

**Die Bedeutung
des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors HIF-1
für die maligne Progression des humanen Magenkarzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Nadine Rohwer

aus Berlin

März 2009

Die vorliegende Arbeit wurde an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie in der Arbeitsgruppe „Hypoxie und maligne Progression“ von PD Dr. Thorsten Cramer angefertigt.

Gutachter

1. Gutachter: PD Dr. Andreas Sturm
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schuster

Disputation am 25.06.2009

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur angegebene Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Hochschule zur Promotion vorgelegt.

Berlin, März 2009

Nadine Rohwer

Die vorliegende Dissertation wurde als kumulative Arbeit eingereicht. Grundlage dieser Arbeit sind die folgenden Publikationen:

Rohwer N, Lobitz S, Daskalow K, Jöns T, Vieth M, Schlag PM, Kemmner W, Wiedenmann B, Cramer T and Höcker M.

HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells.

British Journal of Cancer 2009, 100 (5): 772-781.

[doi: 10.1038/sj.bjc.6604919](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604919)

Rohwer N, Welzel M, Daskalow K, Pfander D, Wiedenmann B, Detjen K and Cramer T.

Hypoxia-inducible factor 1 α mediates anoikis resistance via suppression of α 5 integrin.

Cancer Research 2008, 68 (24): 10113-10120.

[doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1839](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1839)

Rohwer N, Dame C, Haugstetter A, Wiedenmann B, Detjen K, Schmitt CA and Cramer T.

Hypoxia-inducible factor 1 α determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF- κ B.

PLoS ONE 2010, 5 (8): e12038.

[doi: 10.1371/journal.pone.0012038](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012038)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Krebs	1
1.1.1 Molekulare Grundlagen der Karzinogenese.....	1
1.1.2 Metastasierung	3
1.1.3 Bedeutung von Zellzyklus und Apoptose bei der Karzinogenese.....	5
1.1.4 Chemotherapie und Resistenzmechanismen	7
1.2 Das Magenkarzinom	9
1.2.1 Ätiologie und Risikofaktoren	9
1.2.2 Klassifikation	9
1.2.3 Therapie und Prognose.....	10
1.3 Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1).....	11
1.3.1 Struktureller Aufbau von HIF-1	11
1.3.2 Regulation der Aktivität von HIF-1	12
1.3.3 Funktion von HIF-1 und HIF-1-regulierte Genprodukte	14
1.3.4 Bedeutung von HIF-1 für die Tumorbilogie	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Veröffentlichte Ergebnisse	17
2.1 Manuskript I: “HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells”	18
2.1.1 Zusammenfassung.....	18
2.1.2 Publikation	19
2.2 Manuskript II: “Hypoxia-inducible factor 1 α mediates anoikis resistance via suppression of α 5 integrin”	20
2.2.1 Zusammenfassung.....	20
2.2.2 Publikation	21
2.3 Manuskript III: “Hypoxia-inducible factor 1 α determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF- κ B”	22
2.3.1 Zusammenfassung.....	22
2.3.2 Publikation	23

3	Diskussion	24
3.1	Expression von HIF-1 α im humanen Magenkarzinom	24
3.2	Bedeutung von HIF-1 für die Metastasierung des humanen Magenkarzinoms	26
3.2.1	Vermittlung von Zellmotilität und invasivem Wachstum	26
3.2.2	Vermittlung von Anoikisresistenz.....	28
3.2.3	Vermittlung der Endothelzellinteraktion.....	31
3.3	Bedeutung von HIF-1 für die Vermittlung von Chemoresistenz im humanen Magenkarzinom.....	32
3.4	Klinische Relevanz und Ausblick	36
3.4.1	HIF-1 als protumorigener Faktor des humanen Magenkarzinoms?	36
3.4.2	Inhibition von HIF-1 als Therapieoption für das humane Magenkarzinom?	38
4	Zusammenfassung	41
5	Summary	42
	Literaturverzeichnis.....	43
	Danksagung.....	60
	Publikationen und Kongressbeiträge	62
	Lebenslauf.....	66

Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-Allyl-Aminogeldanamycin
2ME2	2-Methoxyestradiol
5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AMF	<i>Autocrine motility factor</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
Apo-1	<i>Apoptosis antigen 1</i>
ARD1	<i>Arrest defective protein 1</i>
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (HIF-1β)</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma/leukemia-2</i>
Bcl-X _L	<i>Basal cell lymphoma extra large</i>
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BNIP3	<i>Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDA interacting protein 3</i>
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
C	Cytosin
CA IX	Carbonische Anhydrase IX
Caspase	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Protease
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CXCR4	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
Cyr61	<i>Cysteine-rich protein 61</i>
DCC	<i>Deleted in colon cancer</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodonium
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERBB2	HER2/neu (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fas	<i>Fibroblast associated</i>
FIH-1	<i>Factor inhibiting HIF-1</i>
G	Guanin
Glut	Glukosetransporter
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HRE	<i>Hypoxia-responsive element</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
I κ B α	<i>Inhibitor of kappa B α</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>

<i>K-ras</i>	<i>Kirsten Ras</i>
LDHA	Lactatdehydrogenase A
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
<i>MET</i>	<i>Mesenchymal-epithelial transition factor</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ODD	<i>Oxygen dependent degradation</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
PAS	PER-ARNT-SIM
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1
PGK	Phosphoglyceratkinase
Pgp	P-Glykoprotein
PHD	Prolylhydroxylase
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PRIMA-1	<i>p53 reactivation and induction of massive apoptosis</i>
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
R	Adenin oder Guanin
<i>Ras</i>	<i>Rat sarcoma virus oncogene cellular homolog</i>
<i>Rb</i>	Retinoblastomgen (Protein: pRb)
Rbx1	<i>Ring-box 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SMAD	<i>Sma and mad related protein</i>
<i>Src</i>	<i>Rous sarcoma virus oncogene cellular homolog</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TCF3	<i>Transcription factor 3</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
uPAR	uPA Rezeptor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<i>VHL</i>	Von Hippel-Lindau Gen (Protein: pVHL)
WHO	<i>World Health Organization</i>
<i>XPA</i>	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>
YC-1	3-(5'-Hydroxy-Methyl-2'-Furyl)-1-Benzylindazol
ZFHX1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Modell zur Karzinogenese am Beispiel des kolorektalen Karzinoms.	2
Abb. 2 Sequenz der Einzelschritte bei der Metastasierung.	4
Abb. 3 Vereinfachte Darstellung der beiden Hauptsignalwege der Apoptose.	6
Abb. 4 Proteinstruktur des humanen HIF-1 α	12
Abb. 5 Regulation von HIF-1.	13
Abb. 6 Regulation des Energiemetabolismus durch HIF-1.	31
Abb. 7 Angriffspunkte der pharmakologischen Inhibition von HIF-1.	38

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Eigenanteil an den Manuskripten der vorliegenden kumulativen Dissertation [in %].	17
---	----

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebserkrankungen stellen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar [1]. Als Krebs bezeichnet man im weitesten Sinne alle bösartigen (malignen) Tumoren, wobei der Begriff Tumor definiert ist als eine Neubildung von Gewebe [2]. Maligne Tumoren unterscheiden sich von gutartigen (benignen) Tumoren im Wesentlichen durch ihren infiltrativen und metastasierenden Wachstumscharakter [2]. Hinsichtlich des Gewebes, aus dem maligne solide Tumoren hervorgehen, unterscheidet man Karzinome und Sarkome. Karzinome sind epithelialen Ursprungs, wohingegen sich Sarkome vom Mesenchym ableiten. Ungefähr 80% aller humanen Krebserkrankungen sind Karzinome, z.B. das kolorektale Karzinom, das Mamma- oder das Magenkarzinom. Das Wissen über die molekularen und zellbiologischen Mechanismen der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen ist immer noch unzureichend. In den letzten Jahrzehnten hat sich jedoch das grundlegende Verständnis der kausalen Tumorphathogenese deutlich verbessert. Aufgrund der Vielfalt und Komplexität von Tumorerkrankungen stellt die genaue Charakterisierung der molekularen Vorgänge in der Tumorzelle, beginnend bei der malignen Transformation bis hin zur Therapieresistenz etablierter Tumoren und Metastasen, die Grundlage für die Entwicklung innovativer und wirksamer Therapieansätze dar.

1.1.1 Molekulare Grundlagen der Karzinogenese

Krebs ist eine multifaktorielle, genetisch bedingte Erkrankung. Krebserkrankungen unterscheiden sich in zwei wichtigen Punkten von anderen genetischen Erkrankungen: (i) Krebserkrankungen gehen in der Regel auf somatische Mutationen zurück und (ii) bei der Entstehung von Krebs bedarf es nicht nur einer einzigen Mutation, sondern einer Akkumulation mehrerer genetischer Mutationen [3]. Damit handelt es sich bei dem Vorgang der Karzinogenese um einen sehr komplexen, mehrstufigen Prozess, der auch als somatische Mikroevolution interpretiert werden kann [4,5]. Im Verlauf dieses evolutionären Prozesses erwerben nicht-transformierte Zellen schrittweise durch mehrere unabhängige Mutationen gefolgt von der Selektion die Eigenschaften des malignen Tumors. Ein beeindruckendes und sehr gut untersuchtes Beispiel ist das von Eric Fearon und Bert Vogelstein aufgestellte genetische Modell der kolorektalen Karzinogenese [6]. In diesem Modell ist eine typische Abfolge genetischer Alterationen beschrieben, die über das Zwischenstadium des benignen Adenoms zur Entwicklung eines malignen Karzinoms aus normalem Darmepithelium führen kann (Abb. 1).

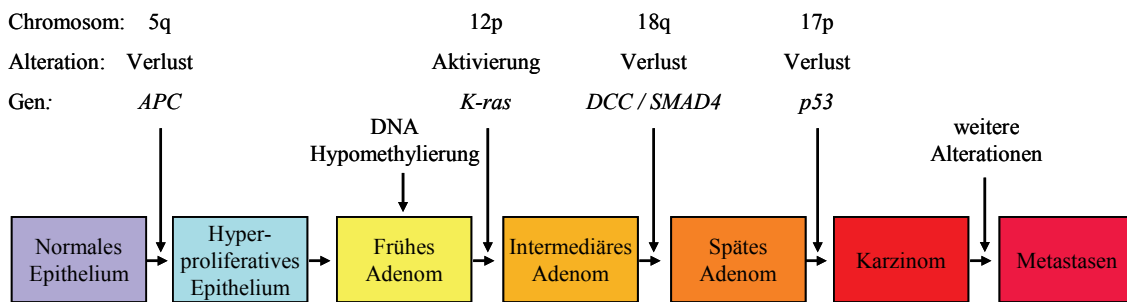


Abb. 1 Modell zur Karzinogenese am Beispiel des kolorektalen Karzinoms.

Bei einem Großteil aller kolorektalen Karzinome sind Mutationen, die das Tumorsuppressorgen *APC* betreffen, der erste oder zumindest ein sehr früher Schritt der Krebsentstehung. Anschließend fördern dann besonders häufig Mutationen in dem Onkogen *K-ras*, dem Tumorsuppressorgen *p53* sowie in Genen des Chromosoms 18, wie dem *SMAD4*- oder *DCC*-Gen, die Tumorprogression und führen zur Ausbildung des invasiven kolorektalen Karzinoms [3]. (modifiziert nach Fearon & Vogelstein [6])

Die Gene, deren Alterationen für die Ausbildung eines malignen Tumors verantwortlich sind, werden in drei Gruppen unterteilt [7]:

1. Proto-Onkogene (Onkogene),
2. Tumorsuppressorgene,
3. Mutator- oder Stabilitätsgene.

Proto-Onkogene sind Gene, deren Genprodukte an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt sind, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Tyrosin-spezifische Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren [8]. Durch Alterationen wie Punktmutationen, Chromosomen-Translokationen oder Gen-Amplifikationen werden Proto-Onkogene in Onkogene umgewandelt [9], die dadurch ihre regulierende Wirkung auf die Zellproliferation verlieren und zum unkontrollierten Zellwachstum führen. Infolge der Transformation erfahren die Genprodukte der Onkogene eine dauerhafte Aktivitätssteigerung bzw. werden konstitutiv exprimiert. In der Regel ist für die Aktivierung eines Onkogens eine Mutation in einem der beiden Allele des Proto-Onkogens ausreichend. Beispiele für Onkogene sind *K-ras*, *BRAF* und *Src* [7].

Tumorsuppressorgene sind definiert als Gene, die durch Funktionsverlust ihre tumorhemmende Wirkung verlieren und dadurch die Tumorbildung fördern. Nach der „*Two-Hit*“-Hypothese sind Tumorsuppressorgene rezessiv, demzufolge erfordert der Funktionsverlust eine Inaktivierung beider Allele des Tumorsuppressorgens [10,11]. Neuere Untersuchungen haben hingegen gezeigt, dass für manche Tumorsuppressorgene eine Haploinsuffizienz¹ besteht [12-14]. Viele der bekannten Tumorsuppressorgene kodieren für Genprodukte, die die Zellproliferation direkt oder indirekt negativ regulieren oder aber die Apoptose einleiten können. Bekannte Tumorsuppressorgene sind beispielsweise *p53*, das Retinoblastomgen *Rb* und das *APC*-Gen [3].

Neben Onkogenen und Tumorsuppressorgen bilden Mutator- oder Stabilitätsgene die dritte Gruppe von tumorrelevanten Genen. Die Stabilitätsgene erhalten die Integrität des Genoms, indem sie genetische Alterationen auf ein Minimum reduzieren [7]. Sie kodieren für Genprodukte, die an der

¹ Das heißt, ein intaktes Allel ist nicht ausreichend, um die Gesamtfunktion des Genprodukts zu erhalten, und die Inaktivierung eines Allels kann bereits zur Tumorprogression beitragen.

Mismatch-Reparatur, der Nukleotid-Exzisionsreparatur, der Basen-Exzisionsreparatur sowie an Reparaturmechanismen bei DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind [15]. Im Gegensatz zu Onkogenen und Tumorsuppressorgenen fördern Stabilitätsgene damit nicht direkt die Tumorinitiation, sondern vielmehr führt deren Inaktivierung zu einer erhöhten Mutationsrate aller Gene inklusive der Onkogene und Tumorsuppressorgene. Bekannte Beispiele sind das *ATM*-Gen sowie das *XPA*-Gen [7]. Mutationen in diesen drei Gruppen von krebsdisponierenden Genen können auch in Zellen der Keimbahn auftreten, was in einer vererbaren Prädisposition für Krebs resultiert.

Trotz der Komplexität und Diversität der verschiedenen Krebserkrankungen postulierten Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg, dass Tumorzellen im Verlauf der malignen Progression mindestens sechs essenzielle Eigenschaften erwerben [16]. Es handelt sich dabei um:

1. die Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren,
2. die Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Wachstumsfaktoren,
3. die Resistenz gegenüber der Apoptose,
4. das unbegrenzte Replikationspotential,
5. die Induktion der Angiogenese,
6. die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung.

Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Krebserkrankungen u.a. in den genetischen Alterationen, wie diese Eigenschaften erworben wurden, sowie in der Abfolge, in der sie erworben wurden. Können sich Tumorzellen eine dieser Eigenschaften nicht aneignen, so stellt dies einen Hinderungsgrund für die Initiation und Progression eines Tumors dar, womit sich auch ein Ansatz für die Therapie von Krebserkrankungen eröffnet. Im Folgenden werden einige dieser Kennzeichen von Krebszellen näher erläutert.

1.1.2 Metastasierung

Ein entscheidendes Charakteristikum maligner Tumoren ist die Fähigkeit einzelner Tumorzellen, sich vom Primärtumor zu lösen und an zum Teil weit vom Primärtumor entfernten Lokalisationen Sekundärtumoren, sog. Metastasen, zu bilden. Das Ausmaß der Metastasierung bestimmt maßgeblich die Prognose und Therapiemöglichkeiten von Krebserkrankungen. Die meisten Patienten sterben nicht an den Folgen des Primärtumors, sondern an der durch die Metastasierung bedingten Insuffizienz der betroffenen Organe [17]. Die Fähigkeit zur Metastasierung ist von einer Vielzahl verschiedener Faktoren abhängig. Neben der Lokalisation des Primärtumors haben die Eigenschaften der Tumorzellen und der unmittelbaren Umgebung sowie Interaktionen der Tumorzellen untereinander und mit benachbarten Zellen (z.B. Stroma-, Endothel- und Entzündungszellen) auf Überleben und Proliferation der Tumorzellen im Sekundärorgan einen entscheidenden Einfluss [17-19]. Der Prozess der Metastasierung beruht auf zahlreichen sequenziellen Einzelschritten, wobei jeder dieser Schritte limitierend ist und Ursache für eine insuffiziente Metastasierung sein kann [18] (Abb. 2).

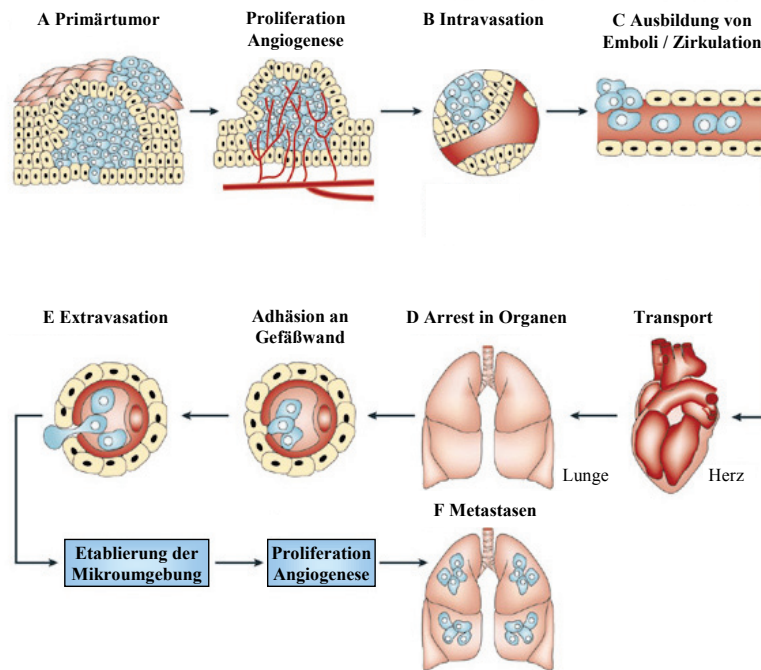


Abb. 2 Sequenz der Einzelschritte bei der Metastasierung.

Durch invasives Wachstum des Primärtumors (A) und Etablierung neuer Blutgefäße (Angiogenese) erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass Tumorzellen in entfernten Lokalisationen Metastasen ausbilden können. Die Invasion erfolgt aktiv und erfordert die Proteolyse extrazellulärer Matrix sowie die Zellmigration [20]. Einzelne invasive Tumorzellen können zu Blut- oder Lymphgefäßen gelangen und in das Gefäßsystem eindringen (Intravasation, B). Die zirkulierenden Tumorzellen können mit Leukozyten oder Blutplättchen zu Emboli aggregieren (C) und setzen sich im Verlauf der Zirkulation in bestimmten Organen fest (Arrest, D). Die anschließende Interaktion mit Endothelzellen der Gefäßinnenwand führt zur Extravasation (E). Nach initialer Proliferation können sich Mikrometastasen etablieren. Durch fortschreitendes Wachstum und Angiogenese entwickeln sich schließlich makroskopisch sichtbare Metastasen (F). (modifiziert nach Fidler [18])

Tumorzellen metastasieren in der Regel nicht zufällig in bestimmten Organen, sondern viele Tumorentitäten weisen eine gewisse Organpräferenz auf [17]. Vermutlich wird der initiale Arrest der Tumorzellen im Gefäßsystem von mechanischen Faktoren bestimmt, wie beispielsweise der vaskulären Anatomie, dem Lumendurchmesser der Gefäße, der Größe der Tumorzellen und den Strömungseigenschaften des Blutes. Das nachfolgende Metastasenwachstum im Sekundärorgan wird hingegen von Eigenschaften der Tumorzelle selbst und geeigneten Wachstumsbedingungen, die das Sekundärorgan bereitstellt, beeinflusst.

Die Metastasierung ist kein effizienter Prozess, so dass zahlreiche disseminierte Tumorzellen erforderlich sind, um wenige Metastasen zu entwickeln. Studien mit experimentellen Tiermodellen haben gezeigt, dass die frühen Schritte der Metastasierung bis hin zum Arrest im Sekundärorgan und der Extravasation noch bemerkenswert effizient ausgeführt werden und erst die nachfolgenden Schritte – also die Etablierung von Mikrometastasen und die anschließende Bildung von Makrometastasen – deutlich ineffizient sind [17,21]. Der fehlende Kontakt der Tumorzellen zur extrazellulären Matrix (EZM), vor allem während der Zirkulation im Blutstrom, ist ein weiterer effizienzlimitierender Faktor für die Metastasierung. Durch diesen Verlust von Zellkontakten zur EZM kann der programmierte Zelltod, die Apoptose, induziert werden, die in dieser Sonderform als Anoikis (griechisch für „Heimatlosigkeit“) bezeichnet wird [22]. Im physiologischen Kontext fungiert Anoikis als

Schutzmechanismus, um aus dem Gewebeverband gelöste Zellen zu eliminieren, wie z.B. in der Haut, im Kolonepithelium und bei der Rückbildung von Brustgewebe [23-25]. Der Erwerb einer Resistenz gegen Anoikis ermöglicht Tumorzellen erst das substratunabhängige Wachstum und damit die Ausbildung von Metastasen [26]. Als zentrale Vermittler der Anoikis wurden transmembranäre Glykoproteine, die Integrine, identifiziert [22,27]. Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, welche jeweils ein spezifisches Molekül oder aber eine Gruppe spezifischer Moleküle der EZM als Liganden binden [28]. Durch die Integrinbindung an die EZM werden Überlebenssignale ins Zellinnere übermittelt und der Verlust dieser Interaktion führt folglich zur Anoikis. Neben der Anoikis regulieren die Integrine weitere protumorigene Prozesse, wie die Angiogenese und die Zellmigration, sowohl durch Vermittlung der Zelladhäsion an die EZM als auch durch Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden [29,30].

1.1.3 Bedeutung von Zellzyklus und Apoptose bei der Karzinogenese

In einem gesunden Organismus besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilungen und Zelltod durch Apoptose. Krebserkrankungen führen alle zu einer Störung dieses fein geregelten Gleichgewichts. Dabei erleichtern sowohl die unkontrollierte Aktivierung von zellzyklusstimulierenden Signalwegen als auch die Hemmung von proapoptotischen Signalwegen die Tumorbildung [31].

