Abbildung 5: Synthese und Abbau von S1P

Die Synthese von Ceramid kann entweder über die de-novo-Synthese ausgehend von Serin und Palmitoyl-CoA, oder über die Spaltung von Sphingomyelin erfolgen. Die Spaltung von Sphingomyelin erfolgt durch die Sphingomyelinasen. Die Umwandlung von Ceramid erfolgt durch die Ceramidase zu Sphingosin und durch die Sphingosin-Kinase weiter zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Umgekehrt kann durch die Dephosphorylierung von S1P durch die S1P-Phosphatase und weiter durch die Ceramid-Synthase Ceramid gebildet werden. Die irreversible Spaltung von S1P in Hexadecenal und Phosphoethanolamin wird durch die S1P-Lyase katalysiert.

Ceramid selbst ist ein wichtiges Signalmolekül, kann aber auch in weitere Botenmoleküle wie Ceramid-1-Phosphat, Galaktosylceramid, Sphingosylphosphocholin, S1P, Psychosin und Sphingosin umgewandelt werden.¹⁴⁴ Mit Hilfe von Ceramidasen entsteht aus Ceramid Sphingosin, das durch die Sphingosin-Kinasen (SK) zu S1P phosphoryliert wird. Es gibt zwei SK-Isoformen, deren Aktivität im ER am höchsten ist.¹⁴⁵ Diesem letzten Schritt der

S1P-Synthese kommt besondere Bedeutung zu, da die Phosphorylierung der geschwindigkeitslimitierende Schritt der S1P-Synthese ist. Daher wird in Abschnitt 2.6.1.1 noch näher auf die SK eingegangen. Die SK bestimmt zusammen mit den S1P-degradierenden Enzymen, S1P-Lyase und S1P-Phosphatase, das Verhältnis von Sphingosin/Ceramid zu S1P (der sog. Sphingolipid-Rheostat). Dieses Verhältnis von proapoptotischem Ceramid zu anti-apoptotischem S1P scheint ausschlaggebend für die Vitalität der Zellen zu sein.^{142,146,147} Der Abbau von S1P erfolgt entweder durch reversible Spaltung durch Mitglieder der Lipid-Phosphat-Phosphohydrolase-Familie oder durch die irreversible Spaltung von S1P in Hexadecenal und Phosphoethanolamin durch die S1P-Lyase.¹⁴⁸⁻¹⁵¹ Die einzelnen Schritte der S1P-Synthese sind in Abbildung 5 zusammen gefasst.

2.6.1.1 Sphingosin-Kinase

Beide Isoformen der SK (SK1 und SK2) katalysieren die reversible Umwandlung von Sphingosin zu S1P. Die Isoformen unterscheiden sich neben ihrer Expression während der Embryonalentwicklung und dem Auftreten in unterschiedlichen Geweben¹⁵²⁻¹⁵⁴ auch in funktioneller Weise.^{155,156} Bei erhöhter SK1-Aktivität wird häufig gesteigertes Wachstum, Proliferation und eine erhöhte Vitalität der Zellen festgestellt.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Im Gegensatz dazu wird das Protein der SK2 mit pro-apoptotischen Vorgängen in Verbindung gebracht. Es wurde gezeigt, dass die SK2 durch die Hemmung der DNA-Synthese oder durch die Freisetzung von Cytochrom C Apoptose induzieren kann.^{160,161} Die SK2 kann durch eine N-terminal gelegene *B-cell lymphoma protein-2* (Bcl-2)-bindende (BH3)-Domäne im Protein mit Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie interagieren und Apoptose auslösen.¹⁶⁰ Weiterhin wurde durch *knockdown* Experimente gezeigt, dass in AZ die SK2-Aktivität für die erhöhte S1P-Freisetzung verantwortlich ist.¹¹⁷ Das SK2-Protein selbst scheint proapoptotisch zu wirken, während das Produkt S1P anti-apoptotisch ist.

Die Mechanismen, die der Aktivierung der SK zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Regulation der Isoenzyme kann sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch durch posttranslationelle Modifikationen erfolgen. So konnte nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (*platelet derived growth factor* (PDGF))¹⁶² oder Zytokinen (TGF- β , TNF- α , IL-1 β),^{163,164} aber auch unter Hypoxie^{165,166} ein erhöhter mRNA-Gehalt der SK1 detektiert werden. Als Faktoren, die zu einer Induktion der SK-Aktivität führen, sind unter anderem TNF- α ,¹⁶⁷ IL-1 β ,^{163,168} PDGF,¹⁶⁹ VEGF,¹⁷⁰ EGF,¹⁷¹ *nerve growth factor* (NGF),¹⁷² *basic fibroblast growth factor* (bFGF),¹⁷²

Lysophosphatidsäure (LPA),¹⁷³ 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)¹⁷⁴ und S1P selbst¹⁷⁵ beschrieben. *In vitro* führte die Zugabe von Phosphatidylserin, Phosphatidylinosit und Phosphatidylsäure zu einer Steigerung der SK-Aktivität.¹⁷⁶ Das lässt vermuten, dass eine Translokation der Enzyme an die Plasmamembran zur Aktivitätssteigerung beiträgt.

2.6.2 Die S1P-vermittelte Signaltransduktion

S1P ist Ligand einer G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie, deren Mitglieder in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert sind. Es sind fünf S1P-Rezeptoren (S1P₁ – S1P₅) beschrieben, die zu der Familie der *endothelial differentiation gene* (EDG)-Rezeptoren gehören. Diese Rezeptorfamilie beinhaltet insgesamt acht Rezeptor-Subtypen, die S1P und LPA spezifisch binden können.¹⁷⁷ Die unterschiedlichen S1P-Rezeptoren können an verschiedene G-Proteine gekoppelt sein (Abbildung 6). Über G_i werden Prozesse wie zelluläres Überleben, Proliferation und Migration beeinflusst, über G_{12/13} der Umbau des Zytoskeletts und die Zellteilung kontrolliert und über G_q zahlreiche zelluläre Effektorfunktionen gelenkt.¹⁴⁶ Des Weiteren besitzen S1P-Rezeptoren unterschiedlich starke Bindungsaffinitäten für S1P (K_d 2 – 63 nM), sodass je nach gegebener S1P Konzentration verschiedene Rezeptoren aktiviert und die Antworten moduliert werden.¹⁷⁸

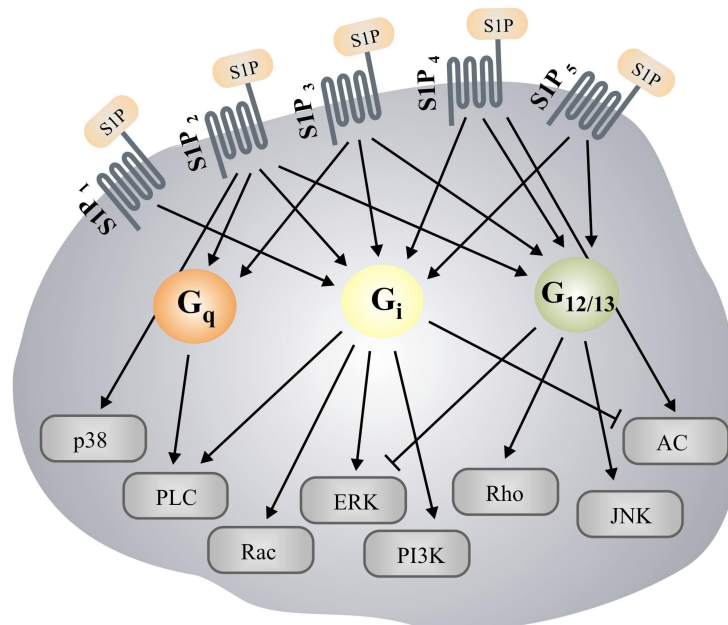


Abbildung 6: Signalvermittlung über S1P-Rezeptoren

In Zielzellen bindet S1P an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (S1P₁₋₅) welche mit G_q, G_i und/oder G_{12/13} assoziieren können. Die Signalweiterleitung erfolgt über unterschiedliche Signalkaskaden (PLC, Rac, ERK, p38-MAPK, PI3K, Rho, JNK und AC).

Nach Rezeptor-vermittelter Aktivierung der G-Proteine erfolgt die intrazelluläre Weiterleitung der Signale unter anderem durch Phospholipase C (PLC), PI3K, Adenylatzyklase (AC), ERK1/2, p38-MAPK oder JNK (Abbildung 6).¹⁷⁸⁻¹⁸⁰

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein S1P-Rezeptor über mehrere G-Proteine gekoppelt ist. Abbildung 6 ist zu entnehmen, dass S1P₁ und S1P₄ an G_i, S1P₂ und S1P₃ an G_i, G_q und G_{12/13} und S1P₅ an G_i und G_{12/13} koppeln.¹⁵⁴ Somit können alle S1P-Rezeptor-Subtypen zumindest das G_i-Protein aktivieren und dadurch eine Vielzahl von zellulären Reaktionen beeinflussen.

2.6.3 Funktionen von S1P

Da S1P ubiquitär vorkommt und die einzelnen Rezeptor-Subtypen je nach Zelltyp unterschiedlich stark exprimiert werden, entsteht ein, zum Teil aus gegensätzlichen Funktionen aufgebautes, komplexes Netzwerk. Zu den Funktionen gehören unter anderem Zellproliferation und -differenzierung, Apoptosehemmung, Stimulation von Zell-Zell-Interaktionen, Chemotaxis, Zytoskelettveränderungen, erhöhte Permeabilität von *tight junctions* und Kontraktion glatter Muskelzellen. Des Weiteren reguliert S1P die intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase.^{181,182}

Mittlerweile wird S1P sowohl als ein wichtiger Teil physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse angesehen. Beispielfhaft zu nennen wären die embryonale Gefäß- und Herzentwicklung, die Neoangiogenese, die Regulierung von Gefäßtonus und -permeabilität bzw. der Herzfunktion und das Vorkommen bei entzündlichen und immunologischen Vorgängen.¹⁴³ Die S1P₁-abhängige Emigration von T-Lymphozyten aus dem Thymus bzw. aus sekundären Lymphorganen konnte gezeigt werden. Ausserdem kann S1P die Ansprechbarkeit von T-Zellen auf chemotaktische Reize reduzieren und durch vermindertes *Homing* von T-Zellen in sekundäre Lymphorgane eine Lymphozytose induzieren.¹⁸³ Die Beteiligung an inflammatorischen Prozessen wird S1P über die Aktivierung von NF-κB zugesprochen.^{184,185} Neben der Aktivierung von NF-κB führt S1P auch zu einer verstärkten Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und damit zur Freisetzung von PGE₂,¹⁸⁶ was neben dem Entzündungsgeschehen auch an der Progression von Darmkrebs wesentlich beteiligt ist.¹⁸⁷ Eine weitere Funktion von S1P, die durch die Aktivierung von S1P-Rezeptoren in Endothel- und glatten Muskelzellen ausgelöst wird, ist die Induktion der Vaskularisierung und Angiogenese.¹⁸⁸

2.6.3.1 S1P in der Tumorentwicklung

Die Erkenntnis, dass S1P das Überleben von Zellen fördert, rückte es in das Interesse onkologischer Studien. Verschiedene Tumorzellen lassen sich durch die SK in ihrem Proliferationsverhalten beeinflussen. So fördert sie das Wachstum und die Migrationsfähigkeit von Magenkarzinomzellen und Brustkarzinomzellen.^{159,189,190} In MCF-7-Brustkrebszellen wurde für die Migration der Zellen neben der Bindung von S1P an die S1P-Rezeptoren auch die Aktivierung der EGF-Rezeptoren benötigt. Dies wurde in MBA-MD-453-Brustkrebszellen bestätigt. Die SK2 wurde EGF-abhängig aktiviert, was eine verstärkte Migration zur Folge hatte.^{191,192} Der Einfluss von S1P auf die Invasivität von Zellen wurde in Glioblastomen gezeigt.¹⁹³ Weiterhin kommt es durch S1P zu einer Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Medikamenten bei malignen Melanomen und Prostatakarzinomen.^{23,186} Während die Hemmung der SK1-Expression zu einem reduzierten Tumorwachstum und einer erhöhten Chemosensitivität führte,¹⁹⁴ induzierte eine Überexpression der SK1, die zur verstärkten Synthese von S1P führte, in Fibroblasten eine maligne Transformation und initiierte die Tumorbildung.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ In einer Vielzahl von Tumoren wurde ebenfalls eine Überexpression der SK1 nachgewiesen.^{198,199} Arbeiten mit einem monoklonalen Antikörper gegen S1P zeigten, dass die Reduktion von S1P im Maus-Xenograft-Modell die Tumorprogression von humanen Brust- und Lungenkrebszellen deutlich inhibiert war und die Freisetzung von pro-angiogenetischen Faktoren wie IL-8 und VEGF verringert war.²⁰⁰

S1P wirkt nicht nur direkt auf die Tumorzellen, sondern moduliert auch die Interaktion von Tumoren mit den Zellen des Immunsystems. Die Freisetzung von TNF- α durch Makrophagen ist einer der ersten Schritte nach dem Kontakt von Immunzellen mit dem Tumor. Xia *et al.* konnten zeigen, dass TNF- α die Aktivierung der SK und die Freisetzung von S1P induziert und so Endothelzellen vor Apoptose schützt.²⁰¹ Die Freisetzung von S1P aus apoptotischen Tumorzellen führt außerdem zu einer Polarisierung der assoziierten Makrophagen hin zu einem pro-Tumor-Phänotyp mit Reduktion von TNF- α und Induktion von IL-8 und IL-10 und schützt diese darüber hinaus vor Apoptose.^{116,117}

2.7 TGF- β

Ein weiterer wichtiger Mediator im Tumormilieu ist TGF- β , von dem es drei Isoformen gibt: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 (im Folgenden werden die Isoformen allgemein TGF- β genannt).²⁰²⁻²⁰⁴ Sie gehören zu der Superfamilie der TGF- β -Proteine, zu der auch Inhibine,

Activine, die Müller-inhibierende Substanz, die *bone morphogenetic proteins* (BMPs) und das *decapentaplegic gene product* (DPP) gehören. TGF- β und seine verwandten Faktoren sind in verschiedensten Organismen von *Drosophila* bis zu Säugetieren weit verbreitet und weisen stark konservierte Strukturhomologien auf.^{205,206} TGF- β erfüllt diverse biologische Funktionen, z.B. als Wachstumsfaktor, als Differenzierungsfaktor sowie als Regulator von endokrinen Funktionen und auch in der Embryonalentwicklung.^{205,207} Die biologischen Wirkungen von TGF- β hängen in hohem Maße von der Zielzelle, deren Differenzierungsgrad sowie Aktivierungszustand ab. Zu den vermittelten Effekten zählen eine reversible Proliferationshemmung auf sowohl normale als auch transformierte epitheliale, endotheliale, fibroblastische, neuronale, lymphatische und hämatopoetische Zellen. Weiterhin bewirkt TGF- β eine gesteigerte Zelladhäsion und Synthese von Extrazellulär-Bestandteilen. Dadurch ist einerseits seine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen und Wundheilungsprozessen sowie Morphogenese bzw. Differenzierung im Laufe der Embryogenese, andererseits aber auch seine pathogenetische Beteiligung bei bestimmten fibrotischen Prozessen zu erklären.²⁰⁵⁻²⁰⁸ TGF- β ist in hohen Konzentrationen in Thrombozyten enthalten und wird in erster Linie von aktivierten Monozyten und Makrophagen, außerdem aber auch von Tumorzellen zur Aufrechterhaltung ihres transformierten Phänotyps und in geringerem Ausmaß von den meisten fibroblastischen und epithelialen Zellen sezerniert.^{205,207,209-211} Auch AZ setzen TGF- β frei.¹¹⁵

2.7.1 TGF- β -Rezeptor

Der Signaltransduktionsweg von TGF- β erfolgt über zwei membrangebundene Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren und wird intrazellulär über *second-messenger* der sogenannten Smad-Protein-Familie weitergeleitet. Diese diffundieren in den Zellkern, wo sie nach Bindung an die DNA die Transkription aktivieren.^{205,212} Beim Menschen gibt es sieben TGF- β -Typ-I-Rezeptoren (T β RI) und drei verschiedene TGF- β -Typ-II-Rezeptoren (T β RII). Die initialen Schritte der TGF- β 1 Signaltransduktion sind mittlerweile gut charakterisiert. TGF- β 1 bindet an den konstitutiv aktiven T β RII, woraufhin der T β RI in einen hetero-oligomeren Komplex rekrutiert wird. T β RI wird auf der zytosolischen Seite durch den Liganden-gebundenen T β RII phosphoryliert und somit aktiviert. Es kommt zu transienter Assoziation mit zytoplasmatischen Effektor-Proteinen, den sog. R-Smads (Smad2, Smad3), die nach Phosphorylierung vom Rezeptor dissoziieren, um mit Smad4

hetero-oligomere Komplexe zu bilden. Diese translozieren in den Nukleus, um dort die Transkription spezifischer Gene zu regulieren.^{213,214}

Neben der Smad-vermittelten Signaltransduktion von TGF- β sind auch einige Fälle beschrieben, in denen TGF- β über die Aktivierung von p38 MAPK und JNK ohne Beteiligung der Smads agiert.²¹⁵⁻²¹⁷

2.7.2 TGF- β in der Tumorentwicklung

Die Rolle von TGF- β im Tumorgeschehen wird kontrovers diskutiert und scheint von der jeweiligen Krebsart und -stadium abhängig zu sein. Während in der frühen Tumorentwicklung TGF- β das Tumorwachstum und die -angiogenese inhibiert, gibt es verstärkt Hinweise, dass bei der Tumorprogression TGF- β pro-angiogenetisch und Tumorunterstützend wirkt.²¹⁸ Die TGF- β -induzierte Angiogenese wurde in Endothelzellen mit der Induktion von uPAR in Verbindung gebracht.²¹⁹ Weiterhin induziert TGF- β VEGF-C²²⁰ und die MMP9²²¹. Ebenso konnte für Makrophagen gezeigt werden, dass TGF- β sowohl an der VEGF als auch der MMP9-Induktion beteiligt ist.²²² Im Maus-Xenograft-Modell kommt es nach Neutralisierung von TGF- β zu einer Inhibition der Tumorangiogenese und des Tumorwachstums.²²³ In Mäusen mit T β RII^{-/-}-Fibroblasten war die Fähigkeit von Prostatakrebszellen zur Invasion stark reduziert.²²⁴ Neuere Arbeiten zeigen einen direkten Einfluss von TGF- β bei der Induktion der SK1-Aktivität^{164,225} und des HIF-1 α -Proteins²²⁶, deren Rolle bei der Tumorangiogenese bereits ausführlich dargelegt wurde. Weiterhin werden durch TGF- β Leukozyten ins Tumorgewebe rekrutiert, jedoch führen die immunsupprimierenden Eigenschaften von TGF- β 1 dazu, dass die Proliferation und funktionelle Differenzierung von B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen unterdrückt wird und der immunologische Angriff auf die malignen Zellen nicht ausgeführt wird.²²⁷

2.8 NFAT

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren besteht aus den folgenden fünf Mitgliedern: NFATc1, c2, c3, c4 und 5. NFAT ist wichtig für die Immunantwort von Zellen, hat jedoch auch Bedeutung für die Entwicklung des Herzens, des Skelettmuskels und des Nervensystems. Es konnte auch gezeigt werden, dass NFAT Zytokine und Gene induziert, die mit der Tumorentwicklung und Angiogenese in Verbindung stehen.²²⁸ In T-Zellen, Darmkrebszellen und Epidermiszellen war NFAT z.B. an der Induktion von COX-2

beteiligt, die wiederum eine wichtige Rolle sowohl im Entzündungsgeschehen als auch in der Krebsentstehung zukommt.²²⁹⁻²³¹

NFATc1, c2 und c4 werden vor allem in Immunzellen und hier überwiegend in Lymphozyten exprimiert, jedoch auch in Mastzellen, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und basophilen Granulozyten. Auch außerhalb des Immunsystems werden Familienmitglieder von NFAT exprimiert, so z.B. NFATc3 in Muskeln und Herz.^{232,233} NFATc4 im Hippocampus vorhanden, wo es die Transkription NFAT-abhängiger Gene als Antwort auf eine Depolarisation des Neurons auslöst.²³⁴ NFAT5 wurde erst kürzlich als Transkriptionsfaktor beschrieben und nimmt eine Sonderstellung unter den Mitgliedern der NFAT-Familie ein. Seine Verteilung im Gewebe ist bisher noch nicht bekannt und der Aktivierungsmechanismus und die DNA-Bindung unterscheiden sich von denen der anderen NFAT Familienmitgliedern. Eine gesteigerte Expression von NFAT5 kann infolge eines osmotischen Stresses auf die Zelle beobachtet werden, sodass eine Induktion von Genen, die in der Antwort auf osmotische Reize exprimiert werden, vermutet wird.^{235,236} DNA-Bindungsstellen für NFAT finden sich in regulatorischen Domänen vieler induzierbarer Gene, die an der Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. IL-2,²³⁷ IFN- γ ,²³⁸ *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF),²³⁹ Fas Ligand (FasL),²⁴⁰ IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, TNF- α und CD40 Ligand²³³ sowie COX-2.²⁴¹ Eine zentrale Rolle spielt NFAT in der Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten.^{233,242,243} Bisher sind *knockout* Experimente einzelner Mitglieder der NFAT-Familie nicht aussagekräftig genug um eine alleinige Funktion eines Mitgliedes im Immunsystem festzustellen.²³³ Obwohl große Unterschiede in den Primärstrukturen von NFATc1 bis c4 zu sehen sind, so sind zwei für die Funktion entscheidende Domänen jedoch hoch homolog. Dies ist die DNA-bindende und die Transkriptions-aktivierende Domäne, sodass sich synergistische und sogar identische Funktionen der NFAT-Proteine ergeben.^{233,244,245} Eine kombinierte Ausschaltung von NFATc1 und c2 führt indes in T-Helfer-Zellen zu einer stark verminderten Zytokinproduktion, wogegen B-Zellen jedoch hyperreaktiv sind.²⁴³ NFAT wird in dieser Arbeit generell als Abkürzung aller exprimierter NFAT-Familienmitglieder benutzt.

2.8.1 Regulierung der NFAT-Aktivität

Der Schlüsselmechanismus der Aktivierung von NFAT und eine daraus resultierende gesteigerte Transkriptionsrate NFAT-abhängiger Gene wird durch Calcineurin (CN), eine Serin/Threonin-Phosphatase, kontrolliert. CN ist ein Heterodimer, bestehend aus einer

ca. 60 kDa großen Calmodulin (CaM)-bindenden, katalytischen Untereinheit A (CnA) und einer kleineren 19 kDa Ca^{2+} -bindenden, regulatorischen Einheit B (CnB). Calcineurin wird Ca^{2+} -abhängig aktiviert, in dem das Ca^{2+} von CnB und CaM gebunden wird, wobei CnB zur Strukturhaltung des Holoenzymen notwendig ist und CaM wahrscheinlich eine Konformationsänderung auslöst, die die autoinhibitorische Domäne aus der katalytischen Domäne von CnA entfernt.^{233,246-249} Die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und das Antibiotikum FK506 sind spezifische CN-Inhibitoren und verhindern die Dephosphorylierung von NFAT. CsA und FK506 interagieren dabei mit ubiquitären intrazellulären Proteinen, den Immunophilinen, mit denen sie als Komplex an CN binden. Da als Bindungsstelle der Berührungspunkt von CnA und CnB fungiert, wird die Struktur von CN nachhaltig gestört und eine dephosphorylierende Aktivität unmöglich.²⁵⁰⁻²⁵²

Nach der Dephosphorylierung transloziert NFAT in den Zellkern, wo es an DNA-Erkennungssequenzen in regulatorischen Promotorregionen bindet und die Transkription von Genen induziert.^{233,236,253} Dabei liegt NFAT im Gegensatz zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B stets als Monomer vor. Spezifische DNA-Bindungsstellen existieren als hochaffine Bindungsstellen für NFAT alleine oder als sogenannte *composite* Bindungsstellen, an denen NFAT Komplexe mit AP-1 bildet. Sinkt die CN-Aktivität in der Zelle wieder ab, wird NFAT infolgedessen rephosphoryliert und aus dem Zellkern über das spezifische Transportprotein *chromosome region maintenanc 1* (Crm1) exportiert.²⁵⁴ Um NFAT inaktivieren zu können, müssen genau die 13 Serinreste phosphoryliert werden, die von CN bei einer NFAT-Aktivierung dephosphoryliert wurden. Diese Kriterien werden für die NFAT-Mitglieder c1 bis c4 von der Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) erfüllt.^{234,255} Es scheinen jedoch auch andere Kinasen, wie die Casein Kinase 1 α (CK1 α)²⁵⁶ und die p38 MAPK²⁵⁷ zumindest einige Mitglieder der NFAT-Familie zu phosphorylieren. Offen ist noch, wie und welche Kinasen tatsächlich in den Kern gelangen und welche Serinreste von NFAT bereits im Kern phosphoryliert werden müssen, sodass der nukleäre Export möglich wird.²³⁶ Man kann jedoch von einem spezifischen Wechselspiel von CN-Aktivität und Kinasen-Inaktivität ausgehen, was eine effektive, schnelle Regulation der Aktivität von NFAT ermöglicht und die Voraussetzung für eine optimale Antwort auf einen Reiz des Immunsystems schafft.²⁵⁶

2.9 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war, zur Aufklärung der Regulation von HIF-1 als einem wichtigen Transkriptionsfaktor in der Tumorbio­logie beizutragen. Hierfür sollte zum einen der HIF-1 α -Proteinabbau in VHL-defizienten Tumorzellen aufgeklärt werden. In den pVHL-defizienten Tumorzellen kommt es unter Hypoxie und gleichzeitiger Inkubation mit dem NO-Donor DETA-NO zu einer Reduktion der HIF-1 α -Expression, die sich durch bisherige Erkenntnisse der HIF-1 α -Regulation nicht erklären ließ. Zum andere wurde die Induktion des HIF-1 α -Proteins in Makrophagen, die durch AZ polarisiert wurden, untersucht. In den polarisierten Makrophagen kann unter Normoxie eine Akkumulation des HIF-1 α -Proteins beobachtet werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie die AZ die Induktion von HIF-1 α vermitteln. Hierbei sollten folgende Aspekte geklärt werden:

- Inkubation von RCC4-Zellen unter Hypoxie und DETA-NO führt zu einer Reduktion des HIF-1 α -Proteins. Handelt es sich hierbei um einen VHL-unabhängigen Abbaumechanismus für das HIF-1 α -Protein? Kann Calpain HIF-1 α abbauen? Findet der Calpain-vermittelte Abbau von HIF-1 α nur in pVHL-defizienten Zellen statt oder ist dies ein allgemein gültiger Mechanismus?
- Die mechanistischen Details des HIF-1 α -Abbaus unter Hypoxie und DETA-NO sollten näher untersucht werden. Können die Mediatoren für die Aktivierung des HIF-1 α -Abbaus identifiziert werden? Werden unter Hypoxie in RCC4-Zellen ROS gebildet, die mit dem NO reagieren und lässt sich der Abbau auch durch Substituierung von NO und O₂⁻ unter Normoxie hervorrufen? Führt die Koadministration von NO und O₂⁻ zu einer Erhöhung der Calpain-Aktivität und lässt sich weiterhin die Aktivierung der Calpaine mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration korrelieren?
- Nach der Inkubation von Makrophagen mit Überständen von AZ kommt es zu einer Akkumulation des HIF-1 α -Proteins. Handelt es sich hierbei um eine Inhibierung des Proteinabbaus oder um verstärkte Synthese von HIF-1 α ? Ist weiterhin eine transkriptionelle Aktivierung oder eine Stabilisierung der Grund für den Anstieg der HIF-1 α -mRNA?

-
- Führt die Induktion von HIF-1 α durch die AZ auch zu einer gesteigerten HIF-1-Aktivität? Werden Makrophagen durch AZ polarisiert, sodass sie pro-angiogenetische Faktoren (HIF-1-abhängig oder -unabhängig) sezernieren? Können Überstände von den durch AZ polarisierten Makrophagen zur Differenzierung von Stammzellen zu CD31⁺-Endothelzellen beitragen?
 - Um die mechanistischen Details zu klären, die der HIF-1 α -Induktion in Makrophagen durch AZ zu Grunde liegen, sollte untersucht werden, welche Mediatoren von den AZ freigesetzt werden, die zur HIF-1 α -mRNA-Induktion beitragen und welcher Transkriptionsfaktor in den Makrophagen die HIF-1 α -mRNA induziert.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (40%, 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (40%, 29:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-CD11b Mikrobeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anthra(1,9- <i>cd</i>)pyrazol-6(2 <i>H</i>)-one1,9-pyrazoloanthron (SP600125)	Alexis Biochemicals, Grünberg
4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(<i>t</i> -butyl)pyrazolo[3,4- <i>d</i>]pyrimidin (PP2)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Aminosäuren, nicht-essentielle	PAA Laboratories, Cölbe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bay11-7082	Alexis Biochemicals, Grünberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA Standart	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Bromphenolblau	Fluka, Buchs
Calpastatin	Calbiochem, Bad Soden
Carbonyl-cyanide- <i>p</i> -trifluoro-methoxy-phenylhydrazon (FCCP)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merk Eurolab, Darmstadt
Coelentaracin	Biotrend Chemikalien, Köln
12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo[2,3- <i>a</i>]pyrrolo[3,4- <i>c</i>]carbazol (Gö6976)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cyclosporin A (CsA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
4',6'-Diamin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dihydrorhodamin (DHR)	Alexis Biochemicals, Grünberg
2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon (DMNQ)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethyloxalylglycin (DMOG)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	PAA Laboratories, Cölbe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Thylenglycole-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ficoll	Amersham Biosciences, Freiburg
4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol (SB203580)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Fluoromount G	Biozol, Eching
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
FKS für Stammzellen	PAA Laboratories, Cölbe
Fura-2AM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gelantine	STEMMCELL Technologies, Köln
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Gentamycin	PAA Laboratories, Cölbe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerol-tolerant Puffer (20 x)	Amersham Biosciences, Freiburg
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Serva, Heidelberg
Harnsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hydroehtidin (HE)	Molecular Probes, Eugene (USA)
2,2'-(Hydroxynitroso-hydrazono) bis-ethanimin (DETA-NO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
JAK-II	Calbiochem, Bad Soden
JTE-013	Biozol, Eching
Interferon- γ (IFN- γ)	Roche Diagnostics, Mannheim
Insulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck EuroLab, Darmstadt
jetPei	Biomol, Hamburg
Kaliumchlorid (KCl)	Merck EuroLab, Darmstadt
Kaliumcyanid (KCN)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumhexacyanoferrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck EuroLab, Darmstadt

Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck EuroLab, Darmstadt
Kobaltchlorid (CoCl_2)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lactacystin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Leukemia inhibitory factor (LIF)	Millipore, Schwalbach
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	Merck EuroLab, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumcarbonat-Hydroxid	Merck EuroLab, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck EuroLab, Darmstadt
MitoSox	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methionin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
3-Morpholinsyndnonimine Hydrochlorid (SIN-1)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4 <i>H</i> -1-benzopyran-4-on (LY294002)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Murine macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)	Peptotech, London (UK)
N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-methioninal (ALLM)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck EuroLab, Darmstadt
Natriumborat	Merck EuroLab, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck EuroLab, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck EuroLab, Darmstadt
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumflourid (NaF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck EuroLab, Darmstadt
Natriumpyruvat	PAA Laboratories, Cölbe
Neomycin	PAA Laboratories, Cölbe
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth GmbH, Karlsruhe
Nitro-L-arginine methylester Hydrochlorid (L-NAME)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nonidet P-40	ICN Biomedicals, Eschwege
Oligomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Para-Hydroxykumarinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Passiv Lysepuffer	Promega, Mannheim
PBS (9,55 g/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PD98059	Alexis Biochemicals, Grünberg
Penicillin/Streptomycin Lösung	PAA Laboratories, Cölbe
peqGold RNAPure	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
5-[4-Phenyl-5(trifluoromethyl)-2-thienyl]-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,4-oxadiazol (SEW2871)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
poly(dI-dC)	Pharmacia, Uppsala (Sweden)
Proteaseinhibitormix (PIM)	Roche Diagnostics, Mannheim
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	PAA Laboratories, Cölbe
(R)-Phosphorsäuremono-[2-amino-2(3-octylphenylcarbamoyl)-ethyl] ester (VPC23019)	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Saccharose	Merck EuroLab, Darmstadt
Seperationsmedium	PAA Laboratories, Cölbe
Semicarbazid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SN50	Alexis Biochemicals, Grünberg
Spingosin-1-Phosphat (S1P)	Avanti Polar Lipids , Alabaster (USA)
STA-21	Biomol, Hamburg
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SybrGreen	Thermo Fisher Scientific, Bonn
<i>Taq</i> Polymerase/Reaktionspuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9 <i>H</i> -purin-6-amin (SQ22536)	Alexis Biochemicals, Grünberg
Transforming growth factor- β (TGF- β)	PeptoTech, London (UK)
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trizin	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.1.2 Puffer und Lösungen

10 x Blottingpuffer

Tris/HCl	250 mM
Glyzin	1,9 M
pH	8,3

6 x DNA Probenpuffer

Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
Ficol	1,5 g
H2O	ad 10 ml

EMSA Kern Lysepuffer

HEPES/KOH	50 mM
KCl	50 mM
NaCl	300 mM
EDTA	0,1 mM
Glycerin	10 %
pH	7,9
frisch dazu:	
DTT	1 mM
NaF	10 mM
PIM	1 x

EMSA Zytosol Lysepuffer

Tris-HCL pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
NP-40	0,5 %
Triton X-100	1 %
frisch dazu:	
DTT	1 mM
NaF	10 mM
PIM	1 x

Erythrozyten Lysepuffer

Ammoniumchlorid	155 mM
Natriumbicarbonat	10 mM
EDTA	0,1 mM
pH	7,4

Harnstoff Lysepuffer

Tris-HCL pH 6,8	10 mM
Harnstoff	6,65 M
Glycerin	10 %
SDS	1 %
pH	7,4
frisch dazu:	
PIM	1 x

Leukozyten Waschpuffer

PBS	500 ml
EDTA	2 mM

Luciferase Substrat

Tricin	20 mM
Magnesiumcarbonat-Hydroxid	1,07 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,67 mM
EDTA-K ⁺	100 µM
DTT	33,3 mM
ATP	530 µM
Coenzym A-Lithiumsalz	21,3 mg/l
D-Luciferin	470 mM

Puffer D

HEPES/KOH	20 mM
Glycerin	20 %
KCl	100 mM
EDTA	0,5 mM
Nonidet P-40	0,25 %

DTT	2 mM
PMSF	0,5 mM
pH	7,9

Puffer F

Ficoll	20 %
HEPES/KOH	100 mM
KCl	300 mM
DTT	10 mM
PMSF	0,5 mM
pH	7,9

Renilla Puffer

NaCl	0,1 M
Tris/HCl pH 7,5	25 mM
CaCl ₂	1 mM

Renilla Substrat

Coelenteracin [90 µM]	100 µl
Renilla Puffer	10 ml

direkt vor Gebraucht
ansetzten

5 x Reporter Lysepuffer

Tris-H ₃ PO ₄	125 mM
DTT	10 mM
Triton-X-100	5 %
Glycerin	50 %
pH	7,8

Sammelgel-Puffer

Tris-HCl	0,5 M
pH	6,8

10 x SDS-Laufpuffer

Tris/HCl	250 mM
Glyzin	1,9 M
SDS	7 mM
pH	7,1

5 x SDS-Probenpuffer

1,25 M Tris (pH 6,8)	2,5 ml
SDS	1 g
Glycin	5 ml
Bromphenolblau	0,002%
DTT	5 mM

5 x TBE

Tris/HCl	445 mM
Natriumborat	445 mM
EDTA	10 mM

10 x TBS

Tris/HCl	500 mM
NaCl	1,5 M
pH	7,4

TTBS

Tris-HCl	50 mM
NaCl 1	50 mM
Tween-20	0,05%
pH	7,4

Trenngel-Puffer

Tris-HCl	1,5 M
pH	8,8

Trypsin-Lösung

Trypsin	0,5 mg/ml
EDTA	0,22 mg/ml

3.1.3 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
HIF-1 α Human	1:1000	BD Bioscience, Heidelberg
HIF-1 α Maus	1:500	Novus Biologicals, Littleton (USA)
pSMAD2	1:1000	Cell Signalling Technology, Beverly (USA)
SMAD2	1:1000	Cell Signalling Technology, Beverly (USA)
Aktin	1:1000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-mouse HRP	1:2000	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-rabbit HRP	1:2000	Amersham Biosciences, Freiburg
TGF- β 1	5 μ g/ml	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Kontroll IgG ₁	5 μ g/ml	R&D Systems, Minneapolis (USA)
NFATc1	2 ng/ml	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

3.1.4 Oligonukleotide

IRD-700 markierte Oligonukleotide für den EMSA wurden von biomers.net GmbH (Ulm) gekauft. Die Bindestellen im HIF-1 α Promoter sind unterstrichen:

NFAT:

5'-TTTTCAACTGGAAACTCGGGCGGG-3'

5'-CCCGCCCGAGTTTCCAGT TGAAA-3'

STAT3:

5' ATTGGCTCTCCGGGAACCCGCCTC 3'

5' GAGGCGGGTTCCCGGAGAGCCAAT 3'

3.1.5 Primersequenzen

Die Primer wurden von biomers.net (Ulm) hergestellt.

