

Aus dem
CharitéCentrum 13 für Innere Medizin mit Kardio-, Gastroentero-, Nephrologie
Medizinische Klinik m.S. Hepatologie und Gastroenterologie
(Direktor: Prof. Dr. Bertram Wiedenmann)
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow-Klinikum

HABILITATIONSSCHRIFT

**„Molekulare Effektoren des Transkriptionsfaktors HIF-1 im Rahmen der
zellulären Anpassung an Sauerstoffmangel“**

**zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Medizin**

**vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin
von Dr. med. Thorsten Cramer
geb. am 19.01.1970 in Rheda-Wiedenbrück/Westfalen**

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

Eingereicht: Juli 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Joachim Fandrey

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Müller-Klieser

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Allgemeine Bedeutung des Sauerstoffs.....	4
1.2	Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor HIF-1	4
1.2.1	Struktureller Aufbau von HIF-1	4
1.2.2	Funktion von HIF-1	5
1.3	Die Bedeutung von HIF-1 im Kontext verschiedener Pathologien.....	6
1.3.1	Phagozyten-vermittelte Entzündungsreaktionen.....	6
1.3.2	Osteoarthritis (<i>Arthrosis deformans</i>)	8
1.3.3	Krebserkrankungen	9
1.4	Zielsetzung	11
2	Eigene Arbeiten.....	12
2.1	HIF-1 α ist ein zentraler Regulator der Funktion mononukleärer Phagozyten.....	12
2.2	HIF-1 α bestimmt das Metastasierungspotential von Magenkarzinomzellen <i>in vitro</i> 14	
2.3	HIF-1 α vermittelt Resistenz gegenüber Anoikis durch Suppression des α 5 Integrins 16	
2.4	Zentrale Regulatoren der Glykolyse werden im humanen hepatozellulären Karzinom unabhängig von HIF-1 α exprimiert	18
2.5	Die chondrozytäre Expression von Matrixkomponenten sowie von VEGF-A wird durch HIF-1 α kontrolliert	20
3	Diskussion	21
3.1	Die Bedeutung von HIF-1 α für die maligne Progression	21
3.1.1	HIF-1 α und die Pathogenese des Magenkarzinoms.....	21
3.1.2	Die Expression von HIF-1 α im humanen hepatozellulären Karzinom.....	26
3.2	Die immunologische Bedeutung von HIF-1 α	28
3.3	HIF-1 α als Regulator des Knorpelstoffwechsels	29
4	Zusammenfassung	32
5	Literaturangaben.....	34
	Danksagung	42

Abkürzungsverzeichnis

2ME2	2-Methoxyestradiol
5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
CAIX	Carbonische Anhydrase IX
Caspase	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Protease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodonium
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
Glut	Glukosetransporter
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>
HRE	<i>hypoxia-responsive element</i>
<i>K-ras</i>	<i>Kirsten Ras</i>
LDHA	Lactatdehydrogenase A
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
ODD	<i>oxygen dependent degradation</i>
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1
PGK-1	Phosphoglyceratkinase 1
<i>Ras</i>	<i>rat sarcoma virus oncogene cellular homolog</i>
<i>Rb</i>	Retinoblastomgen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Bedeutung des Sauerstoffs

Sauerstoff (*Oxygenium*, von griechisch *oxy* „scharf, sauer“ und *gen-* „erzeugen“) stellt das häufigste chemische Element auf unserem Planeten dar. Sauerstoff ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Existenz fast aller Tierarten und der meisten Pflanzen. Die zentrale Wichtigkeit des Sauerstoffs erklärt sich aus seiner Funktion als Elektronenakzeptor in der mitochondrialen Atmungskette (1). Ein Absinken des Sauerstoffpartialdruckes (Hypoxie) im Gewebe unter eine kritische Grenze hat dabei eine verminderte Synthese freier Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zur Folge, so dass eine vitale Bedrohung des jeweiligen Zellverbandes, Organsystems oder sogar des gesamten Organismus entstehen kann (2). Festgehalten werden muss, dass diese kritische Grenze von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren wie z.B. Größe und Komplexität des Organismus sowie Geschwindigkeit des Sauerstoffabfalls abhängt. Daher bestehen deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies aber auch innerhalb einer bestimmten Spezies und es kann kein bestimmter Sauerstoffpartialdruck als kritischer Wert definiert werden. Die essentielle Bedeutung des Sauerstoffs macht verständlich, dass die Versorgung von Gewebeverbänden und Organsystemen mit Sauerstoff kontinuierlich überwacht und reguliert wird (3). Für die zelluläre Anpassung an Sauerstoffmangel sind Transkriptionsfaktoren von zentraler Bedeutung, weil sie in der Lage sind, Änderungen des zellulären Phänotypes in kurzer Zeit zu gewährleisten. Eine Vielzahl gut charakterisierter Transkriptionsfaktoren wird durch Hypoxie aktiviert, z.B. die RelA-Untereinheit von NF- κ B, AP-1 und CREB/ATF (4). Als bedeutendster molekularer Vermittler der Anpassung an Hypoxie hat sich in den letzten Jahren jedoch der Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) herausgestellt (5). Die zentrale Bedeutung von HIF-1 wird dabei durch Daten internationaler Arbeitsgruppen, die eine nahezu vollständige Hemmung der hypoxischen Adaptation nach genetischer Inaktivierung von HIF-1 beschrieben haben, unterstrichen (6).

1.2 Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor HIF-1

1.2.1 Struktureller Aufbau von HIF-1

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer konstitutiv exprimierten β - (Synonym: ARNT, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) und einer sauerstoffabhängig regulierten α -Untereinheit besteht (7). Beide Untereinheiten besitzen an ihren aminoterminalen Enden eine bHLH (*basic helix-loop-helix*)- sowie eine PAS (PER-ARNT-SIM)-Domäne (8). 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 PAS-Domäne die Dimerisierung der beiden Untereinheiten vermittelt. 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. 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 (9). Die Proteinstabilität von HIF-1 α wird sauerstoffabhängig über die sogenannte 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 (10, 11). Diese Hydroxylierungen ermöglichen die Ubiquitin-abhängige Degradation von HIF-1 α im 26S-Proteasomenkomplex (12, 13). Die biologische Funktion von HIF-1 wird vorwiegend über die Proteinstabilität der α -Untereinheit reguliert. Unter normoxischen Sauerstoffbedingungen hat HIF-1 α nur eine sehr kurze Halbwertszeit, weil es durch posttranslationelle Modifikationen rapide und kontinuierlich abgebaut wird (14). Eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration führt über Hemmung der Degradationsmechanismen zur Akkumulation von HIF-1 α (15). Diese Hypoxie-induzierte Stabilisierung von HIF-1 α wird gefolgt von nukleärer Translokation, Heterodimerisierung mit HIF-1 β , der Interaktion mit Kofaktoren und letztlich der Aktivierung von HIF-1-Zielgenen (16). Darüber hinaus kann die HIF-1-Aktivität auch unter normoxischen Bedingungen durch eine Vielzahl von Mechanismen induziert werden, z.B. durch Wachstumsfaktoren und Zytokine (z.B. EGF (*epidermal growth factor*), IGF (*insulin-like growth factor*) 1 und 2, Interleukin-1 β), Aktivierung von Onkogenen (z.B. *Ras*, *Src*) und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. *PTEN*)

1.2.2 Funktion von HIF-1

Die transaktivierende Funktion von HIF-1 wird durch Bindung an die Sequenz 5'-CGTG-3' in sogenannten „Hypoxie-responsiven Elementen“ (HRE) in Promotor- oder Enhancerregionen von HIF-1-Zielgenen erreicht (17). Bis dato wurden etwa 100 unterschiedliche HIF-1-regulierte Gene identifiziert, die zum großen Teil dem Erhalt der Sauerstoffhomöostase dienen (18). HIF-1 ist allerdings nicht nur für die physiologische Adaptation an Hypoxie wichtig, sondern HIF-1-Zielgene regulieren in zentraler Weise auch eine Vielzahl pathophysiologischer Prozesse, z.B. im Rahmen von Ischämie, Entzündungsreaktionen, Infektabwehr und Tumorgenese (19). Die durch HIF-1 gewährleistete Anpassung an Hypoxie wird zuvorderst durch Regulation zweier fundamentaler Prozesse erreicht: Einerseits aktiviert HIF-1 unterschiedliche Zielgene, die eine bessere Versorgung mit Sauerstoff bedingen wie Regulatoren der Angiogenese (z.B. VEGF-A, VEGF Rezeptor-1), der Erythropoese (z.B. Erythropoietin), des Blutgefäßtonus (z.B. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase) und des Eisenstoffwechsels (z.B. Transferrin) (20). Andererseits steuert HIF-1 molekulare Anpassungsvorgänge, die das zelluläre Überleben unter hypoxischen Bedingungen ermöglichen. Ein zentrales Beispiel ist hierbei die HIF-1-regulierte Aktivierung der Glykolyse durch eine erhöhte

Expression von Glukose-Transportern (z.B. Glut-1 und -3) und glykolytischen Schrittmacherenzymen (z.B. Hexokinase, Phosphofruktokinase-1 und Pyruvatkinase) (21). Darüber hinaus spielen HIF-1-kontrollierte Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zellproliferation (z.B. IGF-2), Apoptose (z.B. BNIP-3), Zellmigration und Invasion (z.B. Matrixmetalloproteinase-2 und CXCR4) sowie der Regulation des intra- und extrazellulären pH-Werts (carbonische Anhydrase IX) (22).

1.3 Die Bedeutung von HIF-1 im Kontext verschiedener Pathologien

HIF-1 hat sich in den letzten Jahren als zentraler Vermittler der zellulären Adaptation an Hypoxie herausgestellt (23). Hypoxie stellt ein zentrales Charakteristikum der Pathogenese einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen dar (24). In der vorliegenden Habilitationsschrift werden Untersuchungen zur pathogenetischen Bedeutung von HIF-1 für Krebserkrankungen, Makrophagen-vermittelten Entzündungsreaktionen und der Osteoarthritis vorgestellt. Ziel dieser Arbeiten war es, eine funktionelle Charakterisierung der pathobiologischen Relevanz von HIF-1 an einem breitem Spektrum relevanter Krankheitsbilder zu erreichen. Nachfolgend werden zunächst die einzelnen Pathologien sowie der aktuelle Kenntnisstand der Bedeutung von Hypoxie und HIF-1 dargestellt.

1.3.1 Phagozyten-vermittelte Entzündungsreaktionen

Mononukleäre Phagozyten (Monozyten und Makrophagen) gehören zu den Leukozyten und sind wesentliche Bestandteile des Immunsystems. Sie stellen die phylogenetisch ältesten Vermittler der angeborenen Immunabwehr dar (25). Der Begriff „Makrophage“ wurde von dem russischen Zoologen und Mikrobiologen Elie Metchnikoff um 1880 geprägt (26). Metchnikoff entdeckte damals das Prinzip der Phagozytose, erkannte die Bedeutung der Makrophagen für die Immunabwehr und wurde für diese Arbeiten im Jahr 1908 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Mononukleäre Phagozyten differenzieren aus pluripotenten Knochenmarkstammzellen und reifen im myelomonozytären System des Knochenmarks heran. Die das Knochenmark verlassende Zelle ist noch nicht voll ausgereift und wird als Monozyt bezeichnet (27). Monozyten treten nach kurzzeitiger Zirkulation im peripheren Blut mittels Diapedese in das periphere Gewebe aus, wo sie weiter differenzieren und in Form von Histiozyten, Makrophagen, Epitheloidzellen oder Langhans-Riesenzellen vorkommen (28). Darüber hinaus können mononukleäre Phagozyten auch speziell differenzierte Zellen eines gegebenen Gewebes darstellen: im ZNS als Mikroglia, in der Leber als Kupfferzellen oder im Knochenmark als Osteoklasten. Dies veranschaulicht die enorme Plastizität der mononukleären Phagozyten. Neben der bereits erwähnten Funktion im angeborenen Immunsystem sind mononukleäre Phagozyten auch von zentraler Bedeutung für die spezifische Immunität. Die Eigenschaften der mononukleären Phagozyten erfüllen beide Erfordernisse: Phagozytose von Fremdpartikeln wie Bakterien, Pilze oder Fragmente apoptotischer Zellen, Produktion pro-inflammatorischer Substanzen (Prostaglandine, Leukotriene, Stickstoffmonoxid und reaktive

Sauerstoffspezies), Expression von verschiedenen pro-inflammatorischen und chemotaktischen Zytokinen (29). Letztlich präsentieren Makrophagen Fremd-Antigene mit Hilfe von Klasse II MHC-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche und wirken so im Rahmen der spezifischen Immunabwehr als Antigen-präsentierende Zellen (APC) (30). Mononukleäre Phagozyten sind demnach von einer komplexen biologischen Funktion gekennzeichnet und nehmen eine zentrale Stellung in vielen Erkrankungen ein. In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass mononukleäre Phagozyten nicht nur entscheidend an „klassischen“ Entzündungsreaktionen, wie z.B. Wundheilung, Granulombildung oder Abwehr von Mikroorganismen beteiligt sind, sondern auch eine relevante pathogenetische Bedeutung im Verlauf der malignen Progression einnehmen (31). Makrophagen stellen eine der hauptsächlichen zellulären Komponenten des Mikromilieus solider Tumoren dar (32). Diese sogenannten Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) können dabei sowohl Tumor-hemmende (z.B. durch Phagozytose neoplastischer Zellen) als auch Tumor-fördernde Eigenschaften zeigen (33). Letztere erklären sich durch die Sekretion von Wachstums- und Angiogenesefaktoren sowie Proteasen, so dass sowohl Proliferation von Tumor- und Endothelzellen als auch Invasion benachbarter Gewebeverbände durch TAM effektiv stimuliert werden können (Abb. 4, (34)).