Der Zellzyklus

Der Zellzyklus umfasst die zyklische Abfolge von Ereignissen zwischen zwei Zellteilungen. Der Zellzyklus ist unterteilt in die Teilungsphase (Mitose) und in die Interphase, die sich wiederum aus der G_1 -, der S- und der G_2 -Phase zusammensetzt. Nach Abschluss der Mitose kann die Zelle unmittelbar in den nächsten Teilungszyklus oder aber in eine als G_0 bezeichnete Ruhephase eintreten. Im Verlauf des Zellzyklus gibt es mehrere Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus z.B. bei DNA-Schäden arretiert werden kann. Ein wichtiger Kontrollpunkt ist der Restriktionspunkt in der späten G_1 -Phase. Die Zellzyklusprogression wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) reguliert, die einen Komplex mit jeweils spezifischen Kofaktoren, den kurzlebigen Cyclinen eingehen [32-34]. Die aktiven CDK/Cyclin-Komplexe koordinieren durch Phosphorylierung spezifischer Zielproteine, wie des Retinoblastomproteins (pRb), die Progression im Zellzyklus. Die Aktivität der CDK/Cyclin-Komplexe wird zudem durch spezifische Inhibitoren, die CDKIs (*cyclin-dependent kinase inhibitors*), reguliert [35].

Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Kontrolle von Zellwachstum und Proliferation ist der Zellzyklus mit seinen regulierenden Komponenten ein häufiges Ziel genetischer Alterationen bei Krebserkrankungen [36]. So ist das Tumorsuppressorgen *p53*, das eine Schlüsselfunktion in der Zellzykluskontrolle am G_1 -Restriktionspunkt einnimmt, das am häufigsten mutierte Gen bei humanen Tumoren [37]. Infolge von DNA-Schäden aktiviert *p53* u.a. die Transkription des CDKIs *p21^{Waf1/Cip1}* und bewirkt dadurch einen G_1 -Zellzyklusarrest [38]. Ein Funktionsverlust von *p53* führt folglich trotz

geschädigter DNA zu ungehemmter Zellproliferation und fördert die genetische Instabilität und damit eine erhöhte Mutagenese. Ferner weisen eine Vielzahl von Tumoren Mutationen im Tumorsuppressorgen *Rb* auf [39]. Die Phosphorylierung des pRb durch CDK/Cyclin-Komplexe bewirkt die Transition von der G₁- in die S-Phase und eine Inaktivierung von *Rb* bedingt wie bei *p53* eine Deregulierung des Zellzyklus [16].

Die Apoptose

Der Begriff Apoptose umschreibt einen physiologischen Prozess zur Eliminierung von Zellen, der genetisch determiniert ist und deshalb auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Die Apoptose wird eingeleitet durch einen Mangel an Wachstumsfaktoren, Störungen bei der Signaltransduktion oder durch zellulären Stress, wie DNA-Schädigungen oder Sauerstoffmangel (Hypoxie). Prinzipiell unterscheidet man zwei distinkte Signalwege bei der Apoptose: den intrinsischen und den extrinsischen Signalweg [40] (Abb. 3). Letztendlich resultieren beide Signalwege in der Aktivierung einer Kaskade von spezifischen Proteasen, den Caspasen. Die Caspasen vermitteln durch Proteolyse zellulärer Substrate den Tod der Zelle. Substrate der Caspasen sind beispielsweise Zellstrukturproteine, Reparaturenzyme, Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose sowie Transkriptionsfaktoren [41].

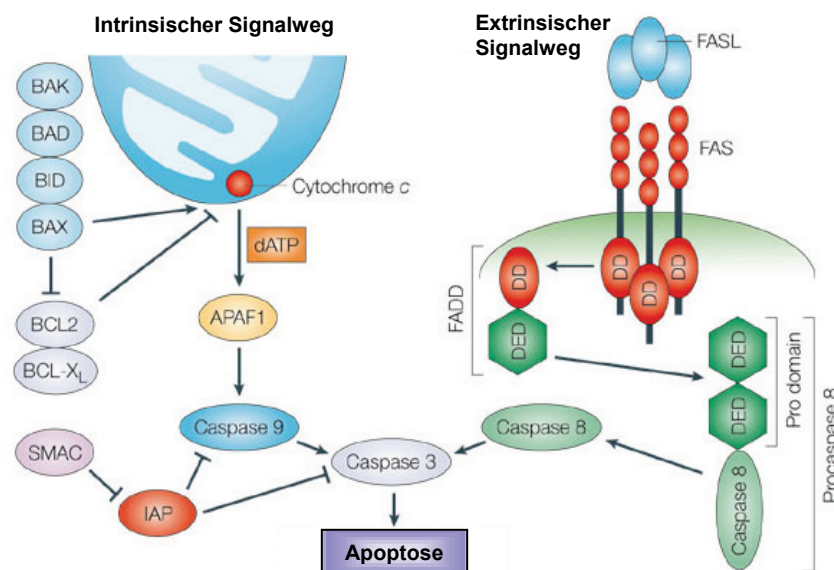


Abb. 3 Vereinfachte Darstellung der beiden Hauptsignalwege der Apoptose.

Der intrinsische Signalweg (links dargestellt) wird über die Mitochondrien vermittelt und durch pro- und antiapoptische Proteine der Bcl-2-Familie reguliert [42]. Eingeleitet werden kann die intrinsische Apoptosekaskade z.B. durch Aktivierung von p53, das die Expression verschiedener proapoptischer Bcl-2-Proteine (z.B. Bax, Bak, Puma und Noxa) transkriptionsabhängig und -unabhängig induziert [43]. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten proapoptischer Bcl-2-Proteine bewirkt letztendlich eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und infolgedessen u.a. die Freisetzung von Cytochrom C [44]. Das Cytochrom C bindet an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*), was dann zur Aktivierung der Caspasen führt. Die extrinsische (rezeptorvermittelte) Signalkaskade (rechts dargestellt) wird initiiert durch die Bindung von extrazellulären Liganden an die Todesrezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptorsuperfamilie, wie beispielsweise CD95 (Fas/Apo-1) [45]. (modifiziert nach Fesik [46])

Im Verlauf der malignen Progression erwerben Tumorzellen die Fähigkeit, die Apoptose zu supprimieren und somit unkontrolliert zu proliferieren [16]. Diese Inhibition der Apoptose beruht

häufig entweder auf der Überexpression antiapoptotischer Proteine oder der verminderten Expression proapoptotischer Proteine [40]. Ein Beispiel ist die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in B-Zell-Lymphomen [47]. Ferner konnten in diversen Tumorentitäten inaktivierende Mutationen des proapoptotischen Proteins Bax oder aber des Todesrezeptors CD95 nachgewiesen werden [48-51]. Ein weiteres wichtiges Protein, das in humanen Tumoren häufig konstitutiv aktiviert vorliegt, ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) [52]. NF- κ B reguliert die Apoptose vor allem negativ durch Aktivierung antiapoptotischer Gene wie Bcl-X_L oder aber durch Inhibition der Expression von proapoptotischen Proteinen wie Bax [53,54].

Wie zuvor beschrieben, sind die Deregulierung des Zellzyklus sowie die Inhibition der Apoptose zentrale Eigenschaften eines malignen Tumors und stellen daher auch wichtige Angriffspunkte für mögliche Therapiestrategien dar. Auch die Ausbildung von Therapieresistenzen bei Krebserkrankungen ist eng mit Veränderungen der Zellzyklus- und Apoptose-Kontrolle verknüpft.

1.1.4 Chemotherapie und Resistenzmechanismen

Aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität von Krebserkrankungen orientieren sich therapeutische Maßnahmen an einer Vielzahl individueller Faktoren, wie Symptomatik, Tumorlokalisation, Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors und Zustand des Patienten. Klassische Behandlungsmöglichkeiten von Krebserkrankungen umfassen operative Verfahren zur Resektion des Tumors und benachbarter Lymphknoten, medikamentöse Therapieverfahren, wie Chemotherapie, Hormontherapie und Immuntherapie, sowie die Strahlentherapie. Unter der Chemotherapie im engeren Sinne versteht man die Applikation von Substanzen, sog. Zytostatika, die möglichst gezielt das Wachstum und die Zellteilung von Tumorzellen hemmen oder aber diese abtöten [55]. Aufgrund ihrer erhöhten Zellteilungsrate reagieren Tumorzellen empfindlicher auf Zytostatika als gesunde Zellen [56]. Neben diesen klassischen Zytostatika werden in der medikamentösen Behandlung von Krebserkrankungen zunehmend auch Substanzen eingesetzt, die ihre Wirkung nicht direkt antiproliferativ entfalten. Diese neue Klasse antineoplastischer Wirkstoffe greift gezielt in gestörte Wege der intrazellulären Signaltransduktion maligner Zellen ein und wird als zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) bezeichnet [57].

Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika gilt als der Hauptgrund für das Nichtansprechen einer chemotherapeutischen Behandlung bei den meisten humanen Tumoren [58]. Man unterscheidet zwischen einer intrinsischen, vor der Therapie bereits vorhandenen Chemoresistenz und einer im Laufe der Chemotherapie erworbenen Resistenz. Ursache für die Chemoresistenz können sowohl nichtzelluläre Faktoren, wie ein ungeeignetes Applikationsschema oder aber Eigenschaften des Tumormikromilieus, als auch zelluläre Resistenzmechanismen sein [59]. Zelluläre Resistenzmechanismen sind die Folge der genetischen Heterogenität eines Tumors infolge von Mutationen und der Selektion von resistenten Tumorzellen [60]. Zu den zellulären Resistenzmechanismen zählen [60,61]:

- der verminderte Transport des Wirkstoffs in die Tumorzelle,
- der aktive Transport des Wirkstoffs aus der Tumorzelle, z.B. infolge einer Überexpression des P-Glykoproteins (Pgp/MDR1) [62],
- Veränderungen des Wirkstoffmetabolismus, wie eine verminderte Aktivierung des Wirkstoffs oder eine enzymatische Inaktivierung des Wirkstoffs,
- quantitative und qualitative Veränderungen der Zielstrukturen des Wirkstoffs,
- verstärkte DNA-Reparaturmechanismen,
- die Inhibition von Apoptose und die deregulierte Zellzyklus-Kontrolle.

Die Chemoresistenz humaner Tumoren ist meist multifaktoriell bedingt durch mehrere miteinander in Beziehung stehende und/oder unabhängige Faktoren. Zusätzlich wird die Therapierbarkeit von Krebserkrankungen verkompliziert durch das Auftreten von Kreuzresistenzen gegenüber mehreren Wirkstoffen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, was auch als „*multidrug resistance*“ (MDR) bezeichnet wird [62].

Wie bereits erwähnt, wird die Effektivität der Chemotherapie auch durch das Mikromilieu des Tumors bestimmt. Die Verfügbarkeit des chemotherapeutischen Wirkstoffs im Tumor wird u.a. durch die anfänglich unzureichende Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen sowie durch die später abnormale Struktur der Blutgefäße im Tumorgewebe begrenzt [63]. Infolgedessen kommt es auch zur Ausbildung hypoxischer Areale innerhalb des Tumors, einem Mangel an Nährstoffen und einer Abnahme des extrazellulären pH-Werts. Die intratumorale Hypoxie ist ein zentrales Charakteristikum des Mikromilieus solider Tumoren und reduziert entscheidend die Effektivität von Radio- und Chemotherapie [64,65]. Sie führt zu einer Selektion von Tumorzellen mit einem reduzierten apoptotischen Potential, was sich auch auf die durch die Chemotherapie induzierte Apoptose auswirkt [66]. Zudem zeigen einige Zytostatika eine verminderte Aufnahme und/oder Aktivität in einem hypoxischen oder azidischen Tumormikromilieu [63,65]. Ferner vermitteln einige chemotherapeutische Wirkstoffe ihre Zytotoxizität über die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies in einem sauerstoffreichen Mikromilieu [67]. Und schließlich induziert die Tumorphypoxie eine Reihe zellulärer Anpassungsreaktionen, die die Effektivität der Chemotherapie beeinträchtigen, wie beispielsweise die Transaktivierung von Wachstumsfaktoren [64].

1.2 Das Magenkarzinom

Das Adenokarzinom des Magens repräsentiert trotz rückläufiger Inzidenz die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache weltweit [68]. Die geographische Verteilung der Magenkarzinomprävalenz ist durch eine hohe Variabilität gekennzeichnet, mit besonders hohen Inzidenzen in Japan, Korea und China [69]. In Deutschland erkranken jährlich ca. 20.000 Menschen, so dass das Magenkarzinom zu den häufigsten tumorbedingten Todesursachen in Deutschland zählt [70]. Die Prognose der betroffenen Patienten ist mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von 28% insgesamt als sehr schlecht anzusehen und wird im Wesentlichen durch das Ausmaß der Metastasierung bestimmt [71].

1.2.1 Ätiologie und Risikofaktoren

Die geographischen Unterschiede in der Inzidenz des Magenkarzinoms legen nahe, dass Umweltfaktoren eine Rolle bei seiner Entstehung spielen. Es ist bekannt, dass bestimmte Ernährungsgewohnheiten, insbesondere der Verzehr stark gesalzener, gepökelter oder geräucherter Speisen, häufiger Fleischkonsum sowie nitrat- oder nitrithaltige Lebensmittel, die Entstehung des Magenkarzinoms begünstigen [71-73]. Hierbei scheint die bakterielle Umwandlung der Nitrat- und Nitritverbindungen in kanzerogene Nitrosamine von Bedeutung zu sein. Aber auch übermäßiger Alkoholkonsum und Nikotinabusus erhöhen das Risiko an einem Magenkarzinom zu erkranken [74,75]. Protektiv hingegen wirkt der Verzehr von frischem Obst und Gemüse durch die darin enthaltenen Antioxidantien, wie Vitamin C, Vitamin E und β -Karotin [72,76,77]. Der Rückgang der Inzidenz des Magenkarzinoms wird u.a. einer besseren Lebensmittelhygiene, einem erhöhten Verzehr von Obst und Gemüse sowie einer Reduktion des Salzkonsums zugeschrieben.

Darüber hinaus spielt die Infektion mit *Helicobacter pylori*, das 1994 als Klasse-1-Karzinogen eingestuft wurde, bei der Magenkarzinomentstehung eine entscheidende Rolle [78]. Epidemiologische Studien belegen, dass etwa 60–90% aller Magenkarzinome ätiologisch mit einer *Helicobacter pylori*-Infektion des Magens in Verbindung zu bringen sind [79]. Zudem begünstigen bestimmte Vorerkrankungen, wie z.B. die chronisch-atrophische Gastritis oder adenomatöse Magenpolypen die Entstehung eines Magenkarzinoms [80,81]. Auch weisen Patienten nach einer Magenteilresektion aufgrund gutartiger Magenerkrankungen ein erhöhtes Risiko für ein Magenkarzinom auf [55].

1.2.2 Klassifikation

Beim Magenkarzinom handelt es sich um ein epitheliales Malignom, das von der WHO (*World Health Organization*) nach histologischen Kriterien in das Adenokarzinom, das adenosquamöse Karzinom, das Plattenepithelkarzinom, das undifferenzierte und das nichtklassifizierbare Karzinom eingeteilt wird [82]. Dabei liegt in über 90% aller Fälle ein Adenokarzinom vor [72].

Der internationalen Stadieneinteilung dient die TNM-Klassifikation, die die lokale Tumorausdehnung (T-Kategorie; Tis, T1-T4), den Lymphknotenstatus (N-Kategorie; N0-N3) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Kategorie; M0, M1) dokumentiert [81]. Das sog. Magenfrühkarzinom bezeichnet einen Tumor, der auf die Mukosa und Submukosa begrenzt ist (Kategorie T1), aber bereits eine Lymphknotenmetastasierung aufweisen kann [83]. Seine Prognose nach kurativer Operation ist mit 5-Jahres-Überlebensraten von 95–98% wesentlich günstiger als bei weiter fortgeschrittenen Karzinomen. Aufgrund mangelnder klinischer Symptomatik wird in Deutschland aber nur ein sehr geringer Prozentsatz aller Magenkarzinome in diesem Frühstadium diagnostiziert.

1.2.3 Therapie und Prognose

Die chirurgische Resektion des Tumors stellt die einzige potentiell kurative Behandlungsoption dar. Während im frühen Stadium die Behandlungsaussichten gut sind und die 5-Jahres-Überlebensrate nach operativer Therapie mehr als 90% beträgt, können in fortgeschrittenen Stadien nur 50% der Magenkarzinome unter kurativen Gesichtspunkten operativ behandelt werden [68]. Die überwiegende Zahl der Fälle wird jedoch erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert, so dass eine definitive Heilung des Magenkarzinoms lediglich in etwa einem Drittel aller Fälle gelingt [84]. Mit fortschreitendem Tumorstadium werden die Therapieoptionen entscheidend durch die Metastasierung bestimmt, da diese eine kurative Resektion unmöglich macht und dann die Chemotherapie als die effektivste Therapiemaßnahme gilt. Bei Diagnosestellung weisen durchschnittlich 70% aller Magenkarzinompatienten bereits regionäre Lymphknotenmetastasen und 30% aller Patienten Fernmetastasen auf [85]. Durch adjuvante² Radio- und Chemotherapie konnte in Therapiestudien eine Prognoseverbesserung erreicht werden [86]. Jedoch ist die Verlängerung der Lebenserwartung durch die aktuellen Standards adjuvanter und neoadjuvanter³ Therapieverfahren bislang noch unbefriedigend: Das mediane Gesamtüberleben nach Operation mit vollständiger Entfernung des Tumors verlängert sich von 27 auf 36 Monate mit adjuvanter Radiochemotherapie [87]. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass innovative Ansätze zur chemotherapeutischen Behandlung des Magenkarzinoms dringend gebraucht werden. Es ist vorstellbar, dass die insgesamt als schlecht anzusehende Gesamtprognose des Magenkarzinoms durch eine Intensivierung der Frühdiagnostik und effektivere Therapiemaßnahmen verbessert werden könnte.

² Therapiemaßnahmen, die nach Tumorresektion auf eine vollständige Tumoreradikation und Heilung abzielen.

³ Adjuvante Therapien, die präoperativ zum Einsatz kommen.

1.3 Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1)

Sauerstoffmangel (Hypoxie) ist ein zentrales Charakteristikum des Mikromilieus solider Tumoren und stellt einen ungünstigen Prognosefaktor für eine Vielzahl von Krebserkrankungen dar [64]. Darüber hinaus korreliert die Hypoxie mit systemischer Metastasierung und reduziert die Effektivität von Radio- und Chemotherapie [88]. Verantwortlich für die Entwicklung hypoxischer Tumorbereiche ist das rasante und unkontrollierte Wachstum neoplastischer Zellen, wodurch Tumoreareale entstehen, deren Entfernung vom nächstgelegenen Blutgefäß jenseits der maximalen Diffusionsstrecke von Sauerstoff (ca. 150 μm) liegt [65]. Der intratumoralen Hypoxie kommt eine wesentliche kausale Bedeutung für die Progression von Krebserkrankungen zu: Zunächst limitiert die Hypoxie das Tumorwachstum durch Inhibition der Zellproliferation sowie Induktion von Wachstumsarrest und Apoptose [88]. Der resultierende Selektionsdruck führt zur Entstehung von Hypoxie-adaptierten Tumorzellen, die sauerstoffunabhängig proliferieren und daher eine Tumorprogression trotz hypoxischer Mikromilieubedingungen ermöglichen [89]. Die zelluläre Adaptation an Hypoxie wird hauptsächlich durch eine Umstellung der Energiegewinnung auf Glykolyse, durch Blutgefäßneubildung (Angiogenese) und durch autarkes Zellwachstum infolge der Sekretion von Wachstumsfaktoren und Inhibition der Apoptose gewährleistet [64]. Als bedeutendster Vermittler für die Anpassung an Hypoxie wurde 1992 der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) identifiziert [90].

1.3.1 Struktureller Aufbau von HIF-1

Das Protein HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit⁴ und einer sauerstoffabhängig regulierten α -Untereinheit besteht [91]. Beide Untereinheiten besitzen an ihren aminoterminalen Enden eine bHLH (*basic helix-loop-helix*)- sowie eine PAS (PER-ARNT-SIM)-Domäne [92] (Abb. 4). Die α -Untereinheit ist spezifisch für das HIF-1-Heterodimer, wohingegen HIF-1 β auch mit weiteren Transkriptionsfaktoren der bHLH-PAS-Familie dimerisieren kann. Die bHLH-Domäne ist für die DNA-Bindung von HIF-1 verantwortlich, während die daran anschließende PAS-Domäne die Dimerisierung der beiden Untereinheiten vermittelt [93]. An der Aktivierung der HIF-1-Zielgene sind zwei Transaktivierungsdomänen (TAD) der α -Untereinheit beteiligt, die der Rekrutierung verschiedener Kofaktoren, wie beispielsweise CBP/p300, dienen [94]. Die Hydroxylierung eines Asparagylrestes (N803) in der carboxyterminalen TAD (C-TAD) von HIF-1 α durch das Enzym FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) inhibiert sauerstoffabhängig die transkriptionelle Aktivität von HIF-1, da die Interaktion mit dem Koaktivator-Komplex CBP/p300 verhindert wird [95].

⁴ Synonym: ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*).

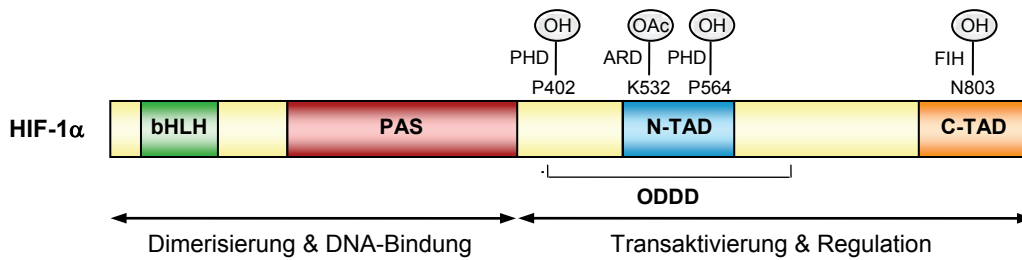


Abb. 4 Proteinstruktur des humanen HIF-1 α .