Tabelle 2: Primer für PCR/qPCR

Primer	Sequenz 5' → 3'
Human Aktin vorwärts	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA
Human Aktin rückwärts	CTAGAAGCATTTGCGGTTCGACGATGGAGGG
Human Cytochrom C Oxidase II vorwärts	TCAAATCAATTGGCCACCAATGG
Human Cytochrom C Oxidase II rückwärts	CATTGACCGTAGTATACCCCCGGTC
Human HIF-1 α vorwärts	CTCAAAGTCGGACAGCCTCA
Human HIF-1 α rückwärts	CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT
Maus Glut-1 vorwärts	GAGGAGCTCTTCCACCCTCT
Maus Glut-1 rückwärts	TCCTCCTGGACTTCACTGCT
Maus HIF-1 α vorwärts	GAAATGGCCCAGTGAGAAAA
Maus HIF-1 α -Exon2 vorwärts	GGCGAAGCAAAGAGTCTGAAG
Maus HIF-1 α rückwärts	CTTCCACGTTGCTGACTTGA
Maus HIF-2 α vorwärts	CCTGCAGCCTCAGTGTATCA
Maus HIF-2 α rückwärts	GTGTGGCTTGAACAGGGATT
Maus ribosomal. 16S Protein vorwärts	AGATGATCGAGCCGCGC
Maus ribosomal. 16S Protein rückwärts	GCTACCAGGGCCTTTGAGATGGA
Maus VEGF vorwärts	TGTCACCACCACGCCATCA
Maus VEGF rückwärts	GGAATCCCAGAAACAACCCTAATC

3.1.6 Zelllinien

Renal clearcell carcinoma (RCC4) sind humane Nierenkarzinom-Zellen mit einem Defekt im VHL-Gen. *RCC4-pVHL* sind RCC4-Zellen, die aufgrund einer stabilen Retransfektion wieder ein funktionelles VHL-Gen haben. *Humane embryonic kidney cells (HEK294)* sind humane Nierenkarzinom-Zellen. *Jurkat-Zellen* sind eine humane T-Zelllinie, die aus einer akuten lymphatischer Leukämie stammt. *MCF-7* sind humane Brust-Adenokarzinom-Zellen. *MCF-7-SK2kd* ist eine mit siRNA gegen Sphingosinkinase 2 stabil transfiziert MCF-7-Linie und *MCF-7-neo* wurde mit einem Kontrollvektor transfiziert und wird in der folgenden Arbeit mit MCF-7 bezeichnet.²⁵⁸ *RAW264.7* sind eine murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie, die aus einem Tumor isoliert wurde, der mit dem

Abelson-Maus-Leukämie-Virus induziert wurde. CCE sind murine embryonale Stammzellen.^{259,260}

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Cell+ Schalen	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Entwicklerkassetten Lightning Plus	REGO-X-Ray, Augsburg
Eppendorfgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Filterpapiere	Whatman, Dassel
Leukosept-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Lumox Schalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrozellulosemembran Hybond C extra	Amersham Biosciences, Freiburg
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pipettboy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten (10 µl; 100 µl; 1000 µl; 5000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl; 5000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plastikmaterial (Zellkultur)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterilfilter 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
SuperX X-Ray Film	Fuji Film, Düsseldorf
WillCo Schalen	WillCo Wells, Amsterdam (Niederlande)

3.1.8 Geräte

Apollo-8 LB 912 Photometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Autoklav HV 85	BPW, Süssen
AutoMacs	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Ultraschall-Generator B250 Sonifier	Branson Ultrasonics, Danbury (USA)
CASY Model TT	Schärfe System, Reutlingen
FACSCanto Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Filmentwicklermaschine Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Wiesloch
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Geldokumentationssystem UV-Transilluminator	Raytest, Straubenhardt
Holten LaminAir Sterilbank	Jouan, Unterhaching
i-Cycler MyiQ	Bio-Rad Laboratories, München

IG 150 (Zellkulturinkubator)	Jouan, Unterhaching
InVivo400 Werkbank	Ruskin Technologies, Leeds (UK)
<i>Laser Scanning</i> Mikroskop LSM 510 META	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer Combimag RCH	IKA Labortechnik, Staufen
Mastercycler Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
<i>Medimachine</i>	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Mithras LB940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Mini-PROTEAN 3 System (SDS-PAGE)	Bio-Rad Laboratories, München
Multiscan RC Luminometer	Thermo Labsystems, Vantaa (Finnland)
NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
<i>Odyssey imaging system</i>	Li-COR Biosciences, Bad Homburg
Oxygraph-2k	Oroboros, Innsbruck (Österreich)
Reinstwasseranlage Purelab Plus ELGA	LabWater, Siershahn
Spannungsquelle	Bio-Rad Laboratories, München
Sub-Cell GT Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories, München
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot SD Blot-Apparatur	Bio-Rad Laboratories, München
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zentrifuge 3413 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

HEK293, RAW264.7, Jurkat, primäre Maus Makrophagen, MCF-7-neo und MCF-7-SK2kd wurden mit RPMI mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) (30 min bei 56 °C), 5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin inkubiert. MCF-7-neo und MCF-7-SK2kd wurden zusätzlich noch mit 1 mM Natriumpyruvat, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 10 mg/ml bovinem Insulin und x ng Neomycin inkubiert. HEK293.7, RCC4 und RCC4-pVHL wurden in DMEM mit 4,5 g/l D-Glukose mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 1 mM Natriumpyruvat kultiviert. RCC4-p0 wurden mit 2 mM Natriumpyruvat und 50 ng/ml Ethidiumbromid inkubiert. CCE wurden in Gelatine-beschichteten Flaschen in DMEM mit 4,5 g/l D-Glukose mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 8 % aktiviertem FKS, 5 mM

L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 µM β-Mercaptoethanol und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren mit 10^3 U/ml LIF kultiviert. Primäre humane Monozyten wurden in RPMI mit 10 % hitzeinaktiviertem humanem Plasma (30 min bei 56 °C von „AB⁺“-Spendern vom Deutschen Roten Kreuz (DRK)-Blutspendedienst), 5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin inkubiert.

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37 °C und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 5 % CO₂ im Zellkulturinkubator kultiviert. Bis auf die Jurkat-Zellen, die in Suspension wachsen, wachsen alle verwendeten Zelllinien adhärent als Monolayer und wurden, wenn sie eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten, trypsiniert und in neue Zellkulturflaschen und für Versuche in die entsprechenden Kulturschalen überführt. Für die Versuche wurde die Zellzahl mit Hilfe des CASY bestimmt und in den für die jeweiligen Methoden notwendigen Konzentrationen ausgesät. Arbeiten mit den Zellen erfolgten an Holten Sterilbänken. Alle Reagenzien wurden bei 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Die Inkubationen unter Sauerstoffmangelbedingungen erfolgten in der InVivo400 Werkbank. Die Werkbank ermöglicht das Arbeiten mit Zellen unter konstanten hypoxischen Bedingungen. Für die durchgeführten Experimente wurden die Zellen bei 0,5 % oder 1 % O₂, 5 % CO₂ und 94,5 % bzw 94 % N₂ bei feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre inkubiert.

3.2.2 Generierung von RCC4-ρ0-Zellen

RCC4-ρ0 sind RCC4-Zellen, die mit 50 ng/ml Ethidiumbromid inkubiert wurden. Durch das Ethidiumbromid kommt es zur Inhibierung der Expression der mitochondrialen Gene, so dass die RCC4-ρ0 keine funktionelle Atmungskette mehr ausbilden können.

3.2.3 Isolation primärer humaner Monozyten aus *Buffy Coats*

Primäre humane Monozyten wurden aus *Buffy Coats*, die vom DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen (Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt wurden, isoliert. Hierzu wurde der *Buffy Coat* in 50 ml Leucosept-Röhrchen überführt, in die zuvor 15 ml Separationsmedium vorgelegt wurde. In der folgenden Dichtegradientenzentrifugation (45 min, 440 x g, Raumtemperatur (RT)) wurden die Blutzellen in drei Phasen aufgetrennt. Die untere Phase enthielt Erythrozyten und Granulozyten, die mittlere Phase die Leukozyten und in der oberen Phase hatte sich das Blutplasma angesammelt. Die

Leukozytenphase wurde mit einer Pipette abgesaugt, in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen übertragen und zwei Mal mit Leukozytenwaschpuffer gewaschen (500 x g, 5 min, RT). Das Pellet wurde in serum-freiem RPMI Medium resuspendiert und auf Cell+ Schalen ausgesät. Nach 2 h wurde das serum-freie Medium abgenommen und durch Kompletmedium ersetzt. In dieser Zeit waren die Monozyten bereits angewachsen und die anderen Zellen wurden beim Mediumwechsel abgesaugt. Die Monozyten ließ man vor Versuchsbeginn 7 Tage zu Makrophagen ausdifferenzieren und führte in dieser Zeit alle 2-3 Tage einen Mediumwechsel durch.

3.2.4 Isolation der primären Maus Makrophagen aus der Milz

Für die Isolierung der Makrophagen wurden C57BL/6 Mäuse mit einem konditionellen HIF-1 α *Knockout* in den myeloiden Zellen verwendet. Die Mäuse wurden von Dr. Johnson zur Verfügung gestellt (Universität Californien, Division of Biological Sciences, San Diego, USA²⁶¹).

Alle Isolierungsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Milz wurde mit der *Medimachine* nach den Anweisungen des Herstellers homogenisiert. Die Zellsuspension wurde 8 min mit 2 ml Erythrozyten Lysepuffer inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5 min, 500 x g). Das Pellet wurde mit PBS gewaschen, in Leukozyten Waschpuffer resuspendiert und die Zellzahl mit dem Casy bestimmt. Anschließend wurden die CD11b⁺-Zellen nach den Anweisungen des Herstellers mit dem AutoMacs separiert. Dazu wurden die Zellen 20 min mit anti-CD11b Mikrobeads inkubiert, zentrifugiert (10 min, 300 x g) und in Leukozyten Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit dem Programm „*positive selection*“ isoliert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (10 min, 300 x g), in Medium resuspendiert und für Versuche in Schalen ausgesät. Für die Differenzierung zu Makrophagen wurden die Zellen für weitere 5 Tage mit *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF)(25 ng/ml) kultiviert.

3.2.5 Herstellung von konditioniertem Medium AZ (KM_{AZ})

Für das konditionierte Medium wurden Jurkat- oder MCF-7-Zellen mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ /ml ausgesät und mit 20 ng/ml Staurosporin für 3 h in FKS-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, zentrifugiert (5 min, 500 x g) und drei Mal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (5 min, 500 x g). Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium in gleicher Zellkonzentration

für weitere 3 h inkubiert. Zum Schluss wurde das Medium zentrifugiert (10 min, 1000 x g) und durch einen 0.22 µm Filter steril filtriert. Das Filtrat ist das KM_{AZ} . Wenn es in den Versuchen nicht anders angegeben ist, wurde das KM_{AZ} immer im Verhältnis 1:5 (lebende Zellen:tote Zellen beim Herstellen des KM_{AZ}) eingesetzt.

Analog wurde KM_{LZ} von $2,5 \times 10^6$ /ml lebenden Zellen und KM_{NZ} von $2,5 \times 10^6$ /ml nekrotischen Zellen hergestellt. Nekrotische Zellen wurden durch 30 minütige Inkubation bei 56 °C generiert.

3.2.6 Herstellung von konditioniertem Medium polarisierter Makrophagen (KM_{PM})

RAW264.7- und primäre Maus WT- und HIF-1 $\alpha^{-/-}$ -Makrophagen wurden für 16 h mit KM_{AZ} inkubiert. Das KM_{AZ} wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 h mit frischem Medium inkubiert. Dieses wurde wieder abgenommen, steril filtriert und das Filtrat ist KM_{PM} .

3.2.7 Proteinbestimmung nach Lowry

Für die Messung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde das Standard DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, München), basierend auf der Methode nach Lowry, verwendet. Zunächst wurde aus BSA-Standard eine Standardreihe (0 - 2 µg/µl) erstellt. Die Proteinlösungen wurden, wenn nötig, verdünnt. Von der Standardreihe sowie den Proben wurden 5 µl in Duplikaten für die Proteinbestimmung in einer 96-Loch-Platte vorgelegt. 25 µl Lösung A und anschließend 200 µl Lösung B wurden dazu gegeben. Die Ansätze wurden für 15 min schüttelnd bei RT inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm mit dem Apollo Photometer.

3.2.8 Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) und Western Blot Analyse

Die Lyse der Zellen erfolgte mit 100 µl Harnstoff Lysepuffer und durch sonifizieren. Hierzu wurden die Zellen am Ultraschall-Generator Branson für 10 sec bei 20 % Ausgangsleistung auf Eis aufgebrochen. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Lysate zentrifugiert (15 min, 16000 x g, 4 °C) und in neue Eppendorfgefäße überführt und der

Proteingehalt, wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben, bestimmt. 100 µg Protein wurden mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Für die Auftrennung der Proteine wurden die Taschen des Sammelgels mit den Proben beladen und in 1 x SDS-Laufpuffer bei 30 mA pro Gel laufen gelassen. Zur späteren Größenbestimmung der Banden wurde zusätzlich der *PageRuler Prestained Protein Ladder* eingesetzt. Die Zusammensetzung der SDS-Gele war wie folgt:

4 % iges Sammelgel

40 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)	1 ml
Sammelgel-Puffer	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
ddH ₂ O	6,4 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

10 % iges Trenngel

40 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)	2,5 ml
Trenngel-Puffer	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
ddH ₂ O	4,9 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Nach der Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembranen mit Hilfe einer Semi-Dry Blotting-Kammer überführt. Das Blotten erfolgte bei 75 mA pro Gel für 90 min. Anschließend wurden die Membranen, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren, 30 min mit 5 % TTBS-Milch geblockt. Die Inkubation des 1. Antikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der 2. Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt war, für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde ein Mal 5 min mit TTBS und anschließend zwei Mal 5 min mit PBS gewaschen. Zur Detektion des Signals wurden 3 ml ECL mit 30 µl para-Hydroxycumarinsäure und 1 µl 30 % H₂O₂ vermischt und 1 min bei RT mit der Membran inkubiert und das Signal mit einem Röntgenfilm detektiert.

3.2.9 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Die Zellen wurden zum Ernten vorsichtig abgeschabt und abzentrifugiert (5 min, 500 x g) und in 100 µl EMSA Zytosol Lysepuffer resuspendiert. Die Proben wurden 20 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (1 min, 16000 x g). Der Überstand wurde bei Bedarf in ein neues Eppendorfgefäß überführt, er enthielt die zytosolischen Proteine. Das Pellet wurde mit 50 µl EMSA Kern Lysepuffer resuspendiert und 30 min bei 0 °C schüttelnd lysiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (20 min, 16000 x g) wurde die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. 10 µg Protein wurden mit 2 µg poly(dI-dC), 2 µl Puffer D, 4 µl Puffer F und 250 fmol 5'-IRD700-gelabelten Oligonukleotide in einem Endvolumen von 20 µl gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Der DNA-Protein-Komplex wurde bei 120V in einem nativen, 4 % Polyacrylamidgel in 1-fach *Glycerol-tolerant* Puffer laufen gelassen. Die Zusammensetzung des Gels war wie folgt:

4 % iges natives Gel

20 x <i>Glycerol-tolerant</i> Puffer	500 µl
40 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1)	1 ml
ddH ₂ O	8,5 ml
10 % APS	100 µl
TEMED	32 µl

Die Protein-Oligonukleotid-Bande wurde mit dem *Odyssey imaging system* sichtbar gemacht. Supershift Analysen wurden mit dem NFAT Antikörper durchgeführt.

3.2.10 Isolation von mRNA aus Zellen

Für die Isolation von mRNA wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml PqGold RNAPure lysiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 200 µl Chloroform und jeder Versuchsansatz wurde 15 s kräftig geschüttelt. Nach einer anschließenden Inkubation von 10 min bei RT wurde das Gemisch durch Zentrifugation (5 min, 14.300 x g, 4 °C) in eine untere gelbliche Phenol-Chloroform Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischen liegende Interphase getrennt. Die Phenol-Chloroform Phase, welche die DNA und die Interphase die Zellbruchstücke und Proteine enthielt, wurden verworfen. Die obere wässrige Phase in der sich die RNA befand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol. Nach einer

weiteren Inkubation (30 min) bei RT, wurde die RNA pelletiert (20 min, 12.000 x g, 4 °C) und zwei Mal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen (10 min, 12.000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde dann im Reaktionsgefäß für 10 min bei 70 °C getrocknet und anschließend in 25 µl DEPC-behandeltem ddH₂O (DEPC-ddH₂O) resuspendiert. Die Konzentration der RNA wurde mit einem Nanodrop ermittelt. Die gelöste RNA wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.11 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Zur Herstellung von cDNA aus mRNA wurde das iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, München) benutzt. Die Verwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurde pro Ansatz 1 µg mRNA eingesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde jeder Versuchsansatz auf 100 µl mit DEPC-ddH₂O aufgefüllt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Folgender Ansatz wurde für die Amplifizierung der cDNA hergestellt:

Tabelle 3: PCR-Ansatz

Template (cDNA)	2 µl
dNTP [25 mM]	1 µl
<i>Taq</i> Polymerase	2 µl
MgCl ₂	3 µl
Vorwärts-Primer [20 ng/µl]	3 µl
Rückwärts-Primer [20 ng/µl]	3 µl
10-fach <i>Taq</i> -Reaktionspuffer	5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

In Tabelle 4 ist das Schema für die Abfolge der Reaktionsschritte während der Amplifikationsreaktion dargestellt.

Tabelle 4: Reaktionsabfolge bei der PCR

Reaktionsfolge	Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	3 min	95 °C
2 (45x)	Denaturierung	60 s	95 °C
	Primer-Anlagerung	90 s	55 °C
	Elongation	3 min	72 °C
3	Finale Elongation	10 min	72 °C

25 µl der DNA Proben wurden mit 6 x DNA Probenpuffer gemischt und auf ein 1,5 % iges Agarosegel geladen. Zur Größenerkennung der DNA-Fragmente wurde der *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* verwendet. Die Gelzusammensetzung war wie folgt:

1, 5 % iges Agarosegel

Agarose	0,75 g
0,5-fach TBE	50 ml

Die Auftrennung erfolgte 1 bis 2 h bei 5 bis 8 V/cm in 0,5-fachem TBE. Anschließend wurde das Gel circa 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und die DNA-Fragmente mit einem Geldokumentationssystem unter UV-Licht mit 254 nm Wellenlänge detektiert.

3.2.13 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), die zur Quantifizierung der mRNA einzelner Gene diente, wurde mit einem i-Cycler und Sybr Green als Flouorchrom durchgeführt. Hierzu wurde cDNA mit entsprechenden Primern und Sybr Green nach dem in Tabelle 5 dargestellten Schema angesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 5: qPCR-Ansatz

Template (cDNA)	4 µl
Vorwärts-Primer [10 pmol/ml]	0,4 µl
Rückwärts-Primer [10 pmol/ml]	0,4 µl
Sybr Green	10 µl
ddH ₂ O	5,2 µl

Die Abfolge der Reaktionsschritte während der Amplifikationsreaktion wurde nach Angaben des Herstellers erstellt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Reaktionsabfolge bei der qPCR

Reaktionsfolge	Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
1	Aktivierung der Polymerase	2 min	50 °C
2	Denaturierung	15 min	95 °C
3 (45x)	Denaturierung	15 s	95 °C
	Primer-Anlagerung	30 s	55 °C
	Elongation	30 s	72 °C
4	Finale Denaturierung	2 min	95 °C
5	Anlagerung homologer DNA-Stränge	30 s	55 °C
6 (80x)	Erstellung der Schmelzkurve	20 s	+ 0,5 °C /Wiederholung

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte jeweils nach dem Elongationsschritt, wobei die Intensität der Fluoreszenz ein Maß für die Menge der gebildeten PCR-Produkte ist. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm MyiQ (Bio-Rad Laboratories, München).

3.2.14 Reporter-Analysen

Für die Messung der HIF-1 α -Aktivität wurde ein Luziferase-Reporterplasmid (pGL3-EPO-HRE) verwendet, das drei HRE Bindestellen aus dem EPO-Gen enthält, die vor einen SV40 Promoter geschaltet sind. Das Plasmid wurde von Dr. Kietzman (Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern²⁶²) zur Verfügung gestellt. Für die Messung der Aktivität am HIF-1 α -Promotor wurde ein Luziferase-Reporterplasmid verwendet, das durch ein 800 bp langes Fragment aus dem HIF-1 α Promoter aktiviert wird. Das Plasmid wurde von Dr. Fandrey (Universitätsklinikum Essen, Essen⁶¹) zur Verfügung gestellt. Für die Messung der NFAT-Aktivität wurde ein Luziferase-Reporterplasmid verwendet, das durch ein Segment des humanen *modulatory calcineurin interacting protein 1* (MCIP-1)-Gens, das die NFAT-Bindestelle beinhaltet, aktiviert wird. Das Plasmid wurde von Dr. Rothermel (Universität Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, USA²⁶³) zur

Verfügung gestellt. Als Kontrollplasmid wurde pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Die Zellen wurden mit jetPei nach den Herstelleranweisungen mit 2 µg der jeweiligen Plasmide (0.02 µg Renilla Luziferase (Promega, Mannheim)) transfiziert. Nach 8 h mit dem Transfektionsreagenz wurde das Medium gewechselt und der Versuch gestartet. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Zellen abgeschabt, abzentrifugiert (500 x g, 5 min, 4 °C) und das Pellet in 100 µl Reporter Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert und dabei immer wieder gevortext. Nach erneuter zentrifugation (13.000 x g, 15 min, 4 °C) wurden 5 µl vom Lysat in ein FACS-Röhrchen gegeben. Nach Zugabe von 100 µl Luziferase Substrat wurden die Proben mit dem Multiscan RC Luminometer gemessen. Anschließend wurde von den Lysaten die Proteine wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben bestimmt und die Luziferase-Aktivität wurde auf den Proteingehalt normiert. Für die Renilla Messung wurden die Zellen mit 100 µl Passiv Lysepuffer resuspendiert und wie für die Luziferase Messung beschrieben lysiert. 10 µl vom Lysat wurden für die Messung mit 50 µl Renilla Substrat versetzt und mit dem Mithras gemessen.

3.2.15 Messung der ROS und RNI mittels durchflusszytometrischer Messung (FACS)

Für die Messung von intrazellulärem ROS wurden oxidative Fluoreszenzfarbstoffe Hydroethidin (HE) und Dihydrorhodamin (DHR) verwendet. 30 min vor Ende der Inkubationszeit der zu untersuchenden Ansätze wurde HE mit einer Endkonzentration von 2 µM zugegeben. DHR wurde zu Beginn der Inkubationszeit der jeweiligen Ansätze in einer Endkonzentration von 50 µM zugesetzt. Für die Messung von ROS in den Mitochondrien wurde der Fluoreszenzfarbstoff MitoSox verwendet. MitoSox akkumuliert spezifisch in den Mitochondrien der Zellen und wird dort oxidiert. 10 min vor Ende der Inkubationszeit der zu untersuchenden Ansätze wurde MitoSox mit einer Endkonzentration von 5 µM zugegeben. Nach Versuchende wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert (5 min, 500×g, RT) und in 1 ml warmem PBS resuspendiert. Die Messung der Fluoreszenz von mindestens 10.000 Zellen erfolgte am FACSCanto Durchflusszytometer im PE Kanal (Anregung 488 nm, Emission 578 nm).

3.2.16 Respirometrie

Die zelluläre Respiration (O_2 -Flux, [pmol O_2 /ml x 10^6 Zellen]) wurde mit einem Oxygraph-2k in einem 2-Kammer System mit einem Volumen von je 2 ml bei 37 °C bestimmt. Für jede Messung wurden 5×10^6 Zellen pelletiert und in 2 ml FKS-freiem Medium resuspendiert. Nachdem der basale Sauerstoffverbrauch der Zellen erfasst worden war, wurde die mitochondriale ATPase mit 2 μ g/ml Oligomycin inhibiert. Dies ermöglichte die Betrachtung des zellulären Sauerstoffverbrauchs unabhängig von der ATP-Produktion. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen durch die sequentielle Zugabe von Substanzen und die zeitliche Änderung des O_2 -Flux wurde erfasst.²⁶⁴ Als Kontrolle wurde am Ende jeder Messung 2 mM KCN (Inhibition des Komplex IV der Cytochrom C Oxidase) in den Ansatz zugegeben, was zur kompletten Inhibition des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs führte. Die Erfassung der Daten und ihre weitere Analyse erfolgte mit der DataLab 4.0 Software (Oroboros, Innsbruck, Österreich).

3.2.17 Messung der Calpain-Aktivität

Die lebend-Zell Messung der intrazellulären Calpain-Aktivität erfolgte mit dem *Fluorogenic Calpain Assay Kit* (Calbiochem, Bad Soden). Nach Beenden der Inkubationszeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 50 μ l Assaypuffer wurde zu den Zellen gegeben. In Versuchsansätzen, in denen Inhibitoren/Chemikalien verwendet wurden, wurden diese auch während der Calpainmessung erneut zugegeben. Das Calpainsubstrat wurde den Herstellerangaben zufolge zu den Zellen gegeben und die Lumineszenz wurde über 45 min lang alle 3 min mit dem Mithras gemessen. Die Anregung erfolgte bei 355 nm und die Emmission wurde bei 460 nm aufgenommen.

3.2.18 Calcium²⁺-Messung

Für die Ca^{2+} -Messung wurden die Zellen auf WillCo-Zellkulturschalen mit Glasboden ausgesät. Die Zellen wurden für 30 min mit 1 μ M Fura-2AM bei 37 °C in HEPES-Puffer beladen. Anschließend wurden sie gewaschen und mit Medium für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Ca^{2+} -Veränderungen wurden mit dem Axiowert Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlänge 380 nm und 340 nm aufgenommen und das Verhältnis (Ratio) von 380nm/340nm wurde benutzt, um die Ca^{2+} -Konzentrationen zu berechnen. Am Ende des

Versuchs wurden zur Kalibrierung zuerst 5 μM Ionomycin, um die maximale Ratio (R_{max}) zu bestimmen, und anschließend 5 mM EGTA, um die minimale Ratio (R_{min}) zu bestimmen, zu den Zellen gegeben. Mit der SlideBook-Software (Intelligent Imaging Innovation, Göttingen) konnten die Ca^{2+} -Konzentrationen berechnet werden.²⁶⁵

3.2.19 *Embryonic Body Assay*

Um *Embryonic Bodies* (EBs) wachsen zu lassen, wurde Medium ohne LIF benutzt. 1000 Zellen/35 μl wurde in hängenden Tropfen ausgesät und für 3 Tage wachsen gelassen. Die EBs wurden dann auf Lumox Schalen ausgesät und für 2 Tage anwachsen gelassen. Das KM_{PM} wurde 1:3 mit Medium (ohne LIF) verdünnt und für 24 h zu den EBs gegeben. Die Phasenkontrastbilder der ausplattierten EBs wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert und der Slide Book Software aufgenommen.

3.2.20 CD31-Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Inkubation wurde die EBs mit kaltem PBS gewaschen und mit kaltem Methanol/Aceton (7:3) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht fixiert. Die Proben wurden zwei Mal mit 0.1% Triton-PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit 10% FCS in 0.01% Triton-PBS geblockt. Der Anti-CD31 AK wurde über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut vier Mal mit 0.01% Triton-PBS gewaschen und mit einem anti-Ratte-cy3 AK für 1 h bei RT inkubiert. Zum Färben der Zellkerne wurde die letzten 30 min DAPI dazugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit 0.01% Triton-PBS wurden die Proben mit Fluoromount G auf Objektträger eingedeckelt und die CD31-Färbung mit dem *Laser Scanning* Mikroskop mit der ZEN Software (Zeiss, Göttingen) aufgenommen. Für Cy3 wurde der 1 mW Helium/Neon Laser mit einer Anregung von 543 nm und für DAPI ein 25 mW Diodenlaser mit einer Anregung von 405 nm verwendet. Für die statistische Auswertung der CD31-Fluoreszenzintensität wurde im *Monolayer*-Bereich der Proben die CD31- und DAPI-Fluoreszenz mit der Histogrammfunktion der ZEN-Software gemessen. Die Hintergrundintensität wurde abgezogen und die Fluoreszenzintensität von DAPI vs. CD31 unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt.

3.2.21 Statistische Analyse

Wurden die Ergebnisse von mehreren unabhängigen Versuchen zusammengefasst, so wurde eine statistische Analyse durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung (SD) berechnet. Die statistische Signifikanz wurde durch Berechnungen mit Hilfe des 1-Weg-ANOVA Test ermittelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der ‚ehrlichen signifikanten Differenz‘ nach Tukey. Ein P-Level von 0,005 gilt als signifikant (*). Die statistische Analyse wurde mit Graph Pad Prism, Version 4, durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 HIF-1 α wird durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies über Calcium²⁺/Calpain reguliert

Ein Großteil der Patienten mit einem VHL-Syndrom entwickelt multiple Tumore, welche eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufweisen und daher schlecht behandelt werden können. Das besonders aggressive Verhalten dieser Tumore wird darauf zurückgeführt, dass HIF-1 α bei diesen Patienten nicht abgebaut werden kann und es somit zu einer dauerhaften HIF-1-Aktivierung kommt. Daher ist es von großem Interesse einen pVHL-unabhängigen Abbaumechanismus von HIF-1 α zu identifizieren. Dies ist der Schwerpunkt im ersten Teil der vorliegenden Arbeit.