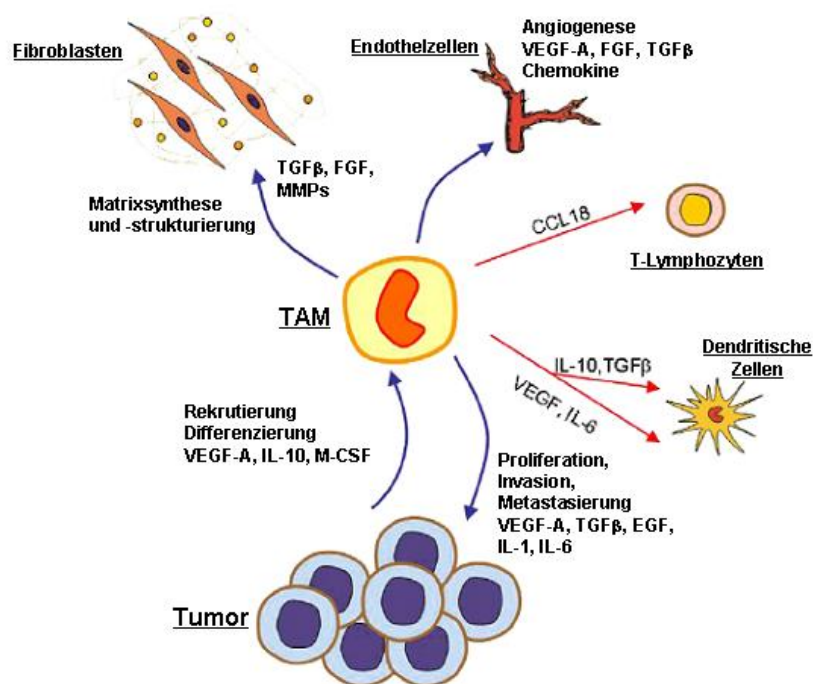


Abb. 1 Vereinfachte Darstellung der Tumor-fördernden Wirkungen von TAM.

Chemotaktische Faktoren aus Tumorzellen (z.B. VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*), IL-10 (Interleukin-10), M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*)) führen zur Einwanderung von Monozyten aus dem peripheren Blut in den Tumor, wo sie zu residenten TAM differenzieren. TAM sezernieren diverse Faktoren, die direkt die Proliferation von Tumorzellen stimulieren (z.B. VEGF-A, TGFβ (*transforming growth factor β*), EGF (*epidermal growth factor*), IL-1 und -6 (Interleukin-1 und -6)). TAM unterstützen die Angiogenese (durch VEGF-A, TGFβ, FGF (*fibroblast growth factor*) und diverse Chemokine) sowie das „Remodelling“ der extrazellulären Matrix (z.B. durch TGFβ, FGF und Matrixmetalloproteinasen (MMPs)). TAM inhibieren Tumor-hemmende Faktoren des Immunsystems, z.B. T-Lymphozyten durch CCL18 (*chemokine (C-C motif) ligand 18*) sowie dendritische Zellen durch VEGF-A, IL-6, IL-10 und TGFβ (modifiziert nach Sica *et al.* (35))

Interessanterweise bestätigen diese aktuellen Ergebnisse Beobachtungen von Rudolf Virchow, der bereits 1863 das gehäufte Vorkommen von Leukozyten in soliden Tumoren beobachtet und daraus eine kausale Verbindung zwischen Entzündung und Krebserkrankungen abgeleitet hatte. Ein wesentliches Charakteristikum mononukleärer Phagozyten stellt Ihre Fähigkeit zum Überleben in äußerst anspruchsvollen Mikromilieu-Konditionen dar. Das entzündliche Mikromilieu ist gekennzeichnet durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel sowie Hyperazidität und nitrosativen Stress (36). Makrophagen müssen in diesen lebensfeindlichen Bedingungen nicht nur existieren sondern auch ihre oben detailliert dargelegten Funktionen im Rahmen der komplexen Entzündungsreaktionen ausüben. Diese Zusammenhänge ließen ein ausgeprägtes Adaptationsvermögen mononukleärer Phagozyten an Hypoxie vermuten. Vorbeschrieben war, dass Makrophagen *in vitro* auf hypoxische Kulturbedingungen mit einer signifikanten Änderung nahezu aller spezifischen Eigenschaften reagierten, z.B. der Phagozytose, der Expression von Zytokinen und Chemokinen, der Migration sowie dem Überleben (37). Die exakte Bedeutung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors HIF-1 α in diesem Kontext war jedoch unbekannt und sollte durch die hier vorgelegten Arbeiten charakterisiert werden.

1.3.2 Osteoarthrose (*Arthrosis deformans*)

Die Zusammensetzung der extrazellulären Knorpelmatrix wird in entscheidendem Maße durch das Verhalten der Chondrozyten geprägt, da sie das einzige zelluläre Element im adulten Knorpel darstellen. Dieser Zelltyp weist im gesunden Gelenkknorpel nur eine geringe metabolische Aktivität auf. Im Verlauf der humanen Arthrose verändert sich das Zellverhalten, es kommt zu Aktivierungs- und Differenzierungsvorgängen. Aktivierungsvorgänge betreffen sowohl die strukturellen Hauptmatrixbestandteile wie Typ-II-Kollagen und Aggrecan als auch eine Vielzahl von Proteinen mit regulatorischen Funktionen. Auch matrixdegradierende Metalloproteinasen werden aktiviert, was letzten Endes in der Nettobilanz zu einem Überwiegen der degenerativen Vorgänge führt. Die Differenzierung ausgereifter Chondrozyten in der Arthrose ist ein beeindruckendes Phänomen, da in den Zellen primär untypische Matrixbestandteile synthetisiert werden. Typ-X-Kollagen, Osteopontin, Osteocalcin, Alkalische Phosphatase und viele andere können im arthrotischen Knorpel nachgewiesen werden. Ihre Funktion ist noch unklar, aber als Differenzierungsmarker helfen sie, diese veränderten Stadien zu charakterisieren. Zweifelsfrei führt aber eine veränderte Matrixzusammensetzung zu unphysiologischen Zell-Matrix- und Matrix-Matrix-Interaktionen. Die Osteoarthrose (*Arthrosis deformans*) ist eine chronische, schmerzhafte und progrediente funktionsbehindernde Gelenkveränderung. Aus morphologischer Sicht ist die Osteoarthrose durch einen konstant voranschreitenden Verlust der Knorpelmatrix, einer Sklerosierung der subchondralen Knochenbereiche und einer partiellen Beteiligung der Synovialmembran charakterisiert. Vornehmliches Ziel der Grundlagenforschung ist es, dieses Erscheinungsbild auf molekularer Ebene zu charakterisieren, um modulierend in den Krankheitsverlauf eingreifen zu können. Mit

zunehmendem Alter, insbesondere nach dem 50. Lebensjahr, steigt die Inzidenz der Osteoarthritis stark an, allerdings können Arthritisbeschwerden auch die Lebensqualität jüngerer Menschen erheblich beeinträchtigen. Die Osteoarthritis stellt die häufigste Ursache körperlicher Behinderungen in Deutschland dar und besitzt daher immense volkswirtschaftliche Bedeutung. Vor diesem Hintergrund besteht eine große Notwendigkeit für effektive Therapien. Der Knorpel stellt ein klassisches Beispiel für einen avaskulären Gewebeverband dar. Vor diesem Hintergrund wurde eine kausale Bedeutung von Hypoxie für Physiologie und Pathophysiologie der Chondrozyten bereits in den frühen 80er Jahren vermutet (38). Es dauerte allerdings bis zum Anfang des 21. Jahrhunderts bis Schipani *et al.* unter Anwendung moderner Mausmodelle eindeutig zeigen konnten, dass die Wachstumsfuge im Knorpel hypoxisch ist (39). In guter Übereinstimmung hiermit konnten Rajpurohit *et al.* erstmals die Expression von HIF-1 in kultivierten Chondrozyten dokumentieren (40).

1.3.3 Krebserkrankungen

Krebserkrankungen stellen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (41). In den letzten Jahrzehnten hat sich das grundlegende Verständnis der kausalen Pathogenese solider Tumoren deutlich verbessert. Die genaue Charakterisierung der molekularen Tumorgenese, von der malignen Transformation über die systemische Metastasierung bis hin zur Therapieresistenz, stellt die Grundlage für die Entwicklung innovativer Therapieansätze dar. Ein zentrales Charakteristikum maligner Tumoren ist die Fähigkeit zur systemischen Metastasierung. Die Ausprägung der Metastasierung bestimmt maßgeblich Prognose und Therapiemöglichkeiten von Krebserkrankungen. Die betroffenen Patienten sterben meist nicht an den lokalen Folgen des Primärtumors, sondern an einer Funktionseinschränkung der von der Metastasierung betroffenen Organe (42). Das Metastasierungspotential ist entscheidend von der Fähigkeit der Tumorzelle zur Migration, Invasion und Adhäsion an Endothelzellen sowie zum Substrat-unabhängigen Wachstum abhängig (43). Die physiologische Interaktion von Tumorzellen mit Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) stellt einen wesentlichen limitierenden Faktor für die systemische Disseminierung dar. Nicht-transformierte Zellen beantworten einen Verlust des EZM-Kontaktes durch Induktion der Apoptose, welche in dieser besonderen Situation als Anoikis (griechisch „Heimatlosigkeit“) bezeichnet wird (44). Physiologisch stellt die Anoikis einen Schutzmechanismus dar, der aus dem Gewebeverband gelöste Zellen eliminiert, z.B. im Bronchialepithel und im Gastrointestinaltrakt (45, 46). Die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der Anoikis verbessert das Substrat-unabhängige Wachstum der Tumorzellen und damit die Effizienz der Metastasierung (47). Als zentrale Vermittler der Anoikis wurde die Familie der Integrine identifiziert (48, 49). Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, welche spezifische EZM-Moleküle als Liganden binden (50). Die Interaktion von Integrinen und EZM führt zur Vermittlung von Überlebenssignalen ins Zellinnere und der Verlust dieser Interaktion entsprechend zur Induktion der Anoikis. Im gesunden Organismus lässt sich ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und

programmierten Zelltod feststellen. Krebserkrankungen führen zu einer Störung dieses streng geregelten Gleichgewichts, wobei sowohl die unkontrollierte Aktivierung von zellzyklusstimulierenden Signalwegen als auch die Hemmung von pro-apoptotischen Signalwegen zur Tumorbildung führen können (51). Eingeleitet wird die Apoptose z.B. durch Wachstumsfaktormangel, Störungen bei der Signaltransduktion, DNA-Schädigungen oder Hypoxie. Die Aktivierung einer Kaskade von spezifischen Proteasen, den sogenannten Caspasen, bildet die molekulare Grundlage der Apoptose (52). Caspasen katalysieren die Proteolyse zellulärer Strukturen, z.B. DNA, Reparaturenzyme und Transkriptionsfaktoren, so dass über eine Auflösung der zellulären Integrität letztlich der programmierte Zelltod erreicht wird (53). Im Verlauf der malignen Transformation wird eine robuste Unterdrückung apoptotischer Signal- und Exekutionswege beobachtet (54). Diese erklärt sich entweder durch Überexpression anti-apoptotischer Faktoren oder durch reduzierte Aktivität pro-apoptotischer Proteine (55). Deregulierung des Zellzyklus und Inaktivierung der Apoptose stellen zentrale Eigenschaften maligner Tumore dar und können somit sinnvolle Angriffspunkte für innovative Therapiestrategien darstellen.

Hypoxie ist ein zentrales Charakteristikum des Mikromilieus solider Tumoren und stellt einen unabhängigen Prognosefaktor für Krebserkrankungen dar. Verantwortlich für die Entwicklung hypoxischer Tumorbereiche ist das exponentielle und ungeordnete Wachstum neoplastischer Zellen, welches zur Entstehung von Tumorarealen führt, deren Entfernung vom nächstgelegenen Blutgefäß jenseits der maximalen Diffusionsstrecke von O₂ (ca. 150-200 µm) liegt. Der intratumoralen Hypoxie kommt eine wesentliche kausale Bedeutung für die Entwicklung eines malignen Phänotyps zu. Dabei limitiert Sauerstoffmangel zunächst das Tumorwachstum durch Hemmung der Zellproliferation sowie durch Induktion von Wachstumsarrest und Apoptose. Hierdurch entsteht ein Druck zur Selektion Hypoxie-adaptierter Subpopulationen, die O₂-unabhängig proliferieren und daher eine Progression des Tumors trotz hypoxischer Mikromilieubedingungen ermöglichen. Die Überexpression von HIF-1α ist ein zentrales Merkmal verschiedener Tumorentitäten (56, 57). HIF-1α kann in Tumoren entweder durch intratumorale Hypoxie induziert werden oder aber wird konstitutiv exprimiert infolge der Aktivierung von Onkogenen (z.B. *Ras*, *ERBB2*) oder der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (*VHL*, *PTEN*) (58). Eine Vielzahl klinischer und experimenteller Studien lässt vermuten, dass HIF-1 eine funktionelle Bedeutung für Wachstum, Progression und Metastasierung solider Malignome zukommt (59, 60). Darüber hinaus korreliert die Expression von HIF-1α in den neoplastischen Zellen maligner Tumoren mit einer infausten Prognose wie beispielsweise beim Pankreas-, Zervix- und Mammakarzinom (61-63). In Einklang hiermit führte die gentechnische und pharmakologische Inhibition von HIF-1α 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 (64-67). Zudem konnte kürzlich mittels muriner Metastasierungsmodelle eine Verringerung der Metastasierung nach Inhibition von HIF-1α gezeigt