Das Protein HIF-1 α besitzt am N-Terminus eine bHLH (*basic helix-loop-helix*)- und eine PAS (PER-ARNT-SIM)-Domäne. Zwei Transaktivierungsdomänen (TAD) dienen der Rekrutierung von Kofaktoren. Zudem besitzt HIF-1 α einen Bereich, der die Regulation durch Sauerstoff vermittelt (ODD-Domäne, *oxygen dependent degradation domain*). HIF-1 α unterliegt verschiedenen posttranslationalen Modifikationen an diversen Aminosäureresten, über die die Proteinestabilität von HIF-1 α und die Transaktivierung reguliert werden. (modifiziert nach Semenza [96])

Die Proteinestabilität von HIF-1 α wird sauerstoffabhängig über die ODD-Domäne (*oxygen dependent degradation domain*) reguliert. Unter normoxischen Sauerstoffbedingungen wird HIF-1 α durch Prolylhydroxylasen (PHD) an zwei spezifischen Prolylresten (P402 und P564) innerhalb der ODD-Domäne hydroxyliert [97,98]. Diese Hydroxylierungen ermöglichen die Bindung des von Hippel-Lindau Proteins (pVHL) und damit die Ubiquitin-abhängige Degradation von HIF-1 α [99,100]. Des Weiteren wird HIF-1 α an einem Lysinrest (K532) innerhalb der ODD-Domäne durch die Acetyltransferase ARD1 (*arrest defective protein 1*) acetyliert, wodurch vermutlich die Bindung von pVHL an HIF-1 α erleichtert wird [101].

1.3.2 Regulation der Aktivität von HIF-1

Die Funktion von HIF-1 als Transkriptionsfaktor wird hauptsächlich posttranslational über die Proteinestabilität von HIF-1 α reguliert. Daneben kann eine Regulation von HIF-1 α in Abhängigkeit von Zelltyp und Stimulus auch auf transkriptioneller und translationeller Ebene erfolgen, wie beispielsweise durch inflammatorische Mediatoren [102]. Unter normoxischen Sauerstoffbedingungen hat das Protein HIF-1 α nur eine sehr kurze Halbwertszeit, da es nach sauerstoffabhängigen posttranslationalen Modifikationen (siehe 1.3.1) kontinuierlich abgebaut wird [103]. Dabei fungieren die hydroxylierten Prolinreste (P402 und P564) in der ODD-Domäne von HIF-1 α als Bindungsstellen für pVHL, das zusammen mit Elongin B und C, Cullin 2 und Rbx1 den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex formt [104]. Die Formation dieses Multiproteinkomplexes führt zur Polyubiquitinierung von HIF-1 α und schließlich zum Abbau durch das 26S-Proteasom. Wie zuvor erwähnt, scheint die ARD1-katalysierte Acetylierung des Lysinrestes K532 die Degradation von HIF-1 α unter Normoxie⁵ zu fördern [101]. Eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration führt über eine Hemmung dieses Degradationsmechanismus zur Akkumulation von HIF-1 α [105]. Dieser Hypoxie-induzierten Stabilisierung von HIF-1 α folgt die nukleäre Translokation, die Heterodimerisierung mit HIF-1 β

⁵ Unter Normoxie liegt der Sauerstoffpartialdruck im Normalbereich des jeweiligen Gewebes oder Organs.

sowie die Interaktion mit Kofaktoren wie CBP/p300 und schließlich die Transaktivierung von HIF-1-Zielgenen [104] (Abb. 5). Auch die Interaktion von HIF-1 mit dem Koaktivator-Komplex CBP/p300 unterliegt der sauerstoffabhängigen Regulation durch Hydroxylierung. Folglich induziert Hypoxie die Transaktivierung von HIF-1-Zielgenen einerseits durch Stabilisierung des HIF-1 α -Proteins sowie andererseits durch Förderung der transkriptionellen Aktivität von HIF-1.

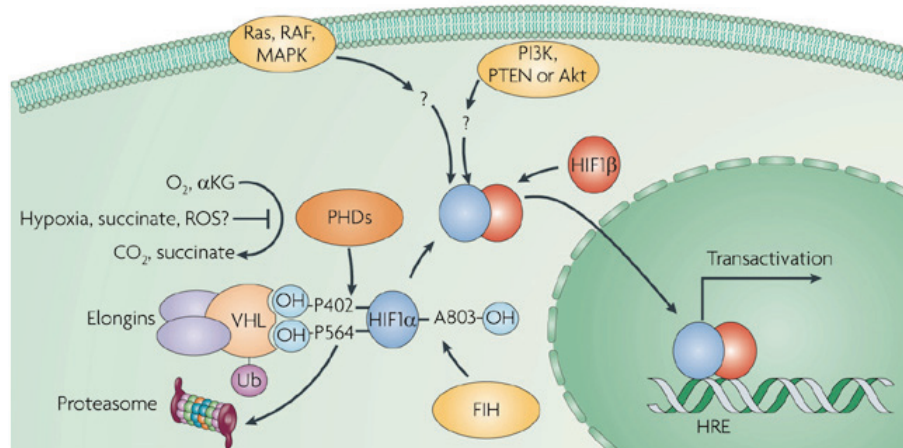


Abb. 5 Regulation von HIF-1.

In Anwesenheit von Sauerstoff (O_2) erfolgt die sauerstoffabhängige Hydroxylierung von HIF-1 α durch Prolylhydroxylasen (PHD). Infolgedessen vermittelt der von Hippel-Lindau (pVHL)-Elongin-Komplex die Ubiquitinierung (Ub) von HIF-1 α , was zur proteasomalen Degradation von HIF-1 α führt. Hypoxie oder auch Zwischenstufen des Tricarbonsäurezyklus, wie Succinat, können die Aktivität der PHDs inhibieren und dadurch HIF-1 α stabilisieren. Das stabilisierte HIF-1 α interagiert mit HIF-1 β sowie weiteren Koaktivatoren. Im Nucleus führt die Bindung von HIF-1 an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) letztlich zur Transaktivierung der HIF-1-Zielgene. Zudem kann die Aktivierung des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)- oder des PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*)-Signalweges eine sauerstoffunabhängige Induktion von HIF-1 α bewirken. α KG, α -Ketoglutarat; ROS, *reactive oxygen species*. (aus Denko [106])

Neben der Induktion der HIF-1-Aktivität durch Hypoxie sind eine Reihe weiterer Mechanismen beschrieben, die HIF-1 α unter normoxischen Sauerstoffbedingungen aktivieren können. So konnte gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren und Cytokine, wie beispielsweise EGF (*epidermal growth factor*), IGF (*insulin-like growth factor*) 1 und 2, Insulin und Interleukin-1 β , die Expression von HIF-1 α sowie die Transaktivierung durch HIF-1 sauerstoffunabhängig induzieren können [107] (Abb. 5). Hierbei scheint die Aktivierung der PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*)- und der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalkaskade durch Bindung von Wachstumsfaktoren an entsprechende Rezeptortyrosinkinasen eine entscheidende Rolle zu spielen [96]. Die Aktivierung von Onkogenen wie *Ras* oder *Src* sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *PTEN* können ebenfalls über eine Deregulation dieser beiden Signalwege sauerstoffunabhängig zu einer erhöhten Expression von HIF-1 α führen [107]. Im Gegensatz zur Hypoxie-induzierten Stabilisierung von HIF-1 α ist diese sauerstoffunabhängige Aktivierung von HIF-1 α aber zelltypspezifisch.

1.3.3 Funktion von HIF-1 und HIF-1-regulierte Genprodukte

Das Heterodimer HIF-1 vermittelt seine transaktivierende Funktion durch Bindung an die Konsensussequenz 5'-RCGTG-3'⁶ von Hypoxie-responsiven Elementen (HRE) in der Promotor- oder Enhancerregion der HIF-1-Zielgene [108]. Bislang wurden fast 100 verschiedene HIF-1-regulierte Gene identifiziert, die unter hypoxischen Bedingungen den Erhalt der Sauerstoffhomöostase ermöglichen [104]. Das Protein HIF-1 vermittelt aber nicht nur die physiologische Adaptation an Hypoxie, sondern HIF-1-regulierte Genprodukte spielen auch eine zentrale Rolle für pathophysiologische Prozesse, wie beispielsweise in ischämischen Geweben, bei Entzündungsreaktionen und im Tumormikromilieu [109].

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 gewährleistet die Anpassung an Hypoxie insbesondere durch Regulation zweier fundamentaler Prozesse. Zum einen aktiviert HIF-1 diverse Zielgene, die eine bessere Versorgung mit Sauerstoff bewerkstelligen, wie Regulatoren der Angiogenese (z.B. VEGF-A, VEGF Rezeptor-1 und Angiopoietin-2), der Erythropoese (z.B. Erythropoietin), des Blutgefäßtonus (z.B. Hämoxxygenase-1) und des Eisenstoffwechsels (z.B. Transferrin) [64,96]. Zum anderen induziert die HIF-1-abhängige Genregulation Anpassungsvorgänge, die ein Überleben der Zelle unter hypoxischen Bedingungen ermöglichen. Ein prominentes Beispiel ist hierbei die HIF-1-regulierte Umstellung des Energiestoffwechsels auf die Glykolyse durch eine erhöhte Expression von Glukose-Transportern (z.B. Glut-1 und -3) und glykolytischen Enzymen (z.B. Hexokinase-1 und -2 sowie Phosphoglyceratkinase-1) [106]. Darüber hinaus spielen HIF-1-induzierte Gene eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zellproliferation (z.B. Wachstumsfaktoren wie IGF-2), Apoptose (z.B. NIX und BNIP3), Zellmigration und Invasion (z.B. Vimentin, Matrixmetalloproteinase-2 und der Chemokinrezeptor CXCR4) sowie bei der Regulation des pH-Werts (carbonische Anhydrase IX) [64].

1.3.4 Bedeutung von HIF-1 für die Tumorbilogie

Die Überexpression von HIF-1 α ist ein zentrales Merkmal verschiedenster Tumorentitäten [110,111]. Das Protein HIF-1 α kann in Tumoren entweder durch intratumorale Hypoxie induziert werden oder aber es wird konstitutiv exprimiert infolge der Aktivierung von Onkogenen wie *Ras* oder *ERBB2* oder der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *VHL* oder *PTEN* [96]. Eine Vielzahl klinischer und experimenteller Studien lässt vermuten, dass HIF-1 eine funktionelle Bedeutung für Wachstum, Progression und Metastasierung solider Malignome zukommt [112,113]. Darüber hinaus korreliert die Expression von HIF-1 α in den neoplastischen Zellen maligner Tumoren mit einer infausten Prognose, wie beispielsweise beim Pankreas-, Zervix- und Mammakarzinom [114-116]. In Einklang hiermit führte die gentechnische und pharmakologische Inhibition von HIF-1 α in murinen Tumormodellen zu einer Reduktion des Tumorwachstums, wobei eine erhöhte Apoptoserate, eine reduzierte Angiogenese und eine fehlende metabolische Adaptation als mögliche Mechanismen diskutiert wurden [112,117-

⁶ R steht für eine der beiden Purinbasen Adenin oder Guanin.

121]. Zudem konnte kürzlich mittels muriner Modelle eine Verringerung der Metastasierung nach Inhibition von HIF-1 α gezeigt werden [122,123]. Von klinischer Relevanz ist die Beobachtung, dass die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α die Empfindlichkeit verschiedenster Karzinomzelllinien sowie auch diverser Tumorentitäten in murinen Modellen gegenüber Radio- und Chemotherapie erhöhte, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen jedoch noch weitgehend unverstanden sind [124-130].

Mittlerweile konnte eine Vielzahl von HIF-1-Zielgenen identifiziert werden, die mit der Entwicklung des malignen Phänotyps assoziiert sind [64,96]. Dabei nimmt das HIF-1-Zielgen VEGF-A eine zentrale Stellung ein, da dieser Faktor durch Stimulation der Endothelzellproliferation und -migration entscheidend zur tumorassoziierten Angiogenese beiträgt [131,132]. Die Bildung von exklusiv den Tumor versorgenden Blutgefäßen führt zu einer verbesserten Versorgung mit Sauerstoff und essenziellen Nährstoffen und wird als Voraussetzung für lokales Tumorstadium und systemische Metastasierung angesehen [133]. Ebenso werden die Invasion und die Metastasierung durch eine Reihe von HIF-1-Zielgenen reguliert, wie beispielsweise durch den Chemokinrezeptor CXCR4, die Matrixmetalloproteinase-2 oder die Lysyloxidase [134-136]. Diese Proteine fördern HIF-1-abhängig die Metastasierung und tragen damit zu einem aggressiveren malignen Phänotyp bei. Des Weiteren konnte auch das MDR1-Gen, das eine herausragende Bedeutung in der Regulation von Chemoresistenz trägt, als ein weiteres HIF-1-Zielgen identifiziert werden [137].

Zusammenfassend lassen diese Zusammenhänge vermuten, dass HIF-1 und seinen Zielgenen eine kausale Bedeutung im Rahmen der Progression und Metastasierung von Krebserkrankungen zukommt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund einer zumeist späten Diagnose und einer dann nicht mehr möglichen kurativen operativen Therapie ist das humane Magenkarzinom mit einer infausten Prognose assoziiert. Bisherige Therapieansätze mit systemischer Chemo- und Radiotherapie haben nur unzureichende klinisch relevante Fortschritte für die Überlebenszeit von Patienten hervorbringen können. Neben dem Ausmaß der Metastasierung werden die Therapieoptionen zusätzlich durch die Ausbildung von Therapieresistenzen bestimmt. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass umfassende Untersuchungen zu den Mechanismen von Metastasierung und Therapieresistenz dringend notwendig sind, um so die Grundlage für die Entwicklung innovativer Ansätze zur Behandlung des Magenkarzinoms zu legen.

Dem Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 kommt eine zentrale Bedeutung für das Wachstum und die Progression von soliden Tumoren zu. Zudem belegt eine Vielzahl klinischer und experimenteller Studien, dass HIF-1 in diversen Tumorentitäten an der Regulation von Metastasierung und der Vermittlung von Chemoresistenz maßgeblich beteiligt ist. Die hierbei zugrunde liegenden molekularen und zellbiologischen Mechanismen und insbesondere die pathobiologische Bedeutung von HIF-1 für das humane Magenkarzinom sind jedoch weitgehend unverstanden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Bedeutung von HIF-1 für das Wachstum und die Metastasierung des Magenkarzinoms durch eine umfassende Analyse zentraler malignitätsdefinierender Charakteristika untersucht werden. Für diese detaillierte Analyse war als erstes die Etablierung einer stabilen funktionellen Inaktivierung von HIF-1 α mittels RNA-Interferenz in zwei humanen Magenkarzinomzelllinien erforderlich. Ergänzend sollten die erzielten Ergebnisse durch Anwendung eines pharmakologischen HIF-1-Inhibitors bestätigt werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Resistenz humaner Magenkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika mit Hilfe der Inaktivierung von HIF-1 α zu überwinden ist und potentiell beteiligte Mechanismen der HIF-1-vermittelten Chemoresistenz identifiziert werden. Somit hatte die vorliegende Arbeit zusammengefasst folgende Ziele:

1. Analyse der Expression von HIF-1 α im humanen Magenkarzinom,
2. Etablierung einer stabilen und funktionellen Inaktivierung von HIF-1 α mittels RNA-Interferenz in zwei humanen Magenkarzinomzelllinien unter Verwendung eines lentiviralen Vektorsystems,
3. Analyse der Bedeutung von HIF-1 für die Metastasierung des Magenkarzinoms durch Untersuchung des Wachstums, der Migration, der Invasion und der Endothelzellinteraktion humaner Magenkarzinomzellen sowie Identifikation potentieller Mechanismen,
4. Analyse der Bedeutung von HIF-1 in der Vermittlung von Chemoresistenz humaner Magenkarzinomzellen sowie Identifikation potentieller Mechanismen.

2 Veröffentlichte Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation wurde als kumulative Arbeit eingereicht. Grundlage dieser Arbeit sind drei Publikationen. Die folgende Tabelle legt die Eigenleistung der Autorin an den einzelnen Manuskripten dar.

Tab. 1 Eigenanteil an den Manuskripten der vorliegenden kumulativen Dissertation [in %].

Manuskript	Konzeption	Durchführung und Auswertung der Daten	Berichtsabfassung
I	80	85	80
II	85	90	85
III	90	90	90

2.1 Manuskript I: “HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells”

2.1.1 Zusammenfassung

Das humane Magenkarzinom repräsentiert die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache weltweit, wobei in Deutschland ca. 20.000 Menschen jährlich erkranken. Prognose und Therapieoptionen betroffener Patienten werden dabei hauptsächlich durch das Ausmaß der Metastasierung bestimmt. Die Ergebnisse einer Vielzahl klinischer und experimenteller Studien deuten darauf hin, dass HIF-1 eine kausale Rolle bei Wachstum, Progression und Metastasierung solider Tumoren spielt. Daher sollte die Bedeutung von HIF-1 für Wachstum und Metastasierung des humanen Magenkarzinoms durch eine Analyse zentraler malignitätsdefinierender Charakteristika untersucht werden.

Zunächst wurde die Expression von HIF-1 α in humanen Magenfrühkarzinomgeweben und in humanen Geweben mit weiter fortgeschrittener Magenkarzinogenese immunhistochemisch untersucht. In nicht-transformierten Magenepithelien konnte HIF-1 α nicht und in den neoplastischen Zellen der Magenfrühkarzinomgewebe nur zu einem sehr geringen Prozentsatz nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde HIF-1 α in 90% der untersuchten fortgeschrittenen Magenkarzinome spezifisch in neoplastischen Epithelien detektiert. Eine signifikante Korrelation der HIF-1 α -Expression mit Lymph- und Blutgefäßinvasion, Metastasierung oder Tumorstadium konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Zwecks funktioneller Analyse der Bedeutung von HIF-1 *in vitro* wurde eine Inhibition von HIF-1 α mittels RNA-Interferenz in den beiden humanen Magenkarzinomzelllinien AGS und MKN28 etabliert. Die Effizienz der Inhibition von HIF-1 α betrug in AGS Zellen $85,2 \pm 6,3\%$ und in MKN28 Zellen $97,2 \pm 2,1\%$. In den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen konnte die Induktion des HIF-1 α -Proteins unter Hypoxie vollständig gehemmt werden. Darüber hinaus führte die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression der beiden HIF-1-Zielgene Phosphoglyceratkinase (PGK) und carbonische Anhydrase IX (CA IX). Mit Hilfe eines HRE-Luciferase-Reporter-Assays konnte ferner gezeigt werden, dass auch die HIF-1-Aktivität in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen signifikant inhibiert wurde.

Anschließend wurde die Bedeutung der funktionellen Inaktivierung von HIF-1 α für verschiedene tumorbiologisch relevante Prozesse wie Proliferation, Migration, Invasion und Endothelzellinteraktion untersucht. Mit Hilfe von Proliferationsassays wurde gezeigt, dass die HIF-1 α -Inhibition weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen zu einer Veränderung der Proliferationsrate führte. Des Weiteren wurden unter Verwendung modifizierter Boydenkammern die Migration und die Invasion⁷ analysiert. Die Hemmung von HIF-1 α bewirkte eine signifikante Reduktion der Migration beider Magenkarzinomzelllinien sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie. Zudem zeigten die HIF-1 α -defizienten AGS Zellen ein signifikant verringertes Invasionsverhalten unter normoxischen

⁷ Die Invasion ist in diesem Fall definiert als die Migration durch Matrigel.

und auch hypoxischen Kulturbedingungen. In guter Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Resultaten führte die Inhibition von HIF-1 α zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion von AGS Zellen an primäre Endothelzellen unter beiden Kulturbedingungen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Anwendung des pharmakologischen HIF-1-Inhibitors 2-Methoxyestradiol zu einer dosisabhängigen Hemmung der Migration, Invasion sowie Adhäsion bei HIF-1 α -kompetenten AGS Zellen führte.

Mit diesen Untersuchungen wurde eine spezifische Expression von HIF-1 α ausschließlich in fortgeschrittenen Stadien der humanen Magenkarzinogenese sowie eine funktionelle Bedeutung von HIF-1 für metastasierungsrelevante Aspekte im Magenkarzinom *in vitro* nachgewiesen. Durch diese umfangreiche Charakterisierung konnte HIF-1 erstmals als ein zentraler Regulator der Metastasierung des humanen Magenkarzinoms beschrieben werden.

2.1.2 Publikation

Rohwer N, Lobitz S, Daskalow K, Jöns T, Vieth M, Schlag PM, Kemmner W, Wiedenmann B, Cramer T and Höcker M.

HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells.

British Journal of Cancer 2009, 100 (5):772-781.

[doi: 10.1038/sj.bjc.6604919](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604919)

2.2 Manuskript II: “Hypoxia-inducible factor 1 α mediates anoikis resistance via suppression of α 5 integrin”

2.2.1 Zusammenfassung

Die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α in den beiden Magenkarzinomzelllinien AGS und MKN28 führte zu einer signifikanten Inhibition der tumorbiologisch relevanten Prozesse Migration, Invasion und Adhäsion an primäre Endothelzellen. Sowohl die Migration als auch die Invasion werden entscheidend durch die Familie der Integrine reguliert. Integrine fungieren als Transmembranrezeptoren und vermitteln die Zelladhäsion zur extrazellulären Matrix. Veränderungen der Integrinexpression erfolgen häufig im Zusammenhang mit der malignen Transformation. Daher wurde die Oberflächenpräsentation einer Reihe von Integrinen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es zeigte sich, dass die Inaktivierung von HIF-1 α in beiden Magenkarzinomzelllinien zu einer selektiven und signifikanten Induktion des α 5-Integrins führte. Diese Induktion des α 5-Integrins konnte sowohl an der Zelloberfläche als auch auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Integrinexpression wird durch zahlreiche Signalwege reguliert, u.a. können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine entscheidende Rolle in der Regulation von Integrinen spielen. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die Behandlung der HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen mit dem ROS-Inhibitor Diphenyleneiodonium (DPI) die Induktion des α 5-Integrins sowohl an der Zelloberfläche als auch auf mRNA-Ebene vollständig aufhob. Ferner konnte gezeigt werden, dass die HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen einen doppelt so hohen Gehalt an ROS aufwiesen wie die entsprechenden HIF-1 α -kompetenten Kontrollzellen. Als molekularer Mechanismus der Induktion des α 5-Integrins infolge des Verlustes von HIF-1 α wurde somit ein erhöhter Gehalt an ROS in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen identifiziert.

Das α 5-Integrin bildet die limitierende Komponente des Fibronektinrezeptors α 5 β 1. Es ist bekannt, dass α 5 β 1 als Tumorsuppressor fungieren kann und über diese Funktion an der Induktion von Anoikis in epithelialen Zellen beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde die Apoptoserate der HIF-1 α -kompetenten und HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen sowohl unter adhärennten Konditionen als auch in Suspension unter Anoikis-Konditionen miteinander verglichen. Dabei ergaben Zellzyklusanalysen sowie ein Caspase-3-Aktivitätsassay, dass unter adhärennten Bedingungen die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α zu keiner Veränderung der Apoptoserate führte. Im Gegensatz dazu bewirkte die Inhibition von HIF-1 α eine signifikante Zunahme der Anoikisrate. Die Inhibition der ROS-Produktion durch Behandlung der HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen mit DPI führte wiederum zu einer Reduktion der Anoikisrate auf das Niveau der HIF-1 α -kompetenten Kontrollzellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit einem blockierenden anti- α 5-Integrin-Antikörper zu einer signifikanten Abnahme der Anoikisrate in den HIF-1 α -defizienten

Magenkarzinomzellen führte. Ergänzend wurde mit Hilfe eines Koloniebildungsassays in Soft-Agar nachgewiesen, dass die Inaktivierung von HIF-1 α die Koloniebildung unter substratunabhängigen Bedingungen signifikant reduzierte.