4.1.1 Die Expression von HIF-1 α unter Hypoxie und NO in RCC4-Zellen

RCC4-Zellen haben kein funktionelles pVHL und bauen daher das HIF-1 α -Protein nicht über den gut beschriebenen Degradationsweg über das 26S-Proteasom ab. Dies führte unter Normoxie zu einer Akkumulation von HIF-1 α (Abbildung 1A) und ebenfalls zu einer Aktivierung von HIF-1.²⁶⁶ Eine Inkubation von RCC4-Zellen für 4 h bei 0,5 % O₂ (Hypoxie) oder 0,5 mM DETA-NO veränderte die HIF-1 α -Proteinexpression nicht. Eine Kombination von Hypoxie mit dem NO-Donor DETA-NO führte jedoch zu einer deutlichen Reduktion des HIF-1 α -Proteingehalts (Abbildung 7A), die sich, wie frühere Experimente zeigten, wiederum auch auf die Aktivität von HIF-1 auswirkte.²⁶⁶ Um festzustellen, ob die nach 4 h Inkubation mit 0,5 mM DETA-NO beobachtete Reduktion von HIF-1 α maximal war, wurde in Abhängigkeit der DETA-NO Konzentration und Expositionsdauer die Proteinakkumulation analysiert. Bereits eine Inkubation mit 0,1 mM DETA-NO bei 0,5 % Hypoxie führte zu einer Reduktion des HIF-1 α -Proteingehalts, die ab einer Konzentration von 0,5 mM DETA-NO nicht weiter verstärkt werden konnte (Abbildung 7B). Der zeitliche Verlauf zeigte bereits ab 2 h eine Reduktion des HIF-1 α -Proteins, die nach 4 h Inkubation unter 0,5 % Hypoxie mit 0,5 mM DETA-NO maximal war (Abbildung 7C). Um mögliche zytotoxische Nebeneffekte zu unterbinden, welche bei hohen Konzentrationen und/oder Langzeit-Inkubationen mit DETA-NO auftreten können, wurden die Zellen im Folgenden immer mit 0,5 mM DETA-NO über 4 h inkubiert. Die

hier verwendete Konzentration von 0,5 mM DETA-NO setzt nur eine ca. 300-fach geringere Menge von NO frei.^{267,268} Damit liegt die durch DETA-NO freigesetzte NO-Menge bei ca. 1,5 μ M, was im Bereich von Konzentrationen ist, die bei Entzündungsprozessen in Geweben zu finden sind.

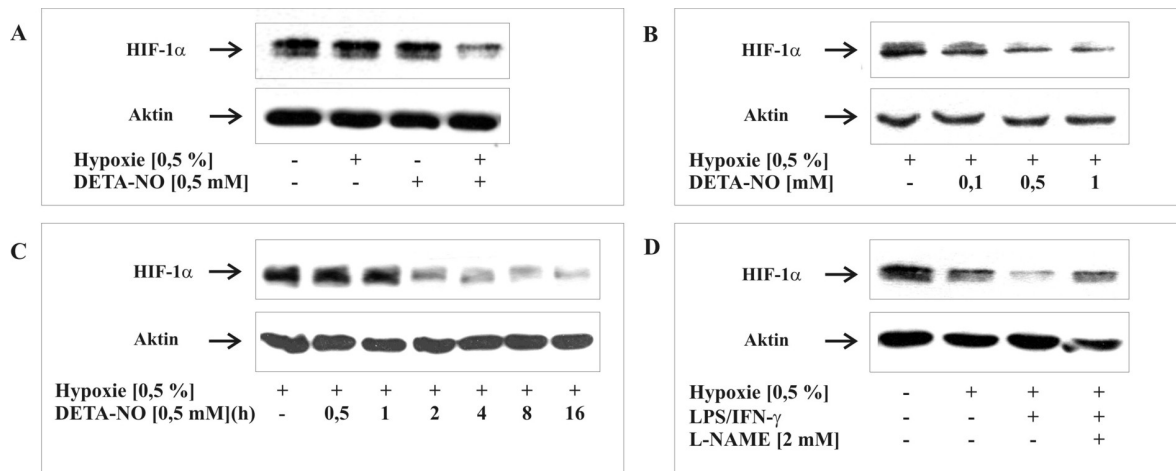


Abbildung 7: Hypoxie und NO verringern die HIF-1 α -Proteinakkumulation

RCC4-Zellen wurden für 4 h sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie (0,5 %) mit und ohne 0,5 mM DETA-NO (A), für 4 h unter Hypoxie (0,5 %) mit DETA-NO Konzentrationen von 0,1 bis 1 mM (B), mit 0,5 mM DETA-NO für 30 min bis 16 h unter Hypoxie (0,5 %)(C) und für 16 h unter Normoxie und Hypoxie inkubiert. Unter Hypoxie wurden die Zellen zusätzlich noch mit LPS (1 μ g/ml)/IFN- γ (100 U/ml) oder mit LPS/IFN- γ und L-NAME (1 mM) behandelt (D). Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Um die Fragestellung zu klären, ob endogen produziertes NO ausreicht, um unter Hypoxie zu einer Reduktion von HIF-1 α zu führen, wurden RCC4-Zellen unter Hypoxie mit einer Kombination von 1 μ g/ml LPS und 100 U/ml IFN- γ stimuliert. LPS/IFN- γ induziert die iNOS und steigert die Menge des endogen gebildeten NO. Die Stimulation der Zellen mit LPS/IFN- γ führte unter Hypoxie zu einer Reduktion des HIF-1 α -Proteingehalts, was durch 2 mM L-NAME, einem iNOS-Inhibitor, inhibiert werden konnte (Abbildung 1D).

Die Ergebnisse zeigen, dass unter Hypoxie sowohl exogenes als auch endogenes NO zu einer Reduktion der HIF-1 α -Proteinexpression in pVHL defizienten Zellen führt.

4.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies in Kombination mit NO vermindert die Proteinakkumulation von HIF-1 α

Ein möglicher molekularer Mechanismus, der an der Reduktion des HIF-1 α -Proteins beteiligt sein könnte, ist die Bildung von ROS unter Hypoxie. Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen mit dem ROS sensitivem Fluoreszenzmarker Hydroethidin (HE)

beladen. HE wird vor allem durch O_2^- , aber auch andere ROS oxidiert, was zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität führt. Unter Hypoxie wurde ein 2-facher Anstieg der HE-Oxidation im Vergleich zur Normoxie beobachtet, während eine Inkubation der Zellen unter Normoxie mit DETA-NO nicht zur Erhöhung der ROS-Produktion führte. Die Kombination von DETA-NO und Hypoxie jedoch zeigte tendenziell einen Rückgang der HE-Oxidation im Vergleich zur Hypoxie allein (Abbildung 8).

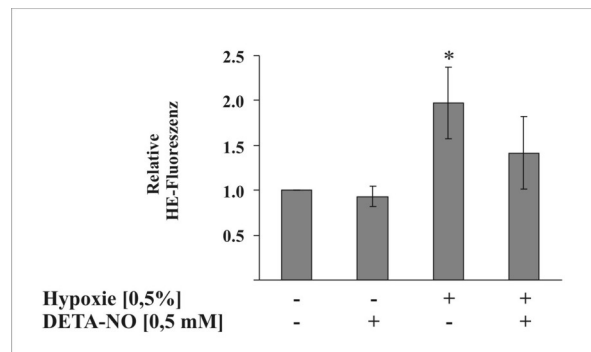


Abbildung 8: NO verringert die Oxidation von Hydroethidin unter Hypoxie

RCC4-Zellen wurden 4 h sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie (0,5 %) mit und ohne 0,5 mM DETA-NO inkubiert. Die HE-Oxidation wurde mittels FACS analysiert. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle.

Der Rückgang der HE-Oxidation unter Hypoxie und DETA-NO lieferte einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion von NO mit den unter Hypoxie gebildeten ROS. Des Weiteren könnte die Reaktion von NO und ROS den Abbau von HIF-1 α in RCC4-Zellen initiieren. Um dies zu überprüfen, sollte unter Normoxie durch gleichzeitige Gabe von NO und O_2^- eine Reduktion von HIF-1 α herbeigeführt werden.

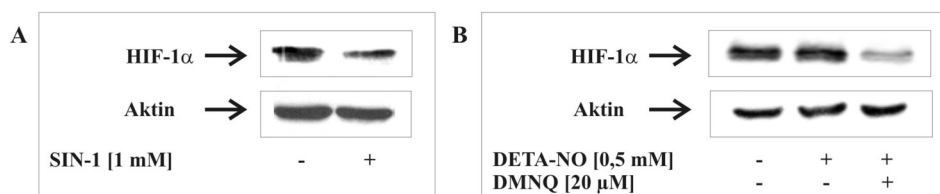


Abbildung 9: SIN-1 und DETA-NO/DMNQ reduzieren die HIF-1 α -Proteinmenge unter Normoxie

RCC4-Zellen wurden 4 h unter Normoxie mit oder ohne SIN-1 (1 mM) (A), DETA-NO (0,5 mM) und/oder DETA-NO/DMNQ (20 μ M) (B) inkubiert. Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Zum einen wurde hierfür SIN-1 verwendet, das sowohl O_2^- als auch NO freisetzt. Zum anderen wurde die Gabe von DETA-NO mit DMNQ kombiniert. DMNQ wird in der Zelle in einem zyklischen Prozess zunächst 2-fach oxidiert. Dieser energetisch ungünstige

Oxidationsstatus führt zur spontanen und kontinuierlichen Bildung von O_2^- . Eine Inkubation von RCC4-Zellen für 4 h mit 1 mM SIN-1 führte unter Normoxie zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des HIF-1 α -Proteingehaltes (Abbildung 9A und Abbildung 14B). Weiterhin zeigte sich, dass unter Normoxie weder DETA-NO noch DMNQ alleine einen Einfluss auf HIF-1 α hatten (Abbildung 16), wogegen die Kombination DETA-NO/DMNQ eine Reduktion des HIF-1 α -Proteins bewirkte (Abbildung 9B).

Um mögliche unspezifische Reaktionen durch Antioxidantien zu vermeiden und um die Quelle der ROS zu klären, wurden RCC4- ρ 0-Zellen hergestellt. Dazu wurden RCC4-Zellen mit Ethidiumbromid inkubiert, was zu einem Verlust der Replikation von mitochondrialen Genen führt. Da einige Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette durch mitochondriale Gene kodiert werden, wurde somit in RCC4- ρ 0-Zellen die Ausbildung einer funktionellen Atmungskette verhindert. Eines dieser Gene ist die Untereinheit II der Cytochrom C Oxidase, das nach der Inkubation mit Ethidiumbromid in den RCC4- ρ 0-Zellen nicht mehr exprimiert wurde (Abbildung 10A).

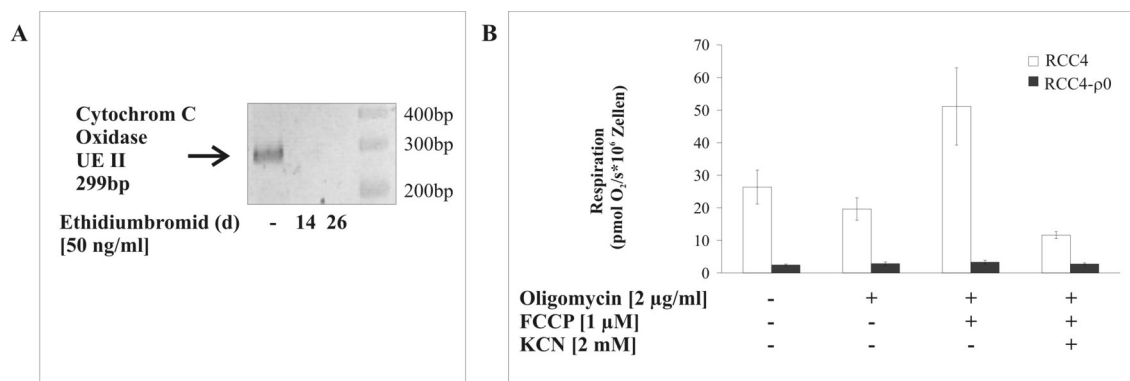


Abbildung 10: Ethidiumbromid führt zum Verlust einer funktionellen Atmungskette

Die UE II der Cytochrom C Oxidase wurde mittels PCR in unbehandelten und nach 14 und 26 d mit 50 ng/ml Ethidiumbromid behandelten RCC4-Zellen nachgewiesen (A). Die zelluläre Atmung von RCC4- und RCC4- ρ 0-Zellen wurde mittels eines Oxygraph-2k gemessen. State-3 ähnliche Basisatmung wurde gemessen, bevor durch Zugabe von 2 μ g/ml Oligomycin das Atmungsminimallevel, state-4, erreicht wurde. Durch Entkoppeln der Atmungskette mittels 1 μ M FCCP wurde das maximale Atmungspotential der Mitochondrien gemessen. Am Ende wurde die Atmung mit KCN abgeblockt (B). Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D.

Um die verringerte Respiration der RCC4- ρ 0-Zellen zu zeigen, wurde zusätzlich der zelluläre Sauerstoffverbrauch gemessen. In RCC4-Zellen wurden, nachdem sich eine Basislinie im Sauerstoffverbrauch eingependelt hatte, 2 μ g/ml Oligomycin zugegeben um die mitochondrielle Atmung durch Hemmung der ATP Synthase auf ein Minimallevel (state 4-like) herab zu senken. Die Zugabe von FCCP, das die oxidative Phosphorylierung entkoppelt, führte zu einem verstärkten Sauerstoffverbrauch. Zum Abschluss der Versuche

wurde die Atmung mit 2 mM KCN blockiert. In den RCC4- ρ 0-Zellen konnte dagegen keine Reaktion auf die verwendeten Chemikalien beobachtet werden (Abbildung 10B). Um nachzuweisen, dass RCC4- ρ 0-Zellen weniger ROS unter Hypoxie bilden, wurde mit MitoSox die ROS-Produktion spezifisch in den Mitochondrien detektiert.

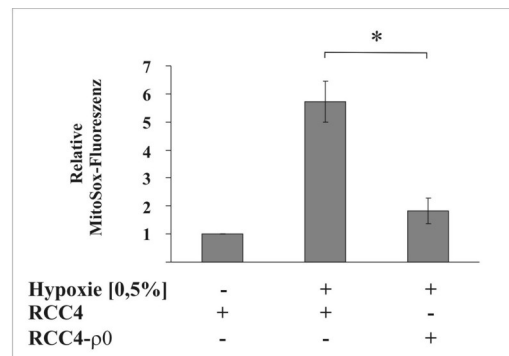


Abbildung 11: MitoSox-Oxidation unter Hypoxie in RCC4- vs. RCC4- ρ 0-Zellen

RCC4- und RCC4- ρ 0-Zellen wurden für 4 h unter Normoxie oder Hypoxie (0,5 %) inkubiert und die mitochondrielle ROS-Produktion wurde mittels MitoSox Oxidierung mit der FACS Analyse analysiert. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich.

Hypoxie führte in RCC4-Zellen zu einer 6-fachen Erhöhung der mitochondrialen ROS-Produktion, wogegen es in RCC4- ρ 0-Zellen nur zu einer 2-fach erhöhten MitoSox-Oxidation unter Hypoxie kam (Abbildung 11). Dies bestätigt, dass RCC4- ρ 0-Zellen, deren respiratorische Atmung drastisch reduziert ist, verringerte ROS Mengen unter Hypoxie produzieren. Die funktionelle Konsequenz dieser verringerten mitochondrialen ROS-Produktion zeigte sich dann in der Analyse der Proteinexpression von HIF-1 α in den RCC4- ρ 0-Zellen unter Hypoxie und NO.

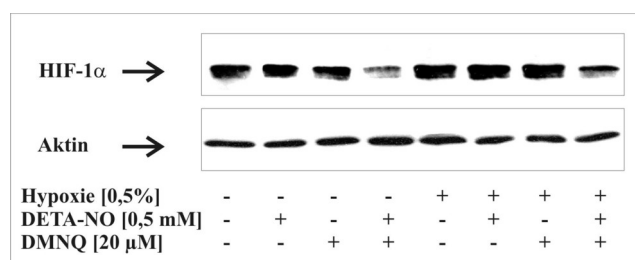


Abbildung 12: Akkumulationsverhalten von HIF-1 α -Protein unter Hypoxie und Normoxie in Kombination mit NO/O₂ in RCC4- ρ 0-Zellen

RCC4- ρ 0-Zellen wurden 4 h unter Normoxie oder Hypoxie (0,5 %) mit 0,5 mM DETA-NO, 20 μ M DMNQ oder DETA-NO/DMNQ inkubiert. Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Während in RCC4-Zellen eine deutliche Reduktion des HIF-1 α -Proteins unter Hypoxie und DETA-NO zu beobachten war (Abbildung 7), ließ sich dies in RCC4- ρ 0-Zellen nicht

beobachten (Abbildung 12). Erst wenn O_2^- durch DMNQ unter gleichzeitiger Gabe von NO substituiert wurde, konnte in RCC4-p0-Zellen eine Reduktion des HIF-1 α -Proteins hervorgerufen werden. Die gleichzeitige Stimulation der RCC4-p0-Zellen mit DETA-NO und DMNQ sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie führte zu einem Rückgang des HIF-1 α -Proteins. Dies bestätigt, dass die unter Hypoxie mitochondriell gebildeten O_2^- zusammen mit NO für die Reduktion des HIF-1 α -Proteingehalts verantwortlich sind.

4.1.3 Oxidierende Substanzen regulieren HIF-1 α

Wenn O_2^- und NO in entsprechenden Raten produziert werden, reagieren sie zu hochreaktiven Sauerstoff- und Stickstoffintermediaten. Die Bildung von oxidativen Reaktionsprodukten aus O_2^- und NO hängt stark von der Stöchiometrie der Moleküle ab. Um dies zu zeigen, wurde die Proteinexpression von HIF-1 α in Abhängigkeit von variierenden Konzentrationen von DETA-NO und DMNQ analysiert.

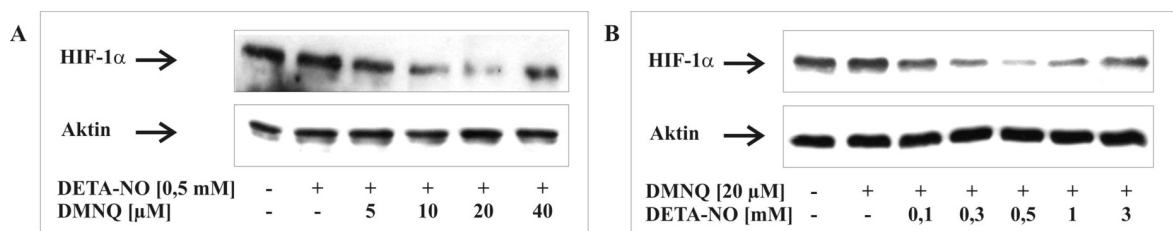


Abbildung 13: NO/ O_2^- beeinflussen den HIF-1 α -Abbau konzentrationsabhängig

RCC4-Zellen werden 4 h unter Normoxie mit 0,5 mM DETA-NO und steigenden Konzentrationen von DMNQ (5 bis 40 μ M)(A) oder mit 20 μ M DMNQ und steigenden Konzentrationen von DETA-NO (von 0,1 bis 3 mM)(B) inkubiert. Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Die Variation beider Substanzen zeigte, dass es nur in bestimmten Konzentrations-Kombinationen von DETA-NO und DMNQ zur Reduktion von HIF-1 α kam. Bei konstanter NO Konzentration wurde HIF-1 α nur zwischen 10 und 20 μ M DMNQ deutlich reduziert, wogegen sowohl niedrigere (5 μ M) als auch höhere (40 μ M) Konzentrationen den HIF-1 α -Proteingehalt nicht beeinflussten (Abbildung 13A). Umgekehrt zeigt sich bei konstanter O_2^- Konzentration ein deutlicher Einfluss auf das HIF-1 α -Protein nur zwischen 0,3 und 1 mM DETA-NO. Auch hier zeigten niedrigere (0,1 mM) und höhere (3 mM) Konzentrationen von DETA-NO nur noch marginale Effekte (Abbildung 13B).

Zur weiteren Aufklärung der entstandenen Radikale, wurde Harnsäure, ein Antioxidans, das Peroxynitrit, ein hochreaktives Reaktionsprodukt aus O_2^- und NO, und andere RNI abfängt, eingesetzt. Harnsäure zeigte in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration

sowohl unter Hypoxie und DETA-NO (Abbildung 14A) als auch unter Gabe von SIN-1 (Abbildung 14B) und DETA-NO/DMNQ (Abbildung 16) eine Inhibition des HIF-1 α -Proteinverlusts.

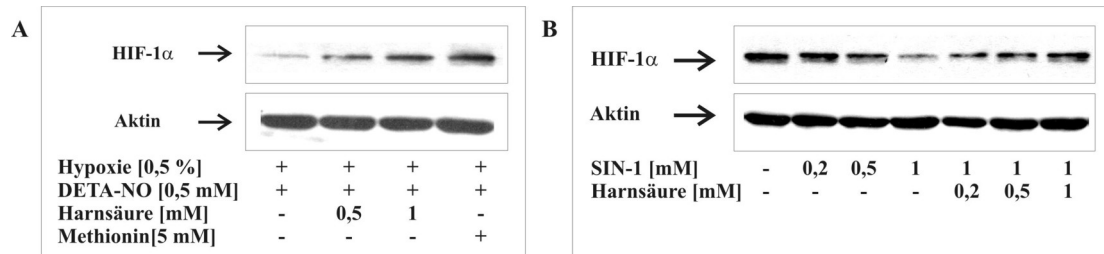


Abbildung 14: Einfluss von Harnsäure und Methionin auf das Akkumulationsverhalten von HIF-1 α nach NO/O $_2^-$

RCC4-Zellen wurden 4 h unter Hypoxie (0,5 %) und 0,5 mM DETA-NO mit 0,5 oder 1 mM Harnsäure oder mit 5 mM Methionin (A), unter Normoxie mit steigenden Konzentrationen von SIN-1 (0,2 bis 1 mM) oder mit 1 mM SIN-1 und steigenden Konzentrationen von Harnstoff (0,2 bis 1 mM) inkubiert (B). Harnsäure wurde zusätzlich 30 min vorinkubiert. Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde als weiteres Antioxidans Methionin benutzt, welches ebenfalls als Peroxynitrit-Scavenger beschrieben ist. Genau wie Harnsäure inhibierte auch Methionin unter Hypoxie und DETA-NO die Reduktion des HIF-1 α -Proteins (Abbildung 14A).

Um das mögliche Reaktionsprodukt aus NO und O $_2^-$ zu messen, wurde Dihydrorhodamin (DHR) eingesetzt, das durch Peroxynitrite und andere RNI oxidiert wird.

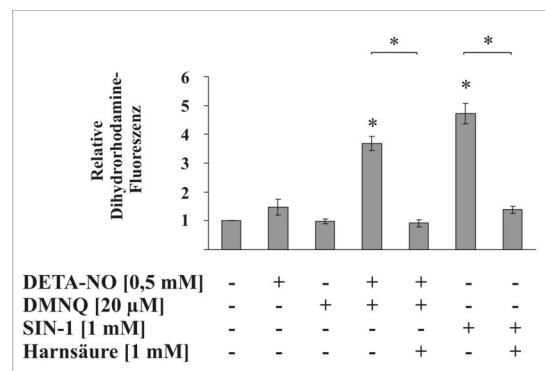


Abbildung 15: Oxidationsverhalten von Dihydrorhodamin durch NO/O $_2^-$

RCC4-Zellen wurden 4 h unter Normoxie entweder mit 0,5 mM DETA-NO, 20 μ M DMNQ, DETA-NO/DMNQ oder mit 1 mM SIN-1 mit oder ohne 1 mM Harnsäure inkubiert. Harnsäure wurde zusätzlich 30 min vorinkubiert. DHR Oxidierung wurde mittels FACS Analyse analysiert. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle, wenn es nicht anders dargestellt ist.

Ein signifikanter Anstieg der DHR-Oxidation wurde sowohl durch SIN-1 als auch durch DETA-NO/DMNQ gemessen. Die Zugabe von 0,5 mM DETA-NO/20 μ M DMNQ zeigte

einen 4-fachen, 1 mM SIN-1 sogar einen 5-fachen Anstieg der DHR-Oxidation, die in beiden Fällen durch Harnsäure inhibiert wurde. Dagegen wurde DHR weder durch 20 μ M DMNQ noch durch 0,5 mM DETA-NO stärker oxidiert als unter unbehandelten Kontrollbedingungen (Abbildung 15). Diese Ergebnisse zeigen, dass oxidative Prozesse, die Harnsäure-sensitiv sind und die von dem gleichzeitigen Vorhandensein von NO sowie O_2^- abhängig sind, für die Reduktion von HIF-1 α in RCC4-Zellen verantwortlich sind. Andere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass NO unter Normoxie HIF-1 α stabilisiert und dass die gleichzeitige Gabe von O_2^- diesem entgegenwirkt.^{269,270}

Um zu vergleichen, ob es sich bei der Reduktion von HIF-1 α unter Hypoxie und NO in RCC4-Zellen um den gleichen Mechanismus handelt wie er in Zellen mit funktionellem pVHL vorliegt, wurden RCC4-pVHL-Zellen benutzt. RCC4-pVHL-Zellen sind RCC4-Zellen, die aufgrund von einer stabile Retransformation wieder ein funktionelles pVHL exprimieren.

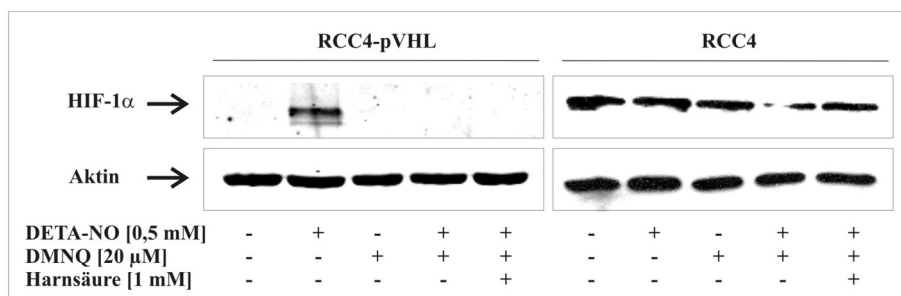


Abbildung 16: Harnsäure hat gegensätzliche Effekte in RCC4- vs. RCC4-pVHL-Zellen

RCC4- und RCC4-pVHL-Zellen wurden 4 h unter Normoxie mit 0,5 mM DETA-NO, 20 μ M DMNQ oder der Kombination DETA-NO/DMNQ mit und ohne Harnsäure inkubiert. Harnsäure wurde zusätzlich 30 min vorinkubiert. Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Unter Normoxie oder unter 20 μ M DMNQ war in RCC4-pVHL-Zellen kein HIF-1 α -Protein detektierbar. HIF-1 α ließ sich jedoch durch die Gabe von 0,5 mM DETA-NO induzieren, was wiederum durch die Koadministration von DMNQ inhibiert wurde. Auch in RCC4-Zellen führte diese Kombination zur Reduktion von HIF-1 α . Entscheidend ist jedoch, dass sich im Gegensatz zu den RCC4-Zellen in RCC4-pVHL-Zellen die Reduktion von HIF-1 α durch DETA-NO/DMNQ nicht durch Harnsäure inhibieren ließ (Abbildung 16). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass das Zusammenspiel von NO und O_2^- beim klassischen, pVHL-abhängigen HIF-1 α -Abbau einen anderen Mechanismus als in pVHL defizienten RCC4-Zellen vermittelt.

4.1.4 NO und O₂⁻ reduzieren die HIF-1 α -Proteinmenge durch Calpain

Wie bereits gezeigt wurde, wird durch NO und O₂⁻ die HIF-1 α -mRNA Menge in RCC4-Zellen nicht verändert,²⁶⁶ so dass die hier gezeigte Abnahme des HIF1- α -Proteins nicht durch eine transkriptionelle Regulation erklärbar ist. Darüber hinaus wurde auch die Translationrate durch NO und O₂⁻ nicht verringert.²⁶⁶ Daraus ergibt sich, dass es sich bei der Reduktion von HIF-1 α in RCC4-Zellen durch NO und O₂⁻ um einen pVHL-unabhängigen Abbaumechanismus des Proteins handelt.

Um herauszufinden, wie HIF-1 α abgebaut wird, wurde nachfolgend der Proteasom-Inhibitor MG132 eingesetzt.

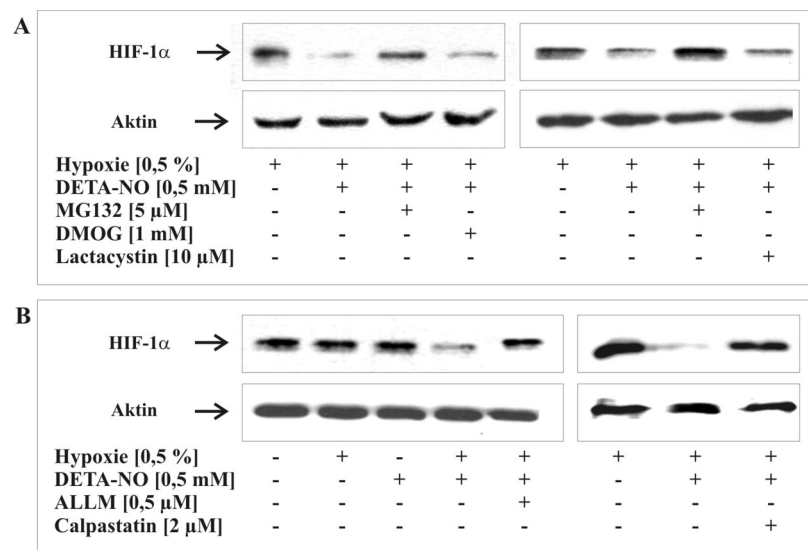


Abbildung 17: Der hypoxische Proteinabbau von HIF-1 α ist Calpain-abhängig

RCC4-Zellen wurden 4 h unter Hypoxie (0,5 %) mit 0,5 mM DETA-NO und zusätzlich mit 5 μ M MG132, 1 mM DMOG, 10 μ M Lactacystin (A), 0,5 μ M ALLM oder 1 μ M Calpastatin (B) behandelt. MG132, DMOG, Lactacystin, ALLM und Calpastatin wurden 1 h vorinkubiert. Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Die Reduktion des HIF-1 α -Proteins unter 0,5 % Hypoxie und 0,5 mM DETA-NO wurde durch den Einsatz von 5 μ M MG132 aufgehoben (Abbildung 11A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch in RCC4-Zellen der Abbau von HIF-1 α über das Proteasom erfolgt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die RCC4-Zellen statt dem defizienten pVHL eine pVHL-ähnliche E3-Ubiquitin-Ligase als Ersatz benutzen und somit der Abbau über das Proteasom gewährleistet wird. Um einen durch Hydroxylierung vermittelten Abbau auszuschließen, wurde im nächsten Schritt der PHD-Inhibitor DMOG eingesetzt. Falls alternative E3-Ligasen in den RCC4-Zellen unter Hypoxie und DETA-NO aktiviert werden, sollte DMOG den Abbau von HIF-1 α in gleicher Weise wie MG132 hemmen.

1 mM DMOG führte jedoch nicht zu einer Wiederherstellung des HIF-1 α -Proteins nach Hypoxie und DETA-NO (Abbildung 11A). Dies zeigt zum einen, dass die Reduktion von HIF-1 α nicht über den klassischen Hydroxylierungs- und Ubiquitinierungs-Abbauweg über das 26S-Proteasom abläuft und zum anderen stellt es in Frage, ob MG132 ein spezifischer Proteasom-Inhibitor ist. Daher wurde zusätzlich Lactacystin verwendet, das spezifischer für den proteasomalen Abbau von Proteinen ist. Es wurde deutlich, dass 10 μ M Lactacystin im Gegensatz zu MG132 die Reduktion von HIF-1 α unter Hypoxie und DETA-NO nicht umkehren konnte (Abbildung 17A). Da somit ausgeschlossen wurde, dass in RCC4-Zellen das HIF-1 α -Protein auf einem alternativen Weg dem 26S-Proteasom zum Abbau zugeführt wird, musste ein alternativer Proteinabbaumechanismus in Betracht gezogen werden. Da für MG132 beschrieben ist, dass es neben dem Proteasom sowohl Calpain als auch weitere lysosomale Cysteinproteasen hemmt, wurde Calpain als möglicher Kandidat für den Abbau von HIF-1 α in Betracht gezogen. Als Erstes wurden dafür die spezifischen Calpain-Inhibitoren ALLM und Calpastatin benutzt. Sowohl 0,5 μ M ALLM als auch 1 μ M Calpastatin inhibieren den Abbau von HIF-1 α unter 0,5 % Hypoxie und 0,5 mM DETA-NO (Abbildung 17B) vergleichbar mit MG132 (Abbildung 17A). Um weiterhin ein Zusammenwirken von O₂⁻ und NO auf den Abbau von HIF-1 α zu bekräftigen, wurde analysiert, ob der Abbau unter Normoxie in Kombination mit DETA-NO und DMNQ auch mittels Calpastatin aufgehoben werden kann.

