

**Identifizierung und Charakterisierung Hypoxie-abhängig
regulierter Gene in Prostata-Tumorzelllinien und
primären Prostata-Epithelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrike Pflugrad

angefertigt in der Arbeitsgruppe von Dr. Gerhard Siemeister
TRG Oncology, Bayer Schering Pharma AG

Oktober 2009

1. Gutachter

Prof. Dr. Petra Knaus
Institut für Biochemie
Freie Universität Berlin

2. Gutachter

Prof. Dr. Peter Donner
APL Professur
Freie Universität Berlin
Gast-Professur
Universität Lissabon

Disputation

08. März 2010

Danksagung

An dieser Stelle ist es mir ein Bedürfnis, mich bei allen zu bedanken, die mich bei der Erarbeitung und Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Besonderem Dank gilt dabei meinem Betreuer Herrn Dr. Gerhard Siemeister, der mir stets mit seinem hervorragendem wissenschaftlichen als auch persönlichen Rat zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Prof. Petra Knaus und Herrn Prof. Peter Donner für die Begleitung meiner Doktorarbeit und die Erstellung der Gutachten bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls meiner gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Katja Kauffeldt, Henk Zimmermann, Klaus Burmeister und Astrid Wohlfahrt. Die Zusammenarbeit war eine große Bereicherung für meine persönliche und berufliche Entwicklung. Ebenso bedanke ich mich für die hervorragende Unterstützung meiner Arbeit durch Anette Sommer, Bertram Weiss und Karl-Heinz Thierauch. Des Weiteren möchte ich mich bei Melanie Lerch-Wisniewski und Florian Pühler für die anhaltende Bereitschaft zum Korrekturlesen sehr bedanken.

Großem Dank gilt der gesamten Onkologieabteilung deren Mitarbeiter durch ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beitrugen.

Ganz besonders danke ich meiner Mutter für ihre unermüdliche Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke!

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Hypoxie und Tumorerkrankungen	1
1.2. Zelluläre Auswirkungen der Hypoxie.....	3
1.2.1 Der Transkriptionsfaktor HIF	4
1.2.2 Posttranslationale Modifikation des Transkriptionsfaktors HIF-1	6
1.2.3 HIF-1 Zielgene und ihr Bedeutung für die Tumorzellfunktion	9
1.3. Der hypoxische Tumorphänotyp.....	12
1.4. Ziel der Arbeit.....	14
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Material.....	16
2.2. Methoden	18
2.2.1 Zellkultur und hypoxische Kulturbedingungen	18
2.2.2 Zellbiologische Methoden	19
2.2.2.1. Proliferations-Assay	19
2.2.2.2. Annexin V-FITC / Propidiumjodid – Färbung	20
2.2.2.3. Nukleosomen-Quantifizierungs-ELISA	21
2.2.2.4. Propidiumjodid – Färbung	22
2.2.2.5. Immuno-Blot Analyse	24
2.2.3 Genexpressionsanalyse	27
2.2.3.1. RNA-Isolierung, RNA-Qualität, RNA-Konzentration	27
2.2.3.2. Reverse Transkription der mRNA	28
2.2.3.3. Quantitative Real-Time PCR	29
2.2.3.4. Affymetrix GeneChip Analyse	30
2.2.3.5. Ermittlung von Gengruppen mittels vergleichender Genexpressionsanalyse	33
2.2.4 RNA-Interferenz und Transfektion	34

3. ERGEBNISSE	36
3.1. Charakteristika der verwendeten Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen.....	36
3.1.1 Androgenabhängigkeit der Prostata-Tumorzelllinien	37
3.2. Etablierung eines zellulären Modells zur Analyse hypoxischer Einflüsse	39
3.2.1 Expression von HIF-1 α regulierten Zielgenen in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen	40
3.2.2 Protein-Expression von HIF-1 α und seines Zielgens Redd1 in Prostata-Tumorzelllinien	41
3.2.3 HIF-1 α Protein-Expression in Prostata-Primärzellen	44
3.2.4 Proliferation von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen unter Hypoxie	45
3.2.5 Apoptoseverhalten von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen unter Hypoxie	47
3.2.6 Auswirkungen der Hypoxie auf den Zellzyklus von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen	49
3.3. Genexpressionsanalyse von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen unter Hypoxie.....	51
3.3.1 Hauptkomponentenanalyse	52
3.3.2 Vergleich der Genexpressionsänderung in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen nach hypoxischer Kultivierung	55
3.3.2.1. Genexpressionsänderung <i>nur</i> in Prostata-Tumorzelllinien unter Hypoxie (Gengruppe I)	56
3.3.2.2. Genexpressionsänderung <i>nur</i> in Prostata-Primärzellen (Gengruppe II)	59
3.3.3 Änderung der Genexpression von Prostata-Tumorzelllinien unter Hypoxie (Gengruppe III)	62
3.3.4 Änderung der Genexpression von Prostata-Primärzellen unter Hypoxie (Gengruppe IV)	66
3.3.5 Vergleich der Genexpressionsänderung von Androgen-abhängigen, p53-positiven gegen Androgen-unabhängigen, p53-negativen Prostata-Tumorzelllinien unter Hypoxie	71
3.3.5.1. Genexpressionsänderung in den Androgen-abhängigen, p53-positiven Prostata-Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 (Gengruppe V)	71
3.3.5.2. Genexpressionsänderung in den Androgen-unabhängigen, p53-negativen Prostata-Tumorzelllinien DU145 und PC3 (Gengruppe VI)	73
3.4. Validierung und Charakterisierung Hypoxie-regulierter Gene in Prostata-Tumorzelllinien.....	75
3.4.1 Validierung von HIF-1 α Zielgenen mittels quantitativer Real-Time PCR	75
3.4.2 Identifizierung und Validierung des Hypoxie-regulierten Transkriptionsfaktors SOX4	80
3.4.2.1. Verminderung der HIF-1 α Genexpression in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP mittels RNA-Interferenz	81
3.4.2.2. HIF-1 α -abhängige Induktion des Transkriptionsfaktors SOX4 unter Hypoxie	87
3.4.3 Verminderung der SOX4 Genexpression in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP mittels RNA-Interferenz	90

3.4.4	Auswirkungen der SOX4 Genexpressions-Inaktivierung auf die Prostata-Tumorzelllinie LNCaP	93
3.4.4.1.	Änderung der Proliferation unter Hypoxie nach Inhibierung der SOX4 mRNA Expression	93
3.4.4.2.	Beeinflussung der Apoptose unter Hypoxie nach Inhibierung der SOX4 mRNA Expression	94
3.5.	SOX4 Proteinexpression in Prostata-Tumorzelllinien	96
4.	DISKUSSION	99
4.1.	Aktivierung des Hypoxie-Signalweges in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Epithelzellen	100
4.2.	Beeinflussung von Proliferation, Apoptose und Zellzyklus durch Hypoxie in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Epithelzellen	103
4.3.	Hypoxie-abhängige Genexpressionsänderung in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen	105
4.3.1	Kohlenhydrat-Metabolismus und Energiegewinnung unter Hypoxie	107
4.3.2	Beeinflussung von Zellüberleben und Zelltod unter Hypoxie	109
4.4.	Prostata-Tumorzellen und Prostata-Primärzellen zeigen unterschiedliche Genexpressionsänderungen nach hypoxischer Kultivierung	111
4.4.1	Sauerstoff-abhängige und -unabhängige HIF-1 α Stabilisierung	114
4.5.	Einfluss von p53- und Androgen-Status auf eine Genexpressionsänderungen unter Hypoxie	115
4.6.	Validierung von bekannten Hypoxie-Markergenen	119
4.7.	Identifizierung und Charakterisierung des Hypoxie-abhängig induzierten Transkriptionsfaktor SOX4	121
4.7.1	Die zelluläre Funktion des Transkriptionsfaktors SOX4	123
4.7.2	Die Rolle von SOX4 in der Tumorigenese	126
4.7.3	Der Transkriptionsfaktor SOX4 wird HIF-1 α abhängig reguliert	127
4.7.4	Funktionelle Bedeutung einer Hypoxie-abhängigen SOX4 Regulation	129
4.7.5	SOX4 Proteinexpression	131

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	133
6. ABSTRACT	135
7. LITERATURVERZEICHNIS	136
8. ANHANG	145
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	145
8.2. Funktioneller Überblick der beschriebenen Gene.....	147
8.3. Publikationen	159
8.4. Lebenslauf	159
8.5. Ehrenwörtliche Erklärung	159

1. Einleitung

1.1. Hypoxie und Tumorerkrankungen

Tumorerkrankungen stellen neben Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache in den Industrieländern dar. Ursache der Tumorentstehung ist ein unkontrolliertes Wachstum von Zellpopulationen, die sich aufgrund von DNA-Schädigungen dem homöostatischen Gleichgewicht von Wachstum, Differenzierung und Zelltod entziehen. Das Tumorstadium ist Ausdruck einer fehlregulierten Genaktivität, basierend auf vorangegangenen Schädigungen des Erbmateriale, die zum Verlust der Zellteilungskontrolle und somit zu einem unkontrollierten Zellwachstum führt (1). Neben dem Verlust der Zellzykluskontrolle spielen die Aktivierung von Oncogenen sowie die Inhibierung von Tumorsuppressorgenen eine ursächliche Rolle bei der Entstehung von Tumoren (2). In aktuellen Forschungsberichten rückten darüber hinaus Faktoren der Tumorumgebung in den Interessenfokus vor. Zu diesen milieu-abhängigen Faktoren zählt die Unterversorgung des Tumorgewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff (3).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Sauerstoffverteilung auf alle Gewebe eines Organismus mit Hilfe der Blutzirkulation realisiert. Eingeatmete Luft weist einen Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von ungefähr 160 mmHg auf (Meeresspiegel-Niveau) und entspricht dem atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 21%. Die Passage des Sauerstoffs durch die Lunge und die anschließende Diffusion in die Alveolarkapillaren resultiert in einem verringertem pO_2 in den Blutgefäßen von etwa 104 mmHg. Dieser Sauerstoffpartialdruck genügt für die Versorgung aller Organe mit der benötigten Sauerstoffkonzentration. Der Sauerstoffpartialdruck der einzelnen Organgewebe ist unterschiedlich und liegt zwischen 4 – 20 mmHg (Abb. 1.1). Die Sauerstoffversorgung jeder einzelnen Zelle erfolgt letztendlich durch Diffusion des Sauerstoffs aus den

Organkapillaren zu den umliegenden Zellen. Wird die Diffusionsgrenze des Sauerstoffmoleküls von 100-200 μm überschritten, entstehen Bereiche, die mit Sauerstoff und Nährstoffen unterversorgt werden. Die verminderte Sauerstoffversorgung des Gesamtorganismus oder bestimmter Gewebsregionen wird als Hypoxie bezeichnet (4). Physiologisch tritt Hypoxie während der normalen Embryonalentwicklung auf (5). Vorwiegend ist die Ausbildung hypoxischer Gewebsbereiche jedoch Kennzeichen verschiedener pathophysiologischer Zustände und ist auf ein defektes Gefäßsystem in der betreffenden Region zurückzuführen. Dazu zählen zerebrale und kardiovaskuläre Erkrankungen (Artherosklerosis, Apoplexie, Myokardinfarkt), Diabetes, Entzündungsprozesse, Psoriasis, Präeklampsie, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen sowie Tumorerkrankungen.