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse konnten zudem gänzlich durch Applikation des pharmakologischen HIF-1-Inhibitors 2-Methoxyestradiol bestätigt werden.

Diese Untersuchungen zeigten erstmals, dass HIF-1 eine zentrale Rolle in der Regulation von Anoikis mittels Suppression des α 5-Integrins einnimmt. Diese Inhibition der integrinvermittelten Apoptose könnte einen weiteren molekularen Mechanismus der tumorfördernden Wirkung von HIF-1 darstellen.

2.2.2 Publikation

Rohwer N, Welzel M, Daskalow K, Pfander D, Wiedenmann B, Detjen K and Cramer T.

Hypoxia-inducible factor 1 α mediates anoikis resistance via suppression of α 5 integrin.

Cancer Research 2008, 68 (24): 10113-10120.

[doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1839](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1839)

2.3 Manuskript III: “Hypoxia-inducible factor 1 α determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF- κ B”

2.3.1 Zusammenfassung

Die Effektivität der aktuellen chemotherapeutischen Therapieregime des Magenkarzinoms ist v.a. aufgrund der rapiden Ausbildung von resistenten Tumorzellen nur unzureichend. Eine Vielzahl experimenteller Studien lässt vermuten, dass dem Transkriptionsfaktor HIF-1 eine funktionelle Bedeutung für die Vermittlung von Resistenzen gegenüber Chemo- und Radiotherapie zukommt. Vor diesem Hintergrund sollten die molekularen Mechanismen der resistenzvermittelnden Wirkung von HIF-1 charakterisiert werden.

Für diese Analysen wurden Magenkarzinomzellen mit dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU), das bei der Therapie des humanen Magenkarzinoms eine zentrale Stellung einnimmt, behandelt. Die Behandlung der Magenkarzinomzelllinie AGS führte zu einer dosisabhängigen Inhibition des Zellwachstums, wobei die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α die Effektivität von 5-FU signifikant verstärkte. Die Überexpression von HIF-1 α bewirkte hingegen eine signifikante Steigerung der Resistenz gegenüber 5-FU. Zellzyklusanalysen demonstrierten, dass sowohl ein Arrest der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus sowie die Induktion von Apoptose ursächlich an der Wachstumshemmung durch 5-FU beteiligt waren. Beide Effekte waren deutlich stärker ausgeprägt in den HIF-1 α -defizienten AGS Zellen.

Häufig kommt Regulatoren von Zellproliferation und Apoptose, wie beispielsweise p53 und NF- κ B, eine zentrale Bedeutung in der Vermittlung von Chemoresistenzen zu. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass die Behandlung mit 5-FU zu einer Induktion des p53-Proteins führte, die in den HIF-1 α -defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich verstärkt war. Die Stabilisierung von p53 durch 5-FU ging einher mit einer Induktion des p53-Zielgens p21, das nachfolgend eine Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinase CDK2 sowie des Cyclins A ausschließlich in den HIF-1 α -defizienten AGS Zellen bewirkte. Die Inhibition des CDK2/Cyclin A-Komplexes führte zu einer Hypophosphorylierung des Zellzyklusregulators pRB, wodurch der beobachtete G₁-Arrest in den HIF-1 α -defizienten Zellen erklärt werden konnte. Die zentrale Bedeutung von p53 für die HIF-1-vermittelte Resistenz gegenüber 5-FU wurde zudem durch eine Inhibition von p53 mittels RNA-Interferenz in den HIF-1 α -defizienten AGS Zellen bestätigt. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind entscheidend an der Aktivierung von p53 durch chemotherapeutische Reagenzien beteiligt, und wie zuvor gezeigt wurde, verstärkt die Inaktivierung von HIF-1 α die Produktion von ROS in den AGS Zellen. In Übereinstimmung mit diesen Daten supprimierte die Behandlung der HIF-1 α -defizienten AGS Zellen mit den ROS-Inhibitoren Diphenyleiodonium oder Apocynin die 5-FU-induzierte Expression von p53 und seiner Zielgene p21 und MDM2. Zudem verminderte die Inhibition der ROS die Toxizität von 5-FU in den HIF-1 α -defizienten AGS Zellen. Die zuvor beschriebenen

Daten wurden alle mit AGS Zellen, die funktionales *p53* aufweisen, erhoben. Um die Bedeutung von *p53* für die HIF-1-vermittelte Chemoresistenz näher zu charakterisieren, wurden diese Daten um Untersuchungen mit der Magenkarzinomzelllinie MKN28, die eine funktionelle Mutation im *p53*-Gen aufweist, ergänzt. Auch die 5-FU-Behandlung der MKN28 Zellen bewirkte eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation, jedoch mit deutlich geringerer Toxizität als bei den AGS Zellen. Die 5-FU-induzierte Wachstumshemmung der MKN28 Zellen konnte durch die Inaktivierung von HIF-1 α nur geringfügig bei höchster Dosis und langer Behandlungsdauer verstärkt werden. Entsprechend dem *p53*-Status der MKN28 Zellen führte die Behandlung mit 5-FU nicht zu einer Induktion des *p53*-Proteins und *p53*-induzierten Apoptose. Interessanterweise wurde aber durch Rekonstitution von *p53* mit Hilfe des Reagenz PRIMA-1 die Sensibilität für 5-FU in den MKN28 Zellen erhöht. Dieser Effekt war zudem bei den HIF-1 α -defizienten MKN28 Zellen deutlich stärker ausgeprägt.

Auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird häufig als Antwort auf chemotherapeutische Reagenzien aktiviert. Mittels „*Electrophoretic mobility shift assays*“ (EMSA) konnte nachgewiesen werden, dass die Bindungskapazität von NF- κ B in den HIF-1 α -kompetenten AGS Zellen durch 5-FU deutlich induziert wurde, wohingegen die Inaktivierung von HIF-1 α zu einer drastischen Reduktion der NF- κ B-Bindungsaktivität führte. Dementsprechend verminderte auch die Überexpression der NF- κ B-Untereinheit p65 die Effektivität von 5-FU in den HIF-1 α -defizienten AGS Zellen. Schließlich zeigten EMSA-Analysen, dass die Behandlung der MKN28 Zellen mit 5-FU zwar eine Aktivierung der NF- κ B-DNA-Bindung bewirkte, jedoch blieb diese unbeeinflusst von der HIF-1 α -Inhibition.

Diese Untersuchungen konnten erstmals zeigen, dass HIF-1 die Resistenz gegenüber klassischen Chemotherapeutika wie 5-FU in Abhängigkeit vom *p53*-Status durch einerseits Inhibition von *p53* und andererseits Aktivierung von NF- κ B vermitteln kann. In Anbetracht dieser Ergebnisse scheinen HIF-1-inhibierende Strategien als innovativer Ansatz zur Therapie des humanen Magenkarzinoms nur unter Berücksichtigung des *p53*-Status sinnvoll zu sein.

2.3.2 Publikation

Rohwer N, Dame C, Haugstetter A, Wiedenmann B, Detjen K, Schmitt CA and Cramer T.

Hypoxia-inducible factor 1 α determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF- κ B.

PLoS ONE 2010, 5 (8): e12038

[doi: 10.1371/journal.pone.0012038](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012038)

3 Diskussion

Angesichts der zentralen Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-1 für die Regulation der Metastasierung und für die Vermittlung von Therapieresistenz in diversen Tumorentitäten sowie dem Einfluss beider Faktoren auf die Therapiesensitivität des humanen Magenkarzinoms, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von HIF-1 für verschiedene Parameter der humanen Magenkarzinogenese charakterisiert. Aufgrund der Beobachtung, dass HIF-1 α vor allem in späten Stadien der humanen Magenkarzinogenese verstärkt exprimiert wird, war es nahe liegend, die Bedeutung von HIF-1 für metastasierungsrelevante Prozesse wie Migration, Invasion, Endothelzellinteraktion und substratunabhängiges Wachstum zu untersuchen. Für diese Untersuchungen wurde eine stabile Inaktivierung von HIF-1 α durch lentiviralvermittelte RNA-Interferenz in zwei humanen Magenkarzinomzelllinien erfolgreich etabliert. Unter Verwendung der HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzelllinien wurde gezeigt, dass HIF-1 eine zentrale Rolle in der Regulation von Metastasierung und in der Vermittlung von Chemoresistenz im humanen Magenkarzinom einnimmt. Des Weiteren wurden in dieser Arbeit mehrere Mechanismen identifiziert, die die fördernde Wirkung von HIF-1 auf die Metastasierung und die Therapieresistenz im Magenkarzinom erklären. Die gewonnenen Erkenntnisse schaffen damit eine Grundlage für die Entwicklung innovativer Therapiestrategien zur Behandlung des humanen Magenkarzinoms.

3.1 Expression von HIF-1 α im humanen Magenkarzinom

Die Charakterisierung des Expressionsmusters von HIF-1 α im Verlauf der Pathogenese des humanen Magenkarzinoms zeigte eine deutliche Überexpression von HIF-1 α vor allem in fortgeschrittenen Stadien der Magenkarzinogenese. Die Expression von HIF-1 α konnte keiner spezifischen histologischen Gewebestruktur zugeordnet werden, weshalb die Induktion von HIF-1 α durch die tumorassoziierte Hypoxie eher unwahrscheinlich ist und die Stabilisierung von HIF-1 α vermutlich auf die Expression aktivierter Onkogene und/oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zurückzuführen ist. Eine Überexpression von HIF-1 α im humanen Magenkarzinom konnte bereits durch mehrere Studien belegt werden, jedoch zeigten sie im Vergleich zu den vorliegenden Daten teilweise geringere Prozentzahlen HIF-1 α -positiver Tumorzellen [138-142]. Da die Zusammensetzung der Patientenkollektive sowie die Anzahl analysierter Magenkarzinompräparate in allen Studien vergleichbar waren, sind die Differenzen in den Prozentzahlen HIF-1 α -positiver Tumorzellen wahrscheinlich auf methodische Unterschiede im immunhistochemischen Nachweis von HIF-1 α oder in der Quantifizierung zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine hochsensitive Nachweismethode als Standardtechnik eingesetzt, wodurch zumindest zum Teil die höheren Zahlen HIF-1 α -positiver Tumorzellen zu erklären sind. Im Gegensatz zu den Geweben fortgeschrittener Magenkarzinogenese zeigten lediglich 15% aller analysierten Magenfrühkarzinomgewebe eine

Expression von HIF-1 α in den Kernen neoplastischer Zellen. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit einer von Sumiyoshi und Mitarbeitern erhobenen Studie, weicht aber von den Resultaten zweier anderer Arbeiten deutlich ab, die weitaus mehr HIF-1 α -positive Tumorzellen in ihren analysierten Magenfrühkarzinompräparaten detektiert haben [138,141,142]. Eine endgültige Erklärung für diese in der Literatur sehr heterogen beschriebene Expression von HIF-1 α im humanen Magenfrühkarzinom kann zurzeit nicht gegeben werden, vielmehr bedarf es der Analyse eines größeren Patientenkollektivs. Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten scheint HIF-1 α als unabhängiger prognostischer Marker für das humane Magenkarzinom eher ungeeignet zu sein. Aufgrund des Nachweises einer HIF-1 α -Expression in nahezu allen Präparaten fortgeschrittener Magenkarzinogenese konnte keine signifikante Korrelation zwischen der HIF-1 α -Proteinexpression und der Lymph- und Blutgefäßinvasion, der Metastasierung sowie dem Tumorstadium errechnet werden. Für eine Reihe anderer Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Pankreas- und dem Zervixkarzinom sowie auch für gastrointestinale Stromatumoren, wurde hingegen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression von HIF-1 α in neoplastischen Zellen und einer infausten Prognose nachgewiesen [114,116,143,144]. Ebenso zeigten zwei Studien mit japanischen Patientenkollektiven der Arbeitsgruppe von Yoshihiko Maehara in multivariaten Analysen, dass die HIF-1 α -Expression im Magenkarzinom mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist [140,141]. In einer dieser beiden Arbeiten wurde jedoch neben der nukleären HIF-1 α -Expression auch der cytoplasmatische Nachweis von transkriptionell inaktivem HIF-1 α ⁸ in die Auswertung mit einbezogen [140]. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit konnten drei weitere Studien ebenfalls keine prognostische Signifikanz der HIF-1 α -Expression für das humane Magenkarzinom ableiten [139,142,145]. In einer dieser Publikationen wurden zwei verschiedene Expressionsmuster für HIF-1 α in den untersuchten Magenkarzinompräparaten beschrieben: eine fokale Expression und eine Expression an den invasiven Tumorgrenzen [139]. Die auf die invasiven Tumorränder begrenzte HIF-1 α -Expression, wie sie auch in dieser Arbeit beobachtet wurde, war dabei assoziiert mit Merkmalen eines aggressiveren Tumorwachstums wie der Lymphknotenmetastasierung. Auch beim Mammakarzinom konnte verschiedenen Mustern der HIF-1 α -Expression eine unterschiedliche prognostische Bedeutung zugewiesen werden [146]. Anhand dieser Daten scheint die prognostische Signifikanz einer HIF-1 α -Überexpression von mehreren Faktoren, wie beispielsweise der Tumorentität, dem Tumorstadium und dem vorherrschenden HIF-1 α -Expressionsmuster, abhängig zu sein. Nicht zuletzt spielen natürlich auch methodische Faktoren, wie eine zuverlässige Nachweismethode, eine einheitliche Quantifizierung und ein ausreichend großes Patientenkollektiv, eine entscheidende Rolle.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten eindeutig, dass HIF-1 α in einem engen zeitlichen und räumlichen Zusammenhang zur Metastasierung des Magenkarzinoms exprimiert wird. Eine nukleäre

⁸ Ausschließlich ein nukleärer Nachweis von HIF-1 α ist mit einem transkriptionell aktiven HIF-1-System vereinbar.

Expression von HIF-1 α wurde häufig in neoplastischen Zellen an den invasiven Tumorgrenzen beobachtet, was die Hypothese zuließ, dass insbesondere invasiv wachsende Magenkarzinomzellen auf die Expression von HIF-1 α angewiesen sind. Aus diesem Grund wurde nachfolgend die Bedeutung von HIF-1 für die lokale Invasion und die Metastasierung durch eine Reihe von *in vitro*-Analysen mit humanen Magenkarzinomzelllinien charakterisiert.

3.2 Bedeutung von HIF-1 für die Metastasierung des humanen Magenkarzinoms

Angesichts der beträchtlichen Bedeutung der Metastasierung beim humanen Magenkarzinom ist eine Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zur Metastasierung beitragen, absolut erforderlich. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit ein möglicher Einfluss von HIF-1 auf das Metastasierungsverhalten des Magenkarzinoms näher betrachtet und potentielle beteiligte Wirkmechanismen identifiziert.

Für diese Untersuchungen wurde HIF-1 α zum einen mit Hilfe eines gentechnischen Ansatzes durch RNA-Interferenz und zum anderen mittels eines pharmakologischen HIF-1-Inhibitors in den beiden verwendeten Magenkarzinomzelllinien inaktiviert. Die RNA-Interferenz gegen HIF-1 α wurde unter Verwendung eines lentiviralen Transfersystems realisiert. Sie bewirkte eine äußerst stabile funktionelle Inhibition von HIF-1 α , wodurch auch die Analyse lang andauernder Experimente ermöglicht wurde. Als pharmakologischer HIF-1-Inhibitor wurde das „*small molecule*“⁹ 2-Methoxyestradiol (2ME2) eingesetzt. 2ME2 ist ein physiologisches Östrogenmetabolit, das vor allem über seine antiangiogene und proapoptotische Wirkung eine starke Wachstumshemmung auf verschiedene Tumortypen ausübt [147]. In zahlreichen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen wurde eine signifikante Inhibition der HIF-1 α -Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Behandlung mit 2ME2 nachgewiesen [148-151]. Ebenso konnten in dieser Arbeit das HIF-1 α -Protein sowie auch seine transaktivierende Funktion durch Behandlung der Magenkarzinomzellen mit 2ME2 inhibiert werden.

3.2.1 Vermittlung von Zellmotilität und invasivem Wachstum

Erste Schlüsse hinsichtlich einer HIF-1-abhängigen Regulation der Metastasierung konnten nach Durchführung von Migrations- und Invasionsassays gezogen werden. Dabei kann anhand von Migrationsassays vor allem eine Aussage über die Motilität der Karzinomzellen getroffen werden, wohingegen für die Invasion durch Matrigel neben der reinen Migration zusätzlich proteolytische Aktivitäten der Zelle erforderlich sind. Sowohl die pharmakologische als auch die siRNA-vermittelte Inhibition von HIF-1 α bewirkte eine signifikante Reduktion der Migration und der Invasion der Magenkarzinomzellen. Interessanterweise war dieser Effekt unter normoxischen wie auch unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen zu beobachten, woraus zu schlussfolgern ist, dass HIF-1 auch unter Normoxie wichtige zelluläre Funktionen zu regulieren scheint. Unter normoxischen

⁹ „*Small molecules*“ sind niedermolekulare synthetische Moleküle.

Kulturbedingungen konnte zwar kein HIF-1 α -Protein in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden, was aber vermutlich auf die nur sehr kurze Halbwertszeit von HIF-1 α und die zu geringe Sensitivität der Nachweismethode zurückzuführen ist. Eine funktionelle Bedeutung von HIF-1 unter normoxischen Sauerstoffbedingungen wurde jedoch auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [152-154].

Aufgrund der zentralen Rolle von HIF-1 für die Regulation der Glykolyse wäre eine mögliche Erklärung für die infolge der HIF-1 α -Inhibition auftretende Reduktion der Zellmotilität ein zu geringer intrazellulärer ATP-Gehalt [152]. In der vorliegenden Arbeit konnte aber weder ein verringerter ATP-Gehalt in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen nachgewiesen werden noch konnte die Zugabe freien ATPs die Motilität der HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen wieder herstellen. Aus diesem Grund scheint eine reduzierte glykolytische Aktivität nicht für die verminderte Zellmotilität verantwortlich zu sein. Ein exakter Mechanismus des fördernden Einflusses von HIF-1 auf die Migration und die Invasion der Magenkarzinomzellen kann zu diesem Zeitpunkt nicht aufgezeigt werden. Anhand publizierter Erkenntnisse können aber Mutmaßungen hinsichtlich beteiligter molekularer Mechanismen angestellt werden. So haben auch die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass HIF-1 die Migration und das invasive Potential von verschiedenen Karzinomzelllinien und nicht-transformierten Zellen, wie Makrophagen, fördert [152,154-159].

Eine wichtige Voraussetzung für die Metastasierung ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), wobei Zell-Zell-Adhäsionen aufgehoben werden und die Tumorzellen einen motilen Phänotyp erlangen. Ein entscheidender Schritt bei der EMT ist der funktionelle Verlust des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, das einen Repressor der Metastasierung darstellt. Im humanen Magenkarzinom ist der funktionelle Verlust des E-Cadherin-Proteins mit einer erhöhten Tumordinvasion und einer schlechten Prognose assoziiert [160]. Zudem bewirkte die siRNA-vermittelte Inhibition von E-Cadherin eine gesteigerte Invasion humaner Magenkarzinomzellen [161]. In humanen Tumoren beruht die Inaktivierung von E-Cadherin häufig auf einer transkriptionellen Repression. Die Expression einiger dieser Transkriptionsregulatoren des E-Cadherin-Gens, wie ZFH1A, ZFH1B, TCF3, Twist und Snail, wird durch HIF-1 reguliert, wodurch HIF-1 einen indirekten Einfluss auf die E-Cadherin-Expression und damit auch auf die EMT sowie die Zellmotilität ausübt [162-164]. In Übereinstimmung damit konnte auch eine Reduktion des E-Cadherin-Proteinlevels durch Überexpression von HIF-1 α in Nieren- und Prostatakarzinomzellen beobachtet werden [156,164,165]. Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Motilität der HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen wäre also eine gesteigerte Expression oder aber eine Reexpression von E-Cadherin infolge einer reduzierten Transaktivierung zuvor genannter Regulatoren durch den Verlust von HIF-1 α . Dieser Mechanismus ist aber rein spekulativ und bedarf noch einer Bestätigung in zukünftigen Untersuchungen.

Das invasive Wachstum von Karzinomzellen ist eine entscheidende Voraussetzung für die Metastasierung, da es den Tumorzellen ermöglicht, in angrenzendes Gewebe und schließlich in Blut-

oder Lymphgefäße einzudringen. Die Invasion erfordert neben der reinen Zellmotilität auch proteolytische Aktivität zur Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix (EZM) [166]. Die Degradation dieser physikalischen Barrieren erfolgt mit Hilfe verschiedener proteolytischer Enzyme, wie beispielsweise den Matrixmetalloproteinasen (MMP). Die Aktivität der MMPs wird u.a. durch das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-(uPA)-System reguliert. In diesem System bindet uPA an seinen zellmembranständigen Rezeptor (uPAR), infolgedessen wird das inaktive Plasminogen in die aktive Protease, das Plasmin, umgewandelt [167]. Plasmin kann entweder direkt Proteine der EZM degradieren oder aktiviert MMPs. In Einklang hiermit führte die Hemmung von uPAR zu einer Reduktion der Invasion verschiedener Karzinomzellen [155,168]. Interessanterweise wird die Expression von uPAR sowie verschiedener MMPs, wie MMP-1 und MMP-2, durch HIF-1 reguliert, und HIF-1 fördert über die Transaktivierung dieser Proteine die Invasion diverser Karzinomzellen [155,158,168]. Wie die Arbeiten mehrerer Arbeitsgruppen gezeigt haben, wird auch die Invasivität humaner Magenkarzinomzellen entscheidend durch die Aktivität des uPA-uPAR-Systems sowie auch von MMP-2 reguliert [169-172]. Aufgrund der dargelegten Daten ist es vorstellbar, dass der in dieser Arbeit beschriebene fördernde Effekt von HIF-1 auf die Invasion der Magenkarzinomzellen zumindest teilweise auf eine HIF-1-abhängige Aktivierung von uPAR und MMP-2 zurückzuführen ist, was aber noch verifiziert werden müsste. In Ergänzung zu dieser Hypothese wurde kürzlich von Lin und Mitarbeitern demonstriert, dass der angiogene Wachstumsfaktor Cyr61/CCN1 die Invasion von Magenkarzinomzellen durch HIF-1-abhängige Expression von PAI-1, einem wichtigen Regulator des uPA-uPAR-Systems, stimulieren kann [173]. Neben uPAR und MMP-2 ist noch eine Vielzahl weiterer HIF-1-Zielgene identifiziert worden, die einen entscheidenden Einfluss auf die Invasion und die Metastasierung ausüben und die den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Phänotyp erklären könnten. Genannt seien hier als besonders prominente Beispiele der Chemokinrezeptor CXCR4 und sein Ligand SDF-1, das Proto-Onkogen *MET*, die Lysyloxidase, Cathepsin D und AMF (*autocrine motility factor*) [96,134,136,155,159]. Festzuhalten ist, dass die HIF-1-regulierte Genexpression, die einen motilen und invasiven Phänotyp begünstigt, sicherlich zelltypspezifisch ist und dass die Überexpression von HIF-1 α in Tumoren vermutlich multiple Aspekte des invasiven Wachstums beeinflusst.