werden (68, 69). Von klinischer Relevanz ist die Beobachtung, dass die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α die Empfindlichkeit verschiedenster Karzinomzelllinien sowie auch diverser muriner Tumormodelle gegenüber Radio- und Chemotherapie erhöhte (70-76). Mittlerweile konnte eine Vielzahl von HIF-1-Zielgenen identifiziert werden, die mit der Entwicklung des malignen Phänotyps assoziiert sind (77). Dabei nimmt das HIF-1 α -Zielgen VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) eine zentrale Stellung ein, weil er durch die Induktion von Proliferation, Migration und Chemotaxis von Endothelzellen das komplette zellbiologische Programm der Neubildung von Blutgefäßen aktivieren kann (78, 79). Neben der Angiogenese ist die erhöhte glykolytische Aktivität solider Tumore für den klinischen Verlauf von Krebserkrankungen von prognostischer Bedeutung. Dieser Zusammenhang konnte beispielhaft für das Zervixkarzinom und Tumore des Kopf-Hals-Bereichs gezeigt werden, deren systemische Disseminierung positiv mit der glykolytischen Aktivität im Primärtumor korreliert (80). Vor dem Hintergrund, dass HIF-1 α die überwiegende Anzahl der glykolytischen Schlüsselenzyme sowie der Glukose-transportierenden Faktoren auf transkriptioneller Ebene reguliert wird davon ausgegangen, dass HIF-1 α eine kausale Bedeutung für die gesteigerte Glukoseverwertung in soliden Tumoren zukommt. Des Weiteren werden Invasion und Metastasierung durch eine Reihe von HIF-1-Zielgenen reguliert, wie beispielsweise durch den Chemokinrezeptor CXCR4, die Matrixmetalloproteinase-2 oder die Lysyloxidase (81-83). Diese Proteine fördern HIF-1-abhängig die Metastasierung und tragen damit zu einem aggressiveren malignen Phänotyp bei. Letztlich konnte auch das MDR1 (*multidrug resistance 1*) Gen, welches eine zentrale Bedeutung in der Regulation von Chemoresistenz aufweist, als HIF-1-Zielgen identifiziert werden (84). Zusammenfassend lassen diese Zusammenhänge vermuten, dass HIF-1 eine kausale Bedeutung im Rahmen der Progression und Metastasierung von Krebserkrankungen zukommt.

1.4 Zielsetzung

Klinische Studien und *in vitro*-Experimente deuteten auf eine zentrale Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-1 für die zelluläre Anpassung an Hypoxie hin. Allerdings ist keiner der bisher diskutierten experimentellen Ansätze in der Lage, die funktionelle Relevanz von HIF-1 im Kontext anatomisch und funktionell stark divergierender Zell- und Gewebeverbände systematisch zu untersuchen. Es ist daher die Zielsetzung dieser Habilitationsschrift, die Effekte der HIF-1-Inaktivierung in Modellsystemen mesenchymaler sowie maligne transformierter epithelialer Zellen zu untersuchen und dabei insbesondere die molekularen und zellbiologischen Mechanismen der Bedeutung von HIF-1 zu identifizieren.

2 Eigene Arbeiten

2.1 HIF-1 α ist ein zentraler Regulator der Funktion mononukleärer Phagozyten

HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation (2003). **Thorsten Cramer**, Yuji Yamanishi, Björn E. Clausen, Irmgard Förster, Rafal Pawlinski, Nigel Mackman, Volker H. Haase, Rudolf Jaenisch, Maripat Corr, Victor Nizet, Gary Firestein, Hans-Peter Gerber, Napoleone Ferrara, Randall S. Johnson. Cell 112:645-657. (85)

Hypoxie ist ein wesentliches Charakteristikum des entzündlichen Mikromilieus und hypoxische Kulturbedingungen beeinflussen nahezu alle spezifischen Eigenschaften von Makrophagen in signifikanter Weise (86). Vor diesem Hintergrund wurde eine zentrale Bedeutung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors HIF-1 α für die regelrechte Funktion mononukleärer Zellen vermutet. Zwecks Überprüfung dieser Vermutung wurde ein Mausmodell etabliert, welches die Analyse von mononukleären Zellen in ihrer natürlichen Umgebung erlaubte. Dieses Modell bestand in einem Zelltyp-spezifischen „knock-out“ von HIF-1 α unter Anwendung des Cre-loxP-Systems¹, wobei durch Nutzung des LysozymM-Promotors eine auf mononukleäre Phagozyten beschränkte Expression der Cre Rekombinase erreicht wurde (87, 88).

Zur Analyse der Auswirkungen des gewebespezifischen HIF-1 α -Verlustes auf den Verlauf inflammatorischer Prozesse wurden drei unterschiedliche *in vivo*-Modelle gewählt: ein akutes (einmalige epikutane Aufbringung des Phorbolesters TPA) sowie ein chronisches (tägliche Aufbringung von 5% SDS für 5 Tage) Modell der kutanen Entzündung, außerdem eine Form der passiven Arthritis-Induktion, ausgelöst durch zweimalige intraperitoneale Injektion eines heterologen Serums. Die Zelltyp-spezifische Inaktivierung von HIF-1 α führte in allen untersuchten Modellen zu einer signifikanten Reduktion der entzündlichen Antwort (89). In den Studien zur kutanen Inflammation zeigten die HIF-1 α -defizienten Tiere entweder deutlich reduzierte (im SDS-Modell) oder komplett fehlende (im TPA-Modell) Einwanderung von inflammatorischen Zellen in die Haut. Die experimentellen Studien anhand des passiven Arthritis-Modells zeigten ebenfalls eine signifikante Verbesserung des histologischen Bildes in den HIF-1 α -defizienten Mäusen und bestätigten somit die Ergebnisse der kutanen Modellsysteme. Des Weiteren zeigten die klinischen Verlaufparameter der Arthritis eine signifikante Reduktion des Schweregrades in den HIF-1 α -negativen Tieren. Das anschließende experimentelle Vorgehen war auf die Eruiierung des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus ausgerichtet. Vor dem Hintergrund, dass HIF-1 einen etablierten Regulator der

¹ Der konditionelle „knock-out“ unter Anwendung des Cre-loxP-Systems basiert auf der Kreuzung von zwei transgenen Mauslinien: eine, die zwei sog. loxP-Sequenzen im zu untersuchenden Gen aufweist und eine zweite, die die bakterielle Rekombinase *Cre* unter der Kontrolle eines zelltyp-spezifischen Promotors exprimiert. Die funktionelle Inaktivierung der Genaktivität beruht auf einer Entfernung des zwischen den loxP-Sequenzen gelegenen DNA-Abschnittes sowie der konsekutiven Zusammenfügung der entstandenen Doppelstrangenden durch Cre.

Glykolyse darstellt wurde vermutet, dass die beobachtete Reduktion der Inflammation in den Zelltyp-spezifischen HIF-1 α -„knock-out“ Mäusen durch eine Hemmung der zellulären Energiesynthese hervorgerufen wird. Die anschließenden Untersuchungen ergaben eine deutliche Hemmung der glykolytischen Aktivität in HIF-1 α -defizienten Zellen, wobei sowohl Laktat im Zellüberstand als auch der intrazelluläre ATP-Gehalt in den HIF-1 α -defizienten Makrophagen hochsignifikant verringert waren. Diese Ergebnisse verdeutlichen zum einen die besondere Abhängigkeit mononukleärer Phagozyten von der glykolytischen Energiegewinnung und zeigen zum anderen die kausale Bedeutung von HIF-1 α in diesem Zusammenhang (90).

2.2 HIF-1 α bestimmt das Metastasierungspotential von Magenkarzinomzellen *in vitro*

HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells (2009). Nadine Rohwer, Stephan Lobitz, Katjana Daskalow, Thomas Jöns, Michael Vieth, Peter-Michael Schlag, Wolfgang Kimmner, Bertram Wiedenmann, Michael Höcker*, **Thorsten Cramer***. British Journal of Cancer, 100:772-781. (91)

Prognose und Therapieoptionen des humanen Magenkarzinoms werden hauptsächlich durch die Ausprägung der systemischen und lymphatischen Metastasierung bestimmt. Eine Vielzahl klinischer und experimenteller Studien deutet drauf hin, dass HIF-1 α eine kausale Rolle für Wachstum, Progression und Metastasierung solider Tumoren einnehmen kann. Daher wurde die Bedeutung von HIF-1 α für die Pathogenese des humanen Magenkarzinoms durch Untersuchung zentraler malignitätsdefinierender Charakteristika bestimmt. Mittels Immunhistochemie an humanen Magenfrühkarzinomgeweben und fortgeschrittener Magenkarzinome wurde eine Immunreaktivität von HIF-1 α lediglich in einem geringen Prozentsatz der untersuchten Frühkarzinome nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigten 90% der fortgeschrittenen Magenkarzinome eine spezifische Immunreaktivität für HIF-1 α in den Tumorzellen. Eine signifikante Korrelation zwischen HIF-1 α -Expression und Lymph- sowie Blutgefäßinvasion, Metastasierung oder Tumorstadium konnte allerdings nicht dokumentiert werden. Zur Analyse der funktionellen Bedeutung von HIF-1 α *in vitro* wurde eine lentiviral-vermittelte RNA-Interferenz (RNAi) gegen HIF-1 α in den humanen Magenkarzinomzelllinien AGS und MKN28 etabliert. Die Effizienz der RNAi-vermittelten Inhibition von HIF-1 α betrug $85,2 \pm 6,3\%$ (AGS) bzw. $97,2 \pm 2,1\%$ (MKN28). Die Hypoxie-vermittelte Stabilisierung von HIF-1 α wurde durch die verwendete RNAi in beiden Zelllinien vollständig unterdrückt. Außerdem konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression der HIF-1-Zielgene PGK und CAIX in den verwendeten Zelllinien erreicht werden. Mittels der Zelllinien AGS und MKN28 wurde anschließend die funktionelle Bedeutung von HIF-1 α für unterschiedliche tumorbiologische Phänomene untersucht. In Proliferationsassays wurde gezeigt, dass die Inhibition von HIF-1 α weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Kulturbedingungen zu einer Veränderung des Wachstums führte. Des Weiteren wurde mit modifizierten Boydenkammern die Migration und Invasion der Magenkarzinomzellen untersucht. Dabei führte die Inaktivierung von HIF-1 α zu einer signifikanten Hemmung von Migration und Invasion der AGS und MKN28 Zellen unabhängig von der Sauerstoffkonzentration. Zusätzlich zeigten HIF-1 α -defiziente Zellen eine signifikante Reduktion der Adhäsion an Endothelzellen. Schließlich wurde gezeigt, dass die Hemmung von Migration, Invasion und Adhäsion auch mittels Anwendung des chemischen HIF-1 α -Inhibitors 2-Methoxyestradiol (2ME2) erreicht werden konnte. Zusammengefasst wurde in dieser

Arbeit eine spezifische Immunreaktivität von HIF-1 α ausschließlich in fortgeschrittenen Stadien der humanen Magenkarzinogenese sowie eine funktionelle Bedeutung von HIF-1 α für Metastasierungsrelevante Aspekte in humanen Magenkarzinomzellen nachgewiesen.

(* geteilte Autorenschaft)

2.3 HIF-1 α vermittelt Resistenz gegenüber Anoikis durch Suppression des α 5 Integrins

Hypoxia-inducible factor 1 α mediates anoikis resistance via suppression of α 5 integrin. Nadine Rohwer, Martina Welzel, Katjana Daskalow, David Pfander, Bertram Wiedenmann, Katharina Detjen, **Thorsten Cramer** (2008). *Cancer Research* 68: 10113-10120. (92)

Migration und Invasion werden in zentraler Weise durch die Familie der Integrine reguliert. Integrine vermitteln als transmembranäre Rezeptoren die Zelladhäsion an extrazelluläre Matrix. Im Verlauf der malignen Transformation entwickeln sich regelmässig Veränderungen der Integrinexpression. Vor diesem Hintergrund charakterisierten wir zunächst die funktionelle Bedeutung von HIF-1 α für die Integrinexpression in den Magenkarzinomzelllinien AGS und MKN28. Dabei zeigte sich eine selektiven Induktion des α 5 Integrins in HIF-1 α -defizienten Zellen, die mittels Durchflusszytometrie, Immunzytochemie, Western Blot und quantitativer „real-time“ PCR bestätigt werden konnte. Die Regulation der Integrinexpression erfolgt durch unterschiedliche Signalwege, u.a. sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entscheidend beteiligt. Vor diesem Hintergrund wurde beobachtet, dass eine chemische Inhibierung der intrazellulären ROS Bildung die Induktion des α 5 Integrins in HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen komplett verhinderte. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die HIF-1 α -defizienten Zellen eine signifikant höhere intrazelluläre Konzentration an ROS aufwiesen als die entsprechenden Kontrollen. Der erhöhte Gehalt an ROS konnte demnach als molekularer Mechanismus der α 5 Integrin-Induktion infolge des Verlustes von HIF-1 α identifiziert werden. Es ist bekannt, dass α 5 über Induktion der Anoikis in epithelialen Zellen Tumor-supprimierende Eigenschaften aufweisen kann. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Apoptoseraten in Abhängigkeit von HIF-1 α sowohl unter adhärennten Bedingungen als auch unter Substrat-unabhängigen Kulturbedingungen bestimmt. Die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α ergab keine Veränderung der Apoptoserate unter adhärennten Bedingungen, wobei Zellzyklusanalysen sowie die Ermittlung der Caspase-3 Aktivität verwendet wurden. Im Gegensatz dazu wurde mittels Zellzyklusanalyse und Messung des mitochondrialen Membranpotentials eine robuste und signifikante Zunahme der Anoikisrate durch Inhibition von HIF-1 α dokumentiert. Unter Anwendung eines Koloniebildungsassays in Soft-Agar wurde nachgewiesen, dass die Inaktivierung von HIF-1 α die Koloniebildung unter substrat-unabhängigen Bedingungen signifikant reduzierte. Zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen stand die Analyse des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus im Vordergrund. Erneut führte die Hemmung der intrazellulären Bildung von ROS zu einer Umkehrung des Phänotyps der HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen: Die Anoikisrate konnte durch chemische Inhibition der ROS-Produktion auf das Maß der HIF-1 α -kompetenten Kontrollzellen

gesenkt werden. Darüber hinaus konnte durch Behandlung der HIF-1 α -defizienten Zellen mit einem Funktions-blockierenden Antikörper gegen α 5 gezeigt werden, dass die erhöhte Anoikisrate der HIF-1 α -defizienten Zellen tatsächlich durch das α 5 Integrin vermittelt wird.