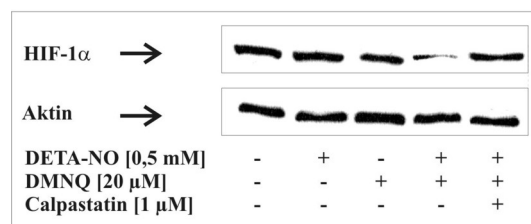


Abbildung 18: NO/O₂⁻ vermitteln den Calpain-abhängigen HIF-1 α -Abbau

RCC4-Zellen wurden 4 h unter Normoxie mit 0,5 mM DETA-NO, 20 μ M DMNQ, der Kombination DETA-NO/DMNQ oder DETA-NO/DMNQ zusammen mit 1 μ M Calpastatin inkubiert. Calpastatin wurde 1 h vorinkubiert. Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Wie schon zuvor unter Hypoxie und DETA-NO führte die Inkubation der Zellen mit Calpastatin zu einer Hemmung des HIF-1 α -Abbaus durch DETA-NO und DMNQ unter Normoxie (Abbildung 18). Aus diesen Inhibitor-Versuchen ergibt sich, dass der Abbau von HIF-1 α , ausgelöst von NO und O₂⁻, durch Calpain vermittelt wird. Calpaine sind Ca²⁺-abhängige Proteasen und in weiteren Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass unter Einsatz des Ca²⁺-Chelators Bapta-AM der Abbau von HIF-1 α unter Hypoxie/ DETA-NO

gehemmt wird.²⁶⁶ Weiterhin führte eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} durch Ionomycin oder Thapsigargin unter Normoxie ebenfalls zu einem Calpain-abhängigen HIF-1 α -Abbau.²⁶⁶ Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass Calpain HIF 1 α in RCC4-Zellen abbaut.

RCC4-Zellen haben kein funktionelles pVHL, wodurch der Abbau von HIF-1 α über das Proteasom nicht möglich ist. Der Abbau von HIF-1 α durch Calpain könnte daher ein Ersatzmechanismus sein, der einen alternativen Abbau des Proteins ermöglicht. Um zu testen, ob dieser alternative Abbaumechanismus nur in RCC4-Zellen oder auch in Zellen, die ein funktionelle pVHL haben, vorliegt, wurden Versuche in HEK293-Zellen durchgeführt. Der Abbau von HIF-1 α über das 26S-Proteasom wurde in den HEK293-Zellen durch Gabe von DMOG gehemmt. DMOG inhibiert die PHD, sodass HIF-1 α unter Normoxie akkumuliert.

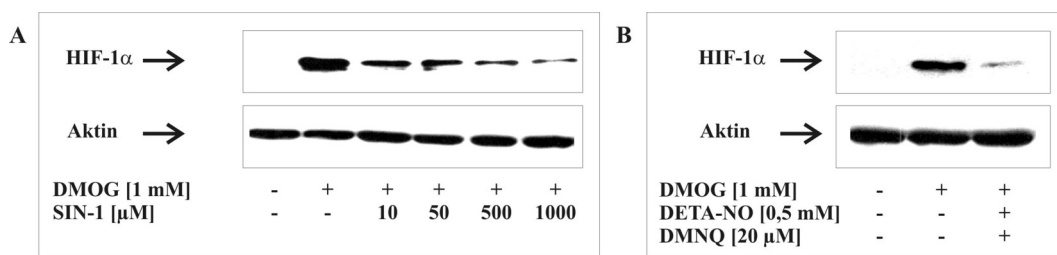


Abbildung 19: Verändertes HIF-1 α -Akkumulationsverhalten durch NO/O $_2^-$ in HEK293-Zellen

HEK293 wurden 1 h mit 1 mM DMOG vorinkubiert und anschließend wurden die Zellen für 4 h unter Normoxie mit steigenden Konzentrationen von SIN-1 (A) oder mit 0,5 mM DETA-NO/20 μ M DMNQ (B) inkubiert. Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Abbildung 19 zeigt, dass ohne DMOG HIF-1 α wie erwartet unter Normoxie depletiert war, da es über das Proteasom abgebaut wurde, wohingegen die Zugabe von 1 mM DMOG zu einer Akkumulation führte. Die Kombination von DMOG mit steigenden Konzentrationen von SIN-1 führt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion von HIF-1 α . Dies entspricht den Beobachtungen in RCC4-Zellen (Abbildung 9 und Abbildung 14). Auch die Kombination von 0,5 mM DETA-NO und 20 μ M DMNQ unter Normoxie, bei gleichzeitiger Inhibierung der PHD durch DMOG, zeigte eine deutliche Reduktion des HIF-1 α Signals (Abbildung 19B). Die Versuche mit SIN-1 und mit DETA-NO/DMNQ in HEK293-Zellen zeigen, dass sich die HIF-1 α Degradation nach Hemmung des pVHL-abhängigen Abbauewegs durch NO und O $_2^-$ induzieren lässt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch in den HEK293-Zellen, genau wie in RCC4-Zellen, der HIF-1 α -Abbau durch Calpain vermittelt wird (Abbildung 20).

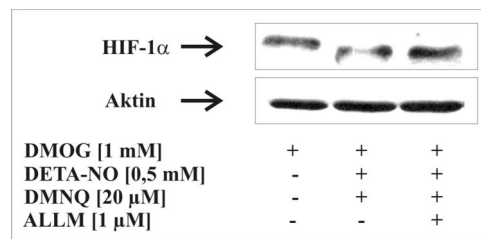


Abbildung 20: Der HIF-1 α -Proteinabbau durch NO/O₂⁻ in HEK293-Zellen ist Calpain-abhängig

HEK293 wurden 1 h mit 1 mM DMOG vorinkubiert und anschließend wurden die Zellen für 4 h unter Normoxie mit 0,5 mM DETA-NO/20 μ M DMNQ mit oder ohne 0,5 μ M ALLM inkubiert. ALLM wurde zusätzlich 1 h vorinkubiert. Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Um weiterhin die mechanistischen Details, die dem Abbau von HIF-1 α zugrunde liegen, zu verdeutlichen, wurde der direkte Einfluss von NO und O₂⁻ auf die Calpain-Aktivität untersucht. Hierfür wurde ein Substrat verwendet, das von den Zellen aufgenommen wird und nach Spaltung durch Calpain luminesziert.

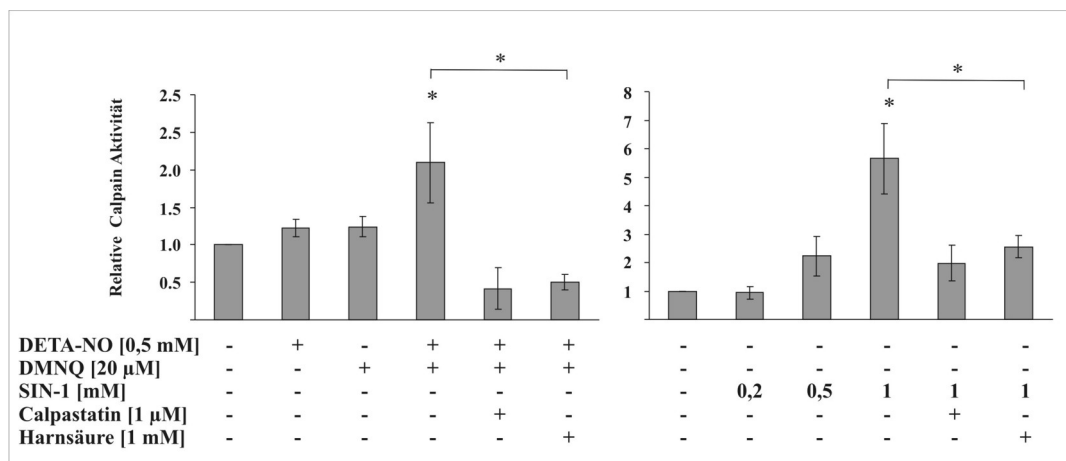


Abbildung 21: Der Einfluss von NO/O₂⁻ auf die Calpain-Aktivität

Die Messung der Calpain-Aktivität erfolgte wie in Material und Methoden erklärt. Die Zellen wurden für 4 h unter Normoxie mit 0,5 mM DETA-NO, 20 μ M DMNQ oder mit DETA-NO/DMNQ mit oder ohne Calpastatin oder Harnsäure oder mit steigenden Konzentrationen von SIN-1 mit oder ohne Calpastatin oder Harnsäure inkubiert. Calpastatin und Harnsäure wurden 30 min vorinkubiert. Die Lumineszenz wurde gemessen und die unbehandelte Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle, wenn es nicht anders dargestellt ist.

Die Kombination von 0,5 mM DETA-NO und 20 μ M DMNQ erhöhte die Calpain-Aktivität in RCC4-Zellen um das 2-fache. Weder DETA-NO noch DMNQ alleine führten zu einer Aktivitätserhöhung. Der Einsatz von 1 μ M Calpastatin und auch von 1 mM Harnsäure konnte die Erhöhung der Calpain-Aktivität durch DETA-NO und DMNQ verhindern. Die Reduktion der Substratlumineszenz durch Calpastatin dient als Nachweis,

dass das Substrat Calpain-spezifisch abgebaut wird. Analog zu DETA-NO/DMNQ erhöhte auch SIN-1 konzentrationsabhängig die Calpain-Aktivität (Abbildung 21). Die gleichen Konzentrationen SIN-1 (1 mM), die zum Abbau von HIF-1 α führten (s. Abbildung 14) erhöhten die Calpain-Aktivität bis auf das 6-fache der Kontrolle. Wie bei der Aktivierung von Calpain durch DETA-NO/DMNQ wurde auch die SIN-1-abhängige Calpain-Aktivität sowohl durch Calpastatin als auch durch Harnsäure inhibiert (Abbildung 21). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Zusammenwirken von NO und O₂⁻ zu einer Aktivierung von Calpain führt.

Da Calpain Ca²⁺-abhängig aktiviert wird, und der Einfluss von Ca²⁺ auf den pVHL-unabhängigen Abbau von HIF-1 α bereits gezeigt wurde,²⁶⁶ wurde im Folgenden untersucht, ob NO und O₂⁻ zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führen. Der intrazelluläre Ca²⁺-Basislevel betrug in RCC4-Zellen 250 nM. Weder 0,5 mM DETA-NO noch 20 μ M DMNQ führten zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺. Wurden RCC4-Zellen mit der Kombination aus 0,5 mM DETA-NO/20 μ M DMNQ inkubiert, so betrug die maximale Ca²⁺-Konzentration nach 1 h 750 nM. 1 mM SIN-1 führte in RCC4-Zellen zu einer stärkeren und schnelleren Ca²⁺-Erhöhung mit einem Maximum nach 30 min von 1,5 μ M (Abbildung 22).

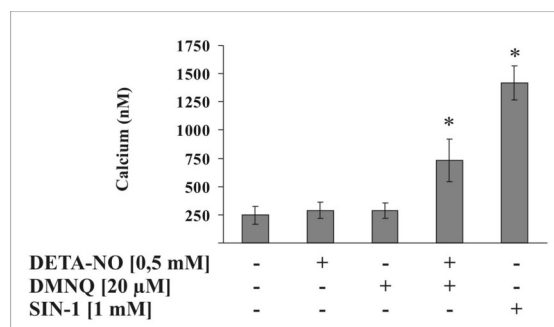


Abbildung 22: Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch NO/O₂⁻

Intrazelluläres Ca²⁺ wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, mit Fura-2AM gemessen. Der absolute Ca²⁺-Gehalt zum maximalen Erhöhungszeitpunkt durch 0,5 mM DETA-NO, 20 μ M DMNQ oder die Kombination aus DETA-NO/DMNQ wurde nach ca. 60 min und durch SIN-1 nach ca. 30 min bestimmt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n \geq 3 Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit p \geq 0,05 signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle, wenn es nicht anders dargestellt ist.

Das 340/380 nm-Verhältnis von Fura2-AM im Zeitverlauf zeigt, dass DETA-NO/DMNQ den Ca²⁺-Level langsam aber stetig innerhalb von 60 min (Abbildung 23A, durchgezogene Linie) erhöht. Wurden die Zellen zuvor mit Harnsäure inkubiert und anschließend mit DETA-NO/DMNQ behandelt, so erhöhte sich die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration nicht (Abbildung 23A, gestrichelte Linie). 1 mM SIN-1 dagegen führte zu einem sofortigen

Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} mit leicht abnehmendem Ca^{2+} -Level ab 30 min Inkubationszeit (Abbildung 23B, durchgezogene Linie). Auch der stärkere, SIN-1 vermittelte Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ließ sich durch Vorinkubation mit Harnsäure inhibieren (Abbildung 23B, gestrichelte Linie).

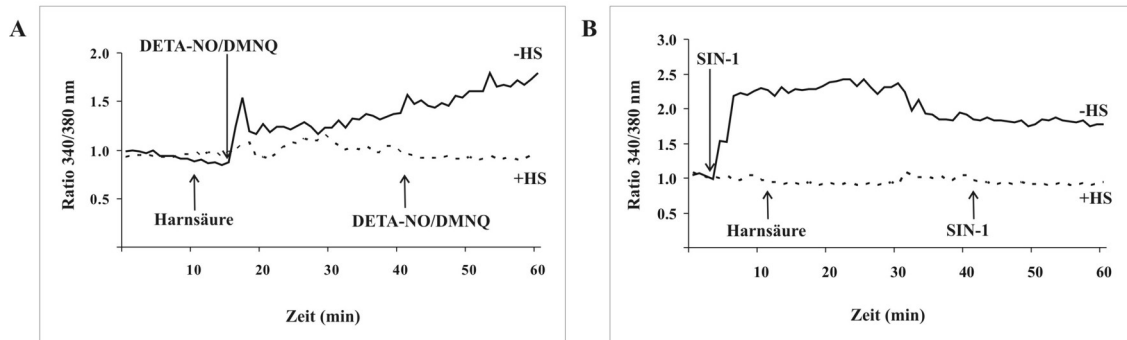


Abbildung 23: Intrazelluläre Ca^{2+} -Veränderungen durch DETA-NO/DMNQ und SIN-1

Die zellulären Ca^{2+} -Schwankungen wurden an der Verhältnisänderung (Ratio) 340/380 nm von Fura-2AM in Einzelzellen im Zeitverlauf gezeigt. RCC4-Zellen wurde entweder mit 0.5 mM DETA-NO/20 μM DMNQ (A) oder mit 1 mM SIN-1 (B) mit und ohne Harnsäure inkubiert. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Zugabe der Substanz an. Die Graphen sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Diese Ergebnisse zeigen, dass NO/O_2^- in der Lage sind, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu erhöhen und somit eine Calpain-Aktivierung zu verursachen. Sowohl die Aktivierung von Calpain als auch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} durch NO/O_2^- war Harnsäure-sensitiv und wurde daher durch Peroxynitrit oder andere RNI vermittelt.

4.2 Makrophagen-Polarisierung durch AZ führt zu einer HIF-1 α -Aktivierung durch TGF- β und S1P

Neben Veränderungen in den Tumorzellen, bei denen die Aktivierung von HIF-1 zu einem unabhängigen Wachstum und einer Resistenz gegenüber Apoptosestimuli beiträgt, tragen auch andere Zelltypen, die im Tumorgewebe vorkommen, wie z.B. Makrophagen, zu dem malignen Wachstum und der Metastasierung des Tumors bei. Makrophagen, die in solide Tumore einwandern, bilden einen Tumor-unterstützenden-Phänotyp aus und stellen einen kritischen Faktor in vielen Phasen der Tumorentwicklung dar. Bisher ist wenig darüber bekannt, welche Signale des Tumors zu einer Phänotyp-veränderung in den Makrophagen führen und noch weniger ist bekannt, wie die Tumor-vermittelten Signale auf molekularer Ebene in den Makrophagen zu einer Tumorprogression führen. Auch die Regulation und Rolle von HIF-1 in den TAMs ist noch nicht gut charakterisiert. Im zweiten Teil der Arbeit sollte daher die Induktion von HIF-1 α in Makrophagen untersucht werden.

4.2.1 AZ induzieren HIF-1 α und aktivieren HIF-1 in Makrophagen

In einem ersten Ansatz wurden RAW264.7-Makrophagen mit den Überständen von apoptotischen T-Lymphoma Jurkat-Zellen (KM_{AZ-J}) inkubiert. Dies führte zu einer zeitabhängigen Akkumulation des HIF-1 α -Proteins beginnend nach 2 h und bis zu 16 h (Abbildung 24A).

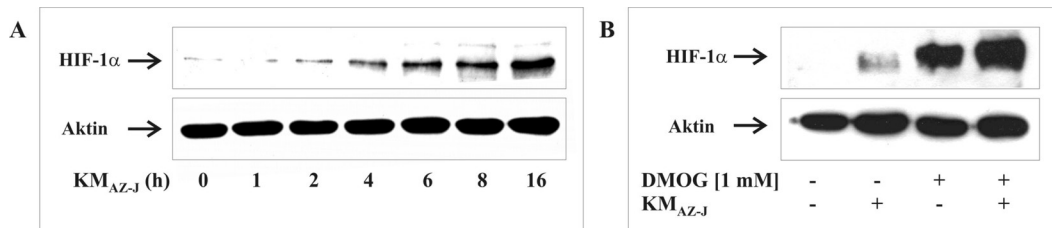


Abbildung 24: HIF-1 α -Protein akkumuliert in Makrophagen durch KM_{AZ}

RAW264.7-Zellen wurden für 1-16 h mit den Überständen von apoptotischen Jurkat-Zellen (KM_{AZ-J}) inkubiert (A). RAW264.7-Zellen wurden für 16 h mit KM_{AZ-J} oder mit 1 mM DMOG oder in Kombination mit beiden inkubiert (B). Die Expression von HIF-1 α und Aktin wurde mittels Western-Blot detektiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Um zu untersuchen, ob KM_{AZ-J} möglicherweise den normoxischen Abbau von HIF-1 α durch das 26S-Proteasom hemmt, wurden die RAW264.7-Makrophagen mit DMOG behandelt. DMOG blockiert die PHD-Aktivität sodass es zu einer maximalen HIF-1 α -Akkumulation aufgrund des inhibierten Proteinabbaus kommt. Die Inkubation mit 1 mM DMOG und KM_{AZ-J} zusammen konnte die Proteinakkumulation im Vergleich zur Probe mit DMOG alleine weiter verstärken (Abbildung 24B), was auf eine erhöhte Proteinproduktion statt auf eine Hemmung des Proteinabbaus hinwies.

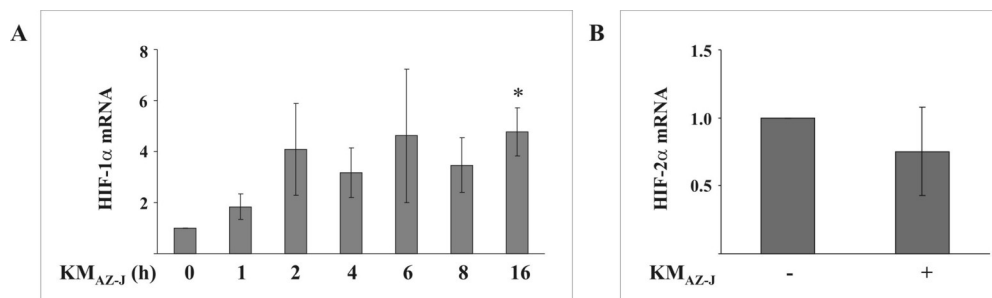


Abbildung 25: HIF-1 α - und HIF-2 α -mRNA nach Inkubation mit KM_{AZ}

RAW264.7-Zellen wurden für 1 bis 16 h mit KM_{AZ-J} inkubiert (A). RAW264.7-Zellen wurden für 16 h mit KM_{AZ-J} inkubiert (B). HIF-1 α - bzw. HIF-2 α - und ribosomales 16S-Protein-mRNA wurden mittels qRT-PCR ermittelt und das Verhältnis von HIF-1 α -/HIF-2 α - zu ribosomalem Protein-mRNA unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle.

Zusätzlich zur HIF-1 α -Proteinakkumulation wurde die HIF-1 α -mRNA-Expression zeitabhängig durch KM_{AZ-J} erhöht. Zwischen 2h und 16 h Inkubation mit KM_{AZ-J} war ein Anstieg der mRNA-Expression von HIF-1 α auf das 4,5-fache der Kontrolle zu sehen wogegen die HIF-2 α -mRNA nicht erhöht wurde (Abbildung 25). Weder der Überstand von nekrotischen (KM_{NZ-J}) noch von lebenden Jurkat-Zellen (KM_{LZ-J}) erhöhte die HIF-1 α -mRNA-Expression (Abbildung 26).

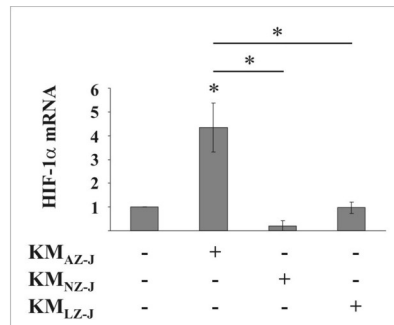


Abbildung 26: HIF-1 α -mRNA nach Inkubation mit Überständen von apoptotischen/nekrotischen/lebenden Zellen

RAW264.7-Zellen wurden für 16 h mit Überständen von apoptotischen (KM_{AZ-J}), nekrotischen (KM_{NZ-J}) oder lebenden (KM_{LZ-J}) Jurkat-Zellen inkubiert. HIF-1 α - und ribosomales 16S-Protein-mRNA wurden mittels qRT-PCR ermittelt und das Verhältnis von HIF-1 α - zu ribosomalem Protein-mRNA unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle wenn nicht anders angegeben.

Die Induktion der HIF-1 α -mRNA nach 16 h Inkubation mit KM_{AZ-J} konnte ebenfalls in primären murinen (Abbildung 27A) und primären humanen (Abbildung 27B) Makrophagen beobachtet werden.

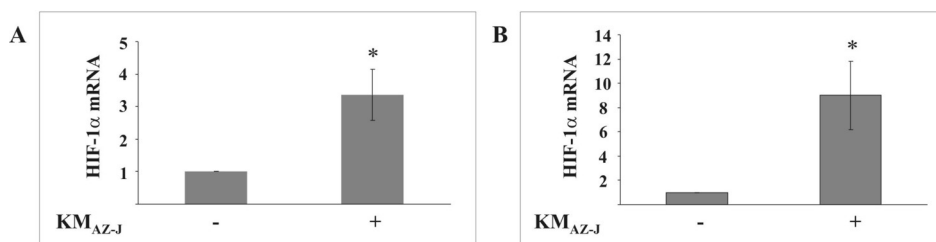


Abbildung 27: KM_{AZ} erhöht die HIF-1 α -mRNA-Expression in primären Makrophagen

Murine primäre Makrophagen (A) und humane primäre Makrophagen (B) wurden für 16 h unter Normoxie mit KM_{AZ-J} inkubiert. HIF-1 α und ribosomales 16S-Protein- (A) bzw. Aktin-mRNA (B) wurden mittels qRT-PCR ermittelt und das Verhältnis von HIF-1 α zu ribosomalem Protein-/Aktin-mRNA unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle.

Um zu bekräftigen, dass es sich bei der Erhöhung der HIF-1 α -mRNA um eine transkriptionelle Hochregulation und nicht um eine Stabilisierung der RNA handelt, wurde

ein Luziferase-Reporter-Konstrukt benutzt, das die Luziferase-Expression unter die Kontrolle eines 800 bp großen Teils des HIF-1 α -Promotors stellt.

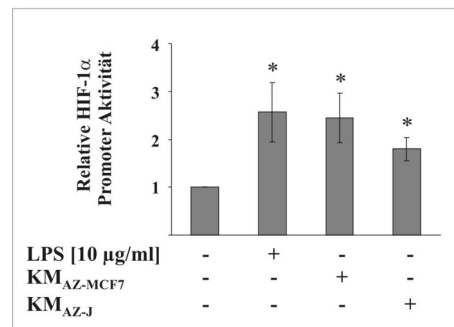


Abbildung 28: KM_{AZ} aktiviert den HIF-1 α -Promotor

RAW264.7-Zellen wurden mit einem HIF-1 α -Promoter-Luziferaseplasmid transfiziert und für 16 h mit 10 µg/ml LPS, KM_{AZ-MCF7} oder KM_{AZ-J} inkubiert. Die Luziferase-Aktivität wurde gemessen und auf den Proteingehalt normiert. Die Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die Kontrolle.

Die Inkubation von RAW264.7-Makrophagen für 16 h mit KM_{AZ-J} erhöhte die Luziferase-Aktivität signifikant zur Kontrolle. Auch der Überstand von apoptotischen MCF-7-Brustkrebszellen (KM_{AZ-MCF7}) erhöhte die Luziferase-Aktivität. Der bereits in der Literatur beschriebene Effekt von LPS auf den HIF-1 α -Promotor,⁶¹ wurde als interne Kontrolle reproduziert (Abbildung 28). Diese Daten zeigen, dass die Überstände von apoptotischen Zellen, unabhängig ob von MCF-7- oder von Jurkat-Zellen, die Transkription der HIF-1 α -mRNA erhöhen.

Um herauszufinden, ob die beobachtete Akkumulation des HIF-1 α -Proteins auch zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivität von HIF-1 führt, wurde ein EPO-Promoter-Luziferase-Konstrukt benutzt, das multiple HRE-Bindestellen enthält.

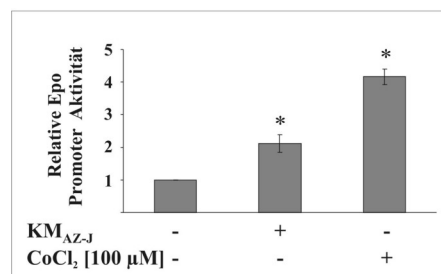


Abbildung 29: KM_{AZ} führt zur Erhöhung der HIF-1-Aktivität

RAW264.7-Zellen wurde mit einem pGL-3x_{EPO}-HRE-Plasmid transfiziert und für 16 h mit 100 µM CoCl₂ oder mit KM_{AZ-J} inkubiert. Die Luziferase-Aktivität wurde gemessen und auf den Proteingehalt normiert. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle.

Während KM_{AZ-J} die Luziferase-Aktivität um das 2-fache steigerte, induzierte $CoCl_2$ die Reporter-Aktivität um das 4-fache (Abbildung 29). Ausserdem wurden klassische HIF-1-Zielgene, Glut-1 und VEGF, zum einen nach 16 h Inkubation mit KM_{AZ-J} und zum anderen nach 16 h Hypoxie (1 % O_2) untersucht.

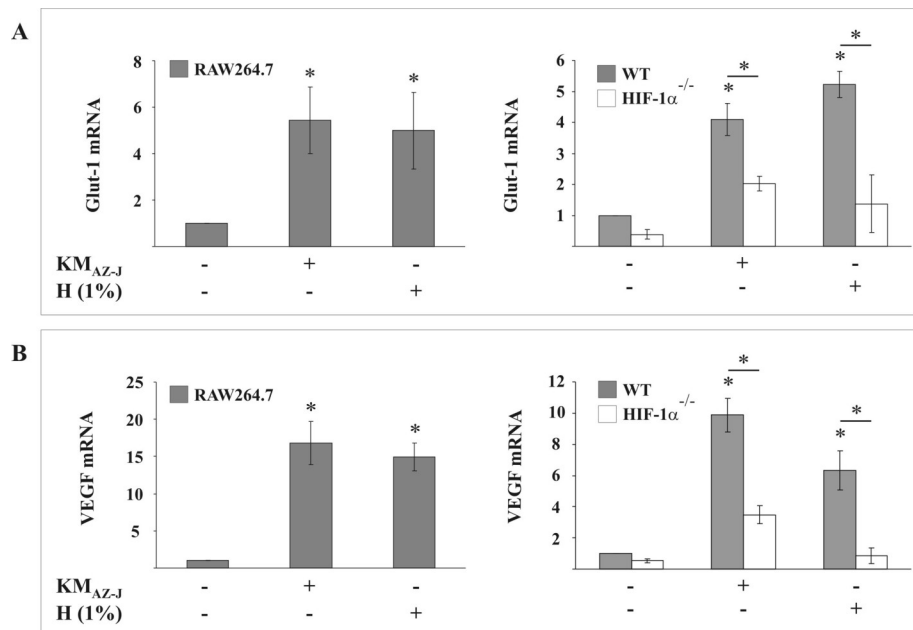


Abbildung 30: KM_{AZ} induziert VEGF und Glut-1 HIF-1-abhängig

RAW264.7-Zellen oder primäre murine Makrophagen wurde für 16 h unter Normoxie, Hypoxie oder mit KM_{AZ-J} inkubiert. Glut-1 (A), VEGF (B) und ribosomales 16S-Protein-mRNA wurden mittels qRT-PCR ermittelt und das Verhältnis von Glut-1- bzw. VEGF- zu ribosomalem Protein-mRNA unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle wenn es nicht anders angegeben wird.

In RAW264.7-Zellen führten KM_{AZ-J} und Hypoxie beide nach 16 h Inkubation zu einer 6-fachen Erhöhung der Glut-1 (Abbildung 30A) und zu einer 17-fachen Erhöhung der VEGF-mRNA-Expression (Abbildung 30B). Um eindeutig nachzuweisen, dass HIF-1 für diese Hochregulierung von Glut-1 und VEGF verantwortlich ist, wurde der gleiche Versuchsansatz in primären murinen Makrophagen wiederholt, in denen, wie schon zuvor gezeigt, die HIF-1 α -mRNA nach KM_{AZ-J} ebenfalls erhöht wurde (s. Abbildung 27). Primäre Wildtyp-Makrophagen zeigten eine 4-fache Hochregulierung von Glut-1 (Abbildung 24A) und eine 10-fache Erhöhung von VEGF (Abbildung 24B) sowohl durch Hypoxie als auch durch Inkubation mit KM_{AZ-J} . Diese Hochregulierung von Glut-1 und VEGF, sowohl durch Hypoxie als auch durch KM_{AZ-J} , war in HIF-1 $\alpha^{-/-}$ -Makrophagen signifikant inhibiert (Abbildung 30). In den HIF-1 $\alpha^{-/-}$ -Makrophagen wurde deutlich, dass bereits die Basislevel von Glut-1 und VEGF durch den *Knockout* beeinflusst wurden,

jedoch sowohl durch KM_{AZ-J} als auch durch Hypoxie noch eine geringe Induktion von Glut-1 und VEGF vorlag.

4.2.2 Polarisierte Makrophagen steigern die Differenzierung von Stammzellen

Nachdem festgestellt wurde, dass KM_{AZ} HIF-1 aktiviert, sollten funktionelle Konsequenzen dieser Aktivierung untersucht werden. Dafür wurden Makrophagen für 16 h mit KM_{AZ-J} behandelt, das Medium entfernt, und die durch das KM_{AZ-J} polarisierten Makrophagen für 5 h mit frischem Medium inkubiert. Die Überstände dieser polarisierten Makrophagen (KM_{PM}) wurden entweder von RAW264.7- oder von primären HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - oder HIF-1 $\alpha^{-/-}$ -Makrophagen hergestellt. Anschließend wurden EBs für 24 h mit diesen Überständen inkubiert. Auf Lumox-Platten (Zellkulturplatten mit einer Sauerstoff-durchlässigen Membran) ausplattierte EBs bildeten einen vielschichtigen Körper aus, der durch einen *Monolayer*-Rand umgeben wurde (Abbildung 31). Hannig *et al.* zeigten, dass in differenzierenden embryonischen Stammzellen die CD31-Expression 6-8 Tage nach Inkubation ohne LIF maximal war.²⁷¹ Deshalb zeigen Abbildung 31-Abbildung 33 die Differenzierung an Tag 6.

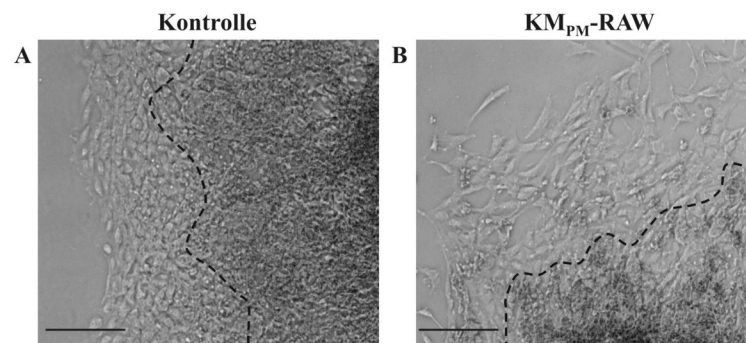


Abbildung 31: KM_{PM} verändert die Morphologie von Stammzellen

Ausplattierte EBs wurden entweder als Kontrolle mit Kulturmedium (A) oder mit KM_{PM} (B), für 24 h inkubiert. KM_{PM} wurde von RAW264.7-Makrophagen hergestellt und für 24 h auf die EBs gegeben. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die gestrichelte Linie zeigt den Übergang zwischen dem vielschichtigen Hauptkörper und dem umgebenden *Monolayer*-Rand angewachsenen EBs. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente (Vergrößerung x 10).