Solide Tumore, wie zum Beispiel Hirn-, Colon-, Brust- und Prostata-Tumore, weisen, im Vergleich zu ihren Ursprungsgeweben, umfangreiche hypoxische Regionen auf (6). Die Versorgung eines soliden Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen erfolgt bis zu einem Durchmesser von 1 – 2 mm mittels Diffusion. Für das weitere Wachstum eines Tumors ist seine Vaskularisierung (Angiogenese) eine notwendige Voraussetzung. Die in den Tumor einwachsenden Gefäße sind jedoch ungeordnet und weisen strukturelle Veränderungen auf. Die Entstehung hypoxischer Regionen in soliden Tumoren basiert demnach auf dem Ungleichgewicht zwischen schnell proliferierenden Tumorzellen und einer inadäquaten Sauerstoffversorgung aufgrund des unregelmäßig einwachsenden Gefäßsystems in den Tumor (7). Der Grad der Hypoxie in soliden Tumoren variiert innerhalb des Tumors selbst und zwischen verschiedenen Tumorarten. In den meisten Tumoren gehen in Abhängigkeit der Lage der Tumorzellen zum Blutgefäßsystem, gut oxygenierte Regionen in hypoxische Bereiche über, welche wiederum mit anoxischen Gebieten assoziiert sind. Der Sauerstoffpartialdruck liegt in soliden Tumoren zwischen 1 – 10 mmHg und entspricht einem atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 0,1 – 1% (8) (Abb. 1.1).

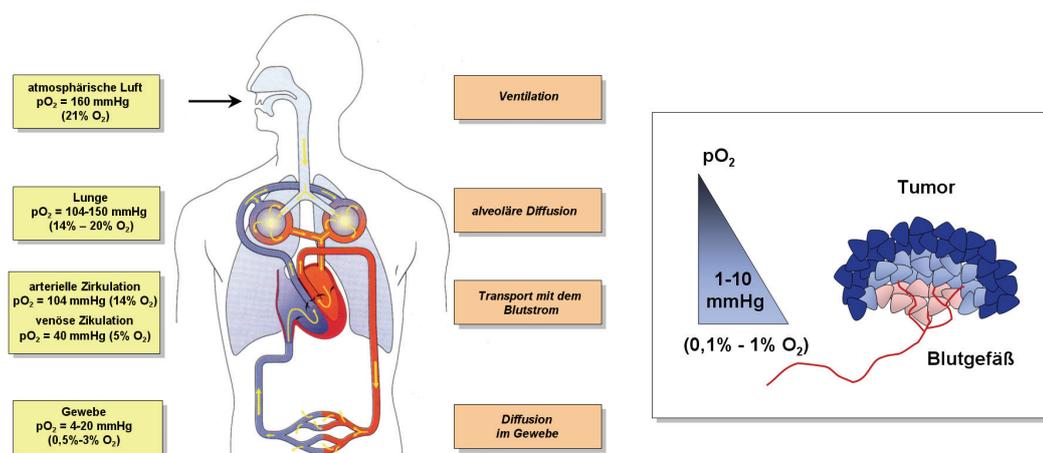


Abb. 1.1 Sauerstoffpartialdruck (pO₂) unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Nach der Ventilation sinkt der pO₂ bis zum Erreichen der Organgewebe deutlich ab. Mit Hilfe des venösen Systems wird der nicht verbrauchte Sauerstoff zu den Lungen zurückgeführt und ausgeatmet. Der Sauerstoffgehalt von soliden Tumoren ist im Vergleich zu den entsprechenden Ursprungsgeweben und in Abhängigkeit der Tumorumvascularisierung deutlich reduziert. Gut oxygenierte Tumorbereiche gehen je nach Lage zum Gefäßsystem in hypoxische und schließlich in anoxische Regionen über. (verändert nach *Brahimi-Horn et al., 2007*)

1.2. Zelluläre Auswirkungen der Hypoxie

Die Reaktionen des menschlichen Organismus auf Sauerstoffmangel hängen sowohl vom Ausmaß als auch von der Dauer der Sauerstoffunterversorgung ab. Das kardiovaskuläre und respiratorische System höherer Eukaryonten ist in der Lage sich an verminderte Sauerstoffverfügbarkeiten anzupassen. Neben den systemischen Kompensationsmechanismen (Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutflusses, arterielle Vasodilation) sind bei Tumorerkrankungen die zellulären Adaptationsmöglichkeiten von zentraler Bedeutung (9).

Hypoxie in Geweben löst die Aktivierung einer zellulären Signalkaskade sowohl in untransformierten Zellen als auch in Tumorzellen aus. Folge ist die Induktion oder Repression der Transkription verschiedener Gene sowie die daraus resultierende Änderung der Proteinexpression. Zentraler Faktor dieser Hypoxie-Signalkaskade ist

der Transkriptionsfaktor „Hypoxia-inducible factor“ (HIF). In einer Vielzahl verschiedener Tumorarten ist HIF überexprimiert und steht in direktem Zusammenhang mit einem schlechteren Erkrankungsverlauf (10, 11).

1.2.1 Der Transkriptionsfaktor HIF

Der Transkriptionsfaktor HIF besteht aus zwei konstitutiv exprimierten Untereinheiten, HIF α und HIF β . Die β -Untereinheit war bereits vor der Identifizierung HIFs bekannt und wurde als „Aryl hydrocarbon receptor translocator“ (ARNT) bezeichnet und fungiert als Dimerisierungspartner für weitere Proteine (Metabolisierung polyaromatischer Hydrocarbone) (12). In Humanzellen konnten sowohl für die α -, als auch für die β -Untereinheit drei Isoformen identifiziert werden. Von funktioneller Bedeutung während der Hypoxie-Signalantwort sind dabei vor allem die Isoformen der α -Untereinheit: HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α , welche untereinander eine 48%ige Proteinübereinstimmung aufweisen (13). Die HIF-1 β Untereinheit ist die bisher einzige bekannte β -Isoform mit einer für die Hypoxie-Antwort relevanten Funktion (14). Beide HIF-Untereinheiten gehören der „Basic Helix-Loop-Helix“ (bHLH) – PER-ARNT-SIM (PAS) Proteinfamilie an. Die bHLH- und PAS-Proteindomänen befinden sich im N-terminalen Bereich des Proteins und vermitteln zum einen die Heterodimer-Bildung als auch die DNA-bindende Funktion. Im Gegensatz zu HIF-1 β besitzen die HIF- α Isoformen weitere funktionelle Proteindomänen. Dazu gehören die „Oxygen-Dependent Degradation Domain“ (ODD) sowie eine N-terminal und C-terminal lokalisierte Transaktivierungsdomäne (N-TAD, C-TAD), welche bei Betrachtung des Gesamtproteins im C-terminalen Bereich angesiedelt sind (Abb. 1.2). Hauptaufgabe der Transaktivierungsdomänen ist die Interaktion mit Cofaktoren, welche ausschlaggebend für die vollständige Aktivität von HIF sind.

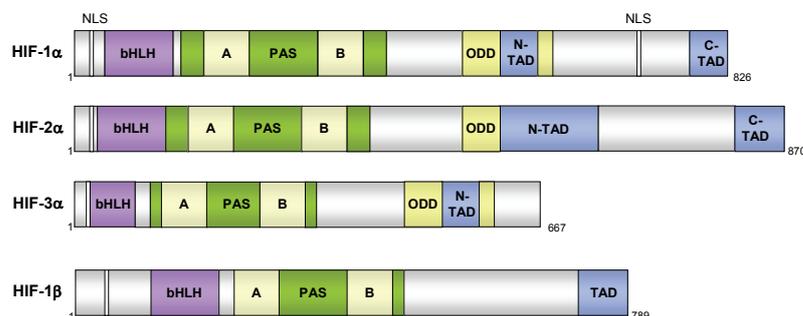


Abb. 1.2 Proteindomänen der α - und β -Untereinheiten des Transkriptionsfaktors HIF. Für beide Untereinheiten sind 3 Isoformen bekannt. Funktionelle Bedeutung in der Hypoxie-Signalkaskade kommen den α -Untereinheiten HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α und der β -Untereinheit HIF-1 β zu. Charakteristisch sind die im N-terminalen Bereich gelegenen „Basic Helix-Loop-Helix“ (bHLH) und PER-ARNT-SIM (PAS) -A/-B Proteindomänen, welche funktionelle Bedeutung bei der Heterodimer-Bildung und DNA-Bindung aufweisen. Im C-terminalen Proteinbereich sind Transkriptionsaktivierungsdomänen (TAD, N-TAD, C-TAD) lokalisiert. Das Kernlokalisierungssignal (NLS) vermittelt unter hypoxischen Bedingungen die Translokation der HIF- α Untereinheiten in den Zellkern. (ODD - Oxygen-Dependent Degradation Domain)

Mit Hilfe der ODD-Domäne wird die HIF- α Proteinstabilität in Abhängigkeit der Gewebssauerstoffkonzentration reguliert (15). In Gegenwart von normalen Sauerstoffkonzentrationen unterliegt HIF- α einer strengen O_2 -abhängigen, posttranslationalen Regulation und wird mit Hilfe des Proteasoms abgebaut.