3.2.2 Vermittlung von Anoikisresistenz

Nach der Intravasation in das Gefäßsystem ist es für das Überleben der Karzinomzellen während der Zirkulation in der Vaskulatur von entscheidender Bedeutung, substratunabhängig, das heißt ohne Kontakt zur EZM, proliferieren zu können. Die Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum spiegelt den Grad der malignen Transformation wider und hat einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorigenität *in vivo*. Das substratunabhängige Wachstum kann *in vitro* mit Hilfe eines Koloniebildungsassays in Soft-Agar abgebildet werden. Wie die vorliegende Arbeit gezeigt hat, führte sowohl die pharmakologische als auch die siRNA-vermittelte Inhibition von HIF-1 α zu einer

Reduktion des substratunabhängigen Wachstums beider Magenkarzinomzelllinien. Diese für die substratunabhängige Proliferation zentrale Bedeutung von HIF-1 konnte auch für humane Kolonkarzinomzellen, transformierte Melanozyten sowie murine Leberkarzinomzellen bestätigt werden, wobei aber eindeutige Mechanismen nicht identifiziert wurden [153,174,175]. Leek und Mitarbeiter beobachteten neben einem verlangsamten substratunabhängigen Wachstum eine erhöhte Apoptosefraktion in den HIF-1-defizienten Leberkarzinomzellen [175]. In der Studie von Dang *et al.* zeigten die HIF-1 α -defizienten Kolonkarzinomzellen auch unter substratabhängigen Kulturbedingungen einen Wachstumsarrest, so dass HIF-1 in diesem Zellsystem vermutlich eher eine generelle proliferative Wirkung aufweist und nicht speziell das substratunabhängige Wachstum fördert [153]. Im Gegensatz dazu war in dieser Arbeit die substratabhängige Proliferation wie auch die Apoptose unter adhärenen Wachstumsbedingungen von dem Verlust von HIF-1 α unbeeinflusst und HIF-1 stimulierte spezifisch das Wachstum unter substratunabhängigen Konditionen. Wie in der Publikation von Leek *et al.* gezeigt wurde, kann eine verstärkte Apoptose die Hemmung des substratunabhängigen Wachstums erklären [175]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Reduktion der substratunabhängigen Proliferation in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen auf eine erhöhte Apoptoserate zurückgeführt werden. Diese Sonderform der Apoptose, die eingeleitet wird durch den Verlust des Zellkontaktes zur EZM, wird als Anoikis bezeichnet. Die Anoikisresistenz bildet eine wichtige Voraussetzung für die Metastasierung und ermöglicht erst das substratunabhängige Wachstum von Krebszellen [26]. In Tiermodellen weisen anoikisresistente Tumorzellen ein höheres Metastasierungspotential und eine längere Überlebensdauer in der Blutzirkulation auf [176,177]. Als zentraler Vermittler der Anoikis wurde eine große Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren, die Integrine, identifiziert (vgl. 1.1.2.). Krebszellen erlangen eine Resistenz gegenüber der Anoikis durch Modifikation des Integrinexpressionsmusters oder aber durch Veränderungen der integrinvermittelten Signaltransduktion [26]. Eine Analyse der Oberflächenpräsentation einer Reihe von Integrinen ergab eine selektive und spezifische Induktion des $\alpha 5$ -Integrins nach Inhibition von HIF-1 α in beiden untersuchten Magenkarzinomzelllinien. Das $\alpha 5$ -Integrin repräsentiert die limitierende Komponente des $\alpha 5\beta 1$ -Fibronektinrezeptors. Häufig weisen humane Tumoren, wie beispielsweise das Pankreas- oder das Kolonkarzinom, eine verminderte $\alpha 5\beta 1$ -Expression im Vergleich zu den entsprechenden nicht-transformierten Normalgeweben auf [178-180]. Des Weiteren führte die Überexpression von $\alpha 5\beta 1$ in CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen und Kolonkarzinomzellen zu einer reduzierten Tumorzellproliferation *in vitro* wie auch zu einer verminderten Tumorigenität und Metastasierung *in vivo*, was eine tumorsupprimierende Wirkung von $\alpha 5\beta 1$ vermuten lässt [181-185]. Der ungebundene $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor übermittelt ein negatives Wachstumssignal ins Zellinnere, das aber durch Bindung an seinen Liganden Fibronektin aufgehoben werden kann [186,187]. Exemplarisch konnten CHO-Zellen dem durch Serumentzug induzierten Zelltod entgehen, wenn die Zellen über den $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor mit Fibronektin interagierten [188]. Auch in der vorliegenden Arbeit führte die funktionelle Blockierung des $\alpha 5$ -Integrins mit Hilfe eines

neutralisierenden anti- $\alpha 5$ -Antikörpers zu einer signifikanten Reduktion der Anoikis in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen. Dieses Ergebnis bestätigt nachhaltig die grundlegende Erfordernis des $\alpha 5$ -Integrins für die Anoikisinduktion in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen.

Im Gegensatz zur HIF-1-abhängigen Suppression des $\alpha 5$ -Integrins in den Magenkarzinomzellen konnte für das $\alpha 5$ -Integrin sowie eine Reihe weiterer Integrine aber auch eine Induktion durch Hypoxie in verschiedenen Karzinomzellen und nicht-transformierten Zellen gezeigt werden [189-194]. So führte die Inhibition von HIF-1 α zur Hemmung des $\beta 1$ -Integrins in Pankreaskarzinomzellen und des $\alpha v\beta 3$ -Rezeptors in Trophoblastzellen [189,195]. HIF-1 scheint also keine generelle supprimierende Wirkung auf die Integrinexpression auszuüben, sondern die HIF-1-abhängige Regulation der Integrinexpression ist abhängig vom jeweiligen Integrin, seiner Funktion und vom Grad der malignen Transformation sowie vermutlich von der Tumorentität. Eine sicherlich interessante weiterführende Untersuchung wäre der Nachweis des $\alpha 5$ -Integrins in humanen Magenkarzinompräparaten, um eine mögliche Korrelation zwischen einer HIF-1 α -Überexpression und einer Reduktion der Expression des $\alpha 5$ -Integrins zu überprüfen.

Die Integrinexpression wird durch zahlreiche Signalwege reguliert, u.a. auch durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) als *second messenger*. Zu den ROS gehören freie Radikale wie beispielsweise Superoxidanionen und Hydroxylradikale, stabile Oxidantien wie Wasserstoffperoxid und Ozon sowie der singuläre Sauerstoff. Neben der Generierung oxidativen Stresses scheinen ROS auch wichtige Signalfunktionen auszuüben und stellen zentrale Regulatoren der Zellproliferation, Apoptose und Migration dar [196]. Infolge der Regulation dieser krebsrelevanten Prozesse wurde den ROS auch eine wesentliche Rolle bei der Karzinogenese zugesprochen [197]. In epithelialen Mammazellen konnte eine Regulation der mRNA-Expression verschiedener Integrine durch oxidativen Stress gezeigt werden [198]. Zudem beobachteten Cho *et al.* eine ROS-vermittelte Induktion des $\alpha 5$ -Integrins nach Infektion von Magenkarzinomzellen mit *Helicobacter pylori* [199]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde als molekularer Mechanismus der Induktion des $\alpha 5$ -Integrins ein erhöhter ROS-Gehalt infolge der HIF-1 α -Inhibition identifiziert. Dabei verminderte die Reduktion des ROS-Gehalts in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen sowohl die Expression des $\alpha 5$ -Integrins als auch die Anoikis. Dies bestätigt eindeutig die funktionelle Bedeutung von ROS für die $\alpha 5$ -vermittelte Anoikisinduktion nach Verlust von HIF-1 α . In Übereinstimmung mit dieser Arbeit beschrieben Zhang *et al.* ebenfalls erhöhte ROS-Level in HIF-1 α -defizienten murinen embryonalen Fibroblasten oder aber eine Reduktion der ROS-Level in Nierenkarzinomzellen nach HIF-1 α -Überexpression [200,201]. Da die Mehrheit der intrazellulären ROS als natürliches Nebenprodukt des aeroben Energiemetabolismus an den mitochondrialen Komplexen I und III der Elektronentransportkette entsteht, wirkt HIF-1 vermutlich der ROS-Generierung durch Hemmung der mitochondrialen Aktivität entgegen [202,203]. Generell führt die Induktion von HIF-1 zu einer Hemmung des aeroben mitochondrialen Energiemetabolismus und zu einer Bevorzugung der

anaeroben Glykolyse (vgl. 1.3.3). Zudem reduziert HIF-1 die Bildung von Acetyl-CoA und damit die Aktivität des Tricarbonsäurezyklus durch Induktion der HIF-1-Zielgene Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (PDK1) und Laktatdehydrogenase A (LDHA) [202,204,205] (Abb. 6). Die HIF-1-induzierte Expression der PDK1 und LDHA führt infolge der verminderten Aktivität des Tricarbonsäurezyklus zu einer Reduktion der oxidativen Phosphorylierung und damit auch zu einer Verringerung der Produktion von ROS. Bekräftigt wird diese Hypothese durch Untersuchungen von Kim *et al.*, die zeigten, dass die Überexpression von PDK1 in HIF-1 α -defizienten murinen embryonalen Fibroblasten zu einer deutlichen Reduktion des ROS-Levels führte [204].

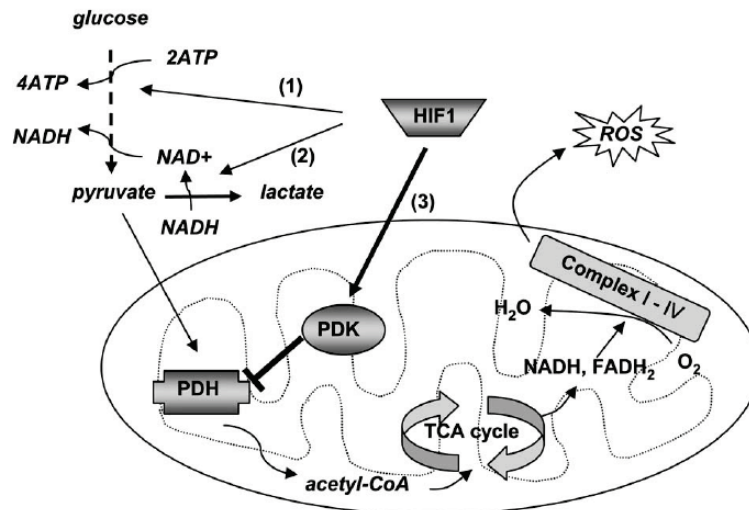


Abb. 6 Regulation des Energiemetabolismus durch HIF-1.

Die Induktion des Transkriptionsfaktors HIF-1 reduziert die mitochondriale Aktivität durch Aktivierung der Glykolyse (1), Stimulation der Bildung von Laktat aus Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase A (2) und Induktion der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (PDK1), welche die Pyruvatdehydrogenase (PDH) und damit die Bildung von Acetyl-CoA hemmt (3). Die resultierende Verminderung der oxidativen Phosphorylierung verringert die Produktion von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). (aus Kim *et al.* [204])

In Ergänzung zu diesen Mechanismen, die eine HIF-1-bedingte Reduktion der mitochondrialen Aktivität bewirken, inhibiert HIF-1 aber auch direkt die mitochondriale Biogenese und stimuliert die Autophagie der Mitochondrien [200,201]. Vermutlich reduziert HIF-1 also den Gehalt an intrazellulären ROS zum einen durch Inhibition des aeroben Energiemetabolismus und damit der mitochondrialen Aktivität und zum anderen durch Reduktion der Mitochondrienzahl selbst.

3.2.3 Vermittlung der Endothelzellinteraktion

Die Dissemination von Krebszellen in entfernte Organe erfolgt hauptsächlich über die Blut- und Lymphgefäßzirkulation. Aus diesem Grund hat die Interaktion zirkulierender Krebszellen mit Zellen des vaskulären Endotheliums auch einen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der Metastasierung. In dieser Arbeit wurde eindeutig belegt, dass HIF-1 die Interaktion der Magenkarzinomzellen mit primären Endothelzellen stimuliert. Die Mechanismen, mit Hilfe derer HIF-1 die Interaktion zwischen Karzinomzellen und Endothelzellen regulieren kann, sind bislang jedoch unbekannt. Bekannt ist aber,

dass die Interaktion von Karzinomzellen mit Endothelzellen entscheidend durch die Expression verschiedener Zelloberflächenproteine, wie beispielsweise Selektine, Integrine, Cadherine und Immunglobuline, bestimmt wird [206]. Eine Veränderung der Expression und der Oberflächenpräsentation dieser Ligand-Rezeptor-Systeme sowohl auf den Endothelzellen als auch auf den Karzinomzellen hat damit einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Metastasierung. Eine HIF-1-abhängige Regulation konnte für verschiedene Oberflächenproteine, wie beispielsweise Integrine und auch Selektin-Liganden, in unterschiedlichen Zellsystemen *in vitro* gezeigt werden [189-191]. Zudem wurde von Kong *et al.* die HIF-1-abhängige Induktion des β 2-Integrins als Mechanismus für die gesteigerte Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beschrieben [191]. Eine HIF-1-vermittelte Stimulation der Endothelzellinteraktion durch Modifikation der Oberflächenpräsentation von Adhäsionsproteinen auf den Karzinomzellen wäre also durchaus denkbar. Diese Überlegungen sind jedoch präliminär und das Ziel zukünftiger Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde HIF-1 erstmals als ein die Metastasierung stimulierender Faktor im humanen Magenkarzinom beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass HIF-1 verschiedene Einzelprozesse der Metastasierung, wie die Migration, die Invasion, das substratunabhängige Wachstum sowie die Endothelzellinteraktion, fördert. Für die HIF-1-abhängige Stimulation der Migration, Invasion und Endothelzellinteraktion wurden potentielle Mechanismen diskutiert, die auf der Induktion verschiedener HIF-1-Zielgene beruhen. Zudem wurde für die HIF-1-abhängige Regulation der Anoikisresistenz ein bisher vollkommen unbekannter Mechanismus identifiziert, der zumindest nicht direkt auf eine gesteigerte Genexpression spezifischer HIF-1-Zielgene zurückzuführen ist. Vielmehr führen HIF-1-induzierte metabolische Anpassungen letztendlich zu einer Suppression der Oberflächenpräsentation des α 5-Integrins, wodurch die Anoikisresistenz bedingt und das metastatische Wachstum gefördert wird.

3.3 Bedeutung von HIF-1 für die Vermittlung von Chemoresistenz im humanen Magenkarzinom

Neben dem Ausmaß der Metastasierung bestimmen sowohl die intrinsische als auch die im Verlauf der Therapie erworbene Chemoresistenz entscheidend die Therapieoptionen zur Behandlung des Magenkarzinoms. Die Aufklärung der molekularen Ursachen einer Resistenzentstehung kann maßgeblich zur Verbesserung der ungünstigen Prognose des Magenkarzinoms beitragen und eine Grundlage für die Entwicklung innovativer und auch effektiverer Therapiemaßnahmen schaffen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von HIF-1 für die Vermittlung von Chemoresistenzen am Beispiel zweier Magenkarzinomzelllinien detailliert untersucht und es wurden zwei bisher unbekannte resistenzvermittelnde Mechanismen identifiziert.

Für diese Analyse wurde das Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU) ausgewählt, da es sich als antineoplastische Therapiemaßnahme bewährt hat und ein effektives sowie gutverträgliches

Therapeutikum für das humane Magenkarzinom darstellt [207]. Die Behandlung solider Tumoren mit 5-FU erfolgt in der Regel als Kombinationstherapie, um einer möglichen Resistenzentstehung entgegenzuwirken. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass HIF-1 eine Resistenz gegenüber 5-FU in humanen Magenkarzinomzellen vermittelt und dass die Effektivität von 5-FU durch die Inaktivierung von HIF-1 α verstärkt wird. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis beobachteten auch Liu und Mitarbeiter eine HIF-1-abhängige Resistenz gegenüber 5-FU in humanen Magenkarzinomzellen [208]. Darüber hinaus konnte eine die Chemoresistenz fördernde Wirkung von HIF-1 ebenfalls in anderen Karzinomzelllinien, wie beispielsweise in Mammakarzinom-, Kolonkarzinom-, Fibrosarkom- und oralen Plattenepithelkarzinomzellen, belegt werden [124,125,128,209,210]. In den meisten dieser Arbeiten wurde der Fokus jedoch auf die Bedeutung von HIF-1 für die Hypoxie-induzierte Chemoresistenz gerichtet, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die HIF-1-abhängige Vermittlung der Chemoresistenz unter normoxischen Sauerstoffbedingungen analysiert wurde.

Wie Zellzyklusanalysen gezeigt haben, beruhte die antiproliferative Wirkung von 5-FU auf einem G₁-Arrest sowie auf einer zeitlich verzögerten Induktion der Apoptose. Die deutlich höhere Toxizität von 5-FU in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen konnte durch signifikant erhöhte Zellfraktionen in der G₁-Phase bzw. der Apoptose erklärt werden. Eine HIF-1-abhängige Suppression der Apoptose als Ursache für die HIF-1-vermittelte Chemoresistenz wurde auch in anderen Publikationen beschrieben [125,208,209]. Die Modulation der chemotherapieinduzierten Apoptoseantwort beruhte dabei häufig auf einer HIF-1-abhängigen Inhibition der proapoptotischen Proteine Bid und Bax und/oder einer Induktion des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 [124,125,208,211]. Neben den pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie spielen auch andere zelluläre Regulatoren von Proliferation und Apoptose wie p53 und NF- κ B eine entscheidende Rolle bei der Resistenzvermittlung. Das Tumorsuppressorgen *p53* liegt beim humanen Magenkarzinom wie auch bei den meisten anderen Krebserkrankungen häufig mutiert vor [212]. Zudem stellt mutiertes *p53* einen unabhängigen Prognosefaktor beim Magenkarzinom dar und ist mit einer erhöhten Chemotherapieresistenz u.a. auch gegen 5-FU assoziiert [213,214]. Ebenso ist bekannt, dass humane Magenkarzinomzelllinien mit mutiertem *p53* resistenter gegen eine Behandlung mit 5-FU sind als Magenkarzinomzellen mit induzierbarem Wildtyp *p53*, was auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte [215]. Das Protein p53 wird durch verschiedenste chemotherapeutische Wirkstoffe, wie u.a. auch durch 5-FU, induziert und aktiviert nachfolgend einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose [216,217]. Die fehlende Induzierbarkeit von p53 infolge von Mutationen führt letztlich zur Chemoresistenz aufgrund der Unfähigkeit der Zellen, eine p53-abhängige Apoptose einzuleiten. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die HIF-1-vermittelte Chemoresistenz in den Magenkarzinomzellen mit Wildtyp *p53* auf einer Suppression des p53-Proteins beruhte. In den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen mit Wildtyp *p53* wurde hingegen als Antwort auf die Stabilisierung von p53 durch 5-FU ein G₁-Arrest und die Apoptose induziert. Hierbei konnte der

G₁-Arrest der HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen durch eine p53-abhängige Aktivierung von p21 und einer anschließenden Hypophosphorylierung des Zellzyklusregulators pRB erklärt werden. Konträr zu diesem Ergebnis beobachteten Goda *et al.*, dass HIF-1 in nicht-transformierten Zellen den Hypoxie-induzierten Zellzyklusarrest durch Stabilisierung von p21 und Hypophosphorylierung von pRb vermittelt [218]. Diese gegensätzlichen Ergebnisse sind vermutlich einerseits durch die verschiedenartigen Stimuli und andererseits durch die unterschiedlichen Zellsysteme zu erklären: Goda *et al.* charakterisierten eine physiologische Antwort auf Hypoxie in zwei nicht-transformierten Zelllinien, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die Reaktion auf die Chemotherapie in Karzinomzellen untersucht wurde. In guter Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit kamen Mizokami und Mitarbeiter zu dem Ergebnis, dass Magenkarzinompatienten, deren Karzinome durch eine HIF-1 α -Überexpression und einen Verlust der p21-Expression gekennzeichnet sind, im Vergleich zu den entsprechenden anderen Patientengruppen die ungünstigere Prognose aufweisen [219]. Als Ursache für diese infauste Prognose wurden eine Reduktion der Apoptose und damit ein verbessertes Überleben der Karzinomzellen diskutiert.

Die funktionelle Bedeutung von p53 für die HIF-1-induzierte Chemoresistenz wurde in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen eindeutig bestätigt: Erstens steigerte die Inhibition von p53 in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen mit Wildtyp *p53* die Resistenz gegenüber 5-FU. Zweitens führte die Inhibition von HIF-1 α in Magenkarzinomzellen mit mutiertem *p53* zu keiner nennenswerten Erhöhung der Sensibilität für 5-FU, was aber durch Rekonstitution von p53 in diesen Zellen erreicht werden konnte. Diese Ergebnisse legen ein Zusammenspiel von HIF-1 und p53 in der Vermittlung von Chemoresistenz beim humanen Magenkarzinom nahe. Diese Vermutung wird bekräftigt durch eine Arbeit von Sumiyoshi *et al.*, die zeigt, dass Magenkarzinompatienten mit einer Überexpression von p53¹⁰ und HIF-1 α die schlechteste Prognose aufweisen [141]. Potentielle Wechselwirkungen von p53 und HIF-1 werden in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert [220]. In den meisten publizierten Arbeiten wurde der Fokus auf die Interaktion von p53 und HIF-1 unter Hypoxie oder Anoxie¹¹ gelegt und nicht wie in dieser Arbeit auf Untersuchungen unter normoxischen Sauerstoffbedingungen. Dabei zeigten An *et al.*, dass die Stabilisierung von p53 unter Hypoxie von HIF-1 α abhängt, was aber von Wenger *et al.* widerlegt wurde [221,222]. Zudem scheint p53 die Stabilisierung von HIF-1 α zu inhibieren [223]. Als Erklärungen für diese Wechselwirkung von p53 und HIF-1 α unter Hypoxie werden die Konkurrenz von p53 und HIF-1 α um den gemeinsamen Koaktivator p300, die indirekte Interaktion von p53 und HIF-1 α über MDM2 und die direkte Interaktion beider Proteine diskutiert [224-226]. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen ein distinkter Mechanismus als Begründung der HIF-1-abhängigen Repression von p53 unter Normoxie identifiziert. Vergleichbar der HIF-1-abhängigen Inhibition des α 5-Integrins konnte auch die HIF-1-vermittelte Suppression von p53 auf Veränderungen der intrazellulären ROS-Produktion zurückgeführt werden. Die funktionelle

¹⁰ Die Überexpression von p53 in humanen Tumoren ist ein Surrogatmarker für mutiertes *p53*.