Wenn man die Stammzellen mit KM_{PM} von RAW264.7-Makrophagen inkubiert, so konnten morphologische Veränderungen der Stammzellen im *Monolayer*-Rand der EBs im Vergleich zur Kultivierung mit Medium beobachtet werden (Abbildung 31).

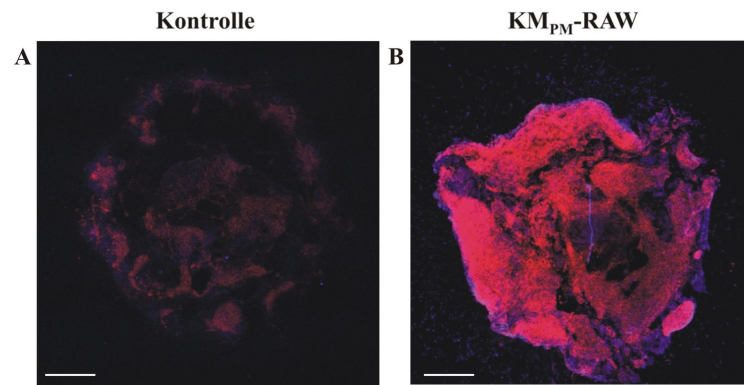


Abbildung 32: KM_{PM} erhöht Differenzierung von Stammzellen zu $CD31^+$ -Endothelzellen

Ausplattierte EBs wurden entweder als Kontrolle mit Kulturmedium (A) oder mit KM_{PM} (B) für 24 h inkubiert. KM_{PM} wurde von RAW264.7-Makrophagen hergestellt und für 24 h auf die EBs gegeben. $CD31^+$ -Zellen wurden mit Immunofluoreszenz aufgenommen (rot). DAPI ist blau gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm . Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente (Vergrößerung x 10).

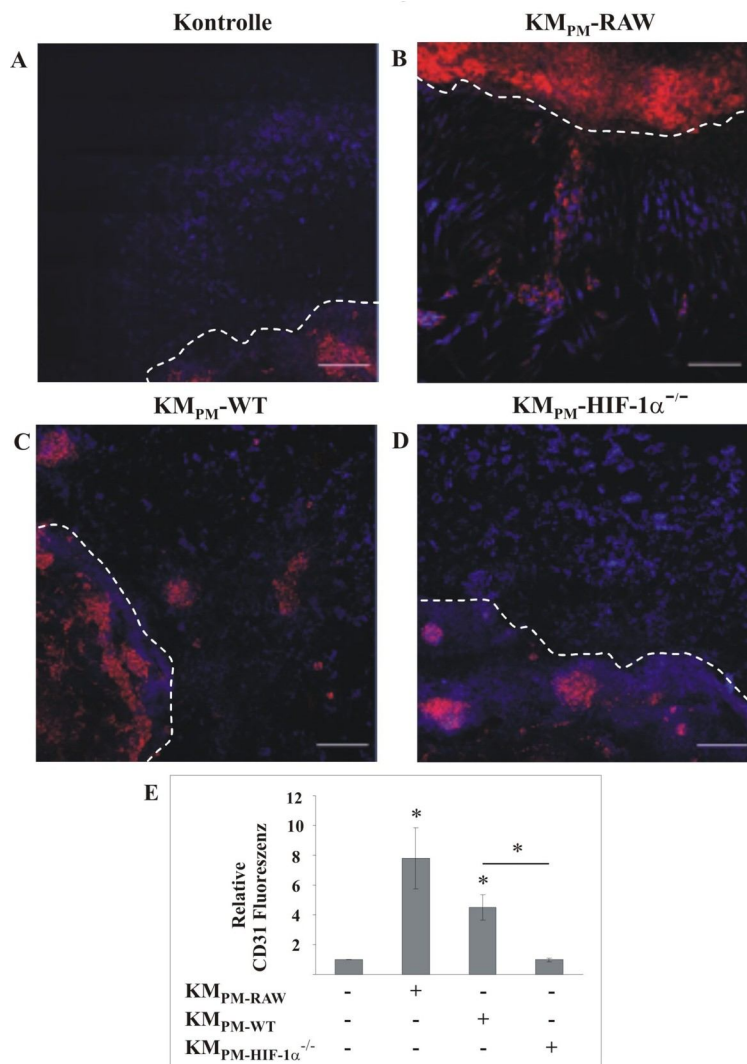


Abbildung 33: KM_{PM} erhöht die Differenzierung von Stammzellen zu $CD31^+$ -Endothelzellen HIF-1 α -abhängig

Ausplattierte EBs wurden entweder als Kontrolle mit Kulturmedium (A) oder mit KM_{PM} für 24 h inkubiert. KM_{PM} wurde von RAW264.7-Makrophagen (B), primären Maus Wildtyp-Makrophagen (C) oder von primären Maus HIF-1 α ^{-/-}-Makrophagen (D) hergestellt und für 24 h auf die EBs gegeben. $CD31^+$ -Zelle

wurden mit Immunofluoreszenz aufgenommen (rot). DAPI ist blau gefärbt. Die gestrichelte Linie zeigt den Übergang zwischen dem vielschichtigen Körper und dem umgebenden einschichtigen Rand des EB. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente (Vergrößerung $\times 40$). Die CD31-Fluoreszenzintensität im *Monolayer*-Rand der EBs wurde gemessen und das Verhältnis von DAPI zu CD31-Fluoreszenz unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle wenn es nicht anders angegeben wird (E).

Deutlicher noch als die morphologischen Veränderungen der Zellen lässt sich der Einfluss des KM_{PM} erkennen, wenn man die Differenzierung der Stammzellen zu CD31^+ -Endothelzellen betrachtet. Die EBs wurden für 24 h mit KM_{PM} von RAW264.7-Zellen inkubiert und ein Anstieg der CD31-Expression (rot) konnte im Vergleich zur Inkubation mit Kulturmedium beobachtet werden (Abbildung 32). Unter Kontrollbedingungen mit Medium zeigte sich im vielschichtigen Körper des EBs eine Autodifferenzierung zu CD31^+ -Zellen, die mit Beginn der Inkubation ohne den Differenzierungsinhibitor LIF einsetzte (Abbildung 32A). Die Differenzierung des vielschichtigen Körpers der EBs wurde deutlich verstärkt, wenn die EBs mit KM_{PM} inkubiert wurden (Abbildung 32B). Betrachtet man den *Monolayer*-Rand der EBs, so wird der Unterschied in der Differenzierung der Zellen nach KM_{PM} im Vergleich zur Kontrolle am deutlichsten. Während unter Kontrollbedingungen keine CD31^+ -Zellen im *Monolayer*-Rand der EBs vorhanden waren (Abbildung 33A), zeigte die Inkubation der Zellen mit KM_{PM} von RAW264.7-Zellen hingegen deutlich CD31^+ -Zellen (Abbildung 33B). Wurden die Stammzellen mit Überständen von unbehandelten RAW264.7-Zellen inkubiert, zeigten sich keine Unterschiede in der CD31-Differenzierung im Vergleich zur Inkubation mit Kulturmedium. Wurden statt RAW264.7-Zellen primäre murine Makrophagen für die Herstellung des KM_{PM} benutzt, wurde ebenfalls eine CD31-Differenzierung der Stammzellen im *Monolayer*-Bereich sichtbar (Abbildung 33C). Stammzellen, die dagegen mit KM_{PM} von $\text{HIF-1}\alpha^{-/-}$ -Makrophagen inkubiert wurden, zeigten nach 24 h keine Differenzierung zu CD31^+ -Zellen im *Monolayer*-Rand der EBs (Abbildung 33D).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Hochregulierung von HIF-1 α durch das KM_{AZ} zur Zielgen-Aktivierung von HIF-1 führt und diese Aktivierung eine Differenzierung der Stammzellen zu CD31^+ -Endothelzellen zur Folge hat.

Nachfolgend sollte geklärt werden, wie die HIF-1-Aktivierung durch die Überstände der AZ vermittelt wird.

4.2.3 Die Rolle von S1P bei der Induktion der HIF-1 α -mRNA

S1P wird von AZ freigesetzt und besitzt die Fähigkeit, den Phänotyp von Makrophagen zu modulieren.^{114,116,117} Daher stellte sich die Frage, inwiefern S1P in der Induktion der HIF-1 α -mRNA involviert sein könnte.

Der Einsatz von 1 μ M VPC23019, einem S1P₁- und S1P₃-Antagonist, inhibierte die Hochregulation der HIF-1 α -mRNA durch KM_{AZ-J} wohingegen 100 nM JTE-013, ein S1P₂-Antagonist, keinen Effekt zeigte (Abbildung 34A). S1P scheint über S1P₁- oder S1P₃-Aktivierung an der Regulation der HIF-1 α -mRNA beteiligt zu sein.

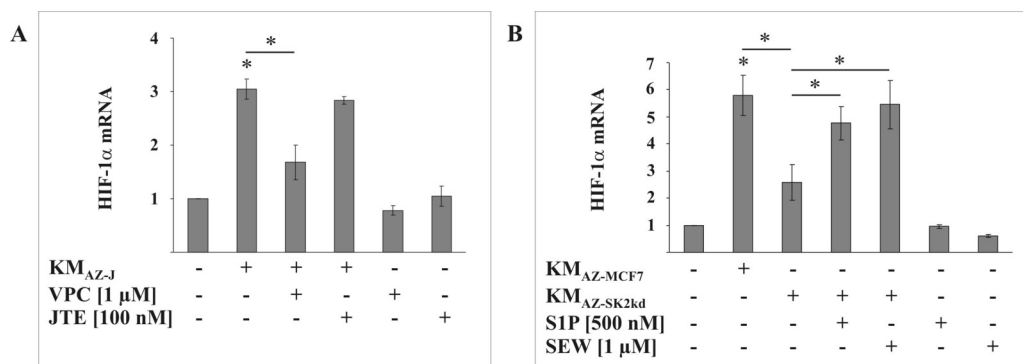


Abbildung 34: Rolle von S1P bei der HIF-1 α -mRNA-Induktion

RAW264.7 Zelle wurden 16 h mit Überständen von apoptotischen Jurkat-Zellen (KM_{AZ-J}) mit oder ohne 1 μ M VPC23019 oder 100 nM JTE-013 inkubiert. VPC23019 und JTE-013 wurden 1 h vorinkubiert (A). RAW264.7-Zellen wurden 16 h mit Überständen von apoptotischen MCF-7-Zellen (KM_{AZ-MCF7}) oder von apoptotischen MCF-7-Zellen mit einem *Knockdown* der Sphingosine-Kinase 2 (KM_{AZ-SK2kd}) mit oder ohne zusätzlich 500 nM S1P oder 1 μ M SEW2871 inkubiert (B). HIF-1 α - und ribosomales 16S-Protein-mRNA wurden mittels qRT-PCR ermittelt und das Verhältnis von HIF-1 α - zu ribosomalem Protein-mRNA unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle wenn es nicht anders angegeben wird.

Um die Bedeutung von S1P in der Hochregulation der HIF-1 α -mRNA weiter zu bekräftigen, wurde Medium von apoptotischen MCF-7-Zellen im Vergleich zu Medium von apoptotischen MCF-7-Zellen mit einem *Knockdown* der Sphingosine-Kinase 2 (KM_{AZ-SK2kd}), das verminderte Mengen von S1P enthält, benutzt.¹¹⁷ Während die Inkubation mit KM_{AZ-MCF7} zu einer 6-fachen Erhöhung der HIF-1 α -mRNA führte, wurde durch KM_{AZ-SK2kd} nur noch eine 2- bis 3-fache Induktion in den RAW264.7-Makrophagen beobachtet. Sowohl S1P als auch SEW2871, ein S1P₁-Agonist, konnten die inhibierende Wirkung des KM_{AZ-SK2kd} wieder aufheben. KM_{AZ-SK2kd} senkte die HIF-1 α -mRNA nicht bis auf das Kontrollniveau herab und weder S1P noch SEW2871 alleine konnten die HIF-1 α -mRNA in RAW264.7-Zellen induzieren (Abbildung 34B). Daraus konnte gefolgert

werden, dass neben S1P noch weitere Mediatoren an der Induktion der HIF-1 α -mRNA beteiligt sind.

4.2.4 TGF- β ist an der Regulation der HIF-1 α -mRNA beteiligt

Es ist bekannt, dass AZ TGF- β als immunregulatorische Komponente freisetzen.¹¹⁵ Weiterhin wurde bereits beschrieben, dass der aktivierte S1P-Rezeptor den TGF- β -Rezeptor transaktivieren kann.^{272,273} Daher wurde untersucht, ob KM_{AZ} zur Aktivierung des TGF- β -Rezeptors führt und ob TGF- β dazu beiträgt, die HIF-1 α -mRNA zu erhöhen. Um die Aktivierung des Rezeptors nachzuweisen, wurde die Phosphorylierung von Smad2, einem *downstream*-Ziel des TGF- β -Rezeptors, untersucht.

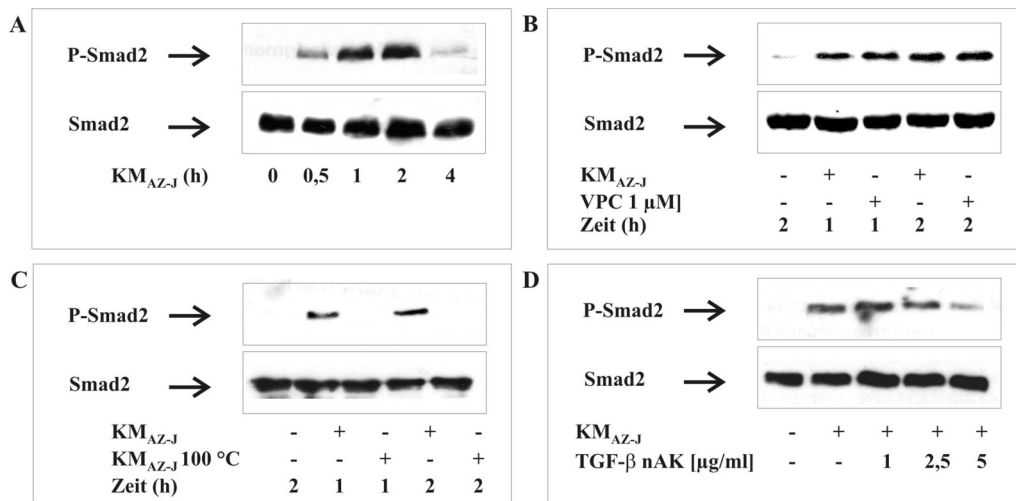


Abbildung 35: TGF- β -Rezeptor-Aktivierung nach KM_{AZ}

RAW264.7-Zellen wurden für 30 min bis 4 h mit KM_{AZ-J} inkubiert (A). RAW264.7-Zellen wurden für 1 oder 2 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne 1 μ M VPC23019 inkubiert. VPC23019 wurde für 1 h vorinkubiert (B). RAW264.7-Zellen wurden für 1 oder 2 h mit KM_{AZ-J} oder mit denaturiertem KM_{AZ-J} (KM_{AZ-J} 100 °C) inkubiert (C). RAW264.7-Zellen wurden für 2 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne steigenden Konzentrationen des TGF- β neutralisierenden Antikörper (nAK) inkubiert. Der nAK wurde 1 h mit KM_{AZ-J} bei 37 °C vorinkubiert. (D) Die Expression von Smad2 und von phosphoryliertem Smad2 (P-Smad2) wurde mittels Western-Blot detektiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

In RAW264.7-Zellen erhöhte KM_{AZ-J} zeitabhängig die transiente Phosphorylierung von Smad2. Die stärkste Aktivierung wurde nach 1 bis 2 h (Abbildung 35A) nachgewiesen. Die Gesamt-Proteinexpression von Smad2 wurde durch KM_{AZ-J} nicht beeinflusst. Um auszuschließen, dass die Aktivierung des TGF- β -Rezeptors lediglich durch das im KM_{AZ-J} vorhandene S1P über den S1P-Rezeptor erfolgt, wurden die Zellen zusätzlich zum KM_{AZ-J} noch mit VPC23013 inkubiert. Hemmung von S1P₁ und S1P₃ beeinflusste die Phosphorylierung von Smad2 weder nach 1 h noch nach 2 h (Abbildung 35B), sodass eine Aktivierung des TGF- β -Rezeptors durch S1P über die S1P₁ und S1P₃ im KM_{AZ-J}

ausgeschlossen werden konnte. Weiterhin wurde das KM_{AZ-J} für eine Stunde bei 100 °C ($KM_{AZ-J}100$ °C) gekocht, sodass Hitze-empfindliche Moleküle, darunter Proteine wie TGF- β , inaktiviert wurden, aber Lipide wie S1P aktiv blieben. Denaturiertes KM_{AZ-J} führte nicht zu einer Phosphorylierung von Smad2 (Abbildung 35C), was darauf hinweist, dass ein Hitze-unbeständiger Faktor, wie ein Protein, für die Aktivierung des TGF- β -Rezeptors verantwortlich ist. Auch dieses Ergebnis stützte die These, dass der TGF- β -Rezeptor nicht durch den S1P-Rezeptor aktiviert wird. Um die Rolle von TGF- β genauer zu untersuchen, wurde das KM_{AZ-J} mit einem neutralisierenden Antikörper (nAK) gegen TGF- β inkubiert, wodurch eine deutliche Reduzierung des phosphorylierten Smad2 bei gleich bleibender Smad2-Proteinexpression beobachtet werden konnte (Abbildung 35D).

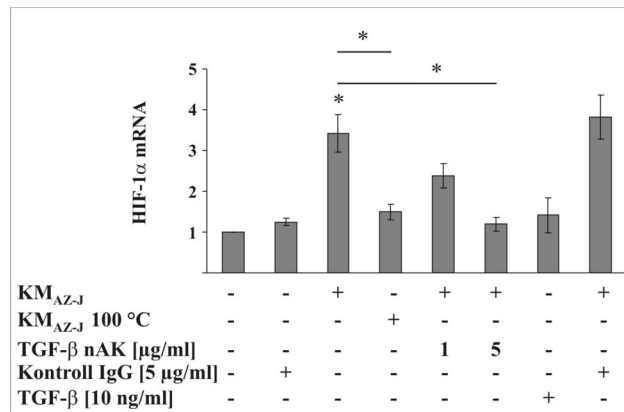


Abbildung 36: Rolle von TGF- β bei der HIF-1 α -mRNA-Induktion

RAW264.7-Zellen wurden für 16 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne zusätzlich 1 oder 5 μ g/ml TGF- β neutralisierendem Antikörper (nAK), mit 5 μ g/ml Kontroll IgG, mit $KM_{AZ-J} 100$ °C oder mit 10 ng/ml TGF- β inkubiert. Die AK wurden 1 h mit KM_{AZ-J} bei 37 °C vorinkubiert. HIF-1 α - und ribosomales 16S-Protein-mRNA wurden mittels qRT-PCR ermittelt und das Verhältnis von HIF-1 α - zu ribosomalem Protein-mRNA unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle wenn es nicht anders angegeben wird.

Nachdem die Aktivierung des TGF- β -Rezeptors auf das im KM_{AZ-J} vorhandene TGF- β zurückgeführt worden war, stellte sich die Frage, in wie weit TGF- β die Induktion der HIF-1 α -mRNA beeinflusst. Hierfür wurden RAW264.7-Zellen für 16 h mit $KM_{AZ-J} 100$ °C inkubiert und es zeigte sich, dass denaturiertes KM_{AZ-J} die HIF-1 α -mRNA kaum induzierte. Wurden RAW264.7-Zellen für 16 h mit KM_{AZ-J} und dem TGF- β nAK inkubiert, so inhibierte der TGF- β nAK die HIF-1 α -mRNA-Induktion durch das KM_{AZ-J} konzentrationsabhängig. Eine IgG-Kontrolle beeinflusste die HIF-1 α -mRNA-Expression hingegen nicht (Abbildung 36). Dies macht deutlich, dass neben S1P auch TGF- β die HIF-1 α -mRNA-Expression durch KM_{AZ} reguliert. Jedoch führte, genau wie S1P allein

(Abbildung 34B), eine Inkubation der RAW264.7-Zellen mit 10 ng/ml TGF- β zu keiner Induktion der HIF-1 α -mRNA (Abbildung 36).

4.2.5 NFAT induziert die Hochregulation der HIF-1 α -mRNA

Obwohl TGF- β den Rezeptor und die Smad-Kaskade aktiviert, befinden sich im HIF-1 α -Promotor keine Wiederholungen der Nukleotidsequenz AGAC oder GTCT, die als Smad-Bindestellen beschrieben sind.²⁷⁴ Daher wurde ein direkter Einfluss von Smad2 *downstream* vom TGF- β Signalweg auf die HIF-1 α Transkription als unwahrscheinlich betrachtet. Vor allem für NF- κ B ist beschrieben, dass es die HIF-1 α Transkription induziert.^{60,61} Daher wurden nachfolgend zwei etablierte NF- κ B-Inhibitoren, Bay11-7082 und SN50, verwendet.

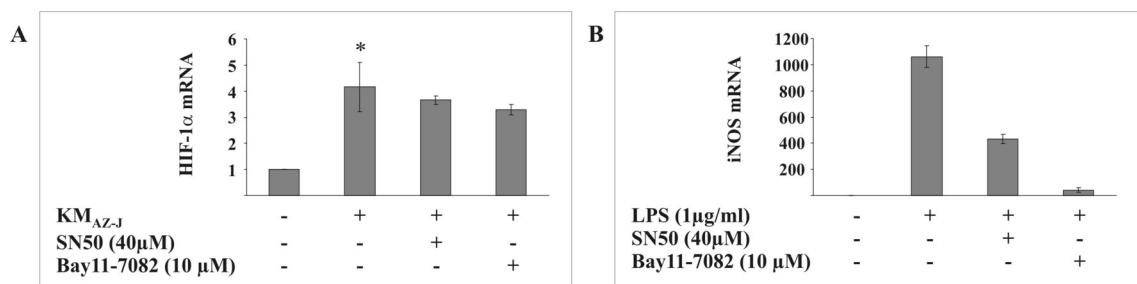


Abbildung 37: NF- κ B ist nicht für die Erhöhung der HIF-1 α -mRNA nach KM_{AZ} verantwortlich

RAW264.7-Zellen wurden für 16 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne 40 μ M SN50 oder 10 μ M Bay11-7082 inkubiert (A). RAW264.7-Zellen wurden für 16 h mit 1 μ g/ml LPS mit oder ohne 40 μ M SN50 oder 10 μ M Bay11-7082 inkubiert (B). SN50 und Bay11-7082 wurden 1 h vorinkubiert. HIF-1 α - und ribosomales 16S-Protein-mRNA wurden mittels qRT-PCR ermittelt und das Verhältnis von HIF-1 α - zu ribosomalem Protein-mRNA unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle.

Obwohl die beiden Agenzien NF- κ B blockierten, wie die Inhibition der iNOS-mRNA nach LPS Behandlung als Kontrolle zeigte (Abbildung 37B), beeinflussten weder SN-50 noch Bay11-7082 die Erhöhung der HIF-1 α -mRNA nach KM_{AZ-J} (Abbildung 37A). Daher wurde NF- κ B als möglicher Signalweg ausgeschlossen.

Es ist weiterhin bereits gezeigt worden, dass NFAT die HIF-1 α -mRNA in Mastzellen regulieren kann⁷¹ und so stellte sich die Frage, ob KM_{AZ} zur Aktivierung von NFAT in RAW264.7-Makrophagen führt. Dafür wurde ein NFAT-abhängiges MCIP-Luziferase-Reporter-Konstrukt verwendet. RAW264.7 wurden 16 h mit KM_{AZ-J} inkubiert, was zu einer ca. 7-fachen Induktion der MCIP-Reporter-Aktivität führte. Die Induktion des MCIP-Reporters wurde durch CsA inhibiert (Abbildung 38A). Die Aktivierung von NFAT

erfordert eine Dephosphorylierung durch Calcineurin, das wiederum durch CsA gehemmt wird.

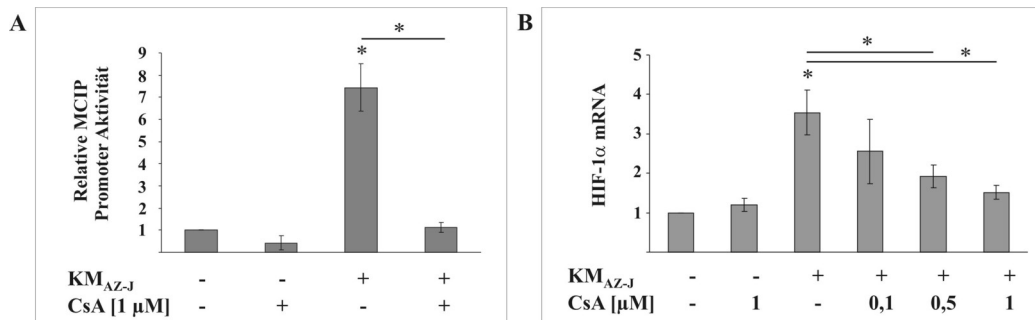


Abbildung 38: KM_{AZ} induziert NFAT-Aktivität und HIF-1α-mRNA-Erhöhung ist NFAT-abhängig

RAW264.7-Zellen wurden mit einem NFAT-abhängigem MCIP-Reporter-Konstrukt und mit einem prl-cmv-Renillaplasmid transfiziert und für 16 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne 1 μM Cyclosporin A (CsA) inkubiert. CsA wurde 1 h vorinkubiert. Luziferase-Aktivität wurde gemessen und auf Renilla-Aktivität normiert. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit 1 gleich gesetzt (A). RAW264.7-Zellen wurden für 16 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne steigenden Konzentrationen von CsA inkubiert. HIF-1α- und ribosomales 16S-Protein-mRNA wurden mittels qRT-PCR ermittelt und das Verhältnis von HIF-1α- zu ribosomalem Protein-mRNA unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt (B). Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥3 Experimenten ± S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle wenn es nicht anders angegeben wird.

Um zu zeigen, dass diese NFAT-Aktivierung auch für die HIF-1α-mRNA-Induktion verantwortlich ist, wurden RAW264.7-Zellen für 16 h mit KM_{AZ-J} und steigenden Konzentrationen von CsA inkubiert und die HIF-1α-mRNA Menge bestimmt. Die Induktion der HIF-1α-mRNA durch das KM_{AZ-J} konnte konzentrationsabhängig durch CsA reduziert werden (Abbildung 38B). Um die direkte Bindung von NFAT an den HIF-1α-Promotor zu zeigen, wurden die beschriebenen NFAT Bindungsstellen aus dem HIF-1α-Promotor im EMSA eingesetzt.⁷¹

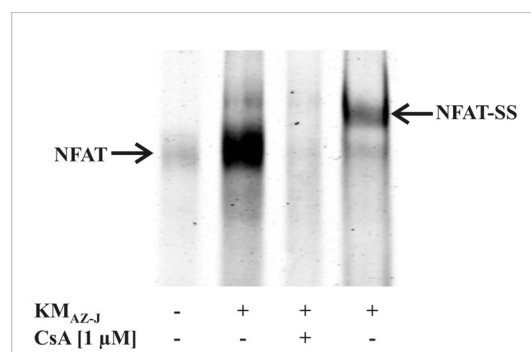


Abbildung 39: KM_{AZ} erhöht die NFAT Bindung an den HIF-1α-Promotor

RAW264.7-Zellen wurden für 4 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne 1 μM CsA inkubiert. Die Bindung von NFAT an die HIF-1α-Promotorsequenz wurde mittels EMSA mit spezifischen 5'-IRD700-gekennzeichneten Oligonukleotiden gemacht. Der *Supershift* wurde mit einem NFATc1 Antikörper gemacht. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Inkubation der RAW264.7-Zellen für 4 h mit KM_{AZ-J} erhöhte die Bindung an diese Sequenz, was wiederum durch CsA verhindert wurde (Abbildung 39). Um die Spezifität des Oligonukleotid-Protein-Komplex zu beweisen, wurde das Proteinlysate zusätzlich mit einem NFATc1 spezifischem Antikörper inkubiert, wodurch ein *Supershift* des Komplexes hervorgerufen werden konnte (Abbildung 39).

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so lässt sich sagen, dass KM_{AZ} NFAT aktiviert, was wiederum an den HIF-1 α Promoter bindet und zur Induktion der HIF-1 α -mRNA führt. Um die Bedeutung von NFAT zu stärken, wurde der Einfluss eines NFAT Expressionsplasmids (NFAT-EP) auf die HIF-1-Aktivität und auf die Aktivierung des HIF-1 α -Promotors untersucht.

RAW264.7-Zellen wurden mit dem NFAT-EP und dem zuvor schon benutzten EPO-Promotor-Luziferase-Konstrukt kotransfiziert. Die Überexpression von NFAT führt zu einer 2,5-fachen Erhöhung der Reporter-Aktivität, womit die Induktion vergleichbar mit der Reporter-Aktivierung durch das KM_{AZ-J} war (Abbildung 40A).

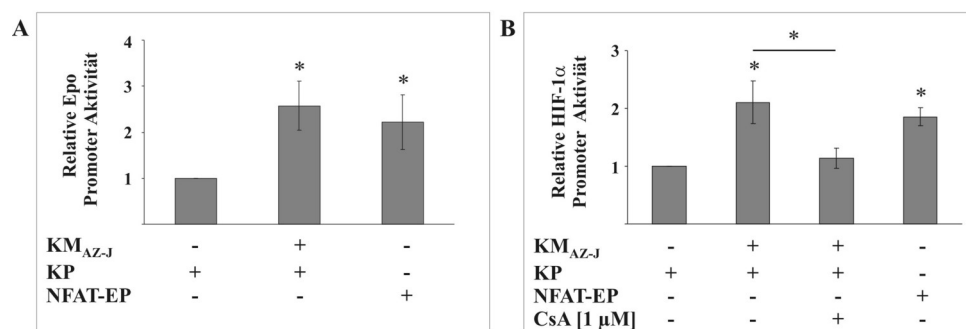


Abbildung 40: Überexpression von NFAT aktiviert HIF-1 und die HIF-1 α -Promotor-Aktivität

RAW264.7-Zellen wurden mit einem pGL-3x EPO -HRE-Plasmid und mit einem NFAT-Expressionsplasmid (NFAT-EP) kotransfiziert und für 16 h inkubiert oder die Kotransfektion wurde mit einem Kontrollplasmid (KP) durchgeführt und die Zellen wurden für 16 h mit KM_{AZ-J} inkubiert (A). RAW264.7-Zellen wurden mit einem HIF-1 α -Promoter-Luciferaseplasmid und mit einem NFAT-EP kotransfiziert und für 16 h inkubiert oder die Kotransfektion wurde mit einem KP durchgeführt und die Zellen wurden für 16 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne 1 μ M Cyclosporin A (CsA) inkubiert. CsA wurde 1 h vorinkubiert (B). Die Luziferase-Aktivität wurde gemessen und auf den Proteingehalt normiert. Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle wenn es nicht anders angegeben wird.

Um zu zeigen, dass NFAT den HIF-1 α Promoter aktiviert und somit direkt für die Induktion der HIF-1 α -mRNA nach KM_{AZ-J} verantwortlich ist, wurde das NFAT-EP mit dem HIF-1 α -Promoter-Konstrukt in die RAW264.7-Zellen kotransfiziert. Die Aktivierung des HIF-1 α Promotors war vergleichbar stark wie nach Inkubation der Zellen mit KM_{AZ-J} . Weiterhin wurde die Induktion des HIF-1 α Promotors durch KM_{AZ-J} durch Inkubation mit 1 μ M CsA gehemmt (Abbildung 40B).

Zur Klärung, ob S1P und/oder TGF- β über NFAT an der Regulierung der HIF-1 α -mRNA durch KM_{AZ-J} beteiligt sind, sollte zuerst ihr Einfluss auf die Bindung von NFAT an der HIF-1 α -Promotorsequenz untersucht werden. Im EMSA wird deutlich, dass die Inhibition von S1P durch VPC23019 keinen Einfluss auf die KM_{AZ-J}-induzierte Bindung von NFAT an den HIF-1 α Promoter hat. Die Blockierung von TGF- β durch den TGF- β nAK zeigte einen leichten Einfluss auf die Bindungsstärke von NFAT durch KM_{AZ-J}, war jedoch nicht annähernd mit der Inhibition durch CsA vergleichbar (Abbildung 41).