Die Halbwertszeit von HIF- α beträgt weniger als 5 Minuten, somit ist es unter Normoxie nicht möglich einen funktionellen Transkriptionsfaktorkomplex auszubilden. Wird jedoch eine kritische Sauerstoffkonzentration unterschritten, kommt es im Cytoplasma zur sofortigen Stabilisierung von HIF- α , gefolgt von einer Translokation in den Zellkern, vermittelt durch das Kernlokalisierungssignal der α -Untereinheit. Im Zellkern finden zum einen die Heterodimer-Bildung mit HIF- β sowie die Interaktion mit transkriptionellen Co-Faktoren statt. Im Gegensatz zur O_2 -abhängigen Regulation von HIF- α wird die HIF- β -Untereinheit unabhängig von der Sauerstoffkonzentration konstitutiv im Zellkern exprimiert.

Der unter Hypoxie gebildete heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1 aktiviert oder reprimiert die Transkription von mehr als 70 Zielgenen durch Bindung an die DNA-Sequenz 5'-RCGTG-3' (R = A oder G) (16), welche als „Hypoxia Response Element“ (HRE) bezeichnet wird (17).

1.2.2 Posttranslationale Modifikation des Transkriptionsfaktors HIF-1

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 unterliegt einer Reihe von regulatorischen posttranslationalen Modifikationen. Von besonderem Interesse ist dabei die Modifizierung der HIF-1 α Untereinheit.

Die schnelle Degradation der HIF-1 α Untereinheit während normoxischen Bedingungen wird mit Hilfe von Hydroxylierungs-Prozessen posttranslational vermittelt. Die Hydroxylierung wird von den HIF Prolyl-Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 (Prolyl-hydroxylase domain-containing protein) katalysiert und erfolgt O₂-abhängig an zwei spezifischen Prolin-Resten (Prolin 402, 564) innerhalb der ODD-Domäne von HIF-1 α . Die Hydroxylreste markieren HIF-1 α für das Tumorsuppressorprotein von Hippel-Lindau (pVHL), welches zusammen mit Elongin B, Elongin C, Cullin-2 und Rbx-1 den VCB-Cul2 E3 Ubiquitin Ligase-Komplex bildet und die Polyubiquitinierung von HIF-1 α bewirkt. Die Polyubiquitinierung ermöglicht den schnellen proteosomalen Abbau des HIF-1 α Proteins (Abb. 1.3).

Die drei HIF Prolyl-Hydroxylasen, PHD1, PHD2 und PHD3 hydroxylieren spezifisch Prolinreste innerhalb des konservierten Aminosäure-Motivs LXXLAP (X = jede Aminosäure, P = zu hydroxylierendes Prolin). Dieses Motiv kommt neben der HIF-1 α Untereinheit auch in den Isoformen HIF-2 α und HIF-3 α vor, wird jedoch mit unterschiedlichen Effizienzen hydroxyliert. Somit besitzt jede der drei Prolyl-Hydroxylasen die Fähigkeit HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α zu hydroxylieren und für den

proteosomalen Abbau zu markieren. Die höchste Spezifität zeigt jedoch PHD2 bei der Hydroxylierung von HIF-1 α . Die HIF Prolyl-Hydroxylasen gehören zur Familie der 2-Oxoglutarat/Fe²⁺-abhängigen Dioxygenasen. Ihre Funktion ist neben der strengen Abhängigkeit von molekularem Sauerstoff auch an das Vorhandensein von 2-Oxoglutarat sowie Eisen und Ascorbat gebunden (18, 19).

Ein zweiter Sauerstoff-abhängiger Kontrollpunkt wird mit Hilfe einer weiteren 2-Oxoglutarat/Fe²⁺-abhängigen Oxygenase, „Factor Inhibiting HIF-1“ (FIH-1), vermittelt. Die vollständige transkriptionelle Aktivität von HIF-1 unter Hypoxie ist abhängig von der Interaktion der HIF-1 α Untereinheit mit den Co-Aktivatoren „CREB [cAMP-response element] binding protein“ (CBP) und p300. FIH-1 katalysiert die Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung des Asparagin-Restes Asn⁸⁰³ innerhalb der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (C-TAD) von HIF-1 α und blockiert damit die Interaktion von HIF-1 α mit den Co-Aktivatoren CBP/p300 (Abb. 1.3) (20). In hypoxischen Geweberegionen kann FIH-1 HIF-1 α nicht hydroxylieren und HIF-1 α erlangt durch die Bindung der Co-Faktoren CBP/p300 seine vollständige transkriptionelle Funktion.

Neben der Hydroxylierung von HIF-1 α besitzen eine Reihe von weiteren posttranslationalen Modifikationen funktionelle Bedeutung, deren Auswirkungen jedoch nicht eindeutig geklärt sind. Dazu zählt die Acetylierung, Phosphorylierung und S-Nitrosierung von HIF-1 α als auch die Sumorylierung von HIF-1 α und HIF-1 β (21).

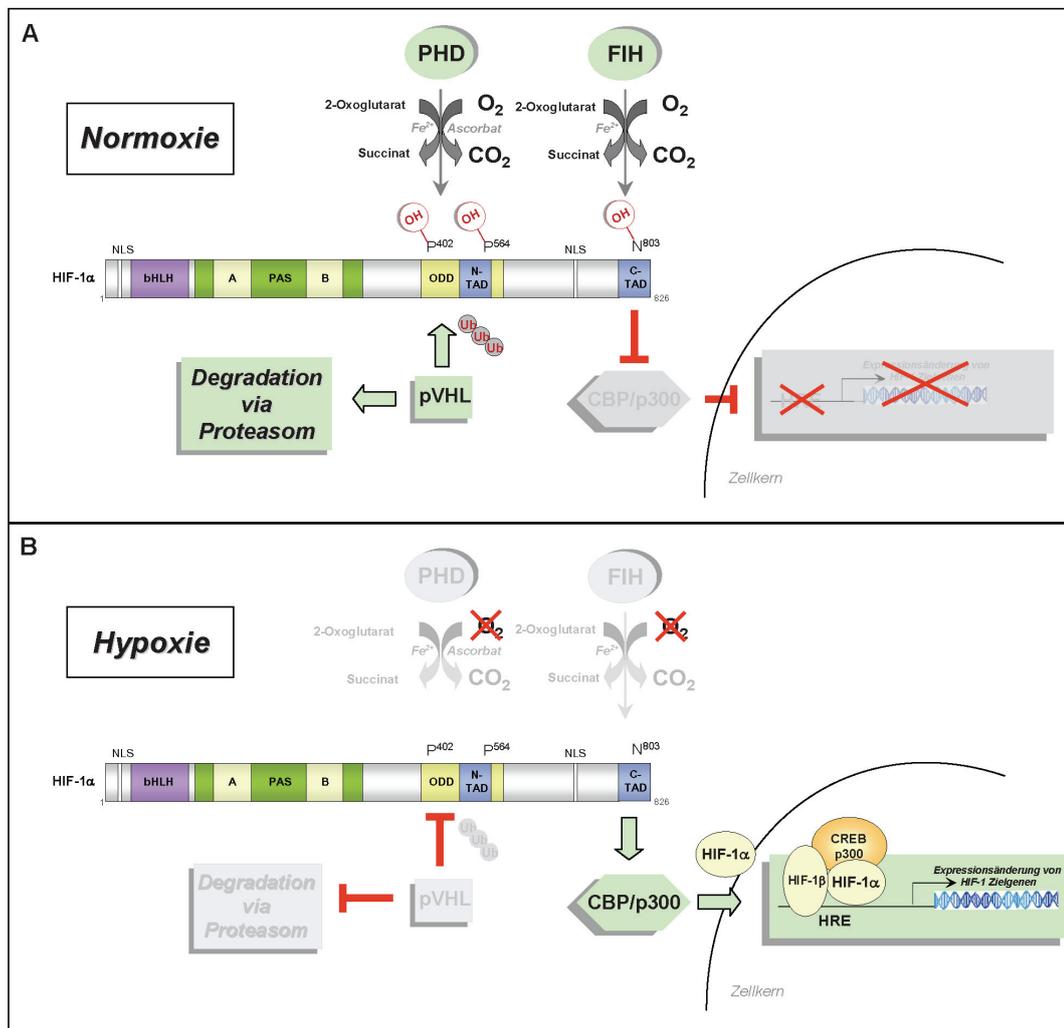


Abb. 1.3 Posttranslationale Regulation von HIF-1 α .

A - Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 α Sauerstoff-abhängig von HIF Prolyl-Hydroxylasen (Prolyl-Hydroxylase Domain-Containing Protein, PHD) innerhalb der „Oxygen-Dependent Degradation Domain“ (ODD) hydroxyliert. Die Hydroxylierung der Prolin-Reste P⁴⁰² und P⁵⁶⁴ stellt die Voraussetzung für die Bindung des Tumorsuppressorprotein von Hippel-Lindau (pVHL) dar, welches Bestandteil einer E3 Ubiquitin Ligase ist, HIF-1 α polyubiquitiniert (Ub) und dem raschen proteosomalen Abbau zuführt. Eine weitere Hydroxylierung wird von der Asparagyl-Hydroxylase „Factor Inhibiting HIF-1“ (FIH) am Asparagin-Rest N⁸⁰³ katalysiert. Folge ist eine verminderte Interaktion von HIF-1 α mit seinen Co-Aktivatoren CBP (CREB [cAMP-response element] binding protein) und p300. Die Enzymaktivität von PHD und FIH ist stark abhängig von Sauerstoff, 2-Oxoglutarat, Aspartat und Eisen.