2.4 Zentrale Regulatoren der Glykolyse werden im humanen hepatozellulären Karzinom unabhängig von HIF-1 α exprimiert

Distinct temporospatial expression patterns of glycolysis-related proteins in human hepatocellular carcinoma. Katjana Daskalow, Nadine Rohwer, David Pfander, Sven Jonas, Bertram Wiedenmann, Christoph Benckert*, **Thorsten Cramer*** (2009). *Histochemistry & Cell Biology* 132:21-31.

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) repräsentiert den fünfthäufigsten malignen Tumor sowie die dritthäufigste Krebstodesursache weltweit. Die Prognose des HCC ist infaust, selbst die 3-Jahresüberlebensrate des prognostisch günstigen Patientenkollektivs beträgt lediglich 20 bis 25%. Chirurgische Tumorresektion und orthotope Lebertransplantation stellen die einzigen potentiell kurativen Therapieverfahren des HCC dar. Allerdings wird die Mehrzahl der HCCs (ca. 75%) im Stadium fortgeschrittenem Tumorwachstums diagnostiziert, so daß eine operative Therapie nicht mehr in Frage kommt (93). Das HCC weist eine ausgeprägte primäre Resistenz gegenüber antiproliferativen Pharmaka auf, so dass die systemische Chemotherapie in der HCC-Therapie keinen Stellenwert besitzt (94). Die erhöhte glykolytische Aktivität in Tumoren wird als ein potentieller Mechanismus der Therapieresistenz angesehen (95). Vor dem Hintergrund, dass die kausale Bedeutung der Glykolyse für die Pathogenese des HCC weitgehend unverstanden ist, wurde eine umfassende histopathologische Analyse von Glykolyse-assoziierten Faktoren durchgeführt. Hierzu wurden anonymisierte Gewebeproben von 60 HCC-Patienten verwendet und die Proteinexpression der Phosphoglyceratkinase-1 (PGK 1) sowie der Glukosetransporter-1 (Glut-1) und -2 (Glut-2) untersucht. Die Expression von PGK-1 wurde zusätzlich mittels quantitativer „real-time“ PCR auf transkriptioneller Ebene analysiert. Es konnte eine moderate PGK-1 Expression in nicht-transformierten Geweben und eine im Vergleich dazu deutlich erhöhte Expression in Tumorgeweben nachgewiesen werden. Glut-2 zeigte eine vergleichbare Immunreaktivität. Die Berechnung der Überlebenszeit nach der Kaplan-Meier-Methode ergab, dass Patienten mit Glut-2- und PGK-1-Immunreaktivität in neoplastischen Zellen eine signifikant schlechtere Prognose aufwiesen als Patienten ohne entsprechende Reaktivität. Im Gegensatz hierzu konnte für Glut-1 keine Immunreaktivität in Tumorgewebe und nicht-transformierten Hepatozyten nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde eine robuste und spezifische Immunreaktivität des Glut-2 Antikörpers über Endothelzellen von Portal- und tumorassoziierten Blutgefäßen beobachtet. Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor HIF-1 α stellt einen etablierten Regulator der Expression Glykolyse-assoziiierter Proteinen dar (96). Bemerkenswerterweise konnte eine spezifische nukleäre Immunreaktivität von HIF-1 α nur in 12% der untersuchten HCC-Gewebe nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der vorliegenden Arbeit die Glykolyse-assoziierten Faktoren PGK-1 und

Glut-2, nicht jedoch HIF-1 α , als Marker einer ungünstigen Prognose des HCC identifiziert werden konnten.

2.5 Die chondrozytäre Expression von Matrixkomponenten sowie von VEGF-A wird durch HIF-1 α kontrolliert

HIF-1 α controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. **Thorsten Cramer***, David Pfander*, Ernestina Schipani, Randall S. Johnson (2003). J Cell Science, 116:1819-1826. (97)

Die Wachstumsfuge des murinen Gelenkknorpels weist eine ausgeprägte Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes auf. Mäuse mit Chondrozyten-spezifischer Inaktivierung von HIF-1 α sind nicht überlebensfähig, da der HIF-1 α -Verlust zu einer herabgesetzten Stabilität des Trachealknorpels führt, der durch die mechanische Belastung unter der Geburt bricht und damit den Erstickungstod der Jungtiere zur Folge hat. Zur Analyse der funktionellen Bedeutung von HIF-1 α für die Chondrozytenfunktion etablierten wir deshalb ein experimentelles Vorgehen zur Inaktivierung von HIF-1 α in Chondrozyten *in vitro*. Zunächst wurden Chondrozyten von neugeborenen Mäusen, die einen HIF-1 α loxP/loxP-Genotyp aufwiesen, anhand eines standardisierten Verfahrens isoliert und kultiviert. Durch Infektion dieser Zellen mit einem Cre-exprimierenden Adenovirus konnte eine Deletionsfrequenz von HIF-1 α in über 90% der Zellen erreicht werden. Die Bedeutung von HIF-1 α für das Wachstum von epiphysealen Chondrozyten wurde zunächst durch die Bestimmung der zellulären Proliferation beurteilt, wobei HIF-1 α -defiziente Chondrozyten ein signifikant reduziertes Wachstum aufwiesen (98). Darüber hinaus resultierte die Deletion von HIF-1 α in einer erheblich eingeschränkten ATP-Synthese der murinen Chondrozyten. HIF-1 α -defiziente Zellen wiesen bereits unter normoxischen Bedingungen einen um 30% reduzierten ATP-Gehalt auf, der unter Hypoxie noch weiter sank. Des Weiteren wurden die Folgen des HIF-1 α -Verlustes für spezifische Chondrozytenfunktionen analysiert. Sauerstoffmangel führte in Wildtyp-Zellen zu einer verstärkten mRNA- und Protein-Expression von Kollagen Typ II und Aggrecan, wichtige Bestandteile der extrazellulären Knorpelmatrix. Interessanterweise konnten die HIF-1 α -defizienten Zellen auf Hypoxie nicht mehr mit einer verstärkten Kollagen Typ II- und Aggrecan-Expression reagieren. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die Expression des angiogenen Faktors VEGF-A in Chondrozyten wesentlich von HIF-1 α reguliert wird: Die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α resultierte in einem vollständigen Verlust der Hypoxie-induzierten Expressionssteigerung von VEGF-A.

3 Diskussion

Die essentielle Bedeutung einer ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff für Leben und Überleben nahezu aller Organismen ist seit vielen Jahrzehnten bekannt. Der lokale Sauerstoffpartialdruck weist in komplexen, multizellulären Lebewesen bereits unter physiologischen Bedingungen eine große Variabilität auf (24). Hierbei konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass ein reduzierter Sauerstoffgehalt (Hypoxie) eine zentrale kausale Bedeutung für eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Phänomene einnimmt (24). Seit der Erstbeschreibung im Jahr 1992 durch Gregg L. Semenza und Guang L. Wang ist eine zentrale Bedeutung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors HIF-1 durch eine Vielzahl von deskriptiven Studien und Zellkulturexperimenten nahegelegt worden (99, 100). Untersuchungen zur kausalpathogenetischen Bedeutung von HIF-1 für maligne, immunologische und degenerative Erkrankungen sind in der vorliegenden Habilitationsschrift beschrieben worden. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf eine funktionelle Relevanz von HIF-1 für die untersuchten Pathologien hin, wobei wichtige zell- und organtypspezifische Unterschiede festgestellt worden sind.

3.1 Die Bedeutung von HIF-1 α für die maligne Progression

Angesichts der vermuteten Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-1 für die Regulation der Metastasierung und für die Vermittlung von Therapieresistenzen in diversen Tumorentitäten wurde die Rolle von HIF-1 für die Pathogenese des humanen Magenkarzinoms sowie des humanen hepatozellulären Karzinoms (HCC) untersucht. Hierfür wurde eine stabile Inaktivierung von HIF-1 α durch Lentiviral-vermittelte RNA-Interferenz in zwei humanen Magenkarzinomzelllinien etabliert.

3.1.1 HIF-1 α und die Pathogenese des Magenkarzinoms

Die immunhistochemische Charakterisierung der Immunreaktivität von HIF-1 α ergab eine deutliche Proteinexpression des Faktors mit Betonung fortgeschrittenener Tumorstadien. Das dokumentierte Muster der HIF-1 α Immunreaktivität ohne klare Assoziation mit definierten Tumorstrukturen lässt eine Stabilisierung von HIF-1 α durch intratumorale Hypoxie eher nachrangig erscheinen und deutet auf aktivierte Onkogene bzw. inaktivierte Tumorsuppressorgene als Grundlage der HIF-1 α Stabilisierung hin. Eine Proteinexpression von HIF-1 α in humanen Magenkarzinomen wurde bereits von internationalen Arbeitsgruppen berichtet, jedoch zeigten sie im Vergleich zu unseren Daten teilweise geringere Prozentzahlen HIF-1 α -positiver Tumorzellen (101-105). Die Unterschiede im Ausmaß HIF-1 α -positiver Tumorzellen sind eventuell durch methodische Unterschiede im immunhistologischen Nachweis von HIF-1 α zu erklären, weil die Komposition der

Patientenkollektive und die Anzahl der Präparate in allen Studien vergleichbar waren. In der vorliegenden Arbeit wurde eine hochsensitive Nachweismethode eingesetzt, wodurch die partiell grössere Zahl HIF-1 α -positiver Tumorzellen zu erklären ist. Im Gegensatz zur Situation in den fortgeschrittenen Magenkarzinomen zeigten bei den untersuchten Magenfrühkarzinomen nur 15% eine spezifische Immunreaktivität für HIF-1 α im neoplastischen Kompartiment. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer von Sumiyoshi *et al.* durchgeführten Studie und lässt vermuten, dass HIF-1 α erst in späteren Stadien der Magenkarzinogenese von tumorbiologischer Relevanz ist (106). Die anonymisierte Datenbank der verwendeten Präparate beinhaltete umfangreiche klinische Parameter der entsprechenden Patienten, so dass eine detaillierte statistische Auswertung der HIF-1 α -Immunreaktivität durchgeführt wurde. Hierbei bildete sich allerdings keine signifikante Korrelation zwischen der HIF-1 α -Proteinexpression und der Lymph- und Blutgefäßinvasion, der Metastasierung sowie dem Tumorstadium ab. Begründet wird diese fehlende Korrelation durch den Nachweis einer spezifischen HIF-1 α -Expression in nahezu allen Präparaten mit fortgeschrittenen Magenkarzinomen, so dass HIF-1 α keinen Stellenwert als prognostischer Marker für das humane Magenkarzinom einnehmen dürfte. In Übereinstimmung hiermit wurde in drei publizierten Studien ebenfalls keine prognostische Signifikanz der HIF-1 α -Immunreaktivität für das Magenkarzinom dokumentiert (103, 107, 108). Dies steht im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer Tumorarten (z.B. Pankreas- und Zervixkarzinom, gastrointestinale Stromatumoren), für die eine klare Assoziation zwischen der HIF-1 α -Immunreaktivität in neoplastischen Zellen und der Prognose gezeigt werden konnte (109-112). Diese Daten verdeutlichen, dass die Funktion von HIF-1 α für die kausale Tumorphogenese entscheidend von tumorspezifischen Faktoren bestimmt wird und eine große Variabilität zwischen den unterschiedlichen Tumorentitäten aufweisen kann.