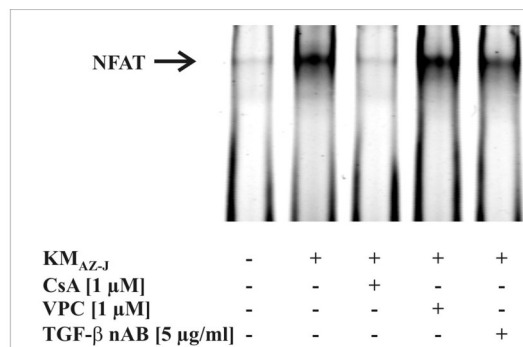


Abbildung 41: NFAT Bindung an den HIF-1 α -Promotor nach VPC23019 und TGF- β nAB

RAW264.7-Zellen wurden für 4 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne 1 μ M CsA, 1 μ M VPC23019 oder 5 μ g/ml TGF- β nAb inkubiert. CsA und VPC23019 wurde 1 h vorinkubiert, der TGF- β nAB wurde 1 h mit KM_{AZ-J} bei 37 °C vorinkubiert. Die Bindung von NFAT an die HIF-1 α -Promotorsequenz wurde mittels EMSA mit spezifischen 5'-IRD700-gekennzeichneten Oligonukleotiden gezeigt. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Die NFAT-Aktivität, gemessen mit dem MCIP-Reporter, wurde weder durch die Inkubation mit 500 nM S1P, 10 ng/ml TGF- β oder einer Kombination aus beiden induziert (Abbildung 42A). Wurde die NFAT-Aktivität mit KM_{AZ-J} induziert, so konnte auch diese nicht durch VPC23019 oder den TGF- β nAK inhibiert werden (Abbildung 42B).

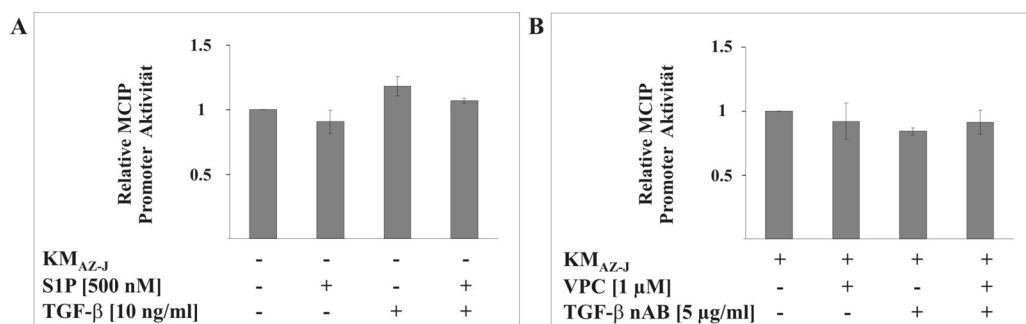


Abbildung 42: NFAT-Aktivität wird nicht durch S1P und TGF- β beeinflusst

RAW264.7-Zellen wurden mit einem NFAT-abhängigen MCIP-Reporter-Konstrukt und mit einem prl-cmv-Renillaplasmid transfiziert. Die Zellen wurden für 16 h mit 500 nM S1P und/oder 10 ng/ml TGF- β inkubiert. Luziferase-Aktivität wurde gemessen und auf den Proteingehalt normiert. Kontrollbedingungen wurden mit 1 gleichgesetzt (A). Die Zellen wurden für 16 h mit KM_{AZ-J} mit oder ohne 1 μ M VPC23019 und/oder 5 μ g/ml TGF- β inkubiert. VPC23019 wurde 1 h vorinkubiert, der TGF- β nAB wurde 1 h mit KM_{AZ-J} bei 37 °C vorinkubiert. Luziferase-Aktivität wurde gemessen und auf den Proteingehalt normiert. KM_{AZ-J} wurde mit 1 gleichgesetzt (B). Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D.

Diese Ergebnisse zeigen, dass S1P NFAT nicht direkt zu beeinflussen scheint. Weiterhin beeinflusst TGF- β möglicherweise die Bindung von NFAT an die DNA, zeigt jedoch ebenfalls keinen direkten Effekt auf die NFAT-Aktivität. Weitere Experimente werden notwendig sein, um die vielfältigen Signalwege, welche die HIF-1 α -mRNA beeinflussen, umfassend aufzuklären. Um zumindest einen Überblick darüber zu bekommen, welche Signalwege überhaupt bei der Induktion der HIF-1 α -mRNA durch KM_{AZ} beteiligt sind, wurde der Einfluss einiger wichtiger Signalwege auf die HIF-1 α -mRNA überprüft.

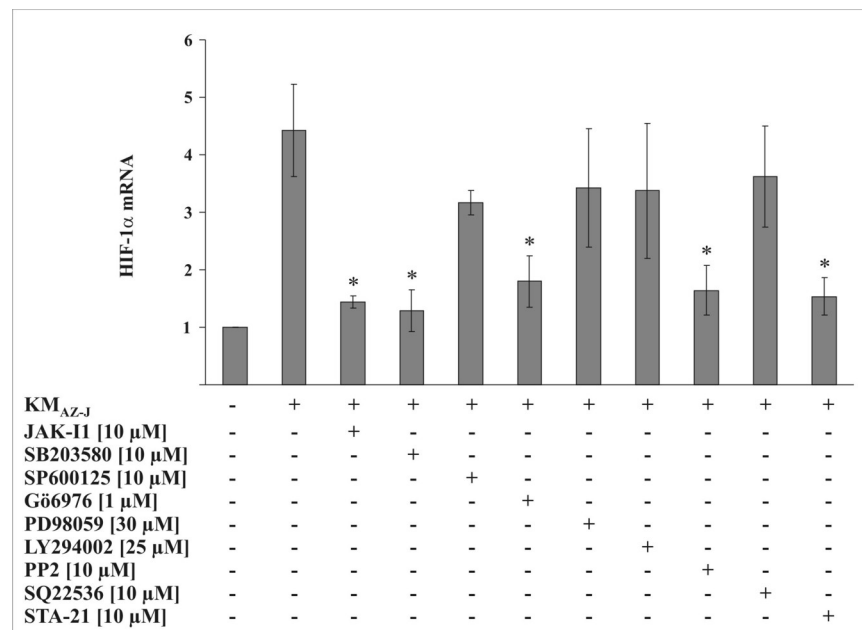


Abbildung 43: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die HIF-1 α -mRNA-Induktion durch KM_{AZ}

RAW264.7-Zellen wurden für 16 h mit KM_{AZ-J} und zusätzlich mit 10 μ M JAK-Inhibitor1 (JAK-I1), 10 μ M SB203580 (p38-Inhibitor), 10 μ M SP600125 (JNK-Inhibitor), 1 μ M Gö6976 (PKC-Inhibitor), 30 μ M PD98059 (ERK-Inhibitor), 25 μ M LY294002 (PI3K-Inhibitor), 10 μ M PP2 (Src-Inhibitor), 10 μ M SQ22536 (Adenylatcyklase-Inhibitor) oder 10 μ M STA-21 (STAT3-Inhibitor) inkubiert. GW9662 wurde 3h, alle anderen Inhibitoren wurden 1 h vorinkubiert. HIF-1 α - und ribosomales 16S-Protein-mRNA wurden mittels qRT-PCR ermittelt und das Verhältnis von HIF-1 α - zu ribosomalem Protein-mRNA unter Kontrollbedingungen wurde mit 1 gleichgesetzt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten \pm S.D. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit $p \geq 0,05$ signifikant unterschiedlich und beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle.

Die Inhibition der Janus-Kinase (JAK), der p38-Kinase, der PKC und der Src-Kinase konnte eine Induktion der HIF-1 α -mRNA durch das KM_{AZ-J} entgegenwirken, wogegen die JNK, ERK, PI3K und auch die Adenylatcyklase keine Rolle bei der Induktion der HIF-1 α -mRNA durch KM_{AZ-J} zu spielen scheinen (Abbildung 43).

Neben NFAT scheint der Transkriptionsfaktor STAT3 an der Regulierung der HIF-1 α -mRNA beteiligt zu sein, für den auch schon gezeigt wurde, dass er die HIF-1 α -mRNA induziert.⁷⁰ Der Einsatz von STA-21, einem STAT3-Inhibitor, hemmte die Induktion der HIF-1 α -mRNA durch KM_{AZ-J} (Abbildung 43). Allerdings konnte im EMSA keine

Erhöhung der STAT3 Bindung an den HIF-1 α -Promotor festgestellt werden, sondern nur eine basale Bindung, die durch das KM_{AZ-J} nicht beeinflusst wurde (Abbildung 44).

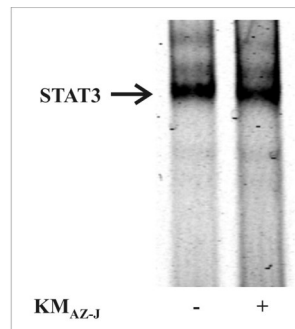


Abbildung 44: STAT3 Bindung an den HIF-1 α -Promotor wird durch KM_{AZ} nicht beeinflusst
RAW264.7-Zellen wurden für 4 h mit KM_{AZ-J} inkubiert. Die Bindung von STAT3 an die HIF-1 α -Promotorsequenz wurde mittels EMSA mit spezifischen 5'-IRD700-gekennzeichneten Oligonukleotiden gemacht. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Die hohe Anzahl an möglichen beteiligten Kinasen und weiteren Transkriptionsfaktoren macht weitere Untersuchungen notwendig, die zum Verständnis dieses komplexen Signalnetzwerkes beitragen werden.

5 DISKUSSION

5.1 ROS vermitteln die HIF-1 α Regulierung durch Calcium²⁺/Calpain unter Hypoxie und NO

Verstärkt proliferierende Tumorzellen erzeugen schnell eine kritische Masse, die keine ausreichende Versorgung der einzelnen Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen mehr gewährleisten kann. Es entsteht ein Sauerstoff- und Nährstoffgradient zum inneren Bereich des Tumors, sodass ein nekrotischer Kern entsteht. Der erhöhte Bedarf des Tumorgewebes macht eine gesteigerte Angiogenese sowie Vaskularisierung notwendig, um das weitere Wachstum des Tumors zu gewährleisten. Die Stabilisierung von HIF-1 α scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Der Abbau von HIF-1 α unter Normoxie ist ein essentieller Schritt eine Überaktivierung von HIF-1 zu verhindern, die, wie z.B. beim VHL-Syndrom, zur Entstehung von Tumoren beitragen kann. Weiterhin wird intratumorale Hypoxie, welche ebenfalls die Aktivierung von HIF-1 zur Folge hat, in soliden Tumoren mit erhöhter Resistenz gegen Chemotherapie assoziiert.^{5,29,30} Beispielsweise wurde für humane Brustkarzinomzellen gezeigt, dass die durch Doxorubicin ausgelöste Apoptose der Tumorzellen nach HIF-1-Induktion deutlich reduziert war.²⁷⁵ HIF-1 induziert Proteine der ABC-Transporter-Familie (MDR1 und *breastcancer resistance protein* (Bcrp)), wodurch der Efflux der Therapeutika aus den Zellen verstärkt wird.^{25-28,276,277} Auch in RCCs kommt es durch die Überaktivierung der HIF-1 zu einer Resistenz²⁷⁸ gegen Chemo- und Radiotherapie.^{31,279} Diese Beispiele verdeutlichen die Rolle von HIF-1 in Tumoren und zeigen auf, wie wichtig die Kontrolle von HIF-Aktivität für die Therapierbarkeit von Tumoren ist.

Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten RCC4-Zellen haben eine biallele Mutation des VHL-Gens, wodurch in den Zellen kein funktionelles pVHL vorliegt und HIF-1 α unkontrolliert akkumuliert. Weiterhin ist HIF-1 in RCC4-Zellen auch transkriptionell aktiv, obwohl FIH unter Normoxie zumindest einen Teil der HIF-1-Aktivität verhindern sollte. Es wurde in anderen Zellen, die aus RCCs isoliert wurden, gezeigt, dass in Abhängigkeit von PI3K/PKC ζ die FIH-Expression inhibiert wird.²⁸⁰ Diese Daten lassen vermuten, dass in RCC4-Zellen ein ähnlicher Mechanismus vorliegt, der zu der normoxischen HIF-1-Aktivierung beiträgt.²⁶⁶

Die vorliegende Arbeit zeigt neue Erkenntnisse der pVHL-unabhängigen HIF-1 α -Regulation. Sowohl unter Hypoxie und NO als auch unter Normoxie, wenn NO und O₂⁻ gleichzeitig vorliegen, kommt es zur Bildung von Peroxynitrit und anderen RNI. Dies hat einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und einer daraus resultierenden Aktivitätssteigerung von Calpain zur Folge. Calpain ist dann in der Lage HIF-1 α abzubauen. So vervollständigen die hier dargestellten Ergebnisse das Verständnis für die Rolle von Ca²⁺ bei Hypoxie-induzierter Genexpression, da HIF-1 α neben dem Proteasom auch durch die Ca²⁺-abhängige Protease Calpain abgebaut werden kann. Im Folgenden wird jetzt näher auf die mechanistischen Details des Calpain-vermittelten HIF-1 α -Abbaus eingegangen.

5.1.1 NO vermittelter HIF-1 α -Proteinabbau unter Hypoxie

Während NO unter Normoxie in vielen Zellen zu einer Stabilisierung von HIF-1 α beiträgt, worauf im nächsten Abschnitt noch eingegangen wird, kommt es unter Hypoxie durch NO zu einer Abnahme der HIF-1 α -Expression und zu einer reduzierten DNA-Bindung und dadurch einer inhibierten Zielgenexpression von HIF-1. Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der mitochondrialen Respiration durch NO zum Abbau von HIF-1 α unter Hypoxie führt.⁸⁵ NO inhibiert dabei die Cytochrom C Oxidase, die der O₂-reduzierende Enzymkomplex der mitochondrialen Atmungskette ist. Dies führt nicht zu einer reduzierten HIF-1 α -Synthese unter Hypoxie und NO, sondern verstärkt den Abbau des Proteins. Durch die Inhibierung der mitochondrialen Atmung steht der noch vorhandene Sauerstoff den PHDs zur Verfügung, so dass diese unter Hypoxie wieder aktiv werden können.⁸⁵ Außer von O₂ ist die PHD-Aktivität auch von der Fe²⁺-Konzentration abhängig. Ein weiterer Ansatz, um die Reaktivierung der PHD unter Hypoxie durch NO zu erklären, ist, dass es durch NO zu einer erhöhten Konzentration von freiem Fe²⁺ kommt, was zu einer Aktivierung der PHDs beiträgt.²⁸¹⁻²⁸⁴ Unabhängig von den zugrunde liegenden molekularen Zusammenhängen gehen alle bisherigen Ansätze davon aus, dass die Reduktion der HIF-1 α -Expression unter Hypoxie und NO durch eine Reaktivierung der PHD-Aktivität hervorgerufen wird, die dann den Abbau von HIF-1 α über das Proteasom auch unter Hypoxie erlaubt. Für die vorliegenden Ergebnisse in RCC4-Zellen können aufgrund des nicht-funktionellen pVHL daher diese Erklärungen nicht herangezogen werden. Vielmehr wird deutlich, dass unter Hypoxie in RCC4-Zellen die Zugabe von NO zu einem Abbau von HIF-1 α führte, dem ein radikal-vermittelter Mechanismus zugrunde liegt. Meine Ergebnisse zeigen, dass unter Hypoxie verstärkt ROS in den Mitochondrien

gebildet und diese durch die Kombination mit NO reduziert wurden. Nach Depletion der mitochondrialen ROS-Produktion fand der Abbau von HIF-1 α unter Hypoxie und NO nicht mehr statt, außer die ROS wurden substituiert. Neben der Zugabe des NO-Donors DETA-NO konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Stimulation der iNOS durch LPS/IFN γ unter Hypoxie ausreichte, um durch endogen produziertes NO den HIF-1 α -Abbau auszulösen. Außerdem war der Abbau von HIF-1 α Methionin- und Harnsäure-sensitiv, was auf eine Beteiligung von Peroxynitrit oder anderen RNI hinwies. Alle bisherigen Arbeiten bringen die Rolle von ROS und NO mit der PHD Aktivierung in Verbindung. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung von ROS/RNI an einem pVHL-unabhängigen Abbau von HIF-1 α gezeigt werden.

5.1.2 HIF-1 α wird unter Normoxie durch NO und O $_2^-$ beeinflusst

Während es unter Hypoxie zu einem erhöhten Abbau durch NO kommt, stabilisiert NO HIF-1 α unter Normoxie. Unter Normoxie wird die pVHL Bindung an HIF-1 α durch NO beeinträchtigt, HIF-1 α wird weniger ubiquitiniert und nicht mehr abgebaut.²⁸⁵ Es wird vermutet, dass NO an das Fe $^{2+}$ der PHDs bindet und damit das Enzym inaktiviert.⁸³ Neben dem Einfluss, den NO auf den Proteinabbau von HIF-1 α hat, kann auch die Synthese und die Transaktivierung moduliert werden. NO bzw. NO-Intermediate können die monomere GTPase Ras aktivieren, welche wiederum die MAPK und PI3K Signalwege stimuliert. MAPK und PI3K können dann die Synthese von HIF-1 verstärken.⁷⁹ Die beschriebenen Mechanismen werden bei unterschiedlichen Konzentrationen von RNI aktiviert. Die Inhibierung der PHD ist bei höheren Konzentrationen von RNI zu beobachten als die Aktivierung der PI3K. Weiterhin findet die Aktivierung der PI3K durch RNI nicht ubiquitär in allen Zellen statt.^{59,286}

Neben NO können auch ROS unter Normoxie einen Anstieg der HIF-1 α -Proteinmenge hervorrufen.⁷⁷ ROS oxidierten Fe $^{2+}$ zu Fe $^{3+}$, wodurch die PHD und damit auch die Degradation von HIF-1 α inhibiert wird.⁷⁸ Kombiniert man jedoch NO und O $_2^-$, reagieren diese miteinander, wodurch weder NO noch O $_2^-$ in ausreichender Menge verfügbar bleiben, um die PHD zu hemmen.²⁶⁹ Meine Ergebnisse zeigen, dass es in RCC4-Zellen durch die Kombination von NO und O $_2^-$ unter Normoxie zu einem pVHL-unabhängigen Abbau von HIF-1 α kommt. Dieser Abbau ist Harnsäure-sensitiv, was untermauert, dass NO und O $_2^-$ miteinander reagieren, wodurch RNI, vermutlich Peroxynitrit, entstehen, die den HIF-1 α -Abbau auslösen. Dies lässt sich nicht durch die bisher bekannte Regulation von HIF-1 α durch NO und O $_2^-$ erklären, da dafür ein funktionelles pVHL notwendig ist.

Interessanterweise konnte hier gezeigt werden, dass der pVHL-unabhängige Abbau von HIF-1 α unter Hypoxie und NO auf die gleiche Weise wirkte wie unter Normoxie und NO, wenn O₂⁻ substituiert wurde. In beiden Fällen reagierten O₂⁻ und NO, wahrscheinlich zu Peroxynitrit, und lösten den Abbau von HIF-1 α über einen pVHL-unabhängigen Mechanismus aus. Zusätzlich zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse auch, dass der pVHL-unabhängige Abbau von HIF-1 α auch in HEK293-Zellen stattfand, wenn der Abbau über das 26S-Proteasom gehemmt war während die Zellen mit der Kombination aus NO und O₂⁻ inkubiert wurden. Dies zeigt, dass der pVHL-unabhängige Abbau von HIF-1 α ein allgemein gültiger Mechanismus in der HIF-1 α -Regulation ist und nicht nur durch den Verlust des pVHL von den RCC4-Zellen entwickelt worden ist. Um weiterhin die Beteiligung von NO und O₂⁻ im Vergleich zum proteasomalen Abbau zu sehen, wurden RCC4-pVHL-Zellen verwendet. Im Gegensatz zu z.B. HepG2-Zellen,²⁷⁰ wurde durch Zugabe von O₂⁻ keine Akkumulation von HIF-1 α hervorgerufen. NO war aber auch in RCC4-pVHL-Zellen in der Lage, HIF-1 α zu stabilisieren. Die Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins durch NO wurde durch die gleichzeitige Gabe von O₂⁻ aufgehoben. In diesem Fall hatte Harnsäure keinen inhibitorischen Effekt auf den HIF-1 α -Abbau. Der Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass beim pVHL-abhängigen Abbau durch NO die PHDs gehemmt werden. Reagiert NO mit O₂⁻, bleibt kein NO für die Hemmung der PHDs mehr übrig. Harnsäure, die das Reaktionsprodukt aus NO und O₂⁻ abfängt, kann die Reaktion von NO mit O₂⁻ nicht verhindern. Im Gegensatz dazu wird deutlich, dass der pVHL-unabhängige Abbau in RCC4-Zellen durch Harnsäure inhibiert wird, da dieser Abbau durch Peroxynitrit/RNI ausgelöst wird.

5.1.3 HIF-1 α wird durch Calpain abgebaut

5.1.3.1 NO und O₂⁻ führen zur Aktivierung von Calpain

Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass HIF-1 α anders als über das 26S-Proteasom abgebaut wird. Die Inhibition mit DMOG in RCC4-Zellen zeigt bei meinen Versuchen jedoch keine Beeinflussung des HIF-1 α -Abbaus durch NO/O₂⁻. DMOG wird in der Zelle zu N-Oxalylglycin, einem Strukturanalogon zu 2-Oxoglutarat, umgesetzt und hemmt so kompetitiv 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen, zu denen auch die PHDs gehören.²⁸⁷ Aus diesem Ergebnis kann man daher schließen, dass sich in RCC4-Zellen keine Ersatzligase für das pVHL ausgebildet hat, die die Hydroxylierung des Proteins durch

PHDs erkennt, HIF-1 α ubiquitiniert und so für den Abbau über das Proteasom markiert. Um weiterhin ausschließen zu können, dass HIF-1 α nicht durch einen unbekanntem Weg über das Proteasom abgebaut wird, wurden die proteasomalen Inhibitoren MG132 und Lactacystin eingesetzt. Während Lactacystin den Abbau von HIF-1 α durch NO und O₂⁻ nicht beeinflusste, konnte die Degradation durch MG132 gehemmt werden. MG132 inhibiert neben dem Proteasom auch Calpain,²⁸⁸⁻²⁹⁰ wobei die Spezifität konzentrationsabhängig ist.²⁹⁰ Für PC12-Zellen konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von 20 nM bis 10 μ M von Tri-Leucinen, zu denen MG132 gehört, das Proteasom inhibieren. Ab Konzentrationen von 100 μ M wurden Calpaine mit gleicher Effektivität wie das Proteasom inhibiert.²⁹⁰ Die in meinen Versuchen eingesetzte Konzentration von 10 μ M MG132, die in den RCC4-Zellen den Abbau inhibierte, liegt damit an der Obergrenze der Konzentration für die spezifische Inhibierung des Proteasoms. Zusammen mit den Ergebnissen für Lactacystin, welches als spezifischer Inhibitor für das Proteasom gilt^{291,292} und den Abbau des HIF-1 α Signals nicht inhibierte, kann geschlussfolgert werden, dass HIF-1 α unter Hypoxie und NO in RCC4-Zellen nicht über das Proteasom sondern durch Calpain abgebaut wird. Calpaine sind Ca²⁺-abhängige Cysteinproteasen, die in vielen intrazellulären Prozessen wie z.B. dem Abbau von Zytoskelettproteinen und der Regulation von Kinaseaktivitäten und Transkriptionsfaktoren involviert sind.⁹⁷

Für den Nachweis, dass Calpain in den Abbau von HIF-1 α involviert ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die Calpain-Inhibitoren ALLM und Calpastatin eingesetzt. Insbesondere Calpastatin ist ein spezifischer, auch endogen in den Zellen vorhandener Inhibitor von Calpain, für den bisher keine inhibierende Wirkung auf andere Proteasen nachgewiesen werden konnte.²⁹³ Meine Ergebnisse zeigen, dass unter allen Bedingungen, die zur Ausbildung der RNI und einem HIF-1 α -Abbau in den RCC4-Zellen führten, durch die Inhibition von Calpain die HIF-1 α -Expression wiederhergestellt werden konnte. Dies bestätigt, dass es sich in RCC4-Zellen sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie um denselben Mechanismus handelt, der zu einer Aktivierung von Calpain und letztendlich zum Abbau von HIF-1 α führt. Zusätzlich zeigten die Versuche in HEK239-Zellen, die ein funktionelles pVHL haben, dass nach Inhibierung der PHD-Aktivität der Calpain-abhängige HIF-1 α -Abbau durch NO und O₂⁻ ebenfalls aktiviert wird. Neben den hier vorliegenden Ergebnissen konnte kürzlich auch in einem anderen System gezeigt werden, dass Calpain an der HIF Regulierung beteiligt ist. Analog zur Feststellung unserer Arbeitsgruppe, dass unter Hypoxie und DETA-NO nicht nur HIF-1 α sondern auch HIF-2 α

durch Calpain abgebaut wird,²⁶⁶ konnten auch Nanduri *et al.* zeigen, dass HIF-2 α durch Calpain reguliert wird. In PC12-Zellen führten kurze Hypoxie-Intervalle zu einer Induktion von HIF-1 α , aber HIF-2 α wurde Calpain-abhängig abgebaut. Die kurzfristige Hypoxie führte zu einer Abnahme des Calpastatin-Proteins in den Zellen, wodurch es zu einer Aktivierung von Calpain kam.²⁹⁴

Die Messung der intrazellulären Calpain-Aktivität bestätigte, dass in meinen Versuchen weder NO noch O₂⁻ allein zu einer Aktivierung führten. Analog zu den Auswirkungen auf den HIF-1 α -Proteinabbau, aktivierte erst die Kombination von NO und O₂⁻ entweder durch SIN-1 oder durch DETA-NO/DMNQ das Calpain. Zusätzlich ließ sich zeigen, dass, genau wie der Abbau von HIF-1 α , auch die Calpain-Aktivierung Harnsäure sensitiv war, d.h. Calpain durch Peroxynitrit oder andere RNI aktiviert wurde. Eine Aktivierung von Calpain durch Peroxynitrit wurde bereits in Chondrozyten und Erythrozyten gezeigt,^{278,295} wobei Peroxynitrit über eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration Calpain aktiviert.²⁷⁸

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Calpain ein alternatives proteolytisches System in der Regulation des HIF-1 α -Proteins darstellt, welches zusätzlich zum proteasomalen Abbau aktiviert werden kann.

5.1.3.2 NO und O₂⁻ führen zu einer Erhöhung des intrazellulären Calcium²⁺

Die Rolle von Ca²⁺ in der HIF-1 α Regulierung ist noch nicht ausreichend untersucht und die bisherigen Ergebnisse stellen sich widersprüchlich dar. Einerseits wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration mit dem Ca²⁺-Ionophor A23187 die verstärkte Neusynthese und Akkumulation von HIF-1 α über die Aktivierung der MAPK und des PI3K/PKB Signalwege zur Folge hat.⁹² Andererseits führt die Reduktion des intrazellulären Ca²⁺ durch BAPTA-AM ebenfalls zu einer Akkumulation von HIF-1 α -Protein, was durch eine Inhibition der PHD-Aktivität erklärt wird.^{92,93} Es ist bekannt, dass Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen die Expression von Hypoxie-regulierten Genen beeinflussen. Selbst wenn der bereits beschriebene Mechanismus der PHD Aktivierung durch Ca²⁺ nicht für pVHL-defiziente Zellen anzuwenden ist, so wird deutlich, dass Ca²⁺ wichtig für die Regulation von HIF-1 α ist. Weitere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass durch Chelatierung der Ca²⁺-Ionen HIF-1 α in RCC4-Zellen nicht mehr abgebaut wird, wohingegen eine Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ wiederum auch in RCC4-Zellen zum Proteinabbau führt.²⁶⁶

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, führte die Kombination von NO und O_2^- zu einem Calpain-abhängigen Proteinabbau. Während weder die verwendeten Konzentrationen von NO noch O_2^- allein zu einer Veränderung des Ca^{2+} -Levels führten, kam es sowohl durch die Kombination von DETA-NO/DMNQ als auch durch SIN-1 zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Genau wie zuvor der Abbau von HIF-1 α und die Aktivierung von Calpain, war auch die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} Harnsäure-sensitiv. Das Reaktionsprodukt aus NO und O_2^- konnte als Mediator sowohl für den HIF-1 α -Proteinabbau als auch für die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration identifiziert werden. In glatten Muskelzellen wurde bereits gezeigt, dass Peroxynitrit einen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem sarcoplasmatischen Retikulum auslösen.²⁹⁶ Auch aus den Mitochondrien wird Ca^{2+} nach Stimulation mit Peroxynitrit ausgeschüttet.²⁹⁷ Eine inhibitorische Wirkung von Peroxynitrit auf die HIF-1 α -Proteinakkumulation wurde ebenfalls beschrieben, jedoch ohne den Mechanismus zu klären.^{298,299} Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass ein möglicher Mechanismus eines Peroxynitrit-induzierten HIF-1 α -Abbaus die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist, die dann die Calpain-Aktivierung und den damit verbundene Proteinabbau zur Folge hat.

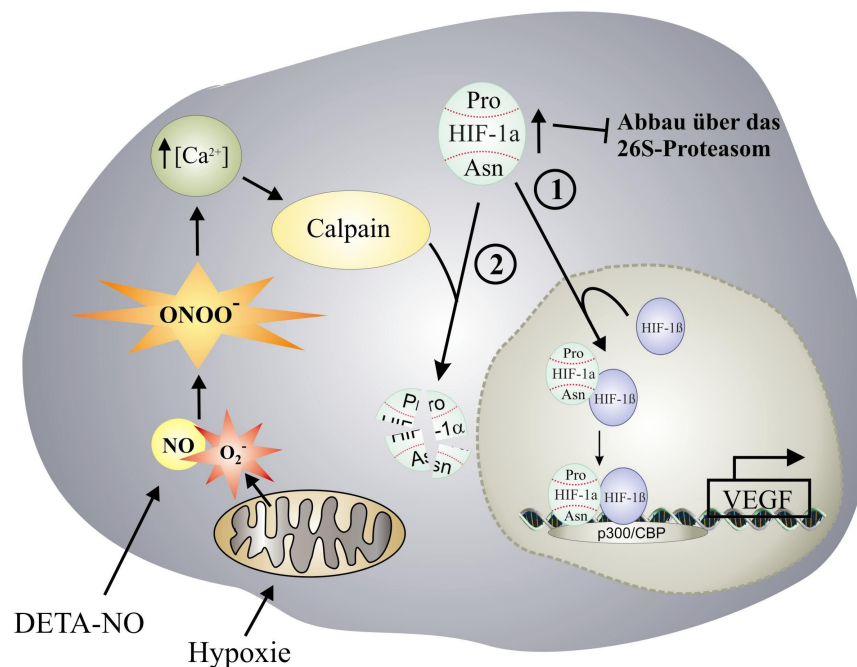


Abbildung 45: NO und O_2^- aktivieren den Calpain-vermittelten HIF-1 α -Abbau

Wenn der Abbau über das Proteasom gehemmt ist, kommt es zur Akkumulation und Translokation von HIF-1 α in den Zellkern, wo es mit HIF-1 β und p300/CBP an die DNS bindet und HIF-1-Zielgene wie VEGF induziert (1). Wird aber z.B. unter Hypoxie, in den Mitochondrien O_2^- gebildet und NO, z.B. exogen durch DETA-NO, hinzu gegeben, reagieren NO und O_2^- zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) und anderen RNI. Diese erhöhen den intrazellulären Ca^{2+} -Level, wodurch es zur Aktivierung von Calpain und zum Abbau von HIF-1 α durch Calpain kommt (2).