B - Sinkt die zelluläre Sauerstoffkonzentration kann HIF-1 α nicht mehr ausreichend hydroxyliert werden und wird im Cytoplasma stabilisiert. Nach Translokation von HIF-1 α in den Zellkern dimerisiert HIF-1 α mit seiner β -Untereinheit und bindet als heterodimärer Transkriptionsfaktor HIF-1 am „Hypoxia response element“ (HRE) im Promotorbereich seiner Zielgene. Durch Interaktion von HIF-1 α mit Co-Aktivatoren erhält HIF-1 α seine vollständige transkriptionelle Aktivität.

1.2.3 HIF-1 Zielgene und ihr Bedeutung für die Tumorzellfunktion

Der aktivierte Transkriptionsfaktor HIF-1 beeinflusst ca. 1-2% der Gene des menschlichen Genoms und vermittelt die zelluläre Anpassung an verringerte Sauerstoffkonzentrationen in untransformierten als auch neoplastischen Zellen. Durch Bindung an das „Hypoxia Response Element“ (HRE) aktiviert oder inhibiert HIF-1 unter physiologisch oder pathophysiologisch hypoxischen Bedingungen die Expression seiner Zielgene. Die Genprodukte der regulierten Zielgene beeinflussen unter anderem die zellulären Prozesse Glukose-Metabolismus, pH-Regulation, Angiogenese, Zellüberleben/-sterben, Migration und Metastasierung (4) (Abb. 1.4).

Die Energiegewinnung eukaryotischer Zellen erfolgt über die O₂-abhängige Verstoffwechselung von Glukose zu Wasser und Kohlendioxid (Glykolyse, Citrat-Zyklus, oxidative Phosphorylierung). Unter hypoxischen Bedingungen ist die Umstellung der ATP-Produktion von aerober auf anaerober Atmung die Grundvoraussetzung für die zelluläre Anpassung an sauerstoffreduzierte Milieubedingungen. Demnach entfällt der größte Anteil der HIF-1 regulierten Zielgene auf den Glukose-Metabolismus. HIF-1 induziert zum einen Gene, welche für Glukosetransporter (Glut1, Glut3) codieren und ist somit für einen verstärkten Glukoseeinstrom in die Zelle verantwortlich (22). Des Weiteren induziert HIF-1 unter Hypoxie wichtige Schlüsselenzyme der Glykolyse (Hexokinase, Phosphofruktokinase, Aldolase und Phosphoglycerat-Kinase), so dass die vorhandene Glukose metabolisiert werden kann. Die ebenfalls HIF-1 vermittelte Induktion der Lactatdehydrogenase A (LDHA) ermöglicht daraufhin die Umsetzung des aus der Glykolyse entstandenen Pyruvats zu Lactat, da die Metabolisierung mittels Citrat-Zyklus und anschließender oxidativen Phosphorylierung unter hypoxischen Bedingungen nicht stattfinden kann (23). Die erhöhte Lactatbildung resultiert in einer Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes. Die gleichzeitige HIF-1 abhängige Induktion der Carboanhydrase IX (CA9) und Membran-assoziiierter Transportsysteme (H⁺/Lactat Cotransporter MCT1, MCT4)

gestattet jedoch die Stabilisierung des intrazellulären pH-Wertes und bedingt eine Verschiebung des sauren Milieus in den extrazellulären Bereich (24, 25).

Neben der Anpassung des Stoffwechsels an hypoxische Sauerstoffkonzentrationen sind insbesondere Tumorzellen in der Lage, die Blutgefäßneubildung zu beeinflussen. HIF-1 induziert die Expression der Wachstumsfaktoren „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und Angiopoietin-2 (Ang-2) und erlaubt damit die Neubildung und das Einwachsen von Blutgefäßen (Angiogenese) in unterversorgte Bereiche (26, 27). Die Aktivierung der Angiogenese resultiert in einer gesteigerten Blutgefäßdichte und führt zu einer verbesserten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der hypoxischen Geweberegionen. Jedoch bilden die einwachsenden Gefäße kein geordnetes Blutgefäßsystem und weisen deutliche strukturelle Defizite auf (7). Die ebenfalls HIF-vermittelte Induktion von Erythropoietin führt zu einer vermehrten Erythrozytenreifung, welche in Zusammenhang mit einer Steigerung der Transferrinkonzentration in einem verbesserten Sauerstofftransport in hypoxische Gebiete resultiert (28, 29).

Die Beeinflussung des Glukose-Metabolismus und die Aktivierung der Angiogenese bemächtigen Tumorzellen unter Hypoxie zu überleben und darüber hinaus zu proliferieren, dennoch induziert HIF ebenfalls Gene, die zum Zelltod führen können (16). Die Stabilisierung von HIF beeinflusst die zellulären Sterbemechanismen Apoptose und Nekrose. Unter anderem induziert HIF die Expression der pro-apoptotisch wirkenden Proteine „Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3“ (BNIP3) und „Nip3 like protein X“ (NIX) (30). Jedoch führt die alleinige Überexpression dieser pro-apoptotisch wirkenden Proteine nicht zum programmierten Zelltod. Erst in Zusammenhang mit weiteren lebensfeindlichen Faktoren wie Azidose oder eine anhaltende strenge Hypoxie erfolgt die Einleitung des Zelltods (31, 32). Die Auslösung des apoptotischen Zelltods kann sowohl abhängig als auch unabhängig vom Tumorsuppressorprotein p53 erfolgen. Unter physiologischen Bedingungen scheint das Tumorsuppressorgen p53 nicht zwingend notwendig für die Aufrechterhaltung eines

normalen Zellwachstums zu sein. Nach Schädigung des Erbgutes wird p53 stabilisiert und führt zum Zellzyklusarrest. Daraufhin kann p53 die Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen als auch die Auslösung des programmierten Zelltods vermitteln (33). Das Tumorsuppressorgen p53 ist in mehr als 50% aller Tumoren mutiert und steht in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten genetischen Instabilität und Aggressivität von Tumorerkrankungen (34). Darüber hinaus weisen Tumorzellen mit einem mutierten p53 Gen eine erhöht Resistenz gegen Hypoxie-induzierter Apoptose auf (35). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unter schweren hypoxischen Bedingungen die Stabilisierung von HIF-1 α zur Akkumulation von p53 führt (36). Die Beeinflussung von Zellüberleben und Zelltod unter sauerstoff- und nährstoffarmen Bedingungen hängt von verschiedenen zellspezifischen Faktoren ab und wird kontrovers diskutiert (37).

HIF verändert weiterhin die Expression von Genen und ihren Genprodukten, die zu einem erhöhten Risiko zur Metastasierung des Tumors beitragen. Die Stabilisierung von HIF wird mit dem Funktionsverlust des Proteins E-Cadherin in Verbindung gebracht. E-Cadherin ist eine Komponente des Zellverbindungstyp „Adherens Junction“ und verhindert, durch Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Verbindungen, das Loslösen von einzelnen Zellen (38). Weitere für den Migrationsprozess relevante Zielgene des Transkriptionsfaktors HIF sind Metalloproteasen, wie zum Beispiel die Lysyl Oxydase (LOX). Sie führen zur Auflösung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen (39). Ein für das Metastasierungs-Potential bedeutender Faktor ist ebenfalls die Induktion der Urokinase „Plasminogen Activator Receptor“ (uPAR). uPAR katalysiert die Umsetzung von Plasminogen zu Plasmin, welches den Abbau der extrazellulären Matrix vermittelt und somit zur Invasion von Tumorzellen beiträgt (40).

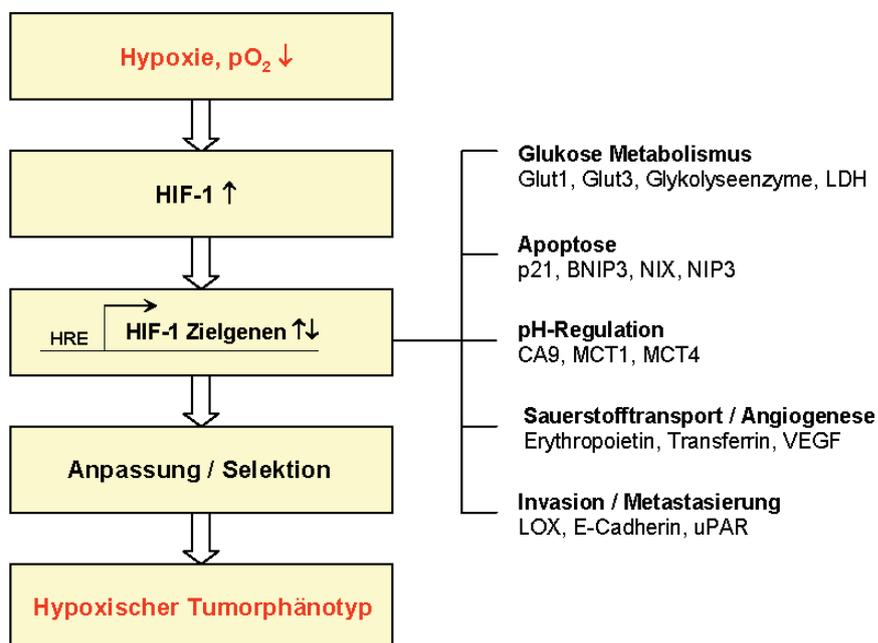


Abb. 1.4 HIF-1 Zielgene und Signaltransduktion unter Hypoxie (pO₂ – Sauerstoffpartialdruck, Glut – glucose transporter, LDH – lactate dehydrogenase, BNIP3 - Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3, NIX - Nip3 like protein X, CA9 – Carboanhydrase IX, MCT – monocarboxylate transporter, VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor, LOX – Lysyl Oxidase, uPAR – Urokinase Plasminogen Activator Receptor)

1.3. Der hypoxische Tumorphänotyp

Charakteristisch für Tumorzellen ist ihr unkontrolliertes Wachstum. Damit verbunden sind die Entfernung der Tumorzellen vom versorgenden Blutgefäßsystem und die daraus resultierende Überschreitung der Sauerstoff-Diffusionsgrenze. Das langsam in den Tumor einwachsende Gefäßsystem ist unstrukturiert und nicht in der Lage, einen Tumor adäquat mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Zwischen 50 und 60% der soliden Tumore weisen hypoxische und anoxische Geweberegionen auf, welche heterogen über den Tumor verteilt sind. Hypoxie in Tumoren resultiert in vielfältigen Genexpressionsänderungen, welche es den Tumorzellen ermöglichen, unter

sauerstoffarmen Milieubedingungen zu überleben und zu proliferieren. Der erhöhte Hypoxie-bedingte Selektionsdruck fördert den malignen Verlauf einer Tumorerkrankung und ist ursächlich für eine erhöhte Aggressivität von Tumoren. Die klonale Selektion unter Hypoxie resultiert in der Entstehung von Tumoren mit einer erhöhten Apoptose-Resistenz, verringertem Differenzierungsgrad, chaotischer Angiogenese sowie einem verstärkten Metastasierungspotential (11).