Die von uns erhobenen immunhistochemischen Daten ließen einen zeitlichen und lokalen Zusammenhang der HIF-1 α -Immunreaktivität mit der systemischen Disseminierung des Magenkarzinoms vermuten. In unserem Gewebekollektiv wurde eine spezifische, nukleäre Immunreaktivität von HIF-1 α regelmäßig in Zellen an den invasiven Tumorgrenzen beobachtet, wodurch eine Bedeutung von HIF-1 α für invasiv wachsende Tumorzellen nahegelegt wurde. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die Bedeutung von HIF-1 für das metastatische Potential des Magenkarzinoms und charakterisierten die zugrunde liegenden Wirkmechanismen. Diese Untersuchungen wurden ermöglicht durch eine spezifische RNA-Interferenz sowie die Anwendung eines chemischen HIF-1-Inhibitors. Zwecks Erreichen einer möglichst effektiven RNA-Interferenz nutzten wir ein lentivirales Transfersystem. Dieser experimentelle Ansatz führt durch stabilen Einbau der shRNA („short hairpin RNA“: ein 64-mer, welches für die spezifisch gegen HIF-1 α gerichtete siRNA kodiert) in das Genom der Zielzellen zu einer langanhaltenden und robusten funktionellen Inaktivierung des Zielproteins. Als chemischen HIF-1-Inhibitor wurde 2-Methoxyestradiol (2ME2) benutzt. Dieser physiologische Östrogenmetabolit vermittelt eine anti-proliferative Wirkung über anti-

angiogene und pro-apoptische Effekte (113). 2ME2 ist heute aufgrund zahlreicher publizierter Studien internationaler Arbeitsgruppen als robuster Hemmstoff von HIF-1 α sowohl *in vitro* als auch *in vivo* akzeptiert (114-117). Translationell bedeutsam ist die Zulassung von 2ME2 als anti-proliferative Substanz für klinische Studien. Zurzeit finden sich auf den Internetseiten der Nationalen Gesundheitsbehörde der USA (www.clinicaltrials.gov) insgesamt neun klinische Studien zur Analyse der tumorhemmenden Wirkung von 2ME2 (Handelsname Panzem) in verschiedenen soliden Tumoren (z.B. Ovarial- und Nierenzellkarzinom oder *Glioblastoma multiforme*). Die durchgeführten Analysen der Migration und Invasion ergaben erste Hinweise für eine Bedeutung von HIF-1 α für die Regulation pro-metastatischer Phänomene *in vitro* (118). Hierbei bewirkte sowohl die chemische als auch die RNAi-bedingte Hemmung von HIF-1 α eine signifikante Reduktion von Migration und Invasion. Bemerkenswerterweise zeigte sich die funktionelle Bedeutung von HIF-1 α für die Metastasierung *in vitro* unabhängig von der Sauerstoffkonzentration. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HIF-1 α in Magenkarzinomzellen bereits unter normoxischen Mikromilieubedingungen einen Regulator von zentralen Tumor-definierenden Eigenschaften repräsentiert. Im Gegensatz zu dieser Annahme stehen die Ergebnisse der eigenen Western Blot Analysen, in denen ohne hypoxische Konditionen kein Nachweis des HIF-1 α -Proteins gelang (119, 120). Eine funktionelle Bedeutung von HIF-1 unter normoxischen Bedingungen wurde allerdings auch von anderen Arbeitsgruppen publiziert (121, 122). Vor diesem Hintergrund wird allgemein vermutet, dass aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von HIF-1 α unter Normoxie die Empfindlichkeit des Western Blot zum erfolgreichen Nachweis des Faktors nicht ausreicht. Migration und Invasion von Zellen benötigen große Mengen an freier Energie. Vor dem Hintergrund der zentralen Bedeutung der glykolytischen Energiegewinnung für neoplastische Zellen und der zentralen Rolle von HIF-1 α für die Regulation der Glykolyse war eine Reduktion der intrazellulären ATP-Spiegel in den HIF-1 α -defizienten Zellen als Mechanismus der Migrations- und Invasionshemmung diskutiert worden (123). Unsere Experimente konnten allerdings weder einen reduzierten Gehalt an ATP nach Inaktivierung von HIF-1 α noch eine Modifikation des Phänotyps durch Zugabe von ATP in das Zellkulturmedium zeigen. Der exakte Mechanismus der pro-metastatischen Funktion von HIF-1 α in den Magenkarzinomzellen konnte daher durch die vorliegenden Arbeiten nicht identifiziert werden. Eine biologisch relevante Bedeutung von HIF-1 α für die Migration von Zellen unterschiedlicher Differenzierung wird allerdings sowohl durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen als auch eigener Untersuchungen an Makrophagen unterstützt (124-128).

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein zentraler Prozess im Rahmen der malignen Transformation und stellt eine Voraussetzung für die systemische Metastasierung dar (129). Die zellbiologische Basis der EMT ist die Entwicklung von einer *per se* unbeweglichen, epithelial differenzierten Primärzelle zu einer motilen, mesenchymal differenzierten Tumorzelle, wobei der Reduktion von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten eine wesentliche Bedeutung zukommt. Auf

molekularer Ebene steht der funktionelle Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin am Beginn der EMT-Pathogenese (130). E-Cadherin ist als starker Repressor der Metastasierung bekannt und im Magenkarzinom ist ein E-Cadherin-Verlust mit Tumorinvasion und schlechter Prognose assoziiert (131). Interessanterweise reguliert HIF-1 die Expression wichtiger negativer Regulatoren des E-Cadherin-Gens (z.B. Twist und Snail), so daß die beschriebene Modifikation der Zellmotilität auch durch HIF-1-vermittelte Unterstützung der EMT via Supprimierung der E-Cadherin-Aktivität erklärbar wäre (132, 133). Diese Überlegung unterstützend führte eine Überexpression von HIF-1 α in Nieren- und Prostatakarzinomzellen zur Reduktion der E-Cadherin-Proteinexpression (134, 135).

Zur erfolgreichen Etablierung einer systemischen Metastase müssen mehrere Abschnitte durchlaufen werden. Zuerst muss die neoplastische Zelle sich aus dem Tumorverband lösen, sich dann mittels Migration und Invasion in Richtung eines Blut- oder Lymphgefäßes bewegen, dieses Gefäß durchwandern, im Blut- oder Lymphstrom ohne Kontakt zur extrazellulären Matrix und Zellkomponenten überleben können und schließlich nach Adhäsion an Endothelzellen aus dem Gefäßsystem auswandern und im fremden Mikromilieu proliferieren (136). Aufgrund dieser komplexen Anforderungen an die Tumorzelle stellt die Metastasierung im Verhältnis zu den sich pro Zeiteinheit aus dem Primärtumorverband lösenden Zellen einen äußerst ineffektiven Prozess dar (137). Hierbei kommt der Fähigkeit der neoplastischen Zellen zum Überleben ohne Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte (das sogenannte Substrat-unabhängige Wachstum) eine zentrale Bedeutung zu. Das Ausmaß des Substrat-unabhängigen Wachstums ist eng mit dem Grad der Malignität assoziiert und besitzt wesentlichen Einfluss auf Tumorwachstum *in vivo*. Wie in der vorliegenden Habilitationsschrift gezeigt, ist HIF-1 α ein zentraler Faktor für die Fähigkeit der verwendeten Magenkarzinomzelllinien zum Substrat-unabhängigen Wachstum (138). Eine wesentliche Bedeutung von HIF-1 α für die Substrat-unabhängige Proliferation wurde von anderen Arbeitsgruppen für Kolonkarzinom- und hepatozelluläre Karzinomzellen beschrieben (139, 140). Die verantwortlichen molekularen Mechanismen konnten allerdings in diesen Studien nicht eindeutig identifiziert werden. In einer Studie wurde eine Zunahme der apoptotischen Zellfraktion nach Inaktivierung von HIF-1 α beobachtet (141). Eine zweite Arbeit zeigte einen eher unspezifischen Wachstums-hemmenden Effekt der HIF-1 α -Inaktivierung, da bereits die zelluläre Proliferation unter Kontakt zur Kulturschale eingeschränkt war (142). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen waren in der vorliegenden Schrift sowohl Substrat-unabhängige Proliferation als auch Apoptose unter adhärenen Wachstumsbedingungen nicht von HIF-1 α abhängig. In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit den Daten von Leek und Mitarbeitern eine Zunahme der Apoptose in HIF-1 α -defizienten Tumorzellen als Grundlage der Reduktion des substratunabhängigen Wachstums dokumentiert werden (143). Diese spezielle Form der Apoptose, ausgelöst durch einen Verlust von Zell-Matrix-Kontakten, wird als Anoikis bezeichnet. Die Anoikis stellt einen wirkungsvollen Schutzmechanismus gegen die Bildung von systemischen Metastasen dar (144). Die Erlangung einer

Anoikisresistenz -ähnlich der Apoptoseresistenz- stellt daher ein wesentliches Merkmal im Verlauf der malignen Transformation dar und ermöglicht erst das Substrat-unabhängige Wachstum neoplastischer Zellen (145, 146). Als wichtige molekulare Vermittler der Anoikis wurden die Integrine identifiziert (147). Integrine sind eine große Familie von dimeren Oberflächenrezeptoren und Anoikisresistenz kann durch Veränderung des Expressionsmusters oder durch Modifikation der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden erreicht werden (148). Vor diesem Hintergrund führten wir eine umfangreiche Analyse der Integrin-Oberflächenpräsentation durch, die eine selektive Induktion des $\alpha 5$ -Integrins in HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzelllinien zeigte. Interessanterweise stellt das $\alpha 5$ -Integrin die Funktions-limitierende Komponente des Fibronektinrezeptors ($\alpha 5\beta 1$ Integrin) dar. Im Verlauf der malignen Transformation unterschiedlicher Gewebe lassen sich regelmässig Veränderungen nachweisen, die zu einer Supprimierung der $\alpha 5\beta 1$ -Aktivität führen (149-151). In Übereinstimmung damit resultierte die Überexpression von $\alpha 5\beta 1$ in Kolonkarzinomzellen zu einer signifikanten Reduktion des malignen Potentials *in vitro* und *in vivo* (152-156). In der vorgelegten Habilitationsschrift führte die Hemmung des $\alpha 5$ -Integrins unter Anwendung eines neutralisierenden Antikörpers zu einer signifikanten Reduktion der Anoikis in den HIF-1 α -defizienten Magenkarzinomzellen. Hierdurch wurde das $\alpha 5$ -Integrin eindeutig als molekularer Vermittler der Anoikisinduktion in den HIF-1 α -defizienten Zellen identifiziert.

Wie bereits in der Einleitung zu dieser Schrift erwähnt sind aktuell über 100 Gene bekannt, deren Expression von HIF-1 α gesteigert wird. Im Gegensatz dazu stellt die Identifikation eines durch HIF-1 α negativ regulierten Gens ein äußerst seltenes Ereignis dar. Die HIF-1 α -vermittelte Hemmung der $\alpha 5$ -Integrin-Expression konnte mittels Western Blot und Durchflußzytometrie auf Proteinebene und mittels quantitativer „real-time“ PCR auf transkriptioneller Ebene dokumentiert werden. Zur Charakterisierung der molekularen Mechanismen wurde zunächst die Bedeutung der reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) analysiert. ROS beinhalten freie Radikale (Superoxidanionen und Hydroxylradikale), stabile Oxidantien (Wasserstoffperoxid und Ozon) sowie den singulären Sauerstoff. Reaktive Sauerstoffspezies stellen essentielle Regulatoren von Proliferation, Apoptose und Chemoresistenz dar und nehmen sowohl physiologische als auch pathophysiologische Funktionen in der Signaltransduktion wahr (157). Vor diesem Hintergrund ist eine zentrale Bedeutung der ROS für die maligne Transformation heute weitgehend akzeptiert (158). ROS sind in der Lage, die Genexpression verschiedener Integrine zu modifizieren (159). Interessanterweise konnte speziell für das $\alpha 5$ -Integrin eine signifikante Induktion der Expression durch reaktive Sauerstoffspezies in Magenkarzinomzellen gezeigt werden (160). Diese publizierten Daten werden durch die hier vorgelegten Ergebnisse bestätigt, wobei ein erhöhter intrazellulärer Gehalt an ROS in HIF-1 α -defizienten Zellen als zugrunde liegender molekularer Mechanismus der Induktion des $\alpha 5$ -Integrins dokumentiert wurde. In guter Übereinstimmung mit dieser Arbeit wurden in HIF-1 α -defizienten murinen embryonalen Fibroblasten ebenfalls erhöhte Mengen an ROS

beschrieben (183). Entsprechend führte eine Überexpression von HIF-1 α zu einer Reduktion des intrazellulären ROS-Gehaltes in Nierenkarzinomzellen (161, 162). Der verantwortliche molekulare Mechanismus findet sich in der metabolischen Bedeutung von HIF-1 α . Wie bereits in der Einleitung dieser Schrift erläutert stellt HIF-1 α einen zentralen Regulator der Glykolyse dar. Nach physiologischer oder pathophysiologischer Aktivierung von HIF-1 α kommt es neben einer starken Aktivierung der Glykolyse zu einer robusten Hemmung des mitochondrialen Stoffwechsels. Die HIF-1-Zielgene Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (PDK1) und Laktatdehydrogenase A (LDHA) hemmen über eine reduzierte Bildung von Acetyl-CoA die Aktivität des Tricarbonsäurezyklus (163, 164). Zusätzlich hemmt HIF-1 α direkt die Biogenese der Mitochondrien und stimuliert die Autophagie derselben (165, 166). Vor dem Hintergrund, dass die Mehrheit der intrazellulären ROS im Verlauf der oxidativen Phosphorylierung an den mitochondrialen Komplexen I und III entstehen, hat die Hemmung des mitochondrialen Stoffwechsels durch HIF-1 eine Reduktion des Gehaltes an ROS in HIF-1 α -defizienten Zellen zur Folge (167, 168). Diese molekularen Zusammenhänge wurden durch Untersuchungen unterstützt, die mittels Überexpression von PDK1 in HIF-1 α -defizienten Tumorzellen eine signifikante Reduktion der intrazellulären ROS-Konzentration erreichen konnten (169).