Der vorgestellte Abbaumechanismus durch Calpain, der in Abbildung 45 verdeutlicht wird, trägt dazu bei, die komplexen Zusammenhänge zu klären, die der Regulierung von HIF-1 α durch NO und O₂⁻ zugrunde liegen. Es konnte gezeigt werden, dass die ROS und RNI, die entstehen, wenn NO und O₂⁻ in physiologischen Mengen vorliegen, an sich nicht zytotoxisch sind,²⁶⁹ sich dadurch also kein direkter Tumor-inhibierender Effekt erzielen lässt. Jedoch kann der durch das Peroxynitrit ausgelöste HIF-1 α -Abbau ein möglicher Therapieansatz sein, um bei Patienten mit VHL-Syndrom oder anderen Tumoren, in denen HIF-1 α überexprimiert ist, eine verringerte Tumor-Progression und einer Verbesserung der Chemotherapie-Effizienz zu erzielen. In verschiedenen Krebszellen konnte gezeigt werden, dass es durch hypoxische Vorstimulation zu einer erhöhten Resistenz gegen Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Paclitaxel und 5-Fluorouracil kam. Wurden die Zellen während der Hypoxie zusätzlich mit NO-Donoren, z.B. DETA-NO, inkubiert, konnte dies die Resistenz gegenüber den Agenzien aufheben.³⁰⁰⁻³⁰²

5.2 Die Polarisierung von Makrophagen durch apoptotische Zellen führt zu einer Aktivierung von HIF-1 α durch TGF- β und S1P

HIF-1 α ist in vielen Tumoren induziert, wobei die verstärkte Expression nicht nur in den Tumorzellen selbst, sondern auch in den Zellen des Tumorstromas vorliegt. Für viele Karzinome ist gezeigt worden, dass Makrophagen, die in den Tumor eingewandert sind, zur Tumorprogression beitragen.¹²⁶ Die Induktion und die Regulation von HIF-1 α in den Tumorzellen, u.a. durch Mutationen im Tumorsuppressor-Gen VHL, ist im ersten Teil der Arbeit dargelegt worden. Die Mechanismen der HIF-1-Aktivierung in TAMs ist bisher noch nicht ausreichend untersucht worden. Da TAMs häufig in hypoxischen Arealen vorgefunden werden, wird die Hypoxie als Ursache für die HIF-1 α -Akkumulation angesehen. Allerdings konnten TAMs auch in normoxischen Bereichen des Tumors nachgewiesen werden,¹³⁵ sodass auch eine Regulation von HIF-1 α durch das Tumormikroklima, wie z.B. durch die nekrotischen oder apoptotischen Tumorzellen, vermutet werden kann. Makrophagen zeigen vielfältige Ausprägungen und verändern ihren Phänotyp aufgrund der Signale, die sie aus ihrer Umgebung erhalten. Zwischen TAMs und Makrophagen, die durch AZ polarisiert werden, lassen sich viele Parallelen im Phänotyp erkennen. TAMs spielen eine kritische Rolle bei der Stimulation der Angiogenese im Tumorgewebe.¹³⁵ Weiterhin zeigen TAMs einen anti-inflammatorischen und anti-apoptotischen Phänotyp. Bei der Entstehung und im frühen Entwicklungsstadium von

Tumoren können pro-inflammatorische Antworten und das Töten der Tumorzellen durch Makrophagen beobachtet werden. Durch die Koinkubation von Makrophagen mit Tumorzellen bilden die Makrophagen, nachdem sie zuvor die Tumorzellen getötet haben, einen anti-inflammatorischen Phänotyp aus.¹¹⁷ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es zu einer verringerten Tumorbildung kommt, wenn in I- κ B-Kinase^{-/-}-Makrophagen die pro-inflammatorische Antwort durch die Hemmung von NF- κ B inhibiert ist.³⁰³ Das Entstehen von transformierten Zellen im Entzündungsgeschehen wird oft mit Gewebsverletzungen und/oder DNA Strangbrüchen bzw. Mutationen durch die zytotoxischen, pro-inflammatorischen Produkte der Makrophagen in Verbindung gebracht.¹²³ Zusätzlich werden die Makrophagen im Tumorgeschehen durch den Kontakt mit den AZ und durch die Zytokine, die von den apoptotischen und lebenden Tumorzellen sezerniert werden, z.B. IL-4, IL-10, PGE₂ and TGF- β , zu regulatorischen Makrophagen polarisiert^{106,116,117,126,304}. Es ist noch nicht geklärt, ob HIF-1 eine Rolle bei der Ausbildung des TAM Profils spielt oder welche Signale z.B. von den apoptotischen Tumorzellen zu der Phänotyp-Veränderung der Makrophagen führen. Daher wurden in dieser Arbeit Makrophagen durch Überstände von AZ stimuliert und die Regulation von HIF-1 α untersucht, um Rückschlüsse bezüglich der Rolle von HIF-1 im „pro-Tumor“-Phänotyp der TAMs ziehen zu können.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überstände von AZ NFAT aktivieren und dadurch HIF-1 α transkriptionell aktiviert wird. Bei der Erhöhung der HIF-1 α -mRNA wurden weiterhin S1P und TGF- β als verantwortliche Mediatoren identifiziert, die von den AZ sezerniert werden. Die Aktivierung von HIF-1 trägt dazu bei, dass Makrophagen sogar unter normoxischen Bedingungen pro-angiogenetische Faktoren, wie z.B. VEGF produzieren. Die funktionelle Konsequenz der HIF-1-Aktivierung in Makrophagen unter Normoxie, die durch das KM_{AZ} polarisiert wurden, wurde durch die Differenzierung von Stammzellen zu CD31⁺-Endothelzellen gezeigt.

5.2.1 Apoptotische Zellen induzieren HIF-1 α und aktivieren HIF-1

Meine Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation von Makrophagen mit KM_{AZ} zu einer Akkumulation der HIF-1 α -mRNA und des Proteins führte. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass es durch KM_{AZ} in RAW264.7-Zellen zu einer Translokation des RNA-stabilisierenden *human protein R* (HuR) ins Cytosol und einer damit verbundenen Aktivierung von HuR kommt, die zur Stabilisierung der Cox-2-mRNA führt.³⁰⁵ Um auszuschließen, dass es sich bei der Induktion der HIF-1 α -mRNA um eine

Stabilisierung der mRNA handelt, wurde die transkriptionelle Induktion durch Reporter Analysen verifiziert. Weiterhin zeigen meine Ergebnisse, dass nach vollständiger Hemmung des HIF-1 α -Abbaus über das 26S-Proteasom das Proteinsignal noch weiter durch KM_{AZ} verstärkt wurde, was auf eine verstärkte Proteinsynthese statt auf einen verminderten HIF-1 α -Abbau hindeutet. Die erhöhte HIF-1 α -mRNA-Expression, die nach Stimulation mit KM_{AZ} beobachtet wurde, stützt diese These. Die normoxische Akkumulation von HIF-1 α durch das KM_{AZ} führte zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1, was mittels eines HIF-Aktivitäts-Reporters und der HIF-1-abhängigen Induktion der Zielgene VEGF und Glut-1 gezeigt werden konnte. In den HIF-1 α ^{-/-}-Makrophagen wurde deutlich, dass bereits die Basislevel von Glut-1 und VEGF durch den *knockout* beeinflusst wurden, jedoch sowohl durch KM_{AZ-J} als auch durch Hypoxie noch eine geringe Induktion von Glut-1 und VEGF stattfand. Da sowohl für Glut-1 als auch für VEGF weitere regulierende Transkriptionsfaktoren bekannt sind, könnten diese hierfür verantwortlich sein. Für VEGF wurde gezeigt, dass es synergistisch von STAT3 und HIF-1 reguliert wird³⁰⁶ und cMyc kann zur Regulation von Glut-1 beitragen.³⁰⁷ Ebenfalls ist vor kurzem gezeigt worden, dass das KM_{AZ} in humanen primären Makrophagen bereits nach 1 h zu einer Erhöhung der VEGF-Produktion führt. Diese VEGF-Induktion ist, Inhibitor-Studien zufolge, STAT1-abhängig.³⁰⁸ Möglicherweise kommt es auch bei der STAT1-abhängigen VEGF-Induktion zu Synergieeffekten mit HIF-1 α wie es bereits für STAT3 beschrieben worden ist.

5.2.2 S1P und TGF- β sind an der Induktion von HIF-1 beteiligt

Nachdem die funktionellen Konsequenzen der HIF-1-Aktivierung durch AZ unter Normoxie gezeigt werden konnten, wurde untersucht, welche Mediatoren von AZ sekretiert werden und zu der HIF-1 α -mRNA-Induktion beitragen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl S1P als auch TGF- β an der Induktion der HIF-1 α -mRNA beteiligt sind. Es ist bekannt, dass AZ sowohl TGF- β als auch S1P freisetzen.¹¹⁴⁻¹¹⁶ S1P ist wichtig für die Tumorangio-genese^{309,310} und wird mit oft einer erhöhten VEGF-Produktion in Verbindung gebracht, jedoch sind die mechanistischen Details, die der S1P vermittelten VEGF-Induktion zu Grunde liegen, noch nicht geklärt. Sowohl in *in vitro* als auch *in vivo* wurde gezeigt, dass die VEGF Konzentration nach Administration eines S1P neutralisierenden Antikörpers stark reduziert werden konnte.²⁰⁰ Meine Ergebnisse konnten weiterhin verdeutlichen, dass HIF-1 unter Beteiligung von S1P aktiviert wird, so dass HIF-1 wiederum zu der S1P-abhängigen VEGF-Induktion beitragen kann.

Die Verwendung der Inhibitoren der S1P-Rezeptoren zeigten, dass der Antagonist für S1P₁ und S1P₃, VPC23019, die Induktion der HIF-1 α -mRNA im Gegensatz zum S1P₂-Antagonisten JTE-013 inhibierte. Bedenkt man, dass murine Makrophagen nur S1P₁ und S1P₂ exprimieren,^{311,312} deutet dies auf einen S1P₁ vermittelten Mechanismus durch das KM_{AZ} hin. Um diese Vermutung, die bisher nur auf dem Einsatz der Inhibitoren beruht, zu verifizieren, müssten *knockdown*-Versuche für die S1P-Rezeptoren durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt jedoch nicht auf die S1P-Rezeptoren, sondern auf die Beteiligung von S1P als einer der löslichen Faktoren, die an der HIF-1 α -Induktion beteiligt sind, gelegt. Dafür wurde KM_{AZ} von Zellen hergestellt, die einen *Knockdown* der SK2 haben. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass die SK2, nicht die SK1, in AZ das entscheidende Enzym für die S1P-Produktion ist und dass das freigesetzte S1P durch den *Knockdown* deutlich reduziert wurde.¹¹⁷ Das KM_{AZ-SK2kd} mit der reduzierten S1P Konzentration konnte die HIF-1 α -mRNA nicht mehr erhöhen. Srinivasin *et al.* haben beschrieben, dass in T-Zellen die mRNA einer verkürzten Isoform von HIF-1 α durch S1P induziert wird, was eine Reduktion der T-Zell-Aktivierung zur Folge hatte.³¹³ In Endothelzellen wiederum führte S1P zu einer Akkumulation des HIF-1 α -Proteins und dadurch zur Aktivierung von HIF-1, was über eine Hemmung des Proteinabbaus erklärt wurde.³¹⁴ Ader *et al.* wiederum konnten zeigen, dass die SK1-Aktivität zur Phosphorylierung und damit zur Inaktivierung von GSK-3 benötigt wird, was zur Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins unter Hypoxie beiträgt.³¹⁵ Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch die Reduktion der S1P Konzentration oder Blockierung des S1P-Rezeptors die HIF-1 α -mRNA-Induktion durch KM_{AZ} inhibiert wurde. Inwieweit die Proteininstabilität möglicherweise zusätzlich beeinflusst wird, wurde nicht weiter untersucht. Jedoch ist hervorzuheben, dass, selbst wenn der Abbau von HIF-1 α durch DMOG vollständig gehemmt war, sich durch KM_{AZ} noch eine Verstärkung des HIF-1 α -Proteins ergab. Dies deutete darauf hin, dass KM_{AZ} nicht den pVHL-abhängigen Abbau über das 26S-Proteasom hemmt, sondern die Proteinsynthese durch erhöhte mRNA-Expression verstärkt. Daher wurde der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf die Aufklärung der Induktion der HIF-1 α -mRNA durch KM_{AZ} gelegt.

Meine weiteren Ergebnisse zeigen, dass S1P an der Induktion der HIF-1 α -mRNA nicht allein beteiligt ist. Während die Inhibition der S1P-vermittelten Signaltransduktion die Erhöhung der HIF-1 α -mRNA verhinderte, konnte weder der S1P₁-Agonist SEW2871 noch S1P alleine eine Induktion der mRNA hervorrufen. Interessanterweise induzieren S1P und SEW2871 die HIF-1 α -mRNA, wenn sie mit dem KM_{AZ-SK2kd} koinkubiert wurden. In dem

Ansatz wurde die Reduktion der HIF-1 α -mRNA, die im Vergleich zu KM_{AZ} zu beobachten war, durch die Gabe von S1P und SEW2871 aufgehoben. Dies bestätigt, dass neben S1P noch weitere lösliche Faktoren im KM_{AZ} enthalten sind, die synergistische Effekte auf die Regulation der HIF-1 α -mRNA ausüben.

Da bereits bekannt ist, dass die S1P-Rezeptoren auch ohne Anwesenheit von TGF- β die TGF- β -Rezeptoren aktivieren können^{272,273} wurde untersucht, ob dies in den Makrophagen nach Stimulation mit KM_{AZ} der Fall ist. Tatsächlich kam es durch KM_{AZ} zu einer Smad2 Phosphorylierung. Weitere Versuche zeigten jedoch, dass dies nicht durch den S1P-Rezeptor vermittelt wurde. Zusätzlich führte die Denaturierung des KM_{AZ} sowohl zu einem Verlust der TGF- β -Rezeptor-Aktivierung als auch zu einer Inhibition der HIF-1 α -mRNA-Induktion durch das KM_{AZ}. Dies zeigte, dass neben S1P ein Protein an der HIF-1 α -mRNA-Induktion beteiligt ist. Durch die Verwendung eines TGF- β neutralisierendem Antikörpers kam es sowohl zur Reduktion der TGF- β -Rezeptor-Aktivierung als auch der HIF-1 α -mRNA-Induktion durch das KM_{AZ}. Es konnte bereits gezeigt werden, dass AZ TGF- β sezernieren¹¹⁵ und dass TGF- β bei der Tumorprogression pro-angiogenetisch und Tumorunterstützend wirken kann.²¹⁸ Die TGF- β -induzierte Angiogenese wird in Endothelzellen mit der Induktion von uPAR in Verbindung gebracht.²¹⁹ Weiterhin wurde gezeigt, dass TGF- β VEGF-C²²⁰ und die MMP9 induziert.²²¹ Auch für murine Makrophagen konnte bestätigt werden, dass TGF- β sowohl an der VEGF- als auch MMP9-Induktion beteiligt ist.²²² Diese pro-angiogenetischen Faktoren sind HIF-1-Zielgene, so dass ein Teil der TGF- β -vermittelten Angiogenese auf eine Aktivierung von HIF-1 zurück zuführen sein könnte. Außerdem wurde für humanen Lungenfibroblasten gezeigt, dass TGF- β zur Induktion des HIF-1 α -Proteins und zur Aktivierung von HIF-1 führt. Mechanistisch wurde die HIF-1 α -Akkumulation noch nicht weiter untersucht.²²⁶ Allerdings bestätigt sich bei meinen Ergebnissen, dass, genau wie S1P, die Administration von TGF- β allein nicht ausreicht, um die HIF-1 α -mRNA zu erhöhen. Im Gegenzug sind aber sowohl TGF- β als auch S1P im KM_{AZ} essentiell notwendig, um die mRNA zu induzieren. Wird nur einer der beiden Signalwege unterbunden, kommt es zu einer Inhibition der HIF-1 α -mRNA-Induktion. Diese Ergebnisse zeigen auch die Komplexität der durch KM_{AZ} vermittelten Signale und legen nahe, dass neben S1P und TGF- β noch weitere Faktoren an der Induktion der HIF-1 α -mRNA beteiligt sind.

5.2.3 NFAT induziert HIF-1 α -mRNA

Nachdem ein Teil der Mediatoren, welche die Induktion der HIF-1 α -mRNA vermitteln, identifiziert wurden, stellte sich als nächstes die Frage, welche Transkriptionsfaktoren HIF-1 α induzieren. Der bisher am besten beschriebene Transkriptionsfaktor, NF- κ B, konnte aufgrund der durchgeführten Inhibitor-Versuche für die Aktivierung der HIF-1 α Transkription in den Makrophagen durch KM_{AZ} ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Transaktivierung von NF- κ B nach Kokultivierung von RAW264.7-Makrophagen und AZ inhibiert ist.³¹⁶ Neben NF- κ B sind noch STAT3 und NFAT als transkriptionelle Aktivatoren für die HIF-1 α -mRNA bekannt.^{60,61,70,71} STAT3 induziert Src-Kinase-abhängig die HIF-1 α -mRNA.⁷⁰ In Mastzellen hingegen induziert NFAT nach Inkubation der Zellen mit Ionomycin und Substanz P, einem Mastzell-Aktivator, die HIF-1 α -mRNA. Beide Reagenzien erhöhen die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, wodurch es zu einer Aktivierung von Calcineurin und infolgedessen von NFAT kommt.⁷¹ In der hier vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass eine Inhibition von STAT3 zwar die Induktion der HIF-1 α -mRNA durch das KM_{AZ} verhindert, mittels EMSA Experimenten jedoch keine verstärkte Bindung von STAT3 an den HIF-1 α -Promotor gezeigt werden konnte. Möglicherweise ist STAT3 an der basalen Expression der HIF-1 α -mRNA beteiligt oder es handelt sich um indirekte Effekte auf die Induktion der HIF-1 α -mRNA, welche durch STAT3 vermittelt werden. Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht und bleibt somit noch zu beantworten. Im Gegensatz dazu zeigte NFAT eine deutliche Aktivierung durch das KM_{AZ} im Reporterassay und ebenfalls eine verstärkte Bindung an den HIF-1 α -Promotor im EMSA. Zusätzlich führte eine Überexpression von NFAT sowohl zu einer Steigerung der HIF-1 α -Promotoraktivität als auch zu einer HIF-1-Aktivierung. Sowohl S1P als auch TGF- β können NFAT aktivieren. In isolierten glatten Muskelzellen aus Koronararterien von Schweinen führte S1P zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, wodurch Calcineurin und NFAT aktiviert wurden.³¹⁷ TGF- β aktiviert die *TGF- β -activated Kinase 1* (TAK1), welche dann wiederum *regulator of calcineurin 1* (RCAN1) phosphoryliert. Unphosphoryliert bindet RCAN1 an das aktive Zentrum von Calcineurin und inhibiert es. Nach der Phosphorylierung löst sich RCAN1 von Calcineurin und folglich wird NFAT aktiviert.³¹⁸ Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen allerdings, dass weder S1P noch TGF- β direkt auf NFAT wirken. Weder die Zugabe noch die Reduktion von S1P und TGF- β allein oder in Kombination beeinflusste die NFAT-Aktivität. Lediglich der TGF- β neutralisierende Antikörper reduzierte die Bindung von NFAT an den HIF-1 α -Promotor

geringfügig. Diese geringe Hemmung ist jedoch nicht ausreichend, um die Reduktion der HIF-1 α -mRNA nach der Inhibition des TGF- β Signalwegs vollständig zu erklären. In Abbildung 46 ist eine Zusammenfassung über die bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der HIF-1 α -mRNA-Regulation in Makrophagen, die durch AZ polarisiert wurden, dargestellt.

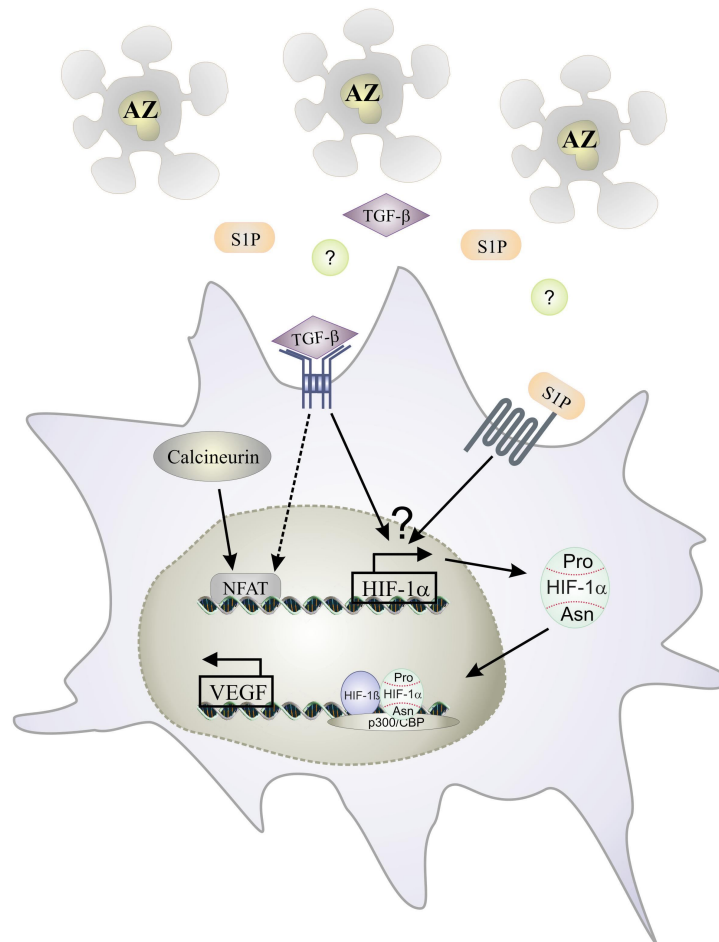


Abbildung 46: Regulation von HIF-1 α in Makrophagen durch AZ

AZ setzen S1P, TGF- β und weitere, bisher unbekannte Substanzen frei. S1P und TGF- β binden an ihre Rezeptoren und aktivieren diese. S1P und TGF- β sind an der HIF-1 α -mRNA-Induktion beteiligt, jedoch sind die beteiligten Signalwege noch nicht geklärt. Weiterhin kommt es durch AZ zu einer Calcineurin-abhängigen NFAT-Aktivierung und TGF- β beeinflusst zum Teil die Bindung von NFAT an den HIF-1 α Promoter. NFAT induziert die HIF-1 α -mRNA und das HIF-1 α -Protein akkumuliert, da der Abbau die verstärkte Synthese nicht kompensieren kann. Nach Translokation in den Zellkern bindet HIF-1 α an HIF-1 β und p300/CBP und die HIF-1-Zielgene, wie z.B. VEGF, induziert.

Da weder S1P noch TGF- β alleine die NFAT-Aktivität beeinflussen, verstärkt dies die Vermutung, dass weitere Faktoren von den AZ und/oder autokrine Mediatoren von den polarisierten Makrophagen sezerniert werden, die an der Induktion von HIF-1 beteiligt sind. Adenosin könnte von AZ sezerniert werden und in murine Makrophagen führt die Aktivierung des Adenosin-A_{2a}-Rezeptors durch PKC- und PI3K-abhängige Mechanismen

zu einer Induktion der HIF-1 α -mRNA.³¹⁹ Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen, dass das KM_{AZ} den Adenosin-A_{2a}-Rezeptor in humanen Makrophagen in SIP/HO-1-abhängiger Weise induziert.³⁰⁸ In Prostatakarzinomzellen wurde gezeigt, dass PGE₂ die HIF-1 α -mRNA induziert,³²⁰ was nach Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe durch die Stimulation mit KM_{AZ} aus RAW264.7-Makrophagen freigesetzt wird.³⁰⁵

Die Signalwege, welche durch KM_{AZ} in den Makrophagen aktiviert werden sind vielfältig. Ein *Screening* möglicher Signalwege zeigte, dass die Inhibitoren für JAK, p38, PKC und die Src-Kinase eine reduzierende Wirkung auf die KM_{AZ} vermittelte HIF-1 α -mRNA-Induktion haben. Zusätzliche Versuche werden in der Zukunft folgen müssen, um weitere Mediatoren und die Interaktionen der unterschiedlichen Mechanismen zu identifizieren.

5.2.4 Polarisierte Makrophagen steigern die Differenzierung von Stammzellen

Klinische Studien bei Menschen zeigen, dass eine Korrelation zwischen einem hohen Makrophagen-Anteil und einer schlechten Prognose für die Krebspatienten zu finden ist. Mehrere *in vivo* Studien verdeutlichen die Rolle von TAMs für die Tumorentwicklung. Im PyMT-Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass in *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF)^{-/-} Mäusen die Anzahl der eingewanderten Makrophagen im Tumorgewebe deutlich reduziert war. M-CSF ist ein Chemokin, welches zur Makrophagenrekrutierung ins Gewebe beiträgt. Zusätzlich war sowohl die Tumorangiogenese als auch die Tumorprogression und Metastatisierung der M-CFS^{-/-} Mäuse verringert.^{135,321} Daher ist es interessant, dass für humane Monozyten gezeigt werden konnte, dass M-CFS VEGF, einen wichtigen pro-angiogenetischen Faktor, über eine Aktivierung von HIF-1 induziert.³²² In humanen Urothelkarzinomen konnte mittels Immunhistologie gezeigt werden, dass die Karzinome, in denen es sowohl zu einer Erhöhung des HIF-1 α und des COX-2-Proteins als auch der TAM- und Endothelzell-Anzahl im Gewebe kam, verstärkt invasiv waren.³²³ Diese Studien verdeutlichen, wie wichtig die Aktivierung von HIF-1 in Tumoren und den Zellen des Tumorstromas, z.B. den TAMs, für die Tumorprogression ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in Makrophagen, die durch AZ polarisiert wurden, zu einer HIF-1-Aktivierung unter Normoxie kommt. Um zu veranschaulichen, ob die Aktivierung von HIF-1 zur Tumorentwicklung beitragen kann, wurde ein *in vitro* Versuchsansatz gewählt, der die pro-angiogenetische Wirkung der Makrophagen verdeutlicht. Hierfür wurden murine embryonale Stammzellen als EBs kultiviert und auf Schalen ausplattiert. Für Stammzellen wurde gezeigt, dass *octamer binding transcription factor 4* (Oct-4) HIF-2-abhängig die Differenzierung von Stamm-

zellen hemmt.³²⁴ Deshalb wurden Lumox Schalen für die EB Kultivierung gewählt. Im Gegensatz zu normalen Zellkulturschalen bildet sich in Lumox-Schalen, die einen Gaspermeablen Boden haben, kein Sauerstoff-Gradient im Medium aus.³²⁵ Die ausplattierten EBs wurden mit den Überständen von KM_{AZ} polarisierten Makrophagen inkubiert, um anschließend die Differenzierung in $CD31^+$ -Zellen zu untersuchen. $CD31$ ist ein in Endothelzellen exprimiertes Membranprotein und wird in vielen ähnlichen Anwendungen mit Stammzellen als Marker für Vaskulogenese und Angiogenese verwendet.^{271,326,327} Meistens werden für Angiogenese-Assays 3-D-Modelle benutzt, in denen die EBs in eine Kollagen-Matrix eingebettet werden, um das Auswachsen der $CD31^+$ -Zellen ins Gel zu beobachten.³²⁶ Da jedoch das KM_{PM} dazu führte, dass die Kollagen-Matrix sich wieder verflüssigt, wurde das modifizierte Modell mit ausplattierten EBs benutzt.³²⁷ Wie schon Jakobssen *et al.* konnte auch bei den hier durchgeführten Versuchen eine Autodifferenzierung der Zellen in $CD31^+$ -Zellen im vielschichtigen Körper des EBs beobachten werden.³²⁷ Im *Monolayer*-Rand der EBs wurden unter Kontrollbedingungen jedoch keine $CD31^+$ -Zellen gefunden. Nach Inkubation der EBs mit dem KM_{PM} zeigte sich die Differenzierung zu $CD31^+$ -Endothelzellen auch im Randbereich der EBs. Wurde KM_{PM} von $HIF-1\alpha^{-/-}$ -Makrophagen verwendet, kam es wiederum zu keiner Differenzierung in $CD31^+$ -Zellen im *Monolayer*-Rand. Dies verdeutlicht, dass die Aktivierung von HIF-1 in den durch AZ polarisierten Makrophagen funktionelle Konsequenzen im Bezug auf die Freisetzung von pro-angiogenetischen Faktoren, wie z.B. VEGF, auch unter Normoxie hat. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Mechanismus für die HIF-1-Aktivierung in TAMs vorgestellt. Da HIF-1 durch AZ bereits unter Normoxie aktiviert wird, können TAMs vermutlich bereits in normoxischen Tumorgewebe ihren pro-angiogenetischen Einfluss ausüben. Die gewonnen Ergebnisse tragen dazu bei, das Verständnis, wie regulatorische Makrophagen mechanistisch zur Tumorentwicklung beitragen, zu erweitern.

5.3 Ausblick

In vielen Tumoren kommt es zu einer HIF-1-abhängigen verbesserten Anpassung an die intratumorale Hypoxie sowie einer Resistenz gegen Strahlen- und Chemotherapie. Außerdem konnte auch für Zellen des Tumorstromas, insbesondere Makrophagen, eine verstärkte $HIF-1\alpha$ -Expression und eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression nachgewiesen werden.

Der in dieser Arbeit vorgestellte alternative HIF-1 α -Proteinabbau in Tumorzellen über Calpain bietet möglicherweise einen neuen Ansatz, um bei Patienten mit VHL-Syndrom die HIF-1-vermittelte Chemoresistenz zu inhibieren. Hierfür könnte in einem pVHL-defizienten System nach Aktivierung von Calpain die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika untersucht werden.

Basierend auf dem analysierten Mechanismus der HIF-1-Induktion in Makrophagen unter Normoxie bietet die Analyse der Überstände, der durch AZ polarisierten Makrophagen, einen Ansatz, die Rolle der Makrophagen im Tumorgeschehen weiter zu charakterisieren. Hierbei wäre von besonderem Interesse, welche Faktoren von den polarisierten Makrophagen HIF-1-abhängig sezerniert werden und welche Effekte dadurch in den Zellen des Tumorstromas hervorgerufen werden.

6 LITERATUR

1. Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today*. 2000;6:157-162.
2. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. 2002;196:254-265.
3. Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev*. 2000;14:1983-1991.
4. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2000;35:71-103.
5. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:721-732.
6. Dehne N, Brune B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp Cell Res*. 2009;315:1791-1797.
7. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394:485-490.
8. Goonewardene TI, Sowter HM, Harris AL. Hypoxia-induced pathways in breast cancer. *Microsc Res Tech*. 2002;59:41-48.
9. Josko J, Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit*. 2004;10:RA89-98.
10. Riva C, Chauvin C, Pison C, Leverve X. Cellular physiology and molecular events in hypoxia-induced apoptosis. *Anticancer Res*. 1998;18:4729-4736.
11. Giaccia AJ. Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Semin Radiat Oncol*. 1996;6:46-58.
12. Durand RE. Keynote address: the influence of microenvironmental factors on the activity of radiation and drugs. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991;20:253-258.
13. Moulder JE, Rockwell S. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 1987;5:313-341.
14. Chan DA, Giaccia AJ. Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:333-339.
15. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:319-331.
16. Koong AC, Denko NC, Hudson KM, et al. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res*. 2000;60:883-887.
17. Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol*. 2003;160:781-791.
18. Thews O, Kelleher DK, Vaupel P. Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. *Cancer Res*. 2001;61:1358-1361.
19. Beinert T, Mergenthaler HG, Sezer O, et al. [Hypoxia in solid tumors]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1999;124:534-540.
20. Teicher BA, Ara G, Herbst R, Takeuchi H, Keyes S, Northey D. PEG-hemoglobin: effects on tumor oxygenation and response to chemotherapy. *In Vivo*. 1997;11:301-311.
21. Vaupel P, Hockel M. Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. *Int J Oncol*. 2000;17:869-879.
22. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:225-239.
23. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:266-276.
24. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol*. 2001;28:29-35.
25. Liu L, Ning X, Sun L, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci*. 2008;99:121-128.
26. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005;205:275-292.
27. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2000;11:265-283.
28. Han HK, Han CY, Cheon EP, Lee J, Kang KW. Role of hypoxia-inducible factor- α in hepatitis-B-virus X protein-mediated MDR1 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357:567-573.
29. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*. 2000;88:2606-2618.

30. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999;59:5830-5835.
31. Sufan RI, Jewett MA, Ohh M. The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287:F1-6.
32. Ohh M, Kaelin WG, Jr. VHL and kidney cancer. *Methods Mol Biol.* 2003;222:167-183.
33. Um JH, Kang CD, Bae JH, et al. Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells. *Exp Mol Med.* 2004;36:233-242.
34. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:551-578.
35. Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:1376-1393.
36. Maynard MA, Ohh M. The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64:2170-2180.
37. Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest.* 2007;117:862-865.
38. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:993-998.
39. Huang LE, Bunn HF. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *J Biol Chem.* 2003;278:19575-19578.
40. Shi YH, Fang WG. Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2004;10:1082-1087.
41. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *Faseb J.* 2001;15:1312-1314.
42. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1999;274:6519-6525.
43. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292:468-472.
44. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J.* 2003;22:4082-4090.
45. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001;294:1337-1340.
46. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001;107:43-54.
47. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 2002;111:709-720.
48. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, et al. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell.* 2007;26:63-74.
49. Masson N, Ratcliffe PJ. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *J Cell Sci.* 2003;116:3041-3049.
50. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem.* 2003;278:15911-15916.
51. Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, Michiels C. Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:847-855.
52. Gu J, Milligan J, Huang LE. Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine. *J Biol Chem.* 2001;276:3550-3554.
53. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 2002;16:1466-1471.
54. Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* 2001;12:363-369.
55. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 2000;14:391-396.
56. Conrad PW, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. Hypoxia differentially regulates the mitogen- and stress-activated protein kinases. Role of Ca²⁺/CaM in the activation of MAPK and p38 gamma. *Adv Exp Med Biol.* 2000;475:293-302.
57. Kietzmann T, Jungermann K, Gorlach A. Regulation of the hypoxia-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression by MAP kinases. *Thromb Haemost.* 2003;89:666-673.

58. Alvarez-Tejado M, Naranjo-Suarez S, Jimenez C, Carrera AC, Landazuri MO, del Peso L. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276:22368-22374.
59. Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Simon MC. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 alpha nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *J Biol Chem.* 2002;277:15162-15170.
60. Blouin CC, Page EL, Soucy GM, Richard DE. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood.* 2004;103:1124-1130.
61. Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J.* 2006;396:517-527.
62. Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. Microtubule disruption utilizes an NFkappa B-dependent pathway to stabilize HIF-1alpha protein. *J Biol Chem.* 2003;278:7445-7452.
63. Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J.* 2003;370:1011-1017.
64. Zhou J, Schmid T, Brune B. Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Mol Biol Cell.* 2003;14:2216-2225.
65. Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:755-761.
66. Kim J, Shao Y, Kim SY, et al. Hypoxia-induced IL-18 increases hypoxia-inducible factor-1alpha expression through a Rac1-dependent NF-kappaB pathway. *Mol Biol Cell.* 2008;19:433-444.
67. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* 2007;18:4691-4697.
68. Rius J, Guma M, Schachtrup C, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature.* 2008;453:807-811.
69. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J.* 2008;412:477-484.
70. Niu G, Briggs J, Deng J, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1alpha RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1099-1105.
71. Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Wagner W, Dastyk J. HIF-1alpha is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT. *J Immunol.* 2008;181:1665-1672.
72. Werno C, Zhou J, Brune B. A23187, ionomycin and thapsigargin upregulate mRNA of HIF-1alpha via endoplasmic reticulum stress rather than a rise in intracellular calcium. *J Cell Physiol.* 2008;215:708-714.
73. Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, et al. Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1279-1288.
74. Fandrey J, Frede S, Jelkmann W. Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem J.* 1994;303 (Pt 2):507-510.
75. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem.* 1996;271:32253-32259.
76. Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR, Chandel NS. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283:L922-931.
77. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000;275:26765-26771.
78. Gerald D, Berra E, Frapart YM, et al. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell.* 2004;118:781-794.
79. Postovit LM, Sullivan R, Adams MA, Graham CH. Nitric oxide signalling and cellular adaptations to changes in oxygenation. *Toxicology.* 2005;208:235-248.
80. Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol.* 1999;276:G315-321.
81. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 1994;78:931-936.
82. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357:593-615.