Die Ausbildung von hypoxischen Bereichen in Tumoren ist zum einen für den Verlauf, aber auch für den Behandlungserfolg einer Tumorerkrankung von entscheidender Bedeutung (16). Die Hypoxie-bedingte extrazelluläre Azidose steht in direktem Zusammenhang mit der Wirkungsweise von Chemotherapeutika (4). Der saure extrazelluläre pH-Wert behindert die Chemotherapeutika-Wirkung, da das Wirkungsoptimum dieser Verbindungen in den meisten Fällen an einen neutralen pH-Wert angepasst ist. Problematisch ist ebenfalls die chaotische Gefäßversorgung des Tumors, da der Wirkstoff seinen Zielort nicht erreicht. Neben der verminderten Chemotherapeutika-Wirkung ist auch die Wirkung einer Radiotherapie in hypoxischen Tumoren beeinträchtigt. Der Grund dafür liegt in der geringen Verfügbarkeit von freien Sauerstoffradikalen, welche zur Schädigung der DNA und zum Tumorzellsterben führen würden (41).

Zusammenfassend ist der reduzierte Oxygenierungsstatus eines Tumors unabhängig von Tumorklassifizierungsmerkmalen, wie histologischer Differenzierungsgrad oder Lymphknotenstatus, mit einem schlechteren Krankheitsverlauf sowie einer deutlich höheren Resistenz gegen konventionelle Therapien (Chemo-/Radiotherapie) verbunden.

1.4. Ziel der Arbeit

Das Auftreten von Hypoxie ist ein kritischer Faktor für den Verlauf und den Behandlungserfolg von Tumorerkrankungen. Tumorzellen unter Hypoxie unterliegen einem klonalen Selektionsdruck und weisen vielfältige Veränderung in ihrer Genexpression auf, die in der Ausbildung eines aggressiveren Tumorphänotyps resultieren. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit Hypoxie-regulierte zelluläre Prozesse besser verstehen zu lernen und Möglichkeiten für neue therapeutische Ansätze in der Behandlung von Tumorerkrankungen zu entwickeln sowie bestehende auszubauen.

Die Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, die Genexpression von Prostata-Tumorzelllinien und primären Prostata-Epithelzellen unter Hypoxie (1% O₂) zu analysieren und die zellulären Auswirkungen von ausgewählten Hypoxie-regulierten Genen zu charakterisieren. Am Anfang dieser Arbeit steht zunächst die Etablierung und Charakterisierung der hypoxischen Kulturbedingungen, welche die optimalen verminderten Sauerstoffbedingungen für die sich anschließenden Genexpressionsstudien liefern. Die Erstellung von hypoxischen Genexpressionsprofilen erfolgt in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 sowie in primären Prostata-Epithelzellen von 4 verschiedenen humanen Spendern, mit Hilfe der Affymetrix Microarray Technologie. Ziel der vergleichenden Expressionsanalyse zwischen Tumorzellen und Primärzellen ist die Identifizierung von Genen, die zur Ausbildung eines aggressiveren hypoxischen Tumorphänotyps beitragen. Weiterhin wird eine mögliche Abhängigkeit der Hypoxie-vermittelten Genexpressionsänderung von zellspezifischen Eigenschaften (p53-Status, Androgenabhängigkeit) durch Vergleich der Tumorzelllinien untereinander betrachtet. Ferner werden die Hypoxie-regulierten Gene entsprechend der Funktion ihrer Genprodukte unterteilt. Dies ermöglicht die Betrachtung von unterschiedlich oder gemeinsam regulierten Signaltransduktionswegen in Prostata-Tumorzellen und Prostata-Primärzellen unter hypoxischen Bedingungen. An die Bestimmung von

Hypoxie-vermittelten Genexpressionsänderungen in Prostata-Tumorzellen und Prostata-Primärzellen, schließt sich die Validierung von ausgewählten Genen auf mRNA- und Proteinebene an. Darüber hinaus erfolgt die Untersuchung der funktionellen Bedeutung dieser differentiell zwischen Prostata-Tumorzellen und Prostata-Primärzellen regulierten Gene, hinsichtlich Proliferation- und Apoptoseverhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Tab. 2.1 Materialien und Bezugsquellen

Methoden	Material	Bezugsquelle
Zellkultur	DMEM/HAM's F12	Biochrom AG
	RPMI 1640	Biochrom AG
	PrEBM	Lonza
	EGM-1 MV	Lonza
	Fetal Bovine Serum (FCS)	Biochrom AG
	Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG
	Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%)	Biochrom AG
	N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG
	Zellkulturflaschen, -Schalen, Stripetten	Corning Life Science
	CO ₂ Zellinkubator	Thermo Scientific
	CASY® Model TT	Innovatis AG
	Methyltrienolon (R1881)	Bayer Schering Pharma AG
	MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza
Hypoxie	CO ₂ /N ₂ Zellinkubator CB-150	Binder GmbH
Proliferation	0,1% Kristallviolett-Lösung	Sigma-Aldrich
	11% Glutaraldehyd-Lösung	Merck KGaA
	10% Essigsäure-Lösung	Merck KGaA
	Sunrise Plate Reader	Tecan group Ltd.
Apoptose	Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences
	FACSCalibur™	BD Biosciences
	Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche Diagnostics GmbH
Zellzyklus	Propidiumjodid 50 µg/ml	Sigma-Aldrich
	RNase A 77 units/mg solid	Sigma-Aldrich
Protein-Extraktion	M-PER Extraction Buffer	PIERCE
	Complete mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH
	Microcon Centrifugal Filter Devices (<10kDa)	Millipore
	Bradford Protein Assay	Bio-Rad
Western-Blot	NuPAGE Bis-Tris Gele (4-12%, 10%)	Invitrogen Life Technologies
	NuPAGE SDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen Life Technologies
	MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen Life Technologies
	MagicMark™XP Standard	Invitrogen Life Technologies

Fortsetzung Seite 22

Tab. 2.1 Materialien und Bezugsquellen (Fortsetzung von Seite 19)

Methode	Material	Bezugsquelle
Western-Blot	NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen Life Technologies
	PVDF-/Nitrocellulose Membran	Invitrogen Life Technologies
	Rainbow Molecular Weight Marker	GE Healthcare
	Xcell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen Life Technologies
	Xcell II Blot Module	
	Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare
RNA-Isolierung, RNA-Qualität, RNA-Konzentration	RNeasy® Mini Kit	Qiagen
	RNase-Free DNase-Set	Qiagen
	RNA 6000 Nano Assay	Agilent Technologies
	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
	NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH
Reverse Transkription	SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen Life Technologies
Quantitative Real-Time PCR	TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems
	SOX4 (Hs00268388_s1)	
	VEGF (Hs00173626_m1)	
	Redd1 (Hs00430304_g1)	
	HIF-1 α (Hs00153153_m1)	
	CA9 (Hs00154208_ml)	
	18S rRNA Pre-Developed TaqMan® Assay	Applied Biosystems
	TaqMan® Universal Master Mix	Applied Biosystems
	7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
	Human universal RNA	BioChain Institute, Inc.
Affymetrix GeneChip Hybridisierung	GeneChip®	Affymetrix Inc.
	Hybridization, Wash, and Stain Kit	
	Human Genome U133plus2 Chip	Affymetrix Inc.
	GeneChip array Scanner 3000	Affymetrix Inc.
	Genedata Expressionist Pro Refinder 4.5	Genedata
	Genedata Expressionist Pro Analyst 4.5	Genedata
RNA Interferenz	On-Targetplus SMARTpool® HIF-1 α	Dharmacon
	On-Targetplus SMARTpool® SOX4	Dharmacon
	On-Targetplus siRNA HIF-1 α	Dharmacon
	On-Targetplus siRNA SOX4	Dharmacon
	Dharmafect® 2 Transfection Reagent	Dharmacon
	OPTI-MEM	Gibco
	SiGlo green Transfection Indicator	Dharmacon
	siRNA non-targeting control	Dharmacon

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkultur und hypoxische Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Prostata-Tumorzelllinien, Prostata-Primärzellen und Endothelzellen erfolgte in Carbonat/CO₂ gepufferten Kulturmedien gemäß Tabelle 2.2 bei 37°C, Kohlendioxidbegasung (5% CO₂) und atmosphärischem Sauerstoffgehalt (Normoxie, 21% O₂). Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in neue Kulturgefäße übertragen. Die Zellzahl wurde unter Verwendung des *CASY[®] TT* ermittelt, welches nach einem erweiterten Widerstandsmessverfahren arbeitet. Durch Ansaugen einer verdünnten Zelllösung mittels einer Messpore, an der eine definierte Spannung anliegt, werden zellvolumenabhängige Widerstandserhöhungen ermittelt. Diese Methode erlaubt die Bestimmung der Zellzahl sowie eine routinemäßige Betrachtung der Zellvitalität, da zwischen Membran-intakten und Membran-geschädigten Zellen unterschieden wird. Die Prostata-Primärzellen PrEC wurden streng nach Herstellerangaben kultiviert. Die Überprüfung der verwendeten Zellen auf eine mögliche Mykoplasmenkontamination erfolgte in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des *MycoAlert Mycoplasma Detection Kit* (Lonza).