3.1.2 Die Expression von HIF-1 α im humanen hepatozellulären Karzinom

Die Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms (HCC) nimmt in den westlichen Industrieländern konstant zu, aktuell stellt das HCC die dritthäufigste Krebstodesursache weltweit dar (ref). Die überwiegende Anzahl der Fälle wird in einem fortgeschrittenen und damit inoperablem Stadium diagnostiziert, so dass eine Behandlung unter kurativer Zielsetzung nicht mehr durchgeführt werden kann. Aufgrund der primären Resistenz des HCC gegenüber systemischer Chemotherapie sind die etablierten antiproliferativen Substanzen in der Therapie des HCC wirkungslos und die 5-Jahresüberlebensrate aller Patienten ist kleiner als 5%. Die exakte Kenntnis der molekularen Pathogenese des HCC stellt eine Voraussetzung für die Entwicklung innovativer, zielgerichteter Therapieformen dar. Im Verlauf der malignen Progression des HCC lässt sich sowohl an humanen Gewebeproben als auch in unterschiedlichen Tiermodellen eine signifikante Aktivierung HIF-1 α -abhängiger Signalwege nachweisen. Hepatozelluläre Karzinome sind typischerweise hypervaskularisierte Tumore und die Neubildung von arteriellen Gefäßen korreliert signifikant mit dem Malignitätsgrad der Tumoren (170). Eine große Anzahl der durch HIF-1 regulierten pro-angiogenen Faktoren findet sich im humanen HCC im Vergleich zu normalem Lebergewebe erhöht exprimiert (z.B. VEGF-A, Angiopoietin-2 und IGF-2) (171). Das X Protein (HBx) des Hepatitis B Virus (HBV) wird im Verlauf der HBV-Infektion exprimiert und ist durch Modulation von Angiogenese, hepatozellulärer Transkription und zellulären Schutzmechanismen gegen genotoxischen Stress kausal an der HBV-induzierten Hepatokarzinogenese beteiligt (172). Aktuelle Studien konnten zeigen, dass HBx *in vitro* zu einer Stabilisierung von HIF-1 α mit nachfolgender Transkription von

HIF-1 α -Zielgenen führte (173). Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine funktionelle Bedeutung von HIF-1 α im Rahmen der Hepatokarzinogenese hin. Die Proteinexpression von HIF-1 α im humanen HCC war bis dato nicht umfassend untersucht worden, so dass wir in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Professor Sven Jonas (Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie) eine HIF-1 α -Immunhistochemie an anonymisierten Gewebeproben von 60 Patienten durchführten. Dabei war eine spezifische nukleäre Färbung des HIF-1 α Proteins lediglich in 12% der Tumorproben nachweisbar. Diese geringere Positivität wurde durch eine Arbeit von Yasuda *et al.* bestätigt, die in keinem von 40 immunhistochemisch untersuchten HCCs eine Immunreaktivität von HIF-1 α nachweisen konnten (174). Eine darüber hinausgehende kritische Wertung dieses Ergebnisses fällt schwer, da die sonstigen publizierten Daten in nicht allgemein zugänglichen asiatischen Zeitschriften veröffentlicht worden sind. Angesichts der guten Übereinstimmung mit der Arbeit von Yasuda *et al.* lassen unsere Daten vermuten, dass der immunhistochemische Nachweis von HIF-1 α an archivierten Paraffingeweben keine Aussage zur Prognose des HCC erlaubt. Vor dem Hintergrund, dass die Qualität der Antigenkonservierung in Paraffin-eingebetteten Geweben mit der Zeit abnimmt kann nicht mit ausreichender Sicherheit konstatiert werden, dass HIF-1 α nicht doch in größerem Umfang im humanen HCC exprimiert ist (175). Eine sinnvolle Ergänzung dieser Untersuchungen könnte daher zum Beispiel die Analyse der Genexpression von HIF-1 α im HCC oder eine Immunhistochemie an Gefrierschnitten sein.

Wie in der Einleitung dieser Habilitationsschrift bereits erläutert stellt HIF-1 durch Regulation glykolytischer Schlüsselenzyme sowie Glukose-transportierenden Faktoren einen wesentlichen Vermittler der zellulären Glukosehomöostase dar (176). Erhöhte glykolytische Aktivität repräsentiert ein zentrales Charakteristikum solider Tumoren und ist -ähnlich wie die Hypoxie- für den klinischen Verlauf von Krebserkrankungen von prognostischer Bedeutung (95). Die verstärkte Glykolyse maligne transformierter Zellen wurde 1930 vom deutschen Biochemiker und Nobelpreisträger Otto Heinrich Warburg entdeckt und wird entsprechend als Warburg Effekt bezeichnet (177). In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Arbeiten unabhängiger internationaler Arbeitsgruppen publiziert worden, die mittels *in vitro* und *in vivo* Tumormodellen eine kausale Bedeutung der erhöhten Glykolyse für die maligne Transformation zeigen konnten (178-180). Die aktuell vorliegenden Daten zur kausalen Bedeutung der Glykolyse für Krebserkrankungen sind in ihrer Gesamtheit so überzeugend, dass bereits die Aufnahme der Glykolyse in die von Douglas Hanahan und Robert Weinberg beschriebenen grundsätzlichen Charakteristika von Tumorzellen („Hallmarks of Cancer“) diskutiert wird (181, 182). Die hier diskutierte experimentelle Arbeit stellt die erstmalige Beschreibung einer prognostisch relevanten Expression Glykolyse-assoziiierter Faktoren im humanen HCC dar (183). PGK-1 ist ein zentrales Enzym des Glukosestoffwechsels und katalysiert die reversible Reaktion von 1,3-Bisphosphoglyzerat zu 3-Phosphoglyzerat. Die immunhistochemische Analyse der humanen Leberbiopsien zeigte eine moderate PGK-1 Immunreaktivität in nicht-

transformierter Leber und eine starke Immunreaktivität in malignen Hepatozyten. Mithilfe einer quantitativen PCR wurden die Analysen ergänzt und der immunhistologische Befund bestätigt. Die Auswertung beider Methoden zeigte, dass die Expression von PGK-1 im HCC mit einer schlechten Prognose korrelierte. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Daten anderer Arbeitsgruppen, die eine erhöhte PGK-1-Expression mit einer progressiven Tumorerkrankung bei Patienten mit Lungen- und Pankreaskarzinomen assoziieren konnten (184, 185). Interessanterweise besitzt PGK-1 neben der glykolytischen Funktion noch weitere tumorbiologisch relevante Wirkungen. So kann von neoplastischen Zellen sezerniertes PGK-1 die Synthese des anti-angiogenen Faktors Angiostatin aus Plasmin katalysieren und somit die intratumorale Neubildung von Gefäßstrukturen hemmen (186). Darüber hinaus ist eine unterstützende Funktion von PGK-1 im Rahmen der Reparatur geschädigter DNA beschrieben worden (187). Die beiden letztgenannten Funktionen würden eine Tumor-hemmende Wirkung bedingen, ihre biologische Relevanz im Kontext der komplexen Pathogenese solider Tumoren kann aktuell nicht umfassend beurteilt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Die Familie der Glukosetransporter beinhaltet mindestens 14 homologe Membranproteine und ist essentiell für die intrazelluläre Aufnahme von Glukose und damit auch für die Glykolyse. Glukosetransporter 1 (Glut-1) wird ubiquitär exprimiert, wobei die hier vorgelegten Daten allerdings dafür sprechen, dass Glut-1 im humanen HCC nur eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Annahme wird von publizierten Daten unabhängiger Arbeitsgruppen unterstützt (188, 189). Im Gegensatz zu Glut-1 konnte für den Glukosetransporter 2 (Glut-2) eine Assoziation der tumorspezifischen Proteinexpression mit der Prognose der Patienten dokumentiert werden. Dies stimmt gut mit publizierten Daten überein, die das Glut-2 Protein mittels Immunhistochemie in humanen HCC-Proben nachweisen konnten (190, 191). Darüber hinaus bestätigen diese Daten die Arbeit von Paudyal und Mitarbeitern, die ebenfalls eine schlechtere Prognose der Patienten bei Positivität der HCC-Zellen für Glut-2- feststellen konnten (192).

3.2 Die immunologische Bedeutung von HIF-1 α

In eigenen Arbeiten konnte erstmalig eine auf mononukleäre Phagozyten begrenzte Inaktivierung von HIF-1 α etabliert und die biologischen Konsequenzen unter Anwendung verschiedener *in vivo* und *in vitro* Modelle der Entzündung demonstriert werden. Diese experimentelle Strategie, die auf dem Cre-loxP-System des sogenannten konditionellen (oder gewebespezifischen) „knock-outs“ basierte, führte zur Identifizierung einer zentralen Rolle von HIF-1 α für die Gewährleistung der Phagozytenfunktion. Hierbei war die Bedeutung von HIF-1 α nicht spezifisch für ein Entzündungsmodell, sondern zeigte sich in robuster Ausprägung über ein breites Spektrum verschiedener entzündlicher Insulte. Darüber hinaus konnten diese eigenen Arbeiten auch erstmalig eine essentielle Bedeutung von HIF-1 α für die antimikrobielle Aktivität von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten dokumentieren. Diese Resultate bestätigten eindrucksvoll die den experimentellen Arbeiten zugrunde

liegende Hypothese. Diese besagte, dass mononukleäre Phagozyten aufgrund der Sauerstoffarmut des entzündlichen Mikromilieus optimal an hypoxische Konditionen angepasst sein müssen, wobei HIF-1 α als molekularer Vermittler dieser Anpassungsvorgänge vermutet worden war. Diese Funktion von HIF-1 α war zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der Arbeiten vollkommen unbekannt (193, 194). In den folgenden Jahren ist allerdings eine Vielzahl von experimentellen Arbeiten erschienen, die die eigenen Resultate bestätigen konnten, so dass die zentrale Bedeutung von HIF-1 α für die Regulation der Phagozytenfunktion heute allgemein anerkannt ist (195). Die eigene Arbeit zur Charakterisierung des Mechanismus hinter der Bedeutung von HIF-1 α zeigte eine hochsignifikante Reduktion der Energieträger in HIF-1 α -defizienten Zellen. Die intrazellulären ATP-Spiegel waren durch den Verlust von HIF-1 α um gut 80% erniedrigt und diese deutliche Einschränkung der Energiesynthese wurde als verantwortlicher Mechanismus für die herabgesetzte Phagozytenfunktion angesehen (196). Die reduzierten ATP-Spiegel erklärten sich aus der Bedeutung von HIF-1 α für die Kontrolle der Glykolyse. Wie bereits mehrfach in dieser Habilitationsschrift erwähnt wird die Genexpression der Mehrzahl der glykolytischen Enzyme von HIF-1 α reguliert (197). Darüber hinaus beeinflusst HIF-1 α durch Kontrolle der Glukosetransporter-1 und -3 auch die zelluläre Aufnahme von Glukose (198). Die ersten experimentellen Hinweise, dass Zellen des Immunsystems in besonderer Weise von glykolytischer Energiegewinnung abhängig sind, wurden vor gut einhundert Jahren von Levene und Meyer erbracht (199). Später konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten die von ihnen benötigte Energie hauptsächlich durch Glykolyse generieren und zwar sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen (200). Nachfolgend wurde klar, dass Phagozyten -im Gegensatz zu den meisten anderen Zelltypen- auch in sauerstoffreichen Mikromilieus keine bevorzugte Nutzung der oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Synthese aufweisen (201). In neutrophilen Granulozyten wird bereits unter ruhenden, aeroben Bedingungen ca. 85% der aufgenommenen Glukose zu Laktat verstoffwechselt (202). Die ausgeprägte Abhängigkeit von der Glykolyse ist demnach ein zentrales Charakteristikum der Phagozyten. Experimente mit Glykolyseinhibitoren zeigten, dass diese Substanzen signifikant hemmende Effekte auf zentrale Phagozytenfunktionen wie z.B. Migration, Invasion und Chemotaxis haben, während eine Hemmung der Mitochondrienaktivität ohne wesentliche Wirkung auf diese Phänomene blieb (203, 204). Die eigenen Arbeiten konnten eine signifikante Reduktion Phagozyten-vermittelter Entzündungsprozesse aufgrund einer reduzierten zellulären Energiesynthese nach funktioneller Inaktivierung von HIF-1 α dokumentieren. Es wurde demnach eine Bestätigung der zentralen Bedeutung der Glykolyse für die regelrechte Funktion inflammatorischer Zellen durch Anwendung moderner gentechnischer Methoden erreicht.