83. Zhang Z, Ren J, Harlos K, McKinnon CH, Clifton IJ, Schofield CJ. Crystal structure of a clavamate synthase-Fe(II)-2-oxoglutarate-substrate-NO complex: evidence for metal centered rearrangements. *FEBS Lett.* 2002;517:7-12.
84. Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7368-7373.
85. Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science.* 2003;302:1975-1978.
86. Callapina M, Zhou J, Schmid T, Kohl R, Brune B. NO restores HIF-1alpha hydroxylation during hypoxia: Role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:925-936.
87. Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, et al. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Biol Chem.* 2004;279:2550-2558.
88. Yasinska IM, Sumbayev VV. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2003;549:105-109.
89. Toescu EC. Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca²⁺ increases. *Cell Calcium.* 2004;36:187-199.
90. Bianchi K, Rimessi A, Prandini A, Szabadkai G, Rizzuto R. Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1742:119-131.
91. Putney JW, Jr. Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol Interv.* 2001;1:84-94.
92. Liu Q, Moller U, Flugel D, Kietzmann T. Induction of plasminogen activator inhibitor I gene expression by intracellular calcium via hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 2004;104:3993-4001.
93. Berchner-Pfannschmidt U, Petrat F, Doege K, et al. Chelation of cellular calcium modulates hypoxia-inducible gene expression through activation of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 2004;279:44976-44986.
94. Metzzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Evidence against a major role for Ca²⁺ in hypoxia-induced gene expression in human hepatoma cells (Hep3B). *J Physiol.* 1999;517 (Pt 3):651-657.
95. Cong J, Goll DE, Peterson AM, Kapprell HP. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J Biol Chem.* 1989;264:10096-10103.
96. Murachi T. Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem Int.* 1989;18:263-294.
97. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003;83:731-801.
98. Thompson VF, Goll DE. Purification of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin from animal tissues. *Methods Mol Biol.* 2000;144:3-16.
99. Saido TC, Mizuno K, Suzuki K. Proteolysis of protein kinase C by calpain: effect of acidic phospholipids. *Biomed Biochim Acta.* 1991;50:485-489.
100. Coolican SA, Hathaway DR. Effect of L-alpha-phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca²⁺-dependent protease. Reduction of the Ca²⁺ requirement for autolysis. *J Biol Chem.* 1984;259:11627-11630.
101. Fernandez-Montalvan A, Assfalg-Machleidt I, Pfeiler D, Fritz H, Jochum M, Machleidt W. Mu-calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca²⁺-activated conformation. *Biol Chem.* 2006;387:617-627.
102. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J.* 1997;328 (Pt 3):721-732.
103. Kunimatsu M, Higashiyama S, Sato K, Ohkubo I, Sasaki M. Calcium dependent cysteine proteinase is a precursor of a chemotactic factor for neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;164:875-882.
104. Edmunds T, Nagainis PA, Sathe SK, Thompson VF, Goll DE. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1077:197-208.
105. Adams DO. Macrophages. *Methods Enzymol.* 1979;58:494-505.
106. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25:677-686.
107. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity.* 2008;28:477-487.
108. Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond).* 2003;104:27-38.
109. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958-969.
110. Johann AM, Barra V, Kuhn AM, Weigert A, von Knethen A, Brune B. Apoptotic cells induce arginase II in macrophages, thereby attenuating NO production. *Faseb J.* 2007;21:2704-2712.

111. Freire-de-Lima CG, Xiao YQ, Gardai SJ, Bratton DL, Schiemann WP, Henson PM. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem.* 2006;281:38376-38384.
112. Johann AM, von Knethen A, Lindemann D, Brune B. Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and attenuates the oxidative burst. *Cell Death Differ.* 2006;13:1533-1540.
113. von Knethen A, Soller M, Tzieply N, et al. PPARgamma1 attenuates cytosol to membrane translocation of PKCalpha to desensitize monocytes/macrophages. *J Cell Biol.* 2007;176:681-694.
114. Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, et al. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *Faseb J.* 2008;22:2629-2638.
115. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity.* 2001;14:715-725.
116. Weigert A, Johann AM, von Knethen A, Schmidt H, Geisslinger G, Brune B. Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. *Blood.* 2006;108:1635-1642.
117. Weigert A, Tzieply N, von Knethen A, et al. Tumor cell apoptosis polarizes macrophages role of sphingosine-1-phosphate. *Mol Biol Cell.* 2007;18:3810-3819.
118. Tomimori Y, Ikawa Y, Oyaizu N. Ultraviolet-irradiated apoptotic lymphocytes produce interleukin-10 by themselves. *Immunol Lett.* 2000;71:49-54.
119. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalten JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997;390:350-351.
120. Reiter I, Krammer B, Schwamberger G. Cutting edge: differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cells on macrophage antitumor activities. *J Immunol.* 1999;163:1730-1732.
121. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:965-975.
122. Bondanza A, Zimmermann VS, Rovere-Querini P, et al. Inhibition of phosphatidylserine recognition heightens the immunogenicity of irradiated lymphoma cells in vivo. *J Exp Med.* 2004;200:1157-1165.
123. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005;7:211-217.
124. Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer.* 2004;40:1660-1667.
125. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23:549-555.
126. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006;66:605-612.
127. Sica A, Saccani A, Bottazzi B, et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol.* 2000;164:762-767.
128. Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol.* 1995;154:3383-3390.
129. Kim J, Modlin RL, Moy RL, et al. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol.* 1995;155:2240-2247.
130. Allavena P, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S, Mantovani A. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev.* 2000;177:141-149.
131. Dirx AE, Oude Egbrink MG, Wagstaff J, Griffioen AW. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2006;80:1183-1196.
132. Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res.* 2002;62:7042-7049.
133. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:618-631.
134. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis.* 2004;25:1543-1549.
135. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.* 2006;66:11238-11246.

136. Hla T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15:513-520.
137. Goetzl EJ, Lynch KR. Preface: the omnific lysophospholipid growth factors. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;905:xi-xiv.
138. Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T, Igarashi Y. Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins.* 2001;64:107-122.
139. Kobayashi N, Nishi T, Hirata T, et al. Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J Lipid Res.* 2006;47:614-621.
140. Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:16394-16399.
141. Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med.* 2005;201:291-301.
142. Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* 2002;531:54-57.
143. Saba JD, Hla T. Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circ Res.* 2004;94:724-734.
144. Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:604-616.
145. Spiegel S, Kolesnick R. Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia.* 2002;16:1596-1602.
146. Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:560-570.
147. Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1585:193-201.
148. Brindley DN. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem.* 2004;92:900-912.
149. Le Stunff H, Peterson C, Liu H, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582:8-17.
150. Mandala SM. Sphingosine-1-phosphate phosphatases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2001;64:143-156.
151. Mandala SM, Thornton R, Galve-Roperh I, et al. Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:7859-7864.
152. Ben-Yosef Y, Miller A, Shapiro S, Lahat N. Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289:C1321-1331.
153. Liu H, Chakravarty D, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002;71:493-511.
154. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:397-407.
155. Alemany R, van Koppen CJ, Danneberg K, Ter Braak M, Meyer Zu Heringdorf D. Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007;374:413-428.
156. Maceyka M, Sankala H, Hait NC, et al. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem.* 2005;280:37118-37129.
157. Bektas M, Jolly PS, Muller C, Eberle J, Spiegel S, Geilen CC. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene.* 2005;24:178-187.
158. Olivera A, Kohama T, Edsall L, et al. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol.* 1999;147:545-558.
159. Sarkar S, Maceyka M, Hait NC, et al. Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett.* 2005;579:5313-5317.
160. Liu H, Toman RE, Goparaju SK, et al. Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278:40330-40336.
161. Igarashi N, Okada T, Hayashi S, Fujita T, Jahangeer S, Nakamura S. Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J Biol Chem.* 2003;278:46832-46839.
162. Francy JM, Nag A, Conroy EJ, Hengst JA, Yun JK. Sphingosine kinase 1 expression is regulated by signaling through PI3K, AKT2, and mTOR in human coronary artery smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1769:253-265.
163. Mastrandrea LD, Sessanna SM, Laychock SG. Sphingosine kinase activity and sphingosine-1-phosphate production in rat pancreatic islets and INS-1 cells: response to cytokines. *Diabetes.* 2005;54:1429-1436.

164. Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, et al. Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *J Biol Chem.* 2004;279:53994-54001.
165. Ahmad M, Long JS, Pyne NJ, Pyne S. The effect of hypoxia on lipid phosphate receptor and sphingosine kinase expression and mitogen-activated protein kinase signaling in human pulmonary smooth muscle cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006;79:278-286.
166. Anelli V, Gault CR, Cheng AB, Obeid LM. Sphingosine kinase 1 is up-regulated during hypoxia in U87MG glioma cells. Role of hypoxia-inducible factors 1 and 2. *J Biol Chem.* 2008;283:3365-3375.
167. Xia P, Gamble JR, Rye KA, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14196-14201.
168. Billich A, Bornancin F, Mechtcheriakova D, Natt F, Huesken D, Baumruker T. Basal and induced sphingosine kinase 1 activity in A549 carcinoma cells: function in cell survival and IL-1beta and TNF-alpha induced production of inflammatory mediators. *Cell Signal.* 2005;17:1203-1217.
169. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature.* 1993;365:557-560.
170. Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D. Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol.* 2002;22:7758-7768.
171. Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, et al. Role of sphingosine kinase in Ca(2+) signalling by epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* 1999;461:217-222.
172. Rius RA, Edsall LC, Spiegel S. Activation of sphingosine kinase in pheochromocytoma PC12 neuronal cells in response to trophic factors. *FEBS Lett.* 1997;417:173-176.
173. Young KW, Challiss RA, Nahorski SR, MacKrell JJ. Lysophosphatidic acid-mediated Ca²⁺ mobilization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells is independent of phosphoinositide signalling, but dependent on sphingosine kinase activation. *Biochem J.* 1999;343 Pt 1:45-52.
174. Johnson KR, Becker KP, Facchinetti MM, Hannun YA, Obeid LM. PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J Biol Chem.* 2002;277:35257-35262.
175. Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, et al. Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *Eur J Pharmacol.* 2001;414:145-154.
176. Olivera A, Rosenthal J, Spiegel S. Effect of acidic phospholipids on sphingosine kinase. *J Cell Biochem.* 1996;60:529-537.
177. Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ. Lysophospholipids--receptor revelations. *Science.* 2001;294:1875-1878.
178. Taha TA, Argraves KM, Obeid LM. Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1682:48-55.
179. Kluk MJ, Hla T. Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582:72-80.
180. Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem.* 2004;92:913-922.
181. Moolenaar WH. Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;905:1-10.
182. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem.* 2002;277:25851-25854.
183. Goetzl EJ, Wang W, McGiffert C, Huang MC, Graler MH. Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J Cell Biochem.* 2004;92:1104-1114.
184. Xia P, Wang L, Moretti PA, et al. Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *J Biol Chem.* 2002;277:7996-8003.
185. El Alwani M, Wu BX, Obeid LM, Hannun YA. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. *Pharmacol Ther.* 2006;112:171-183.
186. Pettus BJ, Bielawski J, Porcelli AM, et al. The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. *Faseb J.* 2003;17:1411-1421.
187. Backlund MG, Mann JR, Dubois RN. Mechanisms for the prevention of gastrointestinal cancer: the role of prostaglandin E2. *Oncology.* 2005;69 Suppl 1:28-32.
188. Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol.* 2005;25:11113-11121.

189. Endo K, Igarashi Y, Nisar M, Zhou QH, Hakomori S. Cell membrane signaling as target in cancer therapy: inhibitory effect of N,N-dimethyl and N,N,N-trimethyl sphingosine derivatives on in vitro and in vivo growth of human tumor cells in nude mice. *Cancer Res.* 1991;51:1613-1618.
190. Yamashita H, Kitayama J, Shida D, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor expression profile in human gastric cancer cells: differential regulation on the migration and proliferation. *J Surg Res.* 2006;130:80-87.
191. Kim JH, Kim JH, Song WK, Kim JH, Chun JS. Sphingosine 1-phosphate activates Erk-1/-2 by transactivating epidermal growth factor receptor in rat-2 cells. *IUBMB Life.* 2000;50:119-124.
192. Le Stunff H, Mikami A, Giussani P, et al. Role of sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in epidermal growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem.* 2004;279:34290-34297.
193. Van Brocklyn JR, Young N, Roof R. Sphingosine-1-phosphate stimulates motility and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett.* 2003;199:53-60.
194. Sabbadini RA. Targeting sphingosine-1-phosphate for cancer therapy. *Br J Cancer.* 2006;95:1131-1135.
195. Argraves KM, Wilkerson BA, Argraves WS, Fleming PA, Obeid LM, Drake CJ. Sphingosine-1-phosphate signaling promotes critical migratory events in vasculogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279:50580-50590.
196. Chae SS, Paik JH, Furneaux H, Hla T. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest.* 2004;114:1082-1089.
197. Xia P, Gamble JR, Wang L, et al. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol.* 2000;10:1527-1530.
198. French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, et al. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res.* 2003;63:5962-5969.
199. Johnson KR, Johnson KY, Crellin HG, et al. Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:1159-1166.
200. Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, et al. Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell.* 2006;9:225-238.
201. Xia P, Wang L, Gamble JR, Vadas MA. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor- α inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999;274:34499-34505.
202. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, et al. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature.* 1985;316:701-705.
203. ten Dijke P, Geurts van Kessel AH, Foulkes JG, Le Beau MM. Transforming growth factor type β 3 maps to human chromosome 14, region q23-q24. *Oncogene.* 1988;3:721-724.
204. Derynck R, Lindquist PB, Lee A, et al. A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3. *Embo J.* 1988;7:3737-3743.
205. Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:597-641.
206. Massague J. The TGF- β family of growth and differentiation factors. *Cell.* 1987;49:437-438.
207. Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor β . *Biochim Biophys Acta.* 1990;1032:79-87.
208. Sporn MB, Roberts AB. TGF- β : problems and prospects. *Cell Regul.* 1990;1:875-882.
209. Gotschl M, Hofler P, Bauer G. Reactivity to TGF- β is one step towards transformation in a murine fibroblast cell line. *Int J Cancer.* 1992;51:139-143.
210. Vossbeck H, Strahm B, Hofler P, Bauer G. Direct transforming activity of TGF- β on rat fibroblasts. *Int J Cancer.* 1995;61:92-97.
211. Wahl SM. Transforming growth factor β : the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med.* 1994;180:1587-1590.
212. Wrana JL. TGF- β receptors and signalling mechanisms. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24:120-130.
213. Massague J. How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:169-178.
214. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113:685-700.
215. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* 2009;19:128-139.
216. Yu L, Hebert MC, Zhang YE. TGF- β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- β responses. *Embo J.* 2002;21:3749-3759.
217. Bein K, Odell-Fiddler ET, Drinane M. Role of TGF- β 1 and JNK signaling in capillary tube patterning. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C1012-1022.
218. Jakowlew SB. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:435-457.
219. Serrati S, Margheri F, Pucci M, et al. TGF β 1 antagonistic peptides inhibit TGF β 1-dependent angiogenesis. *Biochem Pharmacol.* 2009;77:813-825.

220. Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*. 1997;14:2475-2483.
221. Lamar JM, Iyer V, DiPersio CM. Integrin $\alpha 3\beta 1$ potentiates TGF β -mediated induction of MMP-9 in immortalized keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2008;128:575-586.
222. Jeon SH, Chae BC, Kim HA, et al. Mechanisms underlying TGF- β 1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2007;81:557-566.
223. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR. Inhibition of transforming growth factor- β activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res*. 2002;62:6021-6025.
224. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, et al. TGF- β signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*. 2004;303:848-851.
225. Kono Y, Nishiuma T, Nishimura Y, et al. Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF- β 1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37:395-404.
226. Abdul-Hafez A, Shu R, Uhal BD. JunD and HIF-1 α mediate transcriptional activation of angiotensinogen by TGF- β 1 in human lung fibroblasts. *Faseb J*. 2009;23:1655-1662.
227. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 2001;29:117-129.
228. Lu H, Huan C. Transcription factor NFAT, its role in cancer development, and as a potential target for chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7:343-353.
229. Yan Y, Li J, Ouyang W, et al. NFAT3 is specifically required for TNF- α -induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and transformation of C141 cells. *J Cell Sci*. 2006;119:2985-2994.
230. Jimenez JL, Iniguez MA, Munoz-Fernandez MA, Fresno M. Effect of phosphodiesterase 4 inhibitors on NFAT-dependent cyclooxygenase-2 expression in human T lymphocytes. *Cell Signal*. 2004;16:1363-1373.
231. Jiang H, Yamamoto S, Nishikawa K, Kato R. Anti-tumor-promoting action of FK506, a potent immunosuppressive agent. *Carcinogenesis*. 1993;14:67-71.
232. Stankunas K, Graef IA, Neilson JR, Park SH, Crabtree GR. Signaling through calcium, calcineurin, and NF-AT in lymphocyte activation and development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:505-516.
233. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:707-747.
234. Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, et al. L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature*. 1999;401:703-708.
235. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7214-7219.
236. Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*. 2001;20:2476-2489.
237. Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol*. 1995;7:333-342.
238. Kel A, Kel-Margoulis O, Babenko V, Wingender E. Recognition of NFATp/AP-1 composite elements within genes induced upon the activation of immune cells. *J Mol Biol*. 1999;288:353-376.
239. Cockerill PN, Shannon MF, Bert AG, Ryan GR, Vadas MA. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin 3 locus is regulated by an inducible cyclosporin A-sensitive enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:2466-2470.
240. Furuke K, Shiraiishi M, Mostowski HS, Bloom ET. Fas ligand induction in human NK cells is regulated by redox through a calcineurin-nuclear factors of activated T cell-dependent pathway. *J Immunol*. 1999;162:1988-1993.
241. Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2000;275:23627-23635.
242. Amasaki Y, Miyatake S, Arai N, Arai K. Regulation of nuclear factor of activated T-cell family transcription factors during T-cell development in the thymus. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:S1-9.
243. Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity*. 2001;14:13-20.
244. Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG. Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell*. 1998;1:627-637.

245. Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell*. 1999;96:611-614.
246. Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem*. 1998;273:13367-13370.
247. Stemmer PM, Klee CB. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry*. 1994;33:6859-6866.
248. Sagoo JK, Fruman DA, Wesselborg S, Walsh CT, Bierer BE. Competitive inhibition of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain. *Biochem J*. 1996;320 (Pt 3):879-884.
249. Wesselborg S, Fruman DA, Sagoo JK, Bierer BE, Burakoff SJ. Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFATp). *J Biol Chem*. 1996;271:1274-1277.
250. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:3686-3690.
251. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, et al. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature*. 1995;378:641-644.
252. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today*. 1992;13:136-142.
253. Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, et al. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell*. 2000;6:539-550.
254. Ohno M, Fornerod M, Mattaj IW. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell*. 1998;92:327-336.
255. Neilson J, Stankunas K, Crabtree GR. Monitoring the duration of antigen-receptor occupancy by calcineurin/glycogen-synthase-kinase-3 control of NF-AT nuclear shuttling. *Curr Opin Immunol*. 2001;13:346-350.
256. Kiani A, Rao A, Aramburu J. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity*. 2000;12:359-372.
257. Gomez del Arco P, Martinez-Martinez S, Maldonado JL, Ortega-Perez I, Redondo JM. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem*. 2000;275:13872-13878.
258. Herr B, Zhou J, Werno C, et al. The supernatant of apoptotic cells causes transcriptional activation of HIF-1 α in macrophages via sphingosine-1-phosphate and transforming growth factor- β . *Blood*. 2009.
259. Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*. 1986;323:445-448.
260. Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*. 1993;13:473-486.
261. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, et al. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003;112:645-657.
262. Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K, Modaresi S, Jungermann K. Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor α -subunits, HIF1 α , HIF2 α and HIF3 α , in rat liver. *Biochem J*. 2001;354:531-537.
263. Yang J, Rothermel B, Vega RB, et al. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res*. 2000;87:E61-68.
264. Gnaiger E. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control* (ed 1st edition). Innsbruck: OROBOROS® MiPNet Publications; 2007.
265. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260:3440-3450.
266. Zhou J, Kohl R, Herr B, Frank R, Brune B. Calcipain mediates a von Hippel-Lindau protein-independent destruction of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Biol Cell*. 2006;17:1549-1558.
267. Cawley SM, Sawyer CL, Brunelle KF, van der Vliet A, Dostmann WR. Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. 2007;19:1023-1033.
268. Covacu R, Danilov AI, Rasmussen BS, et al. Nitric oxide exposure diverts neural stem cell fate from neurogenesis towards astroglialogenesis. *Stem Cells*. 2006;24:2792-2800.
269. Thomas DD, Ridnour LA, Espey MG, et al. Superoxide Fluxes Limit Nitric Oxide-induced Signaling. *J Biol Chem*. 2006;281:25984-25993.
270. Kohl R, Zhou J, Brune B. Reactive oxygen species attenuate nitric-oxide-mediated hypoxia-inducible factor-1 α stabilization. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1430-1442.
271. Hannig M, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. Control of leukocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue. *J Cell Mol Med*. 2008. Prepublished on July 9, 2008, as DOI 10.1111/j.1582-4934.2008.00424.x.

272. Xin C, Ren S, Kleuser B, et al. Sphingosine 1-phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor-beta-induced cell responses. *J Biol Chem.* 2004;279:35255-35262.
273. Bu S, Kapanadze B, Hsu T, Trojanowska M. Opposite effects of dihydrosphingosine 1-phosphate and sphingosine 1-phosphate on transforming growth factor-beta/Smad signaling are mediated through the PTEN/PPM1A-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2008;283:19593-19602.
274. Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:383-408.
275. Fang Y, Sullivan R, Graham CH. Confluence-dependent resistance to doxorubicin in human MDA-MB-231 breast carcinoma cells requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Exp Cell Res.* 2007;313:867-877.
276. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem.* 2004;279:24218-24225.
277. Krishnamurthy P, Schuetz JD. The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals.* 2005;18:349-358.
278. Whiteman M, Armstrong JS, Cheung NS, et al. Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains. *Faseb J.* 2004;18:1395-1397.
279. Um JH, Kang CD, Bae JH, et al. Association of DNA-dependent protein kinase with hypoxia inducible factor-1 and its implication in resistance to anticancer drugs in hypoxic tumor cells. *Exp Mol Med.* 2004;36:233-242.
280. Datta K, Li J, Bhattacharya R, Gasparian L, Wang E, Mukhopadhyay D. Protein kinase C zeta transactivates hypoxia-inducible factor alpha by promoting its association with p300 in renal cancer. *Cancer Res.* 2004;64:456-462.
281. Callapina M, Zhou J, Schnitzer S, et al. Nitric oxide reverses desferrioxamine- and hypoxia-evoked HIF-1alpha accumulation--implications for prolyl hydroxylase activity and iron. *Exp Cell Res.* 2005;306:274-284.
282. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood.* 1993;82:3610-3615.
283. Petrat F, de Groot H, Sustmann R, Rauen U. The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Chem.* 2002;383:489-502.
284. Kozhukhar AV, Yasinska IM, Sumbayev VV. Nitric oxide inhibits HIF-1alpha protein accumulation under hypoxic conditions: implication of 2-oxoglutarate and iron. *Biochimie.* 2006;88:411-418.
285. Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brune B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell.* 2003;14:3470-3481.
286. Alvarez-Tejado M, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, Landazuri MO, del Peso L. Lack of evidence for the involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factors by low oxygen tension. *J Biol Chem.* 2002;277:13508-13517.
287. Baader E, Tschank G, Baringhaus KH, Burghard H, Gunzler V. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase by oxalyl amino acid derivatives in vitro, in isolated microsomes and in embryonic chicken tissues. *Biochem J.* 1994;300 (Pt 2):525-530.
288. Mailhes JB, Hilliard C, Lowery M, London SN. MG-132, an inhibitor of proteasomes and calpains, induced inhibition of oocyte maturation and aneuploidy in mouse oocytes. *Cell Chromosome.* 2002;1:2.
289. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1998;18:30-38.
290. Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem (Tokyo).* 1996;119:572-576.
291. Dick LR, Cruikshank AA, Grenier L, Melandri FD, Nunes SL, Stein RL. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem.* 1996;271:7273-7276.
292. Mori S, Tanaka K, Omura S, Saito Y. Degradation process of ligand-stimulated platelet-derived growth factor beta-receptor involves ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *J Biol Chem.* 1995;270:29447-29452.
293. Murachi T. Calcium-dependent proteinases and specific inhibitors: calpain and calpastatin. *Biochem Soc Symp.* 1984;49:149-167.
294. Nanduri J, Yuan G, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Transcriptional responses to intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;164:277-281.
295. Matarrese P, Straface E, Pietraforte D, et al. Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *Faseb J.* 2005;19:416-418.
296. Pan BX, Zhao GL, Huang XL, Zhao KS. Mobilization of intracellular calcium by peroxynitrite in arteriolar smooth muscle cells from rats. *Redox Rep.* 2004;9:49-55.

297. Schweizer M, Richter C. Peroxynitrite stimulates the pyridine nucleotide-linked Ca²⁺ release from intact rat liver mitochondria. *Biochemistry*. 1996;35:4524-4528.
298. Agani FH, Puchowicz M, Chavez JC, Pichiule P, LaManna J. Role of nitric oxide in the regulation of HIF-1 α expression during hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C178-186.
299. Wellman TL, Jenkins J, Penar PL, Tranmer B, Zahr R, Lounsbury KM. Nitric oxide and reactive oxygen species exert opposing effects on the stability of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in explants of human pial arteries. *Faseb J*. 2004;18:379-381.
300. Matthews NE, Adams MA, Maxwell LR, Gofton TE, Graham CH. Nitric oxide-mediated regulation of chemosensitivity in cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:1879-1885.
301. Frederiksen LJ, Siemens DR, Heaton JP, Maxwell LR, Adams MA, Graham CH. Hypoxia induced resistance to doxorubicin in prostate cancer cells is inhibited by low concentrations of glyceryl trinitrate. *J Urol*. 2003;170:1003-1007.
302. Frederiksen LJ, Sullivan R, Maxwell LR, et al. Chemosensitization of cancer in vitro and in vivo by nitric oxide signaling. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2199-2206.
303. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004;118:285-296.
304. Zamboni DS, Rabinovitch M. Phagocytosis of apoptotic cells increases the susceptibility of macrophages to infection with *Coxiella burnetii* phase II through down-modulation of nitric oxide production. *Infect Immun*. 2004;72:2075-2080.
305. Johann AM, Weigert A, Eberhardt W, et al. Apoptotic cell-derived sphingosine-1-phosphate promotes HuR-dependent cyclooxygenase-2 mRNA stabilization and protein expression. *J Immunol*. 2008;180:1239-1248.
306. Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, et al. HIF-1 α , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene*. 2005;24:3110-3120.
307. Osthus RC, Shim H, Kim S, et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem*. 2000;275:21797-21800.
308. Weis N, Weigert A, von Knethen A, Brune B. Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Mol Biol Cell*. 2009;20:1280-1288.
309. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, et al. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*. 1999;99:301-312.
310. Liu Y, Wada R, Yamashita T, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*. 2000;106:951-961.
311. Jiang LI, Collins J, Davis R, et al. Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *J Biol Chem*. 2007;282:10576-10584.
312. Hughes JE, Srinivasan S, Lynch KR, Proia RL, Ferdek P, Hedrick CC. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res*. 2008;102:950-958.
313. Srinivasan S, Bolick DT, Lukashev D, et al. Sphingosine-1-phosphate reduces CD4⁺ T-cell activation in type 1 diabetes through regulation of hypoxia-inducible factor short isoform I.1 and CD69. *Diabetes*. 2008;57:484-493.
314. Michaud MD, Robitaille GA, Gratton JP, Richard DE. Sphingosine-1-phosphate: a novel nonhypoxic activator of hypoxia-inducible factor-1 in vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:902-908.
315. Ader I, Brizuela L, Bouquerel P, Malavaud B, Cuvillier O. Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1 α during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68:8635-8642.
316. Jennewein C, Kuhn AM, Schmidt MV, et al. Sumoylation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by apoptotic cells prevents lipopolysaccharide-induced NCoR removal from kappaB binding sites mediating transrepression of proinflammatory cytokines. *J Immunol*. 2008;181:5646-5652.
317. David KC, Scott RH, Nixon GF. Advanced glycation endproducts induce a proliferative response in vascular smooth muscle cells via altered calcium signaling. *Biochem Pharmacol*. 2008;76:1110-1120.
318. Liu Q, Busby JC, Molkentin JD. Interaction between TAK1-TAB1-TAB2 and RCAN1-calcineurin defines a signalling nodal control point. *Nat Cell Biol*. 2009;11:154-161.
319. De Ponti C, Carini R, Alchera E, et al. Adenosine A2a receptor-mediated, normoxic induction of HIF-1 through PKC and PI-3K-dependent pathways in macrophages. *J Leukoc Biol*. 2007;82:392-402.
320. Zhong H, Willard M, Simons J. NS398 reduces hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 activity: multiple-level effects involving cyclooxygenase-2 dependent and independent mechanisms. *Int J Cancer*. 2004;112:585-595.

321. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med.* 2001;193:727-740.
322. Varney ML, Olsen KJ, Mosley RL, Singh RK. Paracrine regulation of vascular endothelial growth factor--a expression during macrophage-melanoma cell interaction: role of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage colony-stimulating factor. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25:674-683.
323. Chen WT, Hung WC, Kang WY, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in urothelial carcinoma in conjunction with tumor-associated-macrophage infiltration, hypoxia-inducible factor-1alpha expression, and tumor angiogenesis. *Apmis.* 2009;117:176-184.
324. Covello KL, Kehler J, Yu H, et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 2006;20:557-570.
325. Doege K, Heine S, Jensen I, Jelkmann W, Metzen E. Inhibition of mitochondrial respiration elevates oxygen concentration but leaves regulation of hypoxia-inducible factor (HIF) intact. *Blood.* 2005;106:2311-2317.
326. Jakobsson L, Kreuger J, Claesson-Welsh L. Building blood vessels--stem cell models in vascular biology. *J Cell Biol.* 2007;177:751-755.
327. Jakobsson L, Domogatskaya A, Tryggvason K, Edgar D, Claesson-Welsh L. Laminin deposition is dispensable for vasculogenesis but regulates blood vessel diameter independent of flow. *Faseb J.* 2008;22:1530-1539.

7 PUBLIKATIONEN

- Zhou J, Kohl R, Herr B, Frank R, Brune B. Calpain mediates a von Hippel-Lindau protein-independent destruction of hypoxia-inducible factor-1alpha. Mol Biol Cell. 2006;17:1549-1558.
- Herr B, Zhou J, Drose S, Brune B. The interaction of superoxide with nitric oxide destabilizes hypoxia-inducible factor-1alpha. Cell Mol Life Sci. 2007;64:3295-3305
- Herr B, Zhou J, Werno C, *et al.* The supernatant of apoptotic cells causes transcriptional activation of HIF-1 α in macrophages via sphingosine-1-phosphate and transforming growth factor- β . Blood. 2009. DOI 10.1182/blood-2009-01-201889

VORTRÄGE

Vortrag beim 12. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung in Xanten (7.12.-9.12.2006)(Titel: Formation of superoxide under hypoxia in combination with nitric oxide destabilizes HIF-1 α in RCC4 cells)

8 CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Vorname	Barbara
Nachname	Herr
Geburtsdatum	02.01.1980
Geburtsort	Mannheim
Nationalität	deutsch

AKADEMISCHER WERDEGANG

10.2005 – 06.2009	Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie I zur Durchführung der Promotion (Prof. Dr. Bernhard Brüne), Klinikum der Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Betreuung an der Goethe-Universität durch Prof. Dr. Holger Stark)
10.2000 – 09.2005	Studium an der Technischen Universität Kaiserslautern im Studiengang Diplom-Biologie Externe Diplomarbeit am Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Biochemie I Promotion (Prof. Dr. Bernhard Brüne) (Thema: Reaktive Sauerstoffspezies vermittelte HIF-1 α Regulierung durch Calcium/Calpain unter Hypoxie und Stickstoffmonoxid)
1997 – 1998	Austauschjahr in Latham, Kansas, USA mit Besuch der 12. Klasse der High School in Burden, KS
1986 – 2000	Schulbildung in Leer, Abschluss mit der Allgemeine Hochschulreife am Ubbo-Emmius-Gymnasium Leer