Die hypoxischen Kulturbedingungen wurden mittels eines CO₂/N₂ Zellinkubators generiert, welcher die hypoxische Atmosphäre 1% O₂, 5% CO₂ und 94% N₂ bildete. Für jedes Hypoxie-Experiment wurden die Zellen in geeignete Kulturgefäße ausgesät und 24h unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für das entsprechende Zeitintervall hypoxischen Bedingungen ausgesetzt.

Tabelle 2.2 Zelllinien und verwendete Kulturmedien

Zelllinie	Zellart	Medienzusammensetzung
DU145	Prostatakarzinom	DMEM/HAM's F12; 10% FCS; 2 mM L-Glutamin
PC3	Prostatakarzinom	DMEM/HAM's F12; 10% FCS; 2 mM L-Glutamin
LNCaP	Prostatakarzinom	RPMI 1640 (ohne Phenolrot); 10% FCS; 2 mM L-Glutamin; 0,1 nM Methyltrienolon (R1881; Androgen)
22RV1	Prostatakarzinom	RPMI 1640 (ohne Phenolrot); 10% FCS; 2 mM L-Glutamin
Prostate Epithelial Cells (PrEC)	Humane Prostata Epithelzellen	PrEBM; Zusätze laut Herstellerangaben
Microvascular Endothelial Cells (MVEC)	Humane Endothelzellen	EGM-1 MV, Zusätze laut Herstellerangaben

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Proliferations-Assay

Die Proliferation von Prostata-Tumorzellen und primären Prostata-Epithelzellen wurde mit Hilfe einer Kristallviolett-Färbung untersucht, welche die schnelle und spezifische Färbung der Zellkerne ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen absorbiertem Farbstoff und Zellzahl eine lineare Beziehung besteht (42).

Die Aussaat der zu untersuchenden Zellen erfolgte als Mehrfachwerte in 96-Well Platten mit einer Zelldichte von 5.000 Zellen pro Well. Nach entsprechender Inkubation wurden die Zellen durch Zugabe einer 11%igen Glutaraldehydlösung unter ständigem Schütteln (500 U/min) fixiert. Daraufhin wurden die Zellen mehrmals mit entionisiertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Im Anschluss erfolgte die Färbung der Zellkerne mit einer wässrigen 0,1%igen Kristallviolett-Lösung. Nach Entfernung der überschüssigen Färbelösung, mehrmaligem Waschen und Lufttrocknen wurden die

Zellkerne durch Zugabe einer 10%igen Essigsäurelösung entfärbt. Die Absorption der Färbelösung wurde photometrisch bei 590 nm gemessen.

Die Bestimmung der Absorption für jede Probe ermöglichte die Berechnung der Generationszeit einer Zelllinie nach entsprechender Behandlung. Die Generationszeit gibt die Zeit an, welche für die Verdopplung einer Zellkultur benötigt wird und wird häufig auch als Verdopplungszeit bezeichnet. Die Generationszeit wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$t_g = \frac{t}{n}$$

- t_g = Generationszeit
 t = Dauer der Zellkultur zum Ablesezeitpunkt
 n = Generationszahl
($[\log N - \log N_0] / 0,3$; N = Absorption)

2.2.2.2. Annexin V-FITC / Propidiumjodid – Färbung

Die zelluläre Apoptose wird durch eine Reihe von morphologischen Veränderungen, wie zum Beispiel die Umverteilung der asymmetrisch verteilten Membran-Phospholipide charakterisiert. Die Phospholipide der Lipiddoppelmembran sind asymmetrisch zwischen innerer und äußerer Membran verteilt. Phosphatidylcholin und Sphingomyelin sind auf der äußeren Membran exponiert, während Phosphatidylserin an der Oberfläche der inneren Membran zu finden ist. Diese Asymmetrie wird bereits in einem frühen Stadium der Apoptose gestört und Phosphatidylserin wird von der inneren auf die äußere Membran übertragen (43). Das antikoagulativ wirkende Protein Annexin V bindet spezifisch und mit hoher Affinität Phosphatidylserin. Fluorochromgekoppeltes Annexin V dient in Verbindung mit einer durchflusszytometrischen Detektion als Marker zum Nachweis von früh-apoptotischen Zellen, welche zu diesem

Zeitpunkt noch eine intakte Membranintegrität aufweisen. Die Kombination der Annexin V – Färbung mit einer Vitalitätsfärbung mittels Propidiumjodid (PI) ermöglicht die Unterscheidung zwischen intakten, nicht apoptotischen Zellen (Annexin V und PI negativ), früh-apoptotischen (Annexin V positiv, PI negativ), spät-apoptotischen (Annexin V und PI positiv) als auch nekrotischen Zellen (Annexin V negativ und PI positiv).

Zur Detektion von Apoptose und Nekrose wurde FITC-markiertes Annexin V und Propidiumjodid verwendet (*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I*, BD Biosciences). Die Aussaat der zu untersuchenden Zellen erfolgte in 6-Well Platten mit 50.000 Zellen pro Well. Nach Behandlung wurden sowohl der Medienüberstand als auch die adhärenen Zellen in Zentrifugenröhrchen übertragen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen einer Probe wurden in Kalziumhaltigen Puffer aufgenommen und nach Herstellerangaben mit Annexin V – FITC und Propidiumjodid gefärbt. Die Messung der Fluoreszenzen erfolgt mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur™. Die Anregung der gefärbten Zellen bei 488 nm ermöglichte die Detektion der grün-fluoreszierende Annexin V – FITC Färbung bei 530 nm und die rot-fluoreszierende PI Färbung bei 600 nm. Unter Verwendung der Software Cell Quest Pro 5.2 wurde der prozentuale Anteil von nicht-, früh- und spät-apoptotischen, als auch nekrotischen Zellen einer jeden Probe detektiert.

2.2.2.3. Nukleosomen-Quantifizierungs-ELISA

Neben morphologischen Veränderungen während der Apoptose, wie zum Beispiel der Verlust der asymmetrischen Verteilung der Membran-Phospholipide, kommt es ebenfalls zu biochemischen Veränderungen. Dazu zählt die Fragmentierung der genomischen DNA, die ein irreversibles Ereignis darstellt und zum Zelltod führt. Dabei spalten apoptosespezifische Endonukleasen die DNA zwischen den Nukleosomen

(Linker-DNA). Es entstehen Mono- und Oligonukleosom-Fragmente (44). Die DNA-Fragmentierung wurde mit Hilfe des *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche Diagnostics) analysiert. Als ELISA wird der „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ bezeichnet. Grundlage dieser Methode ist die Verwendung eines Enzyms als Marker, infolge dessen die Antigenkonzentration anhand des Substratumsatzes dieses Enzyms bestimmt werden kann. Für die Quantifizierung der Nukleosomen-Fragmente wurden Zellen als Mehrfachwerte in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nach entsprechender Behandlung und Inkubation wurde der Überstand der Zellkulturen entfernt. Dies ermöglichte die spezifische Detektion der Apoptose unabhängig vom nekrotischen Zelltod, da nekrotische Zellen DNA-Fragmente in den Zellüberstand abgeben, während bei apoptotischen Zellen die Fragmente im Cytoplasma verbleiben. Nach Entfernung des Zellüberstandes erfolgte die Lyse der Zellen. Der Lysispuffer enthält zwei verschiedene monoklonale Antikörper für die spezifische Detektion von Histon-Proteinen (Biotin-konjugiert) und DNA-Molekülen (Peroxidase-konjugiert). Durch Überführung des Antikörper-Zelllysates auf eine Streptavidin-konjugierte Mikrotiterplatte kommt es zur Bildung von Immunkomplexen aus Nukleosomen, DNA-Antikörper und Histon-Antikörper, welche mit Hilfe der Biotin-Streptavidin-Bindung an die Mikrotiterplatte gekoppelt sind. Danach erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase-Substrat. Die Absorption des entstandenen Farbumschlages wurde photometrisch bei 405 nm gemessen und diente als Maß für die Menge an gebundenen Nukleosomen und somit als quantitativer Nachweis des apoptotischen Zelltods.

2.2.2.4. Propidiumjodid – Färbung

Eine häufig verwendete Methode zur Untersuchung der Zellzyklus-Phasen ist die Messung des zellulären DNA-Gehaltes. Der DNA-Gehalt einer Zelle gibt Aufschluss

darüber ob sich die Zelle in der G_0/G_1 -, S - oder G_2/M - Phase des Zellzykluses befindet. Dazu wurden 3-fach Werte jeder Zelllinie für jeden Zeitpunkt in 6-Well Zellkulturplatten mit 50.000 Zellen/Well ausgesät. Nach Kultivierung der Zellen unter Normoxie oder Hypoxie für die entsprechenden Zeitintervalle wurde der Zellüberstand, als auch die trypsinisierten Zellen in eine 5 mM EDTA/PBS – Lösung aufgenommen. Die EDTA-Zugabe verhinderte ein Verklumpen der Zellen und ermöglichte eine verbesserte durchflusszytometrische Analyse. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurden die Zellen durch Zugabe von 70%igem Ethanol für mindestens 24h bei -20°C fixiert. Die Inkubation ermöglichte die Permeabilisierung der Zellmembran. Nach Entfernung des Alkohols und Waschen der fixierten Zellen mit PBS erfolgte die Färbung der Zellen durch Zugabe einer PI- (100 $\mu\text{g/ml}$) / RNase A - Lösung (5%) in PBS. Die Zugabe von RNase A verdaut doppelsträngige RNA und verhindert ein Verfälschen der Ergebnisse, da PI nicht spezifisch an DNA-Moleküle bindet. Die Fluoreszenzintensitäten jeder Probe wurde im Durchflusszytometer FACSCalibur™ gemessen. Die Emission von Propidiumjodid konnte nach Anregung mit einem 488 nm Argon-Laser bei 600 nm gemessen werden.