3.3 HIF-1 α als Regulator des Knorpelstoffwechsels

Das Chondrozyten-typische Mikromilieu ist durch Hypoxie, niedriger Glukosekonzentration und sauren pH und damit insgesamt sehr anspruchsvollen Bedingungen gekennzeichnet (205, 206). Die

Analyse von Knorpelgewebe, welches durch Anwendung des Cre-loxP-Systems eine Chondrozyten-spezifische funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α aufwies, konnte eindrucksvoll zeigen, dass Überleben und physiologischer Wachstumsarrest von Chondrozyten der Wachstumsfuge in zentraler Weise von HIF-1 α kontrolliert werden (207). In eigenen Arbeiten wurde daraufhin die Hypothese verfolgt, dass HIF-1 α durch Regulation der glykolytischen Energiegewinnung die Funktion von Chondrozyten beeinflusst (208-211). Die experimentellen Arbeiten basierten auf der Analyse HIF-1 α -defizienter muriner Chondrozyten. Ein entsprechendes Protokoll wurde durch adenoviral-vermittelte Cre-Expression in Chondrozyten, die aus murinen Epiphysen von Tieren mit einem HIF-1 α loxP/loxP Genotyp isoliert wurden, etabliert. Diese Zellen zeigten eine deutliche Wachstumsretardierung nach Verlust von HIF-1 α *in vitro*, wodurch die Ergebnisse der zuvor publizierten *in vivo* Studien bestätigt wurden (212). Die nachfolgenden Analysen ergaben eine signifikante Bedeutung von HIF-1 α für die Regulation des glykolytischen Stoffwechsel in den Chondrozyten: Die intrazelluläre ATP-Konzentration war in den HIF-1 α -defizienten Knorpelzellen um etwa 50% niedriger als in entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (213). Diese Ergebnisse werden sowohl von publizierten Daten mithilfe muriner embryonaler Fibroblasten als auch von eigenen Arbeiten mit mononukleären Phagozyten bestätigt (214, 215). HIF-1 α stellt demnach einen wichtigen Regulator der zellulären Energiehomöostase in verschiedenen Zelltypen dar. Zur Untersuchung der Bedeutung von HIF-1 α für die Regulation der Glykolyse in Chondrozyten führten wir Laktatmessungen sowie Genexpressionsanalysen wichtiger Faktoren des Glukosestoffwechsels durch. Entsprechend publizierten und eigenen Daten führte die Inaktivierung von HIF-1 α zu einer signifikanten Abnahme der Laktatkonzentration im Überstand der Chondrozyten, wobei der Unterschied unter hypoxischen Bedingungen ausgeprägter war als unter Normoxie (216-218). Die quantitative Bestimmung der Genexpression von Glut-1 und PGK-1 mittels quantitativer „real-time“ PCR dokumentierte eine fehlende Steigerung der Expression unter Hypoxie in den HIF-1 α -defizienten Chondrozyten und bestätigte damit die zentrale Bedeutung von HIF-1 α für die Aktivierung der Glykolyse unter Sauerstoffmangelbedingungen. Nachfolgend interessierte uns die Rolle von HIF-1 α für die chondrozytäre Synthese von Matrixkomponenten, wobei wir zwei zentrale Proteoglykane der Knorpelmatrix untersuchten: Aggrecan und Kollagen Typ II (219). Die funktionelle Inaktivierung von HIF-1 α führte zur signifikanten Reduktion der Expression von Aggrecan und Kollagen Typ II, wobei der Effekt unter hypoxischen Bedingungen noch deutlicher war. Weiterführende eigene Arbeiten zeigten, dass auch die Hypoxie-induzierte Expression des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF-A in Knorpelzellen unter Kontrolle von HIF-1 α stand (220). Die enchondrale Ossifikation der epiphysären Wachstumsfuge stellt einen entscheidenden Vorgang im Rahmen der Bildung des Knochengewebes dar (221). Dabei kommt der Einsprossung von Endothelzellen aus dem metaphysären Knochen in den Knorpel und der nachfolgenden Ausbildung intakter Blutgefäße (Angiogenese) eine zentrale Bedeutung zu (222). Die Angiogenese wird durch das Verhältnis einer Vielzahl aktivierender und

hemmender Faktoren bestimmt (223). Hierbei nimmt VEGF-A eine zentrale Stellung ein, weil er durch die Induktion von Proliferation, Migration und Chemotaxis von Endothelzellen das komplette zellbiologische Programm der Neubildung von Blutgefäßen aktivieren kann (224). Die erwähnten eigenen Daten lassen vermuten, dass HIF-1 α durch Kontrolle der VEGF-A-Expression eine pathogenetisch bedeutende Funktion in der Skeletogenese besitzt. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser eigenen Daten war eine umfassende Diskussion der Ergebnisse nicht möglich, da es sich um die Erstbeschreibung dieser HIF-1 α -Funktion gehandelt hatte. In der Zwischenzeit sind allerdings mehrere Veröffentlichungen unabhängiger Arbeitsgruppen erschienen, die ebenfalls eine funktionelle Aktivierung von HIF-1 α in Chondrozyten gezeigt haben (225-227). Eine zentrale Bedeutung von HIF-1 für Physiologie und Pathophysiologie des Knorpels ist mittlerweile international akzeptiert (228).

Präklinische und klinische Arbeiten der letzten Jahre machen zunehmend deutlicher, dass die biologische Bedeutung von HIF-1 weit über die Regulation der Adaptation an Hypoxie hinausgeht. Eigene Arbeiten konnten eine zentrale Funktion von HIF-1 im Rahmen der Pathogenese entzündlicher und degenerativer Erkrankungen zeigen. Erstmals wurde HIF-1 als essentieller Regulator der Aktivität von myeloiden Zellen identifiziert. Die bereits bekannte Bedeutung von HIF-1 für eine physiologische Entwicklung der Wachstumsfuge wurde durch die Charakterisierung der Matrixkomponenten Kollagen Typ II und Aggrecan sowie des pro-angiogenen Faktors VEGF-A als HIF-1-Zielgene weiter untersucht. Schließlich erweiterten die Arbeiten das Verständnis der Funktion von HIF-1 im Rahmen der malignen Transformation. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass HIF-1 sowohl eine wichtige als auch eine vernachlässigbare pathogenetische Bedeutung für solide Tumore einnehmen kann. Diese Arbeiten deuten daher auf eine Kontext- und Tumor-spezifische Bedeutung von HIF-1 im Rahmen der kausalen Pathogenese solider Tumore hin. Die intensiven Bemühungen, chemische Inhibitoren von HIF-1 als Therapeutika gegen entzündliche, degenerative und maligne Erkrankungen zu etablieren werden durch diese Arbeiten zusätzlich unterstützt. Angesichts der beschriebenen Bedeutung von HIF-1 für physiologische Funktionen von Immunzellen und Chondrozyten werden zukünftige klinische Studien zeigen müssen, dass diesbezüglich keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen auftreten, die der Zulassung dieser Substanzgruppe im Wege stehen.

4 Zusammenfassung

Sauerstoff stellt aufgrund seiner Bedeutung als finaler Elektronenakzeptor in der oxidativen Phosphorylierung eine unabdingbare Voraussetzung für die Existenz der Mehrzahl von Organismen dar. Eine kritische Abnahme der Sauerstoffkonzentration (Hypoxie) kann durch Einschränkung der zellulären Energiesynthese lebensbedrohliche Folgen haben. Mehrzellige Organismen besitzen daher ein komplexes Programm zur Adaptation an Hypoxie, dem letztlich ein verbesserter Sauerstofftransport im Blut, eine erhöhte Organperfusion, Blutgefäßneubildung und eine Aktivierung der Glykolyse bei gleichzeitiger Reduktion der Mitochondrienfunktion zugrunde liegt. Hypoxie besitzt dabei als Charakteristikum verschiedenster Prozesse, z.B. der Embryonalentwicklung, der Entzündung sowie der malignen Transformation zentrale physiologische und pathophysiologische Relevanz. Der Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktor 1 (HIF-1) stellt einen entscheidenden Vermittler der zellulären Adaptation an Hypoxie dar. Eine Vielzahl von Studien lässt vermuten, dass HIF-1 eine funktionelle Bedeutung für die Pathogenese inflammatorischer, neoplastischer und degenerativer Erkrankungen zukommt, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen weitgehend unklar sind. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher die umfangreiche Charakterisierung der pathobiologischen Funktion von HIF-1 im Rahmen der erwähnten Krankheitsbilder einschließlich der beteiligten molekularen und zellbiologischen Mechanismen. Zunächst wurde unter Anwendung des Cre-loxP-Systems eine Gewebe-spezifische Inaktivierung von HIF-1 in mononukleären Phagozyten bzw. Chondrozyten etabliert. Zur HIF-1-Hemmung *in vitro* wurde eine funktionelle Inaktivierung der regulatorischen α -Untereinheit von HIF-1 (HIF-1 α) mittels lentiviraler RNA-Interferenz erarbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 eine kausale Bedeutung für die Pathogenese der hier verwendeten Modellsysteme einnimmt. So wurde HIF-1 erstmalig als zentraler Faktor für die regelrechte Funktion mononukleärer Phagozyten identifiziert. Darüber hinaus konnte eine wesentliche Bedeutung von HIF-1 für die Pathobiologie von Chondrozyten gezeigt werden. Außerdem deuteten die Ergebnisse auf eine differentielle Rolle von HIF-1 im Rahmen neoplastischer Erkrankungen hin: Im Magenkarzinom konnte eine pathogenetisch relevante HIF-1-Expression nachgewiesen werden, das humane hepatozelluläre Karzinom zeigte dagegen keine relevante Aktivität des Faktors. Zusammengefasst dokumentiert die vorliegende Arbeit eine kausalpathogenetische Relevanz von HIF-1 für die Makrophagen-vermittelte Entzündung, das Magenkarzinom und die Osteoarthritis. Es kann daher vermutet werden, dass HIF-1-inhibierende Strategien eine sinnvolle Ergänzung der aktuellen Behandlungsverfahren für inflammatorische, degenerative und maligne Erkrankungen darstellen.

Abstract

Oxygen constitutes a central prerequisite for the existence of the majority of animals and plants due to its role as an electron acceptor during oxidative phosphorylation. Reduction of oxygen partial pressure (hypoxia) may result in significant limitation of cellular energy synthesis and thereby can exert deleterious effects in the whole organism. To subvert potentially harmful consequences of hypoxia, multicellular organisms have developed a complex program to adapt to low oxygen levels. Improved oxygen transport in blood, increased organ and tissue perfusion, development of new blood vessels (angiogenesis) and activation of glycolysis represent central features of this hypoxic adaptation. Hypoxia is a common characteristic of diverse physiological and pathophysiological processes, e.g. embryonic development, inflammation and malignant transformation. The hypoxia-inducible transcription factor HIF-1 represents the pivotal molecular mediator of cellular adaptation to low oxygen levels. A vast number of studies points towards a functional relevance of HIF-1 for the pathogenesis of inflammatory, neoplastic and degenerative diseases. However, the underlying molecular mechanisms remain largely elusive. Therefore, the presented work aimed at performing a comprehensive characterization of the pathobiological role of HIF-1 in the context of the aforementioned diseases including the underlying molecular and cell biological mechanisms. By applying the Cre-loxP-system, a tissue-specific functional inactivation of HIF-1 in cells of the myeloid lineage and in chondrocytes was established. Inactivation of HIF-1 α , the oxygen-regulated subunit of HIF-1, *in vitro* was achieved by means of lentivirally transduced RNA interference. It could be shown that HIF-1 represents a pivotal factor for maintaining physiological myeloid cell function in the context of various *in vivo* inflammation models. Furthermore, HIF-1 was identified as being centrally involved in the expression of cartilage type II and aggrecan, two characteristic and important members of the extracellular matrix in cartilage, in chondrocytes. Finally, the results point towards a tissue-specific role of HIF-1 during tumor pathogenesis: While gastric cancer displayed robust and functional HIF-1 expression, hepatocellular carcinoma cells failed to show significant expression of HIF-1 α . Taken together, this work showed a functional relevance of HIF-1 for the pathogenesis of myeloid-mediated inflammation, gastric cancer and osteoarthritis. It can be concluded that inhibition of HIF-1 constitutes a reasonable supplementation to established therapeutic strategies against inflammation, gastric cancer and degenerative diseases.

5 Literaturangaben

1. Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:865-73.
2. Maltepe E, Saugstad OD. Oxygen in health and disease: regulation of oxygen homeostasis--clinical implications. *Pediatr Res* 2009;65:261-8.
3. Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 2005;450:363-71.
4. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54.
5. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007;2007:cm8.
6. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1230-7.
7. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002;295:858-61.
8. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-72.
9. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464-8.
10. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5.
11. Ohh M, Park CW, Ivan M, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000;2:423-7.
12. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, et al. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001;15:1312-4.
13. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996;271:C1172-C1180.
14. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 2008;15:621-7.
15. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, et al. 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* 1996;271:32529-37.
16. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trend Mol Med* 2001;7:345-50.
17. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
18. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 2008;8:705-13.
19. Harris AL. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47.
20. Vaupel P, Mayer A, Hockel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 2004;381:335-54.
21. Ezekowitz RAB, Hoffmann JA. Innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:1-2.
22. Metchnikoff E. Über die intracelluläre Verdauung bei Coelenteraten. *Zoologischer Anzeiger* 1880;3:261-3.

23. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436-44.
24. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:71-8.
25. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-45.
26. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 2008;267:204-15.
27. Saadi S, Wrenshall LE, Platt JL. Regional manifestations and control of the immune system. *FASEB J* 2002;16:849-56.
28. Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol* 1999;66:889-900.
29. Shapiro IM, Golub EE, May M, Rabinowitz JL. Studies of nucleotides of growth-plate cartilage: evidence linking changes in cellular metabolism with cartilage calcification. *Biosci Rep* 1983;3:345-51.
30. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, et al. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 2001;15:2865-76.
31. Rajpurohit R, Koch CJ, Tao Z, Teixeira CM, Shapiro IM. Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J Cell Physiol* 1996;168:424-32.
32. Robert Koch-Institut (Hrsg). *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* Robert Koch-Institut, Berlin: 2006.
33. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563-72.
34. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:701-6.
35. Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267:891-3.
36. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994;107:3569-77.
37. Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1352-64.
38. Varner JA, Cheresch DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:724-30.
39. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001;305:285-98.
40. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411:342-8.
41. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 2009;9:501-7.
42. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
43. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002;2:277-88.
44. Talks KL, Turley H, Gatter KC, et al. 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* 2000;157:411-21.
45. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5.

46. Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, Arbeit JM. 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* 2000;60:6189-95.
47. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000;60:4010-5.
48. Bos R, van der GP, Greijer AE, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2003;97:1573-81.
49. Shibaji T, Nagao M, Ikeda N, et al. Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2003;23:4721-7.
50. Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693-6.
51. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, et al. 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* 2003;163:1001-11.
52. Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, et al. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:516-25.
53. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8104-9.
54. Williams KJ, Telfer BA, Airley RE, et al. A protective role for HIF-1 in response to redox manipulation and glucose deprivation: implications for tumorigenesis. *Oncogene* 2002;21:282-90.
55. Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, Hiraoka M, Yoneda T. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:4157-63.
56. Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* 2007;67:563-72.
57. Brown LM, Cowen RL, Debray C, et al. Reversing Hypoxic Cell Chemoresistance in Vitro Using Genetic and Small Molecule Approaches Targeting Hypoxia Inducible Factor-1. *Mol Pharmacol* 2006;69:411-8.
58. Hao J, Song X, Song B, et al. Effects of lentivirus-mediated HIF-1alpha knockdown on hypoxia-related cisplatin resistance and their dependence on p53 status in fibrosarcoma cells. *Cancer Gene Ther* 2008;15:449-55.
59. Li L, Lin X, Shoemaker AR, et al. Hypoxia-inducible factor-1 inhibition in combination with temozolomide treatment exhibits robust antitumor efficacy in vivo. *Clin Cancer Res* 2006;12:4747-54.
60. Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, et al. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* 2005;8:99-110.
61. Sasabe E, Zhou X, Li D, et al. 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* 2007;120:268-77.
62. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, et al. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003;22:3213-20.
63. Williams KJ, Telfer BA, Xenaki D, et al. Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiother Oncol* 2005;75:89-98.
64. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.

65. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4604-13.
66. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 2000;60:916-21.
67. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006;440:1222-6.
68. Staller P, Sulitkova J, Lischwan J, et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 2003;425:307-11.
69. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003;63:1138-43.
70. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, et al. Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene. *Cancer Res* 2002;62:3387-94.
71. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003;112:645-57.
72. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 1999;8:265-77.
73. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 1995;269:1427-9.
74. Cramer T, Johnson RS. A novel role for the hypoxia inducible transcription factor HIF-1alpha: critical regulation of inflammatory cell function. *Cell Cycle* 2003;2:192-3.
75. Rohwer N, Lobitz S, Daskalow K, et al. HIF-1alpha determines the metastatic potential of gastric cancer cells. *Br J Cancer* 2009;100:772-81.
76. Rohwer N, Welzel M, Daskalow K, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha mediates anoikis resistance via suppression of alpha5 integrin. *Cancer Res* 2008;68:10113-20.
77. Roxburgh P, Evans TR. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: Are we making progress? *Adv Ther* 2008.
78. Thomas MB. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer J* 2008;14:123-7.
79. Gatenby RA, Gillies RJ. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1358-66.
80. Pfander D, Cramer T, Schipani E, Johnson RS. HIF-1alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J Cell Sci* 2003;116:1819-26.
81. Cabuk D, Basaran G, Celikel C, et al. 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* 2007;72:111-7.
82. Mizokami K, Kakeji Y, Oda S, et al. Clinicopathologic significance of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression in gastric carcinomas. *J Surg Oncol* 2006;94:149-54.
83. Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer* 2006;9:44-9.
84. Griffiths EA, Pritchard SA, Valentine HR, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2007;96:95-103.

85. Sumiyoshi Y, Kakeji Y, Egashira A, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:5112-7.
86. Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, Sugihara K. 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* 2008;15:2336-44.
87. Chen WT, Huang CJ, Wu MT, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:207-13.
88. Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep* 2003;10:797-802.
89. Schumacher G, Neuhaus P. The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:405-10.
90. Escuin D, Kline ER, Giannakakou P. Both Microtubule-Stabilizing and Microtubule-Destabilizing Drugs Inhibit Hypoxia-Inducible Factor-1{alpha} Accumulation and Activity by Disrupting Microtubule Function. *Cancer Res* 2005;65:9021-8.
91. Kang SH, Cho HT, Devi S, et al. Antitumor Effect of 2-Methoxyestradiol in a Rat Orthotopic Brain Tumor Model. *Cancer Res* 2006;66:11991-7.
92. Mabweesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003;3:363-75.
93. Ricker JL, Chen Z, Yang XP, et al. 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* 2004;10:8665-73.
94. Dang DT, Chen F, Gardner LB, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 2006;66:1684-936.
95. Liu YL, Yu JM, Song XR, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1320-6.
96. Miyoshi A, Kitajima Y, Ide T, et al. Hypoxia accelerates cancer invasion of hepatoma cells by upregulating MMP expression in an HIF-1alpha-independent manner. *Int J Oncol* 2006;29:1533-9.
97. Shyu KG, Hsu FL, Wang MJ, Wang BW, Lin S. Hypoxia-inducible factor 1 alpha regulates lung adenocarcinoma cell invasion. *Exp Cell Res* 2007;313:1181-91.
98. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-8.
99. Chen HC, Chu RY, Hsu PN, et al. Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas. *Cancer Lett* 2003;201:97-106.
100. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1[alpha] promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008;10:295-305.
101. Luo d, Wang J, Li J, post M. Snail is a Target Gene for HIF. *FASEB J* 2007;21:A1032-A103e.
102. Esteban MA, Tran MGB, Harten SK, et al. Regulation of E-cadherin Expression by VHL and Hypoxia-Inducible Factor. *Cancer Res* 2006;66:3567-75.
103. Luo Y, He DL, Ning L, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostatecancer cells. *Chin Med J* 2006;119:713-8.

104. Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, et al. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* 2005;8:443-54.
105. Leek RD, Stratford I, Harris AL. The role of hypoxia-inducible factor-1 in three-dimensional tumor growth, apoptosis, and regulation by the insulin-signaling pathway. *Cancer Res* 2005;65:4147-52.
106. Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS, et al. p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* 1996;13:1709-19.
107. Zhu Z, Sanchez-Sweetman O, Huang X, et al. Anoikis and Metastatic Potential of Cloudman S91 Melanoma Cells. *Cancer Res* 2001;61:1707-16.
108. Hall PA, Coates P, Lemoine NR, Horton MA. Characterization of integrin chains in normal and neoplastic human pancreas. *J Pathol* 1991;165:33-41.
109. Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Oohara T, Beger HG. Altered expression of extracellular matrix molecules and their receptors in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma in comparison with normal pancreas. *Int J Pancreatol* 1995;18:227-34.
110. Stallmach A, von Lampe B, Matthes H, Bornhoft G, Riecken EO. Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation. *Gut* 1992;33:342-6.
111. Giancotti FG, Ruoslahti E. Elevated levels of the [alpha]5[beta]1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* 1990;60:849-59.
112. Schirner M, Herzberg F, Schmidt R, et al. Integrin alpha5beta1: a potent inhibitor of experimental lung metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:427-35.
113. Schreiner C, Fisher M, Hussein S, Juliano RL. Increased tumorigenicity of fibronectin receptor deficient Chinese hamster ovary cell variants. *Cancer Res* 1991;51:1738-40.
114. Stallmach A, von LB, Orzechowski HD, Matthes H, Riecken EO. Increased fibronectin-receptor expression in colon carcinoma-derived HT 29 cells decreases tumorigenicity in nude mice. *Gastroenterology* 1994;106:19-27.
115. Varner JA, Emerson DA, Juliano RL. Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 1995;6:725-40.
116. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 2005;10:1881-96.
117. Fruehauf JP, Meyskens FL, Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 2007;13:789-94.
118. Mori K, Shibamura M, Nose K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2004;64:7464-72.
119. Cho SO, Kim KH, Yoon JH, Kim H. Signaling for integrin alpha5/beta1 expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial AGS cells. *Ann NY Acad Sci* 2006;1090:298-304.
120. Zhang H, Gao P, Fukuda R, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 2007;11:407-20.
121. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008;283:10892-903.
122. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3:187-97.

123. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3:177-85.
124. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002;80:780-7.
125. Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 2007;405:1-9.
126. Kim KR, Moon HE, Kim KW. Hypoxia-induced angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Med* 2002;80:703-14.
127. Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 2001;36:651-60.
128. Moon EJ, Jeong CH, Jeong JW, et al. Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha. *FASEB J* 2004;18:382-4.
129. Yasuda S, Arii S, Mori A, et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J Hepatol* 2004;40:117-23.
130. Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, et al. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol* 1998;51:370-4.
131. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309-14.
132. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008;452:230-3.
133. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006;9:425-34.
134. Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL. Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5992-7.
135. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008;13:472-82.
136. Daskalov K, Pfander D, Weichert W, et al. Distinct temporospatial expression patterns of glycolysis-related proteins in human hepatocellular carcinoma. *Histochem Cell Biol* 2009;132:21-31.
137. Chen G, Gharib TG, Wang H, et al. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13537-42.
138. Hwang TL, Liang Y, Chien KY, Yu JS. Overexpression and elevated serum levels of phosphoglycerate kinase 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 2006;6:2259-72.
139. Lay AJ, Jiang XM, Kisker O, et al. Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature* 2000;408:869-73.
140. Popanda O, Fox G, Thielmann HW. Modulation of DNA polymerases alpha, delta and epsilon by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochim Biophys Acta* 1998;1397:102-17.
141. Lee JD, Yang WI, Park YN, et al. Different glucose uptake and glycolytic mechanisms between hepatocellular carcinoma and intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma with increased (18)F-FDG uptake. *J Nucl Med* 2005;46:1753-9.
142. Zimmerman RL, Fogt F, Burke M, Murakata LA. Assessment of Glut-1 expression in cholangiocarcinoma, benign biliary lesions and hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2002;9:689-92.
143. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, et al. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:223-30.

144. Godoy A, Ulloa V, Rodriguez F, et al. Differential subcellular distribution of glucose transporters GLUT1-6 and GLUT9 in human cancer: ultrastructural localization of GLUT1 and GLUT5 in breast tumor tissues. *J Cell Physiol* 2006;207:614-27.
145. Paudyal B, Paudyal P, Oriuchi N, et al. Clinical implication of glucose transport and metabolism evaluated by 18F-FDG PET in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2008;33:1047-54.
146. Dehne N, Brune B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. *Exp Cell Res* 2009;315:1791-7.
147. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, et al. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2001;21:3436-44.
148. Levene PA. The action of leucocytes on glucose. *J Biol Chem* 1912;11:361-70.
149. SBARRA AJ, KARNOVSKY ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1959;234:1355-62.
150. Reiss M, Roos D. Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocytes and neutrophils. *J Clin Invest* 1978;61:480-8.
151. Borregaard N, Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *J Clin Invest* 1982;70:550-7.
152. Kay NE, Bumol TF, Douglas SD. Effects of 2-deoxy-D-glucose on human monocyte metabolism and function. *J Reticuloendothel Soc* 1980;28:367-79.
153. O'Flaherty JT, Kreutzer DL, Showell HJ, Ward PA. Influence of inhibitors of cellular function on chemotactic factor-induced neutrophil aggregation. *J Immunol* 1977;119:1751-6.
154. Cramer T, Schipani E, Johnson RS, Swoboda B, Pfander D. Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 alpha dependent. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:433-9.
155. Pfander D, Cramer T, Swoboda B. Hypoxia and HIF-1alpha in osteoarthritis. *Int Orthop* 2005;29:6-9.
156. Pfander D, Swoboda B, Cramer T. The role of HIF-1alpha in maintaining cartilage homeostasis and during the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:104.
157. Gentili C, Cancedda R. Cartilage and bone extracellular matrix. *Curr Pharm Des* 2009;15:1334-48.
158. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 1995;80:371-8.
159. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:789-91.
160. Zhu G, Tang Y, Liang X, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in the regulation of plasminogen activator activity in rat knee joint chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2009.
161. Gelse K, Muhle C, Knaup K, et al. Chondrogenic differentiation of growth factor-stimulated precursor cells in cartilage repair tissue is associated with increased HIF-1alpha activity. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:1457-65.
162. Brucker PU, Izzo NJ, Chu CR. Tonic activation of hypoxia-inducible factor 1alpha in avascular articular cartilage and implications for metabolic homeostasis. *Arthritis Rheum* 2005;52:3181-91.
163. Schipani E. Hypoxia and HIF-1alpha in chondrogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:66-73.

Danksagung

Herr Prof. Dr. Bertram Wiedenmann, Direktor der Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum der Charité, danke ich für die vorbehaltlose Unterstützung im Rahmen des Aufbaus meiner eigenständigen Arbeitsgruppe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Randall S. Johnson an der Universität von Kalifornien in San Diego, USA. In seiner Arbeitsgruppe konnte ich mir während meines fast dreijährigen Aufenthaltes ein umfangreiches Spektrum genetischer, molekular- und zellbiologischer Methoden aneignen. Ich danke Professor Johnson als brillantem Wissenschaftler und großartigem Mentor für das Vertrauen, welches er in mich als Postdoktorand gesetzt hat und dafür, dass er mir Denk- und Handlungsprinzipien des verantwortungsbewussten Wissenschaftlers nachhaltig näher gebracht hat.

Meinen Dank möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Michael Höcker aussprechen, dessen wertvolle Unterstützung die unmittelbare Weiterführung meiner experimentellen Arbeiten in Deutschland ermöglichte.

Den Mitarbeiterinnen meiner Arbeitsgruppe danke ich für die Entwicklung eines dynamischen Forschungslabors mit Teamgeist und hoher Motivation. Zu besonderem Dank bin ich Frau Dipl.-Biol. Nadine Rohwer verpflichtet, ohne deren immensen persönlichen Einsatz die Etablierung der Arbeitsgruppe in ihrer heutigen Form nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen deren Unterstützung und konstruktive Zusammenarbeit einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen der experimentellen Arbeiten geleistet hat. Nennen möchte ich insbesondere Herrn Dr. Stephan Lobitz, Frau Dr. Katharina Detjen, Frau Martina Welzel, Herrn Prof. Dr. Christoph Loddenkemper, Herrn Prof. Dr. Clemens Schmitt und Herrn Prof. Dr. Christof Dame.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Berliner Krebsgesellschaft und der Charité bin ich verpflichtet für großzügige Unterstützung unserer Forschungsprojekte und Drittmittelfinanzierung von Personal meiner Arbeitsgruppe.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern Gabriele und Hans-Georg sowie meinen Geschwistern Nadja und Henning für bedingungslosen Rückhalt und Unterstützung. Last but not least gebührt großer Dank meiner Frau Larissa für Liebe, Aufmunterung, Motivation und Verständnis. Deus abençoe!