¹¹ Als Anoxie bezeichnet man das vollständige Fehlen von Sauerstoff.

Bedeutung von ROS für den p53-vermittelten Wachstumsarrest nach Behandlung mit 5-FU konnte durch Inhibition der ROS und einer dadurch bedingten Zunahme der Chemoresistenz in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen bestätigt werden. Potentielle Erklärungsansätze der HIF-1-vermittelten Hemmung der Produktion intrazellulärer ROS wurden bereits im Kapitel 3.2.2 erörtert. In Ergänzung zu dieser Arbeit wurde in der Literatur hinreichend belegt, dass intrazelluläre ROS potente Induktoren der p53-Aktivität als Antwort auf die Chemotherapie darstellen [227].

Neben p53 wurde in der vorliegenden Arbeit auch für den Transkriptionsfaktor NF- κ B eine Beteiligung an der HIF-1-vermittelten Chemoresistenz nachgewiesen. Die NF- κ B Familie umfasst eine Gruppe dimerer Transkriptionsfaktoren. Sie aktivieren eine Vielzahl an Genen, die an der Regulation der Immunantwort, der Inflammation sowie der Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind [227]. NF- κ B spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung und -progression, insbesondere beim humanen Magenkarzinom [228,229]. Zudem belegten Camp *et al.*, dass die Aktivierung von NF- κ B ein zentrales Ereignis der Resistenzvermittlung in humanen Magenkarzinomzellen darstellt, was mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt [230]. Die Analysen der vorliegenden Arbeit gingen jedoch weit über die von Camp *et al.* hinaus, denn sie zeigten zusätzlich eine Abhängigkeit der resistenzfördernden Wirkung von NF- κ B von sowohl HIF-1 als auch p53. Eine Interaktion zwischen HIF-1 und NF- κ B wurde in den Publikationen anderer Arbeitsgruppen bereits beschrieben. Hierbei ist bekannt, dass NF- κ B die Expression von HIF-1 α unter Normoxie und Hypoxie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* regulieren kann [231-234]. Aber auch HIF-1 kann, übereinstimmend mit dieser Arbeit, die Aktivität von NF- κ B induzieren [235,236]. In der Arbeit von Walmsley *et al.* wird dargelegt, dass die Hypoxie-induzierte Suppression der Apoptose von der HIF-1-abhängigen Aktivierung von NF- κ B vermittelt wird, wobei ein zugrunde liegender Mechanismus jedoch nicht identifiziert wurde [236]. Scortegagna *et al.* zeigten hingegen, dass die HIF-1-abhängige Aktivierung von NF- κ B in Keratinozyten einerseits auf der Hyperphosphorylierung von I κ B α ¹² und andererseits auf der aktivierenden Phosphorylierung der NF- κ B-Untereinheit p65 beruht [235]. In der vorliegenden Arbeit war die HIF-1-vermittelte Aktivierung von NF- κ B zusätzlich abhängig vom p53-Status der Zellen: In Magenkarzinomzellen mit mutiertem p53 blieb die NF- κ B-Aktivität von der HIF-1 α -Inaktivierung unbeeinflusst, wohingegen in Magenkarzinomzellen mit Wildtyp p53 die HIF-1 α -Inhibition zu einer Reduktion der NF- κ B-Aktivität führte. Der p53- und der NF- κ B-Signalweg werden häufig gemeinsam infolge DNA-schädigender Einflüsse, wie der Chemotherapie, aktiviert und das Zusammenspiel beider Faktoren bestimmt letztendlich die Zellantwort auf die DNA-Schädigung [237,238]. In diesem Zusammenhang ist eine bidirektionale Repression von p53 und NF- κ B beschrieben, die hauptsächlich auf der Competition um den Koaktivator-Komplex CBP/p300 beruht [237,239,240]. Eine präzise molekulare Erklärung für die

¹² I κ B-Proteine inhibieren NF- κ B-Untereinheiten durch Komplexbildung. Infolge der Hyperphosphorylierung von I κ B werden die NF- κ B-Untereinheiten freigesetzt und transkriptionell aktiviert.

Wechselwirkungen von HIF-1, NF- κ B und p53 bei der Resistenzvermittlung kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht gegeben werden, sondern muss zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein wesentlicher Beitrag zum besseren Verständnis der chemoresistenzvermittelnden Wirkung von HIF-1 geleistet werden. Es wurden zwei distinkte Mechanismen identifiziert, die in Abhängigkeit von HIF-1 zur Chemoresistenz des humanen Magenkarzinoms beitragen: (i) die HIF-1-induzierte Repression des p53-Signalweges und (ii) die HIF-1-unterstützte und p53-abhängige Aktivierung von NF- κ B.

3.4 Klinische Relevanz und Ausblick

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 entscheidend an der Regulation von Metastasierung und der Vermittlung von Chemoresistenz im humanen Magenkarzinom beteiligt. Es wurden wesentliche, bisher unbekannte Mechanismen identifiziert, die in Abhängigkeit von HIF-1 die Aggressivität und Therapierbarkeit des humanen Magenkarzinoms maßgeblich beeinflussen. Zum einen wurde HIF-1 erstmals als zentraler Regulator von Anoikis durch Suppression des α 5-Integrins beschrieben. Zum anderen wurde erstmals gezeigt, dass HIF-1 die Chemoresistenz humaner Magenkarzinomzellen sowohl durch Inhibition von p53 als auch durch Stimulation der NF- κ B-Aktivität steigert. Zudem scheint die Grundlage beider Mechanismen eine HIF-1-abhängige Reduktion der intrazellulären ROS-Produktion zu sein. Angesichts dieser Erkenntnisse könnte eine HIF-1-Inhibition als innovativer Therapienansatz zur Behandlung des humanen Magenkarzinoms von klinischer Bedeutung sein. Abschließend soll anhand der gewonnenen Erkenntnisse die Definition von HIF-1 als protumorigener Faktor des humanen Magenkarzinoms diskutiert sowie die Bedeutung einer HIF-1-Inhibition als potentielle Therapie des Magenkarzinoms erörtert werden.

3.4.1 HIF-1 als protumorigener Faktor des humanen Magenkarzinoms?

Für verschiedenste humane Tumorentitäten wurde HIF-1 als protumorigener Faktor beschrieben und seine tumorfördernde Wirkung wurde in einer Vielzahl experimenteller Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt (vgl. 1.3.4). Auf der Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wirkt HIF-1 auch im humanen Magenkarzinom protumorigen. Der tumorfördernde Effekt von HIF-1 wurde dabei durch die HIF-1-abhängige Stimulation der Migration, der Invasion, der Endothelzellinteraktion sowie des substratunabhängigen Wachstums in humanen Magenkarzinomzellen belegt. In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde eine tumorfördernde Wirkung von HIF-1 auch *in vivo* in zwei Arbeiten mit Hilfe von Mausmodellen für das Magenkarzinom bestätigt. So beobachteten Stoeltzing *et al.*, dass die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α in humanen Magenkarzinomzellen zu einer signifikanten Abnahme des Tumorwachstums nach sowohl subkutaner

als auch orthotoper Xenotransplantation in immundefizienten Mäusen führte [241]. Ferner hat eine Arbeit von Yeo *et al.* gezeigt, dass auch die pharmakologische Inhibition von HIF-1 das Wachstum subkutaner Magenkarzinom-Xenotransplantate in immundefizienten Mäusen reduzierte [119]. Beide Arbeiten bestätigten zwar die tumorfördernde Wirkung von HIF-1 für das Magenkarzinom, jedoch wurden die molekularen Mechanismen nicht oder nur in Ansätzen charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen bisher unbekannte molekulare Mechanismen der protumorigenen Wirkung von HIF-1 identifiziert, die die Anwendung HIF-1-inhibierender Ansätze als innovative Therapiestrategie zur Behandlung des humanen Magenkarzinoms bekräftigen. Es liegen jedoch auch Studienergebnisse vor, die einen hemmenden Effekt von HIF-1 in der Pathogenese maligner Tumoren vermuten lassen. So konnte beispielsweise die Überexpression von HIF-1 α in diversen Tumorentitäten mit einer besseren Überlebensrate assoziiert werden und eine funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α resultierte in einem signifikant beschleunigten Wachstum von experimentellen Teratokarzinomen [242-244]. Die antitumorogene Wirkung von HIF-1 lässt sich möglicherweise durch die HIF-1-abhängige Transaktivierung proapoptotischer Proteine, wie beispielsweise BNIP3 und NIX, oder durch eine HIF-1-regulierte Stabilisierung von p53 erklären [221,245,246]. Zudem ist bekannt, dass HIF-1 indirekt auch einen Zellzyklusarrest induzieren kann [247]. Der Nettoeffekt von HIF-1 auf das Tumorstadium wird wohl von einer Vielzahl an Einflussgrößen bestimmt, wie beispielsweise dem Tumorstadium, der Tumorklassifikation und dem Verhältnis von pro- und antitumorigenen Faktoren. Studienergebnisse, die HIF-1 eine antitumorogene Wirkung für das Magenkarzinom zusprechen, liegen jedoch bislang nicht vor, so dass anhand der Erkenntnisse dieser Arbeit und den bisher publizierten Daten von einer vornehmlich tumorfördernden Wirkung von HIF-1 für das humane Magenkarzinom ausgegangen werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zudem darauf hin, dass HIF-1 insbesondere die Metastasierung des humanen Magenkarzinoms fördert. Die Bedeutung von HIF-1 für die Metastasierung des Magenkarzinoms wurde *in vivo* bisher nicht charakterisiert. Eine Verringerung der Metastasierung nach Inhibition von HIF-1 α konnte aber mittels muriner Metastasierungsmodelle für das Mammakarzinom *in vivo* belegt werden [122,123]. Vergleichbare *in vivo*-Daten für das Magenkarzinom fehlen bisher, nicht zuletzt aufgrund eines fehlenden geeigneten Tiermodells, in dem das Metastasierungsverhalten des Magenkarzinoms analysiert werden könnte. Kürzlich wurde jedoch ein murines orthotopes Magenkarzinommodell, in dem auch eine Metastasenbildung beobachtet wurde, von Bhargava und Mitarbeitern in Berlin entwickelt [248]. Die Untersuchung der Bedeutung von HIF-1 für das Metastasierungsverhalten des Magenkarzinoms anhand dieses Mausmodells wäre eine sinnvolle Ergänzung zu den Beobachtungen dieser Arbeit und ist in naher Zukunft in Kooperation mit dieser Arbeitsgruppe vorgesehen.

zellen. Diese Ergebnisse erlauben den Rückschluss, dass 2ME2 durchaus ein aussichtsreicher Kandidat für eine HIF-1-inhibitorische Therapiestrategie des metastasierenden Magenkarzinoms darstellen könnte. Zudem wird die Wirksamkeit und die Pharmakokinetik von 2ME2 als Substanz zur medikamentösen Krebstherapie bereits in klinischen Studien der Phase I/II evaluiert [251]. Auch für den HIF-1-Inhibitor YC-1¹³ konnte eine Verringerung der HIF-1-Aktivität in humanen Magenkarzinomzellen und dadurch bedingt eine Reduktion des Wachstums subkutaner Magenkarzinom-Xenotransplantate in immundefizienten Mäusen beobachtet werden [119]. Im Einklang mit diesem Ergebnis führten auch die HIF-1-Inhibition infolge der Hemmung von mTOR durch Rapamycin und die Inhibition der HSP90-HIF-1 α -Interaktion durch 17-AAG¹⁴ zu einer Reduktion des Tumorwachstums in subkutanen und orthotopen Magenkarzinommodellen [252,253]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit den bisher publizierten, soeben erläuterten Daten lassen eine HIF-1-Inhibition als Therapieansatz des humanen Magenkarzinoms durchaus aussichtsreich erscheinen. Jedoch ist in den letzten Jahren eine Reihe von Einsprüchen gegen HIF-1-inhibitorische Therapieansätze laut geworden. Ein wichtiger Einwand ist dabei, dass keiner der bisher identifizierten HIF-1-Inhibitoren ausschließlich und selektiv HIF-1 hemmt, sondern dass auch andere Signalmoleküle oder Signalwege inhibiert werden [254]. Diese Tatsache disqualifiziert den entsprechenden Wirkstoff natürlich nicht als potentiell antineoplastisches Therapeutikum, es bedarf aber einer genauen Analyse der Wirkung am Patienten [255]. Die Inhibition multipler, in die Karzinogenese involvierter Signalwege durch nur einen Wirkstoff kann zudem auch von Vorteil sein, und einige dieser Wirkstoffe, wie 2ME2, 17-AAG oder Topotecan, sind bereits in der klinischen Entwicklung und/oder Erprobung [254]. Auch die Komplexität des HIF-Systems, wie beispielsweise eine funktionelle Bedeutung von HIF-1 auch unter physiologischen Bedingungen, der Nachweis mehrerer HIF- α -Isoformen und die Induktion von HIF-1-Zielgenen mit sowohl pro- als auch antitumorigener Wirkung (vgl. 3.4.1), erfordert eine detaillierte Analyse eines HIF-1-inhibitorischen Therapieansatzes im jeweiligen Zielorgan oder -gewebe [104,249]. Zu berücksichtigen ist ferner, dass häufig auch inflammatorische Infiltrate in soliden Tumoren HIF-1 α exprimieren, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Es ist bekannt, dass die Funktion inflammatorischer Zelltypen ebenfalls in essenzieller Weise vom Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert wird [152]. Zudem können Entzündungsvorgänge sowie infiltrative Stromazellen entscheidend zum Tumorwachstum und zur Tumorprogression beitragen [256]. Der Effekt einer HIF-1-Inhibition auf die Stromazellen des Tumormikromilieus wurde bisher jedoch in präklinischen Studien noch nicht näher analysiert. Eine Hemmung von HIF-1 nicht nur in den Tumorzellen, sondern auch in den Stromazellen könnte aber durchaus förderlich für den Erfolg HIF-1-inhibitorischer Therapiestrategien sein [249].

Es ist nahe liegend, dass die Inhibition von HIF-1 als Einzeltherapie für Krebserkrankungen eine nur unzureichende Therapiemaßnahme darstellt, zum einen aufgrund des Risikos einer potentiellen

¹³ 3-(5'-Hydroxy-Methyl-2'-Furyl)-1-Benzylindazol.

¹⁴ 17-Allyl-Aminogeldanamycin.

Resistenzbildung und zum anderen, weil HIF-1-unabhängige Signalwege die Effekte der HIF-1-Inhibition überwinden könnten. Sinnvoller wäre daher der Einsatz HIF-1-inhibitorischer Therapiestrategien in Kombination mit konventionellen Therapieverfahren. Eine Steigerung der Effektivität herkömmlicher Chemotherapeutika durch die HIF-1-Inhibition konnte in der vorliegenden Arbeit für das humane Magenkarzinom belegt werden (vgl. 3.3). Eine sinnvolle weiterführende Untersuchung dieser Arbeit wäre daher die Analyse HIF-1-inhibitorischer Therapiestrategien in Kombination mit in der Klinik bereits etablierten Zytostatika in einem murinen Magenkarzinommodell. Angesichts der aussichtsreichen Ergebnisse für den HIF-1-Inhibitor 2ME2 wäre eine Kombination mit dem zur Behandlung des humanen Magenkarzinoms häufig eingesetzten 5-FU ein erfolgversprechender Ansatz. Eine wichtige Ergänzung dieses Versuchsansatzes wäre die Analyse des Einflusses von funktionalem *p53* auf den Erfolg der Therapie, da in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Steigerung der Chemotherapiesensibilität durch Inhibition von HIF-1 α hauptsächlich in Magenkarzinomzellen mit induzierbarem Wildtyp *p53* beobachtet wurde.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass HIF-1 ein vielversprechendes Ziel für innovative und zielgerichtete Therapieansätze zur Behandlung des Magenkarzinoms darstellt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die HIF-1-Inhibition die Wirkung konventioneller Zytostatika verstärkt und daher einen hohen Stellenwert für eine innovative und effiziente antiproliferative Kombinationstherapie besitzt.

4 Zusammenfassung

Die Überexpression des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors 1 (HIF-1) ist ein zentrales Charakteristikum vieler Tumorentitäten. Eine Vielzahl von Studien lässt vermuten, dass HIF-1 eine funktionelle Bedeutung für das Wachstum und die Progression solider Tumoren zukommt. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 scheint insbesondere auch an der Regulation der Metastasierung und der Vermittlung von Chemoresistenz beteiligt zu sein, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen weitgehend unklar sind. Das humane Magenkarzinom ist durch eine sehr ungünstige Prognose gekennzeichnet. Der Verlauf der Erkrankung wird weitgehend durch das Ausmaß der Metastasierung und durch die Ausbildung von Therapieresistenzen bestimmt. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-1 für die Regulation der Metastasierung und die Vermittlung von Chemoresistenz im humanen Magenkarzinom untersucht und potentielle Wirkmechanismen identifiziert werden. Für diese Untersuchungen wurde eine funktionelle Inaktivierung der regulatorischen α -Untereinheit von HIF-1 (HIF-1 α) in zwei humanen Magenkarzinomzelllinien mittels RNA-Interferenz erfolgreich etabliert. Erste Hinweise auf einen Einfluss von HIF-1 auf die Regulation der Metastasierung lieferte die Expressionsanalyse humaner Magenkarzinompräparate. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte, dass HIF-1 α vor allem in fortgeschrittenen Stadien der Magenkarzinogenese exprimiert wird, wobei invasiv wachsende Tumorbereiche eine verstärkte Expression aufwiesen. Die *in vitro*-Analyse verschiedener tumorrelevanter Parameter bestätigte die metastasierungsfördernde Wirkung von HIF-1: Die Inhibition von HIF-1 α führte zu einer signifikanten Reduktion der Migration, der Invasion, der Anoikisresistenz und der Interaktion mit Endothelzellen. Als molekularer Mechanismus der HIF-1-bedingten Anoikisresistenz wurde eine Suppression des α 5-Integrins identifiziert, das einen gut etablierten Vermittler der Anoikis darstellt. Durch diese umfangreiche Charakterisierung konnte HIF-1 erstmals als zentraler Regulator der Metastasierung beim humanen Magenkarzinom beschrieben werden. Des Weiteren führte die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α zu einer Steigerung der antiproliferativen Wirkung des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil. Diese Daten legen nahe, dass HIF-1 eine zentrale Bedeutung bei der Resistenzvermittlung gegenüber der Chemotherapie im humanen Magenkarzinom zukommt. Die Analyse der verantwortlichen Mechanismen ergab, dass HIF-1 die Chemosensitivität der Magenkarzinomzellen einerseits durch Inhibition von p53 und andererseits durch Stimulation der NF- κ B-Aktivität reguliert. Sowohl die Regulation der Anoikisresistenz durch Suppression des α 5-Integrins als auch die Resistenzvermittlung durch Regulation von p53 beruhten zumindest teilweise auf einer HIF-1-abhängigen Hemmung reaktiver Sauerstoffspezies. Zusammengefasst zeigten sowohl deskriptive als auch funktionelle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass HIF-1 die systemische Metastasierung und die Therapiesensitivität des humanen Magenkarzinoms maßgeblich beeinflusst. In Anbetracht dieser Ergebnisse scheinen HIF-1-inhibierende Strategien eine innovative und sinnvolle Ergänzung der aktuellen Behandlungsverfahren für das humane Magenkarzinom darzustellen.

5 Summary

Overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor 1 (HIF-1) is a common feature in a wide variety of human tumors. In several studies HIF-1 has been identified as a positive factor for growth and progression of solid tumors. HIF-1 appears to play a central role in determining metastasis and in mediating chemoresistance; however, the underlying molecular mechanisms are only beginning to emerge. Human gastric cancer is characterized by an unfavourable prognosis. The course of this often fatal disease is mainly determined by the metastatic spread and the occurrence of therapy resistance. Therefore, the aim of the present study was to characterize HIF-1's role in regulating metastasis and in mediating chemoresistance in human gastric cancer as well as the identification of potential underlying mechanisms. To achieve this, a functional inactivation of the regulatory α -subunit of HIF-1 (HIF-1 α) in two human gastric cancer cell lines was established via lentiviral mediated RNA interference. The expression analysis of HIF-1 α in human gastric cancer tissues initially indicated a functional relevance of HIF-1 for the regulation of metastasis. Immunohistochemistry showed specific HIF-1 α staining in advanced gastric adenocarcinoma and especially high HIF-1 α expression levels at the invading tumor edge. The assumed metastasis promoting impact of HIF-1 was further supported by the analysis of different tumor-relevant aspects *in vitro*: the inactivation of HIF-1 α significantly reduced migration, invasion, anoikis resistance and adhesion to endothelial cells. Interestingly, the induction of anoikis resistance by HIF-1 was attributed to the suppression of the α 5 integrin, a well established mediator of anoikis. In this comprehensive study, HIF-1 was characterized for the first time as a central regulator of metastasis in human gastric cancer. Furthermore, functional inactivation of HIF-1 α significantly increased the antiproliferative effect of the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil. These findings strongly suggest a pivotal role for HIF-1 in mediating chemoresistance in human gastric cancer. With respect to the underlying molecular mechanisms, the present study could show that HIF-1 regulates chemosensitivity of gastric cancer cells by inhibition of p53 protein as well as stimulation of NF- κ B activity. Both, the α 5 integrin-mediated anoikis resistance and the p53-regulated chemoresistance were at least partly caused by a HIF-1-dependent inhibition of reactive oxygen species. Taken together, both descriptive and functional investigations of the present study revealed that HIF-1 holds the potential to affect systemic metastasis and therapy sensitivity in human gastric cancer. In consideration of these results, HIF-1-inhibiting treatment strategies might be an innovative and useful supplement of the current treatment options for human gastric cancer.