Die gemessene Fluoreszenzintensität jeder untersuchten Zellen einer Probe steht dabei in stöchiometrischer Beziehung zum DNA-Gehalt und wird als Grundlage zu Unterscheidung der Zellzyklusphasen genutzt (45). Unter Verwendung der Software Cell Quest Pro 5.2 wurden die Zellen einer Probe nach ihrem DNA-Gehalt in einem Histogramm (X-Achse = Fluoreszenzintensität/DNA-Gehalt, Y-Achse = Zellanzahl) dargestellt (Abbildung 2.1). Der größte Zellanteil einer proliferierenden Zellpopulation befindet sich in der G_0/G_1 -Phase und besitzt einen diploiden Chromosomensatz. Demzufolge zeigt die Mehrheit der Zellen eine ähnliche Fluoreszenzintensität mit einem normalen, diploiden DNA-Gehalt. In der S-Phase schwankt der DNA-Gehalt zwischen einem diploiden und kurz vor Eintritt in die M-Phase einem tetraploiden Chromosomensatz und ebenso die Fluoreszenzintensität der Zellen. In der G_2 - und M-Phase stehen die Zellen kurz vor oder in mitten der Zellteilung und weisen einen doppelten, tetraploiden Chromosomensatz auf. Die Fluoreszenzintensität ist somit auf

Grund des gebundenen Propidiumjodids doppelt so stark. Im Histogramm erscheinen zwei Peaks, da sich die meisten Zellen einer Zellpopulation entweder in der G_0/G_1 -Phase befinden oder in der G_2 - oder M-Phase. Die G_2 - und M-Phase wird als gemeinsamer Peak dargestellt, da diese beiden Phasen durchflusszytometrisch nicht unterschieden werden können. Der zwischen den beiden Peaks gelegene Bereich des Histogramms spiegelt die S-Phase dar. Ein geringer prozentualer Anteil einer Zellpopulation entfällt auf Zellen die zum einen weniger DNA als einem diploiden Chromosomensatz besitzen (sub G_0/G_1 , Apoptose) oder Zellen die mehr als einen tetraploiden Chromosomensatz aufweisen (polyploide Zellen).

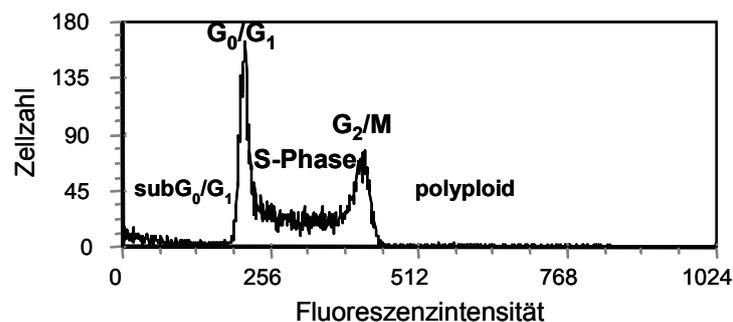


Abb. 2.1 Schematisch Darstellung eines Histogramms nach Propidiumjodid-Färbung zur Analyse der Zellzyklusphasen. (Erläuterungen siehe Text)

2.2.2.5. Immuno-Blot Analyse

Mit Hilfe des Immuno-Blot (Western-Blot) Verfahrens wurden die Proteine HIF-1 α , SOX4, Redd1 und β -Actin spezifisch in zellulären Proteinextrakten identifiziert und quantifiziert. Für den Proteinnachweis wurden die Zellen nach entsprechender Behandlung zunächst mit *M-PER Extraction* Puffer (PIERCE) unter Zugabe eines Protease-Inhibitor Cocktails lysiert. Nach Aufkonzentrierung der Proteinlysate (*Microcon Centrifugal Filter Devices*; Millipore) erfolgte die Quantifizierung des

Gesamtproteingehaltes unter Verwendung des Bradford-Tests. Der Bradford-Proteinnachweis basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Proteinen nach Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm und ist ein Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung.

Nach Herstellung der Proteinlysate und Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 20 µg des Proteingemisches der zu untersuchenden Probe mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyarylamid-Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Die Verwendung des anionischen Detergens SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) hat die Unterbrechung von hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb einer Proteinstruktur zur Folge und die damit verbundene Zerstörung von höheren Proteinstrukturen wie Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur. Die Proteine gehen in eine linearisierte Form über. Zudem besitzt SDS eine starke negative Eigenladung und überdeckt somit die Ladung der Proteine. Die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches erfolgte somit nach dem Molekulargewicht. Vorteil der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese ist die Fokussierung des aufgetragenen Proteingemisches durch Passage eines Sammelgels, dieses führt zur Erhöhung der Proteinbandenschärfe und zu einer verbesserten Auftrennung. Erst nach Durchlaufen des Sammelgels wurden die Proteine im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

Zum Nachweis der Proteine HIF-1 α , SOX4, Redd1 und β -Actin wurden 4-12%ige SDS-Polyacrylamid-Gradientengele verwendet. Nachdem die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt wurden (180V, 110-125mA, 45-60min), folgte der Proteintransfer auf eine geeignete Membran. Im Fall von HIF-1 α wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Proteintransfer für den Nachweis von SOX4 und Redd1 erfolgte auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) - Membran. Der elektrophoretische Transfer wurde nach dem „Wet-Blot“ - Verfahren bei 130 V (110-170mA) für 60min realisiert. Im Anschluss wurden unspezifische Proteinbindungen mit

5% Milchpulver abgesättigt, wodurch die Sensitivität des spezifischen Protein-Nachweises erhöht werden konnte.

Der Nachweis des gesuchten Antigens erfolgte in zwei Schritten, indem zunächst die Membran mit dem antigenspezifischen unmarkierten Primärantikörper inkubiert wurde gefolgt von der Inkubation mit dem entsprechenden spezienspezifischen Sekundärantikörper. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper wurden in TBS-Tween (0,1% Tween, 3% Milchpulver) gelöst und können Tabelle 2.3 entnommen werden. Zwischen den beschriebenen Inkubationsschritten wurde die Membran jeweils mit TBS-Tween gewaschen um die überschüssigen Reagenzien zu entfernen. In den durchgeführten Western-Blots diente der Nachweis von β -Actin als Ladekontrolle für eine gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge.

Die Visualisierung der Proteine wurde ermöglicht durch die Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper und basiert auf der Oxidation des zyklischen Dialcylhydrazid Luminol, welches als Substrat der Meerrettichperoxidase in ein Chemolumineszenzsignal umgesetzt wurde. Dieses Signal konnte im Anschluss mit Hilfe von chemolumineszenz-sensitiven Filmen detektiert werden. Die Quantifizierung der entwickelten Immuno-Blotfilmen erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ.

Tabelle 2.3 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Immuno-Blot Analyse

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper
HIF1α	mouse anti-HIF-1 α (BD Biosciences, #610959) 1:100	anti-mouse IgG, HRP-gekoppelt 1:5.000
Redd1	rabbit anti-Redd1 (Proteintech Group, Inc., #10638-1-AP) 1:200	anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelt 1:5.000
SOX4	rabbit anti-SOX4 (abcam, #ab41891) 1:100	anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelt 1:5.000
β-Actin	rabbit anti- β -Actin (Sigma Aldrich, #A2066) 1:10.000	anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelt 1:5.000

2.2.3 Genexpressionsanalyse

2.2.3.1. RNA-Isolierung, RNA-Qualität, RNA-Konzentration

Das Prinzip der RNA-Isolation basiert auf den selektiven Eigenschaften einer Siliziumdioxidmembran. Zunächst werden die Zellen durch Suspension in Guanidiniumisothiocyanat-Puffer (Lysispuffer) vollständig denaturiert und homogenisiert. Die gesamte Suspension wird anschließend in eine Reaktionssäule, welche die Siliziumdioxidmembran enthält, überführt. Die Gesamt-RNA bindet an der Membran durch Zentrifugation der Suspension. Sämtliche weiteren Zellbestandteile werden durch Waschschriffe abzentrifugiert. Die Eluation der RNA aus der Membran erfolgt mit RNase-freiem Wasser. Nach entsprechender Behandlung der Zellen erfolgte die RNA-Isolierung nach dem beschriebenen Prinzip, mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kits* (Qiagen), entsprechend dem Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen mittels Zentrifugation (*RNeasy Mini Handbuch April 2006*). Um Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde eine zusätzliche DNase-Behandlung durchgeführt (*RNase-Free DNase-Set*, Qiagen).

Die qualitative Überprüfung der RNA erfolgte mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers. Unter Verwendung der Kapillarelektrophorese wurde die isolierte RNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Gesamt-RNA einer Zelle besteht zu 98% aus ribosomaler RNA (rRNA), welche sich elektrophoretisch in ihre zwei Untereinheiten 18S und 28S rRNA aufgliedert und auf Grund der unterschiedlichen Größe als zwei deutlich von einander getrennten RNA-Banden erscheint. Kommt es zur Degradation der RNA lassen sich eine Vielzahl von RNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe nach elektrophoretischer Trennung nachweisen. Die Auftrennung der RNA erfolgte streng nach Herstellerangaben mit Hilfe des *RNA 6000 Nano Assays* (Agilent, Handbuch November 2003).

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop ND-100 bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.3.2. Reverse Transkription der mRNA

Voraussetzung für die Amplifizierung von definierten RNA-Bereichen mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) ist die Synthese von cDNA (complementary DNA) aus isolierter Gesamt-RNA, da RNA selbst nicht als Matrize für eine DNA-Polymerase dienen kann. Zu dem ist cDNA nicht gefährdet durch RNasen abgebaut zu werden. Dieser Prozess wird mit Hilfe einer so genannten viralen Reversen Transkriptase (Moloney Murine Leukaemia Virus, M-MuLV) durchgeführt, die an Hand einzelsträngiger RNA eine einzelsträngige DNA synthetisiert (RNA-abhängige DNA-Polymerase). Kernbestandteil der Reversen Transkription ist weiterhin der Einsatz von bestimmten Primerarten, die den Startpunkt für die Reverse Transkriptase darstellen. Je nach späterer Verwendung der synthetisierten cDNA werden Oligo-dT-Primer, Random-Hexamer-Primer oder spezifische Primer genutzt.