Literaturverzeichnis

(Referenzen der Kapitel 1 und 3)

1. Robert Koch-Institut (Hrsg). (2006) Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch-Institut, Berlin.
2. Pschyrembel W. (2002) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage. de Gruyter, Berlin, New York.
3. Vogelstein B and Kinzler KW. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9**: 138-141.
4. Gatenby RA and Gillies RJ. (2008) A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**: 56-61.
5. Bodmer W. (1999) 1998 Runme Shaw Memorial Lecture: somatic evolution of cancer. *Ann Acad Med Singapore* **28**: 323-329.
6. Fearon ER and Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-767.
7. Vogelstein B and Kinzler KW. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**: 789-799.
8. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, and Soltoff S. (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**: 281-302.
9. Bishop JM. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**: 235-248.
10. Comings DE. (1973) A General Theory of Carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 3324-3328.
11. Knudson AG. (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 820-823.
12. Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, and Kemp CJ. (1998) The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* **396**: 177-180.
13. Payne SR and Kemp CJ. (2005) Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* **26**: 2031-2045.
14. Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN, Vogel H, Bradley A, Pinkel D, and Donehower LA. (1998) Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J* **17**: 4657-4667.
15. Hoeijmakers JHJ. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374.
16. Hanahan D and Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
17. Chambers AF, Groom AC, and MacDonald IC. (2002) Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**: 563-572.
18. Fidler IJ. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-458.

19. Radinsky R. (1995) Modulation of tumor cell gene expression and phenotype by the organ-specific metastatic environment. *Cancer Metastasis Rev* **14**: 323-338.
20. Liotta LA and Kohn EC. (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**: 375-379.
21. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, and Groom AC. (1998) Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* **153**: 865-873.
22. Frisch SM and Ruoslahti E. (1997) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 701-706.
23. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, and Bissell MJ. (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* **267**: 891-893.
24. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, and Hopwood D. (1994) Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* **107**: 3569-3577.
25. Polakowska RR, Piacentini M, Bartlett R, Goldsmith LA, and Haake AR. (1994) Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Dev Dyn* **199**: 176-188.
26. Chiarugi P and Giannoni E. (2008) Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* **76**: 1352-1364.
27. Varner JA and Cheresch DA. (1996) Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 724-730.
28. van der Flier A and Sonnenberg A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**: 285-298.
29. Stupack DG. (2007) The biology of integrins. *Oncology* **21**: 6-12.
30. Schwartz MA, Schaller MD, and Ginsberg MH. (1995) Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 549-599.
31. Evan GI and Vousden KH. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**: 342-348.
32. Morgan DO. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131-134.
33. Morgan DO. (1997) Cyclin-dependent kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-291.
34. Murray AW. (2004) Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell* **116**: 221-234.
35. Pavletich NP. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**: 821-828.
36. Sherr CJ. (1996) Cancer Cell Cycles. *Science* **274**: 1672-1677.
37. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, and Harris CC. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* **22**: 3551-3555.
38. Vogelstein B, Lane D, and Levine AJ. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-310.
39. Massague J. (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**: 298-306.

40. Igney FH and Krammer PH. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**: 277-288.
41. Fischer U, Janicke RU, and Schulze-Osthoff K. (2002) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**: 76-100.
42. Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, and Green DR. (2005) Connected to Death: The (Unexpurgated) Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Science* **310**: 66-67.
43. Moll UM, Wolff S, Speidel D, and Deppert W. (2005) Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 631-636.
44. Green DR and Kroemer G. (2004) The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* **305**: 626-629.
45. Schmitz I, Kirchhoff S, and Krammer PH. (2000) Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **32**: 1123-1136.
46. Fesik SW. (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* **5**: 876-885.
47. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, and Croce CM. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**: 1440-1443.
48. Meijerink JPP, Mensink EJB, Wang K, Sedlak TW, Sloetjes AW, de Witte T, Waksman G, and Korsmeyer SJ. (1998) Hematopoietic Malignancies Demonstrate Loss-of-Function Mutations of BAX. *Blood* **91**: 2991-2997.
49. Möller P, Koretz K, Leithäuser F, Brüderlein S, Henne C, Qentmeier A, and Krammer PH. (1994) Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* **57**: 371-377.
50. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, and Perucho M. (1997) Somatic Frameshift Mutations in the BAX Gene in Colon Cancers of the Microsatellite Mutator Phenotype. *Science* **275**: 967-969.
51. Volkmann M, Schiff JH, Hajjar Y, Otto G, Stilgenbauer F, Fiehn W, Galle PR, and Hofmann WJ. (2001) Loss of CD95 expression is linked to most but not all p53 mutants in European hepatocellular carcinoma. *J Mol Med* **79**: 594-600.
52. Rayet B and Gelinas C. (1999) Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* **18**: 6938-6947.
53. Bentires-Alj M, Dejardin E, Viatour P, Van Lint C, Froesch B, Reed JC, Merville MP, and Bours V. (2001) Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene* **20**: 2805-2813.
54. Chen CL, Edelstein LC, and Gelinas C. (2000) The Rel/NF-kappa B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* **20**: 2687-2695.
55. Erbar P. (2000) Onkologie Compact Lehrbuch. Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
56. Tannock I. (1978) Cell kinetics and chemotherapy: a critical review. *Cancer Treat Rep* **62**: 1117-1133.
57. Sawyers C. (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* **432**: 294-297.

58. Gatti L and Zunino F. (2005) Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol Med* **111**: 127-148.
59. Martinez-Lacaci I, Garcia MP, Soto JL, and Saceda M. (2007) Tumour cells resistance in cancer therapy. *Clin Transl Oncol* **9**: 13-20.
60. Chabner BA and Roberts TG. (2005) Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* **5**: 65-72.
61. Wilson TR, Longley DB, and Johnston PG. (2006) Chemoresistance in solid tumours. *Ann Oncol* **17**: 315-324.
62. Gottesman MM, Fojo T, and Bates SE. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**: 48-58.
63. Minchinton AI and Tannock IF. (2006) Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* **6**: 583-592.
64. Harris AL. (2002) Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**: 38-47.
65. Hockel M and Vaupel P. (2001) Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *J Natl Cancer Inst* **93**: 266-276.
66. Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, and Brune B. (2006) Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett* **237**: 10-21.
67. Cosse JP and Michiels C. (2008) Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem* **8**: 790-797.
68. Hohenberger P and Gretschel S. (2003) Gastric cancer. *Lancet* **362**: 305-315.
69. Becker JC, Domschke W, and Pohle T. (2006) [Medicinal prevention of gastrointestinal tumors: aspirin, Helicobacter and more?]. *Internist* **47**: 1229-1236.
70. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland und das Robert Koch-Institut. (2006) Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken.
71. Fuchs CS and Mayer RJ. (1995) Gastric Carcinoma. *N Engl J Med* **333**: 32-41.
72. Crew KD and Neugut AI. (2006) Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* **12**: 354-362.
73. Gonzalez CA, Jakszyn P, Pera G, Agudo A, Bingham S, Palli D, Ferrari P, Boeing H, del Giudice G, Plebani M, Carneiro F, Nesi G, Berrino F, Sacerdote C, Tumino R, Panico S, Berglund G, Siman H, Nyren O, Hallmans G, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Quiros JR, Allen N, Key TJ, Day NE, Linseisen J, Nagel G, Bergmann MM, Overvad K, Jensen MK, Tjonneland A, Olsen A, Bueno-De-Mesquita HB, Ocke M, Peeters PHM, Numans ME, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Trichopoulou A, Psaltopoulou T, Roukos D, Lund E, Hemon B, Kaaks R, Norat T, and Riboli E. (2006) Meat intake and risk of stomach and Esophageal adenocarcinoma within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* **98**: 345-354.

74. Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, Tumino R, Panico S, Berglund G, Siman H, Nyren O, Agren A, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Tornio MJ, Quiros JR, Allen N, Bingham S, Day N, Miller A, Nagel G, Boeing H, Overvad K, Tjonneland A, Bueno-De-Mesquita HB, Boshuizen HC, Peeters P, Numans M, Clavel-Chapelon F, Helen I, Agapitos E, Lund E, Fahey M, Saracci R, Kaaks R, and Riboli E. (2003) Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* **107**: 629-634.
75. Salaspuro MP. (2003) Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**: 679-694.
76. Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, Bueno-De-Mesquita HB, Ceroti M, Boeing H, Schulz M, del Giudice G, Plebani M, Carneiro F, Berrino F, Sacerdotte C, Tumino R, Panico S, Berglund G, Siman H, Hallmans G, Stenling R, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Quiros JR, Allen N, Key TJ, Bingham S, Day NE, Linseisen J, Nagel G, Overvad K, Jensen MK, Olsen A, Tjonneland A, Buchner FL, Peeters PH, Numans ME, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Roukos D, Trichopolou A, Psaltopoulou T, Lund E, Casagrande C, Slimani N, Jenab M, and Riboli E. (2006) Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Int J Cancer* **118**: 2559-2566.
77. Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, Chow WH, Jammon MD, Vaughan TL, Farrow DC, Schoenberg JB, Stanford JL, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, and Blot WJ. (2001) Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**: 1055-1062.
78. International Agency for Research on Cancer. (1994) Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **61**: 177-241.
79. Parsonnet J. (1998) Helicobacter pylori: the size of the problem. *Gut* **43**: 6-9.
80. Cristallini EG, Ascani S, and Bolis GB. (1992) Association Between Histologic Type of Polyp and Carcinoma in the Stomach. *Gastrointestinal Endosc* **38**: 481-484.
81. Sandler A, Bottcher K, Etter M, and Siewert JR. (2000) [Gastric carcinoma]. *Internist* **41**: 817-828.
82. Watanabe H, Jass JR, and Sobin SH. (1990) International Classification of Tumors: histological typing of oesophageal and gastric tumors. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
83. Gotoda T, Sasako M, Ono H, Katai H, Sano T, and Shimoda T. (2001) Evaluation of the necessity for gastrectomy with lymph node dissection for patients with submucosal invasive gastric cancer. *Br J Surg* **88**: 444-449.
84. Kretzschmar A and Schlag P. (2006) Welchen Stellenwert hat die neoadjuvante und die adjuvante Therapie im Behandlungskonzept des Magenkarzinoms? *Zentralbl Chir* **131**: 121-125.
85. Böttcher K, Roder JD, Busch R, Fink U, Siewert JR, Hermanek P, and Meyer HJ. (1993) [The epidemiology of stomach carcinoma from the surgical viewpoint. The results of the German Stomach Carcinoma Study 1992. The German Stomach Carcinoma Study Group]. *Dtsch Med Wochenschr* **118**: 729-739.
86. Lim L, Michael M, Mann GB, and Leong T. (2005) Adjuvant therapy in gastric cancer. *J Clin Oncol* **23**: 6220-6232.

87. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, and Martenson JA. (2001) Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* **345**: 725-730.
88. Vaupel P, Mayer A, and Höckel M. (2004) Tumor Hypoxia and Malignant Progression. In: *Methods in Enzymology: Oxygen Sensing*, pp. 335-354. Academic Press.
89. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, and Giaccia AJ. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **379**: 88-91.
90. Semenza GL and Wang GL. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**: 5447-5454.
91. Wang GL and Semenza GL. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **270**: 1230-1237.
92. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5510-5514.
93. Semenza GL. (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 551-578.
94. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, and Semenza GL. (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* **272**: 19253-19260.
95. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, and Whitelaw ML. (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **295**: 858-861.
96. Semenza GL. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 721-732.
97. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, and Kaelin WG, Jr. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**: 464-468.
98. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, and Ratcliffe PJ. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**: 468-472.
99. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, and Ratcliffe PJ. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**: 271-275.
100. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, and Kaelin WG. (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* **2**: 423-427.
101. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, and Kim KW. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* **111**: 709-720.

102. Frede S, Berchner-Pfannschmidt U, and Fandrey J. (2007) Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods Enzymol* **435**: 405-419.
103. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, and Gassmann M. (2001) Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* **15**: 1312-1314.
104. Weidemann A and Johnson RS. (2008) Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* **15**: 621-627.
105. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, and Marti HH. (1996) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* **271**: 1172-1180.
106. Denko NC. (2008) Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* **8**: 705-713.
107. Hopfl G, Ogunshola O, and Gassmann M. (2004) HIFs and tumors - causes and consequences. *Am J Physiol-Reg I* **286**: 608-623.
108. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, and Giallongo A. (1996) Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. *J Biol Chem* **271**: 32529-32537.
109. Semenza GL. (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trend Mol Med* **7**: 345-350.
110. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, and Harris AL. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2 alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* **157**: 411-421.
111. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, and Simons JW. (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* **59**: 5830-5835.
112. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, and Johnson RS. (2000) Hypoxia-inducible factor-1 alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* **60**: 4010-4015.
113. Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, and Arbeit JM. (2000) Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 alpha and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* **60**: 6189-6195.
114. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, and Oberhuber G. (2000) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* **60**: 4693-4696.
115. Bos R, van der GP, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, and van der WE. (2003) Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* **97**: 1573-1581.
116. Shibaji T, Nagao M, Ikeda N, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Fukumoto A, and Nakajima Y. (2003) Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* **23**: 4721-4727.
117. Ryan HE, Lo J, and Johnson RS. (1998) HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* **17**: 3005-3015.

118. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Fan F, Parikh AA, Bucana CD, Evans DB, Semenza GL, and Ellis LM. (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. *Am J Pathol* **163**: 1001-1011.
119. Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, and Park JW. (2003) YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* **95**: 516-525.
120. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, and Ratcliffe PJ. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8104-8109.
121. Williams KJ, Telfer BA, Airley RE, Peters HPW, Sheridan MR, van der Kogel AJ, Harris AL, and Stratford IJ. (2002) A protective role for HIF-1 in response to redox manipulation and glucose deprivation: implications for tumorigenesis. *Oncogene* **21**: 282-290.
122. Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, Hiraoka M, and Yoneda T. (2007) Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res* **67**: 4157-4163.
123. Liao D, Corle C, Seagroves TN, and Johnson RS. (2007) Hypoxia-inducible factor-1 alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* **67**: 563-572.
124. Brown LM, Cowen RL, Debray C, Eustace A, Erler JT, Sheppard FCD, Parker CA, Stratford IJ, and Williams KJ. (2006) Reversing Hypoxic Cell Chemoresistance in Vitro Using Genetic and Small Molecule Approaches Targeting Hypoxia Inducible Factor-1. *Mol Pharmacol* **69**: 411-418.
125. Hao J, Song X, Song B, Liu Y, Wei L, Wang X, and Yu J. (2008) Effects of lentivirus-mediated HIF-1alpha knockdown on hypoxia-related cisplatin resistance and their dependence on p53 status in fibrosarcoma cells. *Cancer Gene Ther* **15**: 449-455.
126. Li L, Lin X, Shoemaker AR, Albert DH, Fesik SW, and Shen Y. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 inhibition in combination with temozolomide treatment exhibits robust antitumor efficacy in vivo. *Clin Cancer Res* **12**: 4747-4754.
127. Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY, and Dewhirst MW. (2005) Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* **8**: 99-110.
128. Sasabe E, Zhou X, Li D, Oku N, Yamamoto T, and Osaki T. (2007) The involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* **120**: 268-277.
129. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, and Wenger RH. (2003) The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* **22**: 3213-3220.
130. Williams KJ, Telfer BA, Xenaki D, Sheridan MR, Desbaillets I, Peters HJ, Honess D, Harris AL, Dachs GU, van der KA, and Stratford IJ. (2005) Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiother Oncol* **75**: 89-98.
131. Ferrara N, Gerber HP, and LeCouter J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**: 669-676.

132. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, and Semenza GL. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**: 4604-4613.
133. Fidler IJ and Ellis LM. (1994) The Implications of Angiogenesis for the Biology and Therapy of Cancer Metastasis. *Cell* **79**: 185-188.
134. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JTA, Jeffrey SS, and Giaccia AJ. (2006) Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* **440**: 1222-1226.
135. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, and Semenza GL. (2003) Regulation of Colon Carcinoma Cell Invasion by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cancer Res* **63**: 1138-1143.
136. Staller P, Sulitkova J, Liszlwan J, Moch H, Oakeley EJ, and Krek W. (2003) Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* **425**: 307-311.
137. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, and Colgan SP. (2002) Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene. *Cancer Res* **62**: 3387-3394.
138. Cabuk D, Basaran G, Celikel C, Dane F, Yumuk PF, Iyikesici MS, Ekenel M, and Turhal NS. (2007) Vascular endothelial growth factor, hypoxia-inducible factor 1 alpha and CD34 expressions in early-stage gastric tumors: relationship with pathological factors and prognostic impact on survival. *Oncology* **72**: 111-117.
139. Griffiths EA, Pritchard SA, Valentine HR, Whitchelo N, Bishop PW, Ebert MP, Price PM, Welch IM, and West CM. (2007) Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer* **96**: 95-103.
140. Mizokami K, Kakeji Y, Oda S, Irie K, Yonemura T, Konishi F, and Maehara Y. (2006) Clinicopathologic significance of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression in gastric carcinomas. *J Surg Oncol* **94**: 149-154.
141. Sumiyoshi Y, Kakeji Y, Egashira A, Mizokami K, Orita H, and Maehara Y. (2006) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 5112-5117.
142. Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, Tsujie M, Yamamoto H, Miyata H, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M, and Monden M. (2006) Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer* **9**: 44-49.
143. Chen WT, Huang CJ, Wu MT, Yang SF, Su YC, and Chai CY. (2005) Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Clin Oncol* **35**: 207-213.
144. Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, Haruma K, and Chayama K. (2003) Hypoxia-inducible factor-1alpha expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep* **10**: 797-802.
145. Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, and Sugihara K. (2008) Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: Association with hypoxia-inducible factor (HIF-1 alpha) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. *Ann Surg Oncol* **15**: 2336-2344.

146. Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aarbodem Y, van Tinteren H, Harris AL, van Diest PJ, and van der Wall E. (2005) Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 {alpha} expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* **58**: 172-177.
147. Schumacher G and Neuhaus P. (2001) The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**: 405-410.
148. Escuin D, Kline ER, and Giannakakou P. (2005) Both Microtubule-Stabilizing and Microtubule-Destabilizing Drugs Inhibit Hypoxia-Inducible Factor-1 {alpha} Accumulation and Activity by Disrupting Microtubule Function. *Cancer Res* **65**: 9021-9028.
149. Kang SH, Cho HT, Devi S, Zhang Z, Escuin D, Liang Z, Mao H, Brat DJ, Olson JJ, Simons JW, LaVallee TM, Giannakakou P, Van Meir EG, and Shim H. (2006) Antitumor Effect of 2-Methoxyestradiol in a Rat Orthotopic Brain Tumor Model. *Cancer Res* **66**: 11991-11997.
150. Mabeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, Willard MT, Zhong H, Simons JW, and Giannakakou P. (2003) 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* **3**: 363-375.
151. Ricker JL, Chen Z, Yang XP, Pribluda VS, Swartz GM, and Van Waes C. (2004) 2-Methoxyestradiol Inhibits Hypoxia-Inducible Factor 1 {alpha}, Tumor Growth, and Angiogenesis and Augments Paclitaxel Efficacy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**: 8665-8673.
152. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, and Johnson RS. (2003) HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* **112**: 645-657.
153. Dang DT, Chen F, Gardner LB, Cummins JM, Rago C, Bunz F, Kantsevov SV, and Dang LH. (2006) Hypoxia-inducible factor-1alpha promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts. *Cancer Res* **66**: 1684-1936.
154. Liu YL, Yu JM, Song XR, Wang XW, Xing LG, and Gao BB. (2006) Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol Ther* **5**: 1320-1326.
155. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, and Semenza GL. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* **63**: 1138-1143.
156. Luo Y, He DL, Ning L, Shen SL, Li L, and Li X. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 alpha induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostatecancer cells. *Chin Med J* **119**: 713-718.
157. Miyoshi A, Kitajima Y, Ide T, Ohtaka K, Nagasawa H, Uto Y, Hori H, and Miyazaki K. (2006) Hypoxia accelerates cancer invasion of hepatoma cells by upregulating MMP expression in an HIF-1alpha-independent manner. *Int J Oncol* **29**: 1533-1539.
158. Shyu KG, Hsu FL, Wang MJ, Wang BW, and Lin S. (2007) Hypoxia-inducible factor 1 alpha regulates lung adenocarcinoma cell invasion. *Exp Cell Res* **313**: 1181-1191.
159. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, and Newcomb EW. (2006) Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* **86**: 1221-1232.

160. Chen HC, Chu RY, Hsu PN, Hsu PI, Lu JY, Lai KH, Tseng HH, Chou NH, Huang MS, Tseng CJ, and Hsiao M. (2003) Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas. *Cancer Lett* **201**: 97-106.
161. Zheng ZH, Sun XJ, Zhou HT, Shang C, Ji H, and Sun KL. (2005) Analysis of metastasis suppressing function of E-cadherin in gastric cancer cells by RNAi. *World J Gastroenterol* **11**: 2000-2003.
162. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, and Wu KJ. (2008) Direct regulation of TWIST by HIF-1[alpha] promotes metastasis. *Nat Cell Biol* **10**: 295-305.
163. luo d, Wang J, Li J, and post M. (2007) Snail is a Target Gene for HIF. *FASEB J* **21**: A1032-A103e.
164. Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH, and Semenza GL. (2006) Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B. *Cancer Res* **66**: 2725-2731.
165. Esteban MA, Tran MGB, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, Raval R, O'Brien TS, and Maxwell PH. (2006) Regulation of E-cadherin Expression by VHL and Hypoxia-Inducible Factor. *Cancer Res* **66**: 3567-3575.
166. Steeg PS. (2006) Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* **12**: 895-904.
167. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, and Duffy MJ. (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int J Cancer* **72**: 1-22.
168. Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, and donald-Goodfellow S. (1999) Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer* **80**: 617-623.
169. Lee DH, Yang Y, Lee SJ, Kim KY, Koo TH, Shin SM, Song KS, Lee YH, Kim YJ, Lee JJ, Choi I, and Lee JH. (2003) Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Induces the Invasiveness of Gastric Cancer Cells by Up-Regulating the Urokinase-type Plasminogen Activator System. *Cancer Res* **63**: 4648-4655.
170. Kim MH, Yoo HS, Chang HJ, Hong MH, Kim HD, Chung IJ, Shin BA, Cho MJ, Ahn BW, and Jung YD. (2005) Urokinase plasminogen activator receptor is upregulated by Helicobacter pylori in human gastric cancer AGS cells via ERK, JNK, and AP-1. *Biochem Biophys Res Comm* **333**: 874-880.
171. Bae IH, Park MJ, Yoon SH, Kang SW, Lee SS, Choi KM, and Um HD. (2006) Bcl-w Promotes Gastric Cancer Cell Invasion by Inducing Matrix Metalloproteinase-2 Expression via Phosphoinositide 3-Kinase, Akt, and Sp1. *Cancer Res* **66**: 4991-4995.
172. Oliveira MJ, Costa AC, Costa AM, Henriques L, Suriano G, Atherton JC, Machado JC, Carneiro F, Seruca R, Mareel M, Leroy A, and Figueiredo C. (2006) Helicobacter pylori Induces Gastric Epithelial Cell Invasion in a c-Met and Type IV Secretion System-dependent Manner. *J Biol Chem* **281**: 34888-34896.
173. Lin MT, Kuo IH, Chang CC, Chu CY, Chen HY, Lin BR, Sureshbabu M, Shih HJ, and Kuo ML. (2008) Involvement of Hypoxia-inducing Factor-1{alpha}-dependent Plasminogen Activator Inhibitor-1 Up-regulation in Cyr61/CCN1-induced Gastric Cancer Cell Invasion. *J Biol Chem* **283**: 15807-15815.

174. Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, and Powell MB. (2005) The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* **8**: 443-454.
175. Leek RD, Stratford I, and Harris AL. (2005) The Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Three-dimensional Tumor Growth, Apoptosis, and Regulation by the Insulin-Signaling Pathway. *Cancer Res* **65**: 4147-4152.
176. Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS, Connor TM, Lowe SW, Deichman GI, and Gudkov AV. (1996) p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* **13**: 1709-1719.
177. Zhu Z, Sanchez-Sweatman O, Huang X, Wiltrout R, Khokha R, Zhao Q, and Gorelik E. (2001) Anoikis and Metastatic Potential of Cloudman S91 Melanoma Cells. *Cancer Res* **61**: 1707-1716.
178. Hall PA, Coates P, Lemoine NR, and Horton MA. (1991) Characterization of integrin chains in normal and neoplastic human pancreas. *J Pathol* **165**: 33-41.
179. Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Oohara T, and Beger HG. (1995) Altered expression of extracellular matrix molecules and their receptors in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma in comparison with normal pancreas. *Int J Pancreatol* **18**: 227-234.
180. Stallmach A, von Lampe B, Matthes H, Bornhoft G, and Riecken EO. (1992) Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation. *Gut* **33**: 342-346.
181. Giancotti FG and Ruoslahti E. (1990) Elevated levels of the [alpha]5[beta]1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* **60**: 849-859.
182. Schirner M, Herzberg F, Schmidt R, Streit M, Schoning M, Hummel M, Kaufmann C, Thiel E, and Kreuser ED. (1998) Integrin alpha5beta1: a potent inhibitor of experimental lung metastasis. *Clin Exp Metastasis* **16**: 427-435.
183. Schreiner C, Fisher M, Hussein S, and Juliano RL. (1991) Increased tumorigenicity of fibronectin receptor deficient Chinese hamster ovary cell variants. *Cancer Res* **51**: 1738-1740.
184. Stallmach A, von LB, Orzechowski HD, Matthes H, and Riecken EO. (1994) Increased fibronectin-receptor expression in colon carcinoma-derived HT 29 cells decreases tumorigenicity in nude mice. *Gastroenterology* **106**: 19-27.
185. Varner JA, Emerson DA, and Juliano RL. (1995) Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* **6**: 725-740.
186. Juliano RL and Varner JA. (1993) Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 812-818.
187. Plath T, Detjen K, Welzel M, von MZ, Murphy D, Schirner M, Wiedenmann B, and Rosewicz S. (2000) A novel function for the tumor suppressor p16(INK4a): induction of anoikis via upregulation of the alpha(5)beta(1) fibronectin receptor. *J Cell Biol* **150**: 1467-1478.
188. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, and Ruoslahti E. (1995) The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6161-6165.
189. Cowden Dahl KD, Robertson SE, Weaver VM, and Simon MC. (2005) Hypoxia-inducible Factor Regulates {alpha}{beta}3 Integrin Cell Surface Expression. *Mol Biol Cell* **16**: 1901-1912.

190. Koike T, Kimura N, Miyazaki K, Yabuta T, Kumamoto K, Takenoshita S, Chen J, Kobayashi M, Hosokawa M, Taniguchi A, Kojima T, Ishida N, Kawakita M, Yamamoto H, Takematsu H, Suzuki A, Kozutsumi Y, and Kannagi R. (2004) Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8132-8137.
191. Kong TQ, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP, and Shelley CS. (2004) Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta 2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 10440-10445.
192. Spangenberg C, Lausch EU, Trost TM, Prawitt D, May A, Keppler R, Fees SA, Reutzel D, Bell C, Schmitt S, Schiffer IB, Weber A, Brenner W, Hermes M, Sahin U, Tureci O, Koelbl H, Hengstler JG, and Zabel BU. (2006) ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the alpha5beta1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. *Cancer Res* **66**: 3715-3725.
193. Walton HL, Corjay MH, Mohamed SN, Mousa SA, Santomena LD, and Reilly TM. (2000) Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(vbeta3) and alpha(vbeta5) in cultured human endothelial cells. *J Cell Biochem* **78**: 674-680.
194. Yoon SO, Shin S, and Mercurio AM. (2005) Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin. *Cancer Res* **65**: 2761-2769.
195. Chang Q, Qin R, Huang T, Gao J, and Feng Y. (2006) Effect of antisense hypoxia-inducible factor 1alpha on progression, metastasis, and chemosensitivity of pancreatic cancer. *Pancreas* **32**: 297-305.
196. Storz P. (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* **10**: 1881-1896.
197. Fruehauf JP and Meyskens FL, Jr. (2007) Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* **13**: 789-794.
198. Mori K, Shibamura M, and Nose K. (2004) Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res* **64**: 7464-7472.
199. Cho SO, Kim KH, Yoon JH, and Kim H. (2006) Signaling for integrin alpha5/beta1 expression in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial AGS cells. *Ann NY Acad Sci* **1090**: 298-304.
200. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, and Semenza GL. (2007) HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* **11**: 407-420.
201. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, and Semenza GL. (2008) Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* **283**: 10892-10903.
202. Semenza GL. (2007) Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* **405**: 1-9.
203. Liu Y, Fiskum G, and Schubert D. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**: 780-787.
204. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, and Dang CV. (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* **3**: 177-185.

205. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, and Denko NC. (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* **3**: 187-197.
206. Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, Scherbarth S, and Nance DM. (2000) Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol* **190**: 310-329.
207. Wils J. (1998) Treatment of gastric cancer. *Curr Opin Oncol* **10**: 357-361.
208. Liu L, Ning X, Sun L, Zhang H, Shi Y, Guo C, Han S, Liu J, Sun S, Han Z, Wu K, and Fan D. (2008) Hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci* **99**: 121-128.
209. Ravizza R, Molteni R, Gariboldi MB, Marras E, Perletti G, and Monti E. (2009) Effect of HIF-1 modulation on the response of two- and three-dimensional cultures of human colon cancer cells to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* **45**: 890-898.
210. Sullivan R, Pare GC, Frederiksen LJ, Semenza GL, and Graham CH. (2008) Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther* **7**: 1961-1973.
211. Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ, and Dive C. (2004) Hypoxia-Mediated Down-Regulation of Bid and Bax in Tumors Occurs via Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent and -Independent Mechanisms and Contributes to Drug Resistance. *Mol Cell Biol* **24**: 2875-2889.
212. Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, and Hirohashi S. (1993) P53 Mutation in Gastric-Cancer - A Genetic Model for Carcinogenesis Is Common to Gastric and Colorectal-Cancer. *Int J Cancer* **54**: 759-764.
213. Diez M, Medrano MJ, Gutierrez A, Lopez A, Muguerza JM, Hernandez P, Lozano O, Noguerales F, Ruiz A, and Granell J. (2000) P53 protein expression in gastric adenocarcinoma. Negative predictor of survival after postoperative adjuvant chemotherapy. *Anticancer Res* **20**: 3929-3933.
214. Nakata B, Chung KHYS, Ogawa M, Ogawa Y, Yanagawa K, Muguruma K, Inoue T, Yamashita Y, Onoda N, Maeda K, Sawada T, and Sowa M. (1998) p53 protein overexpression as a predictor of the response to chemotherapy in gastric cancer. *Surg Today* **28**: 595-598.
215. Osaki M, Tatebe S, Goto A, Hayashi H, Oshimura M, and Ito H. (1997) 5-fluorouracil (5-FU) induced apoptosis in gastric cancer cell lines: role of the p53 gene. *Apoptosis* **2**: 221-226.
216. Brown JM and Wouters BG. (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* **59**: 1391-1399.
217. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, and Housman DE. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**: 957-967.
218. Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, and Johnson RS. (2003) Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* **23**: 359-369.
219. Mizokami K, Kakeji Y, Oda S, and Maehara Y. (2006) Relationship of hypoxia-inducible factor 1alpha and p21WAF1/CIP1 expression to cell apoptosis and clinical outcome in patients with gastric cancer. *World J Surg Oncol* **4**: 94.

220. Hammond EM and Giaccia AJ. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 and p53: friends, acquaintances, or strangers? *Clin Cancer Res* **12**: 5007-5009.
221. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, and Neckers LM. (1998) Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Nature* **392**: 405-408.
222. Wenger RH, Camenisch G, Desbaillets I, Chilov D, and Gassmann M. (1998) Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha is not sufficient for hypoxic/anoxic p53 induction. *Cancer Res* **58**: 5678-5680.
223. Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T, and Neckers L. (1998) p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem* **273**: 11995-11998.
224. Chen D, Li M, Luo J, and Gu W. (2003) Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* **278**: 13595-13598.
225. Hansson LO, Friedler A, Freund S, Rudiger S, and Fersht AR. (2002) Two sequence motifs from HIF-1alpha bind to the DNA-binding site of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10305-10309.
226. Schmid T, Zhou J, Kohl R, and Brune B. (2004) p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J* **380**: 289-295.
227. Martindale JL and Holbrook NJ. (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**: 1-15.
228. Karin M. (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**: 431-436.
229. Karin M, Cao Y, Greten FR, and Li ZW. (2002) NF-[kappa]B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* **2**: 301-310.
230. Camp ER, Li J, Minnich DJ, Brank A, Moldawer LL, Mackay SL, and Hochwald SN. (2004) Inducible nuclear factor-kappaB activation contributes to chemotherapy resistance in gastric cancer. *J Am Coll Surg* **199**: 249-258.
231. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, and Gorlach A. (2007) 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* **18**: 4691-4697.
232. Frede S, Stockmann C, Freitag P, and Fandrey J. (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* **396**: 517-527.
233. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, and Karin M. (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* **453**: 807-811.
234. van Uden P., Kenneth NS, and Rocha S. (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J* **412**: 477-484.
235. Scortegagna M, Cataisson C, Martin RJ, Hicklin DJ, Schreiber RD, Yuspa SH, and Arbeit JM. (2008) HIF-1alpha regulates epithelial inflammation by cell autonomous NFkappaB activation and paracrine stromal remodeling. *Blood* **111**: 3343-3354.

236. Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, and Chilvers ER. (2005) Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med* **201**: 105-115.
237. Webster GA and Perkins ND. (1999) Transcriptional Cross Talk between NF- κ B and p53. *Mol Cell Biol* **19**: 3485-3495.
238. Yang C-R, Wilson-Van Pattern C, Planchon SM, Wuerzberger-Davis SM, Davis TW, Cuthill S, Miyamoto S, and Boothman DA. (2000) Coordinate modulation of Sp1, NF- κ B, and p53 in confluent human malignant melanoma cells after ionizing radiation. *FASEB J* **14**: 379-390.
239. Ravi R, Mookerjee B, van Hensbergen Y, Bedi GC, Giordano A, El-Deiry WS, Fuchs EJ, and Bedi A. (1998) p53-mediated Repression of Nuclear Factor- κ B RelA via the Transcriptional Integrator p300. *Cancer Res* **58**: 4531-4536.
240. Wadgaonkar R, Phelps KM, Haque Z, Williams AJ, Silverman ES, and Collins T. (1999) CREB-binding Protein Is a Nuclear Integrator of Nuclear Factor- κ B and p53 Signaling. *J Biol Chem* **274**: 1879-1882.
241. Stoeltzing O, McCarty MF, Wey JS, Fan F, Liu W, Belcheva A, Bucana CD, Semenza GL, and Ellis LM. (2004) Role of hypoxia-inducible factor 1 α in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst* **96**: 946-956.
242. Beasley NJP, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S, and Harris AL. (2002) Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in head and neck cancer: Relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* **62**: 2493-2497.
243. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, and Keshert E. (1998) Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**: 485-490.
244. Nakanishi K, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kasamatsu H, Matsuyama S, Matsuyama T, and Kawai T. (2005) Expression of hypoxia-inducible factor-1 α protein predicts survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Clin Cancer Res* **11**: 2583-2590.
245. Bruick RK. (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 9082-9087.
246. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, and Harris AL. (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* **61**: 6669-6673.
247. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, and Huang LE. (2004) HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* **23**: 1949-1956.
248. Bhargava S, Hotz B, Buhr H, and Hotz H. (2009) An orthotopic nude mouse model for preclinical research of gastric cardia cancer. *Int J Colorectal Dis* **24**: 31-39.
249. Semenza GL. (2007) Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today* **12**: 853-859.

-
250. Kaufman B, Scharf O, Arbeit J, Ashcroft M, Brown JM, Bruick RK, Chapman JD, Evans SM, Giaccia AJ, Harris AL, Huang E, Johnson R, Kaelin W, Jr., Koch CJ, Maxwell P, Mitchell J, Neckers L, Powis G, Rajendran J, Semenza GL, Simons J, Storkebaum E, Welch MJ, Whitelaw M, Melillo G, and Ivy SP. (2004) Proceedings of the Oxygen Homeostasis/Hypoxia Meeting. *Cancer Res* **64**: 3350-3356.
251. Schumacher G and Neuhaus P. (2006) [2-Methoxyestradiol - a new compound for cancer treatment]. *Dtsch Med Wochenschr* **131**: 825-830.
252. Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, Seidel U, Bataille F, Klein D, Ellis LM, Bolder U, Hofstaedter F, Schlitt HJ, Geissler EK, and Stoeltzing O. (2007) Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *Int J Cancer* **120**: 1803-1810.
253. Lang SA, Klein D, Moser C, Gaumann A, Glockzin G, Dahlke MH, Dietmaier W, Bolder U, Schlitt HJ, Geissler EK, and Stoeltzing O. (2007) Inhibition of heat shock protein 90 impairs epidermal growth factor-mediated signaling in gastric cancer cells and reduces tumor growth and vascularization in vivo. *Mol Cancer Ther* **6**: 1123-1132.
254. Melillo G. (2006) Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol Cancer Res* **4**: 601-605.
255. Patiar S and Harris AL. (2006) Role of hypoxia-inducible factor-1 {alpha} as a cancer therapy target. *Endocr Relat Cancer* **13**: 61-75.
256. Mantovani A, Allavena P, Sica A, and Balkwill F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* **454**: 436-444.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die durch ihre fachliche und moralische Unterstützung zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schuster danke ich für die Übernahme des Gutachtens und die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin sowie für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit.

Bei Herrn PD Dr. Andreas Sturm bedanke ich mich für die freundliche und unkomplizierte Unterstützung meiner Promotion und die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thorsten Cramer, der mir die Gelegenheit gegeben hat, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe „Hypoxie und maligne Progression“ anzufertigen. Seine sehr engagierte Betreuung, seine wissenschaftlichen Anregungen und die vielen konstruktiven Gespräche waren mir stets eine große Hilfe und Motivation. Ohne seine fortwährende Unterstützung wäre meine Doktorarbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion an der Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum der Charité unter sehr guten wissenschaftlichen Bedingungen anfertigen zu können.

Meinen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Michael Höcker aussprechen für die initiale Betreuung und für die Möglichkeit am Graduiertenkolleg „Signalerkennung und -umsetzung“ teilzunehmen.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs „Signalerkennung und -umsetzung“ und für die Finanzierung mehrerer Kongressteilnahmen.

Für die nette Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft danke ich meinen Kollegen der Arbeitsgruppe „Hypoxie und maligne Progression“ Birgit Bogdanoff, Katjana Daskalow und Heike Härtel. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Katharina Detjen für die fachlichen Diskussionen und ihre wissenschaftlich wertvollen Ratschläge bedanken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Frau Martina Welzel danke ich für ihre kompetente und freundliche Hilfe bei allen Laborfragen und die Einführung in die Geheimnisse der Durchflusszytometrie. Ein Dankeschön auch an Herrn Dr. Stephan Lobitz für seine Hilfe bei der Etablierung der lentiviralvermittelten RNA-Interferenz.

Bei Petra Schulz und Wenke Jonas möchte ich mich für das geduldige Korrekturlesen und für ihre wissenschaftliche und moralische Unterstützung auf dem Weg dieser Doktorarbeit bedanken sowie für die netten gemeinsamen Stunden und Ausflüge zur Ostsee, denen hoffentlich noch viele folgen werden.

Ein Dankeschön auch an alle meine Freunde und an meine Schwester, die mir gezeigt haben, dass es ein Leben neben der Doktorarbeit gibt und mich in schwierigen Zeiten immer aufgemuntert haben.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir bedingungslosen Rückhalt haben zukommen lassen und mich in jeglicher Hinsicht mit ihrer Hilfe und Liebe in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Schließlich danke ich meinem Freund Dennis für sein geduldiges Zuhören, sein nahezu grenzenloses Verständnis und seine Unterstützung in guten wie in schlechten Zeiten.

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Becker CM, **Rohwer N**, Funakoshi T, Cramer T, Bernhardt W, Birsner A, Folkman J, D'Amato RJ. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *The American Journal of Pathology* 2008, 172 (2): 534-544.

Rohwer N, Welzel M, Daskalow K, Pfander D, Wiedenmann B, Detjen K and Cramer T. Hypoxia-inducible factor 1 α mediates anoikis resistance via suppression of α 5 integrin. *Cancer Research* 2008, 68 (24): 10113-10120.

Rohwer N, Lobitz S, Daskalow K, Jöns T, Vieth M, Schlag PM, Kemmner W, Wiedenmann B, Cramer T and Höcker M. HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells. *British Journal of Cancer* 2009, 100 (5): 772-781.

Daskalow K, Pfander D, Weichert W, **Rohwer N**, Thelen A, Neuhaus P, Jonas S, Wiedenmann B, Benckert C and Cramer T. Distinct temporospatial expression patterns of glycolysis-related proteins in human hepatocellular carcinoma. *Histochemistry and Cell Biology* 2009, 132 (1): 21-31.

Küster K, Koschel A, **Rohwer N**, Fischer A, Wiedenmann B and Anders M. Downregulation of the coxsackie and adenovirus receptor in cancer cells by hypoxia depends on HIF-1 α . *Cancer Gene Therapy* 2010, 17 (2):141-146.

Daskalow K, **Rohwer N**, Raskopf E, Dupuy E, Kühl A, Loddenkemper C, Wiedenmann B, Schmitz V and Cramer T. Role of hypoxia-inducible transcription factor 1 α for progression and chemosensitivity of murine hepatocellular carcinoma. *Journal of Molecular Medicine* 2010, 88 (8): 817-827.

Rohwer N, Dame C, Haugstetter A, Wiedenmann B, Detjen K, Schmitt CA and Cramer T. Hypoxia-inducible factor 1 α determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF- κ B. *PLoS ONE* 2010, 5 (8): e12038.

Rohwer N and Cramer T. HIFs as central regulators of gastric cancer pathogenesis. *Cancer Biology & Therapy* 2010, 10 (4): 383-385.

Daskalow K, Raskopf E, Dupuy E, Sinn B, Loddenkemper C, **Rohwer N**, Wiedenmann B, Schmitz V and Cramer T. Inhibition of glycolysis displays antiproliferative efficacy against hepatocellular carcinoma. Manuskript zur Publikation eingereicht.

Bernhardt WM, Wehrbein C, **Rohwer N**, Hackenbeck T, Cramer T, Schödel J, Amann K, Eckardt K-U and Wiesener MS. Expression and distribution of hypoxia-inducible transcription factors HIF-1 α and HIF-2 α in different cells of the mouse kidney and liver. Manuskript in Vorbereitung.

Kongressbeiträge*

Rohwer N, Vieth M, Wiedenmann B, Höcker, M and Cramer T. HIF-1 α inhibition impairs epithelial-mesenchymal transformation in gastric cancer cells. 2nd Annual International Tumor Metabolism Summit. Oktober 2005 in Genua, Italien (Poster).

Rohwer N, Vieth M, Kemmner W, Schlag PM, Cramer T and Höcker M. Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 α (HIF-1 α) reguliert die maligne Progression des Magenkarzinoms. 27. Deutscher Krebskongress. März 2006 in Berlin (Postervortrag). Posterpreis des deutschen Krebskongress 2006.

Rohwer N, Vieth M, Kemmner W, Schlag PM, Höcker M and Cramer T. The hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) regulates the malignant progression of gastric adenocarcinoma. 61. Deutsche Gesellschaft für Stoffwechsel und Verdauungskrankheiten. September 2006 in Hannover (Poster).

Rohwer N, Welzel M, Detjen K, Höcker M, Wiedenmann B and Cramer T. Inhibition of HIF-1 α enhances anoikis in gastric cancer cells via upregulation of integrin α 5. Digestive Disease Week 2007. Mai 2007 in Washington, USA (Poster).

Rohwer N, Welzel M, Daskalow K, Pfänder D, Wiedenmann B, Detjen K and Cramer T. HIF-1 α reguliert Anoikis durch Suppression des α 5-Integrins in Magenkarzinomzellen. 63. Deutsche Gesellschaft für Stoffwechsel und Verdauungskrankheiten. September 2008 in Berlin (Poster).

Rohwer N, Welzel M, Wiedenmann B, Detjen K, Schmitt CA and Cramer T. HIF-1 regulates metastatic ability and chemoresistance by modification of oxidative stress. 10. Deutsch-Italienische Konferenz: "Redox-Regulation in acute and chronic inflammation". März 2009 in Lovenno di Menaggio, Italien (Vortrag auf Einladung des Veranstalters).

Rohwer N, Bogdanoff B, Glauben R, Wiedenmann B, Loddenkemper C, Schmitt CA and Cramer T. Dual role of HIF-1 α in the pathogenesis of inflammation-associated cancer. EACR Special Conference "Inflammation and Cancer". September 2009 in Berlin (Poster).

Rohwer N. New aspects of HIF-1 α 's tumor-promoting role in gastric cancer. MKFZ-Nachwuchsforscherpreis 2009 in der Kategorie bestes publiziertes Projekt einer/eines Postdoktorandin/en. Dezember 2009 in Berlin (Vortrag im Rahmen des Minisymposiums)

Rohwer N, Bogdanoff B, Wiedenmann B, Loddenkemper C, Schmitt CA and Cramer T. Die Bedeutung von HIF-1 α für die Pathogenese der Kolitis -assoziierten Kolonkarzinogenese. 29. Deutscher Krebskongress. Februar 2010 in Berlin (Präsidentenposter und Vortrag).

*Koautorenschaften sind nicht aufgeführt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung dieser Arbeit nicht veröffentlicht.