Die cDNA-Synthese aus isolierter RNA von Zellen, die unterschiedliche Zeitintervalle unter Normoxie und Hypoxie kultiviert wurden, erfolgte mit Hilfe der *SuperScript™ II* Reversen Transkriptase (200 units) und dem Gebrauch von Random-Hexamer-Primern (250 ng). Vervollständigt wurde ein Reaktionsansatz durch Zugabe von 10 nM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP,dTTP), 0,1M DTT (1,4- Dithiothreitol) und RNase Inhibitor *RNaseOUT* (40 units). In jedem Reaktionsansatz wurden 2 µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben.

2.2.3.3. Quantitative Real-Time PCR

Die Untersuchung der Expression von bestimmten Genen vor und nach einer Behandlung (Hypoxie, Normoxie) erfolgte unter Verwendung der qRT-PCR. Prinzip dieser Methode ist der Einsatz von drei Oligonukleotid-Primern zur spezifischen Detektion des gesuchten mRNA- bzw. cDNA-Abschnittes. Zwei der eingesetzten Primer begrenzen den zu amplifizierenden cDNA-Abschnitt. Der dritte Primer (Sonde) bindet zwischen den begrenzenden Primern und ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierendem Reporter-Farbstoff markiert. Am 3'-Ende trägt die Sonde einen Quencher-Farbstoff der auf Grund der räumlichen Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff dessen Emission nach Anregung unterdrückt. Während der Amplifikation des spezifischen cDNA-Abschnittes wird die Sonde auf Grund der 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase aufgelöst. Diese Sondenhydrolyse verursacht eine Unterbrechung der räumlichen Nähe zwischen Reporterfarbstoff und Quencher. Mit jedem PCR-Zyklus erfolgt eine exponentielle Vervielfältigung des PCR-Produktes und die Fluoreszenz des Reporters steigt ebenfalls mit jedem Zyklus an. Bindet die Sonde nicht spezifisch am Matrizenstrang, so wird die Sonde von der Polymerase verdrängt ohne sie zu hydrolysieren. Somit ist das Fluoreszenzsignal sequenzspezifisch.

Für die Amplifizierung der Gene VEGF, CA9, Redd1, HIF-1 α und SOX4 wurden *Gene Expression Assays* der Firma Applied Biosystems verwendet, die sowohl die begrenzenden Primer, als auch die Sonde für das jeweilige Gen beinhalteten. Die qRT-PCR wurde für jedes Gene als Multiplex-Analyse durchgeführt. Das heißt, die Amplifikation des Zielgenes und der Referenz 18S rRNA erfolgten in einem Reaktionsansatz. Die qRT-PCR wurde für jeden Wert mit 20 ng RNA und als 3-fach Wiederholungen durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien sind Tabelle 2.1 zu entnehmen. Des Weiteren wurde für jede qRT-PCR eine Standardkurve mitgeführt, welche die cDNA-Konzentrationen von 100 ng/ μ l bis 0,4 ng/ μ l in sechs Verdünnungsschritten umfasste. Die Verwendung einer standardisierten humanen

Universal-RNA der Firma BioChain gewährleistete eine möglichst gleich bleibende Qualität der Standardkurve. Neben der Standardkurve enthielt jede durchgeführte qRT-PCR eine Negativ-Kontrolle ohne cDNA zur Beurteilung der Gesamtspezifität der PCR.

Für die Auswertung der qRT-PCR wurde die Fluoreszenzintensität festgelegt, bei der sich alle auszuwertenden Proben einer PCR im linearen Bereich befinden. Dieser Bereich liegt etwa 10mal höher als die Fluoreszenz der Hintergrundaktivität (Basislinie). Der Zyklus, bei dem das Signal einer Probe diese Fluoreszenzintensität erreicht, wird als Schwellenzyklus (Threshold Cycle, C_T) bezeichnet. Setzt man eine 100%ige Effizienz der PCR-Reaktion voraus, so bedeutet die Abnahme des C_T -Wertes um den Faktor 1 eine Verdopplung des Ausgangsmaterials. Die C_T -Werte wurden unter Verwendung der Sequence Detection Software 1.3.1 ermittelt.

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach der relativen Standardkurven-Methode. Mit Hilfe der ermittelten C_T -Werte aus den bekannten cDNA-Konzentrationen der Standardkurve konnte auf die cDNA-Konzentration der C_T -Werte des zu untersuchenden Genes geschlossen werden. Die Bestimmung einer relativen Standardkurve wurde sowohl für das Zielgen als auch für die 18S rRNA-Referenz durchgeführt. Nach dem die Zielgenexpression auf die Expression der Referenz normalisiert wurde, erfolgte der relative Vergleich der Expression eines Genes unter Normoxie und Hypoxie. Für die Gene VEGF, CA9, Redd1, HIF-1 α und SOX4 wird somit die relative Genexpressionsänderung unter Hypoxie im Ergebnisteil dargestellt (Hypoxie vs. Normoxie).

2.2.3.4. Affymetrix GeneChip Analyse

Mit Hilfe der Affymetrix GeneChip[®] Technologie konnte die Genexpression der Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und der primären

Prostata-Epithelzellen PrEC_2, PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 nach hypoxischer Kultivierung untersucht werden. Dazu wurden die Tumorzelllinien in drei unabhängigen Zellkulturexperimenten 24h und 48h unter Hypoxie oder Normoxie kultiviert. Auf Grund der limitiert zur Verfügung stehenden Primärzellen variiert die Anzahl der biologischen Wiederholungen pro Primärzellspender. Die Primärzellen PrEC_2 und PrEC_3 konnten lediglich in einer Wiederholung genutzt werden, PrEC_5 in zwei und für PrEC_4 standen 3 biologische Replikate zur Verfügung. Für die Hybridisierung wurde der *Affymetrix Human Genome U133Plus2.0 GeneChip*[®] (HGU133Plus2.0) verwendet, mit dessen Hilfe mehr als 38.000 humane Gene analysiert werden konnten. Die Prozessierung der aus den Zellkulturexperimenten isolierten RNA sowie die Hybridisierung mit den GeneChips erfolgte mittels den angegebenen Reaktions-Kits in Tabelle 2.1 nach dem Protokoll der Firma Affymetrix (vgl. *GeneChip*[®] Expression Analysis Technical Manual). In dessen Verlauf wurde die isolierte RNA zunächst durch reverse Transkription in einzelsträngige und anschließend in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Die synthetisierte cDNA diente danach als Vorlage für die *in vitro* Transkription in Biotin-markierte cRNA. Nach Fragmentierung der cRNA folgte die sequenzspezifische Hybridisierung mit den Oligonukleotiden des GeneChips. Die Detektion erfolgte durch Bindung eines Phycoerythin gekoppelten Streptavidin-Antikörper-Komplexes, dessen Fluoreszenzsignal mit Hilfe des *GeneChip*[®] Array Scanners 3000 gemessen wurde. Die Menge an emittierter Fluoreszenz verhält sich proportional der Menge an gebundenen cRNA-Fragmenten. Die Erfassung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit Hilfe der Genedata Expressionist Pro Refinder Array 4.5 Software. Durch Subtraktion der Hintergrundsignale wurden so die Fluoreszenzsignale eines GeneChips gemessen, die repräsentativ für ein Gentranskript (Probe Set) sind.

Die vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen Proben die unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert wurden, erfolgte mit Hilfe der Genedata Expressionist Pro Analyst 4.5 Software. Zu Beginn der Analyse wurden die ermittelten Genexpressionen in zwei Durchgängen normalisiert. Zunächst wurden die Signale eines jeden Chips auf den

Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzen dieses Chips normalisiert (Median-Normalisierung; „per chip normalisation“). Danach folgte die Normalisierung der für jeden Chip korrigierten Signalstärke eines Gentranskripts auf den mittleren Signalwert gemessen über alle hybridisierten GeneChips (LOWESS-Normalisierung; „per gene normalisation“). Der beschriebene Normalisierungs-Prozess erlaubte den Vergleich von mehreren hybridisierten GeneChips, welche unterschiedlich starke Hybridisierungsraten und die daraus resultierende Fluoreszenzsignalschwankungen für ein Gentranskript aufwiesen (46).

Nach der Normalisierung der gemessenen Fluoreszenzen wurde die Validität eines Gentranskripts (Probe Sets) innerhalb der drei unabhängig voneinander durchgeführten Zellkulturexperimenten bestimmt (Valid Value Proportion). Ein Probe Set wird als valide eingestuft, wenn es in zwei der drei Experimente reguliert ist. Des Weiteren konnte die Signifikanz der Regulation mittels eines t-Test bestimmt werden und für $p < 0,05$ festgelegt. Zum Schluss erfolgte die Mittelung der Expressionswerte eines Probe Sets über die durchgeführten Zellkulturversuche. Die Genexpressionsanalyse bezieht sich auf eine veränderte Genexpression in Tumor- oder Primärzellen, die unter Hypoxie kultiviert wurden, im Vergleich zu Zellen die unter Normoxie wuchsen. Gene die ihre Expression um mehr als das 1,5-fache unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen ändern, gelten im Nachfolgenden als unter Hypoxie reguliert. Die Regulation kann sowohl positiv (Genexpressionsinduktion) als auch negativ (Genexpressionsrepression) ausfallen. Die im Ergebnisteil dargestellten Genexpressionsänderungen sind jeweils als n-fache Regulation unter Hypoxie zu verstehen (Hypoxie vs. Normoxie).

Die Qualität der vorliegenden Microarray-Studie wurde mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (Principle component analysis, PCA) untersucht. Die PCA-Analyse ermöglichte den Vergleich der Genexpression über alle behandelten Proben hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit bzw. ihrer Unterscheidungskraft. Die Ähnlichkeitsmerkmale einer jeden Probe werden mathematisch so berechnet, dass eine dreidimensionale Darstellung entsteht. Je mehr sich die Genexpression

verschiedener Proben ähnelt, desto dichter liegen die Proben in der räumlichen Darstellung zusammen. Unterscheidet sich die Genexpression von zwei Proben sehr stark, liegen sie im Raum auch deutlich auseinander. In jeder Darstellung können jeweils drei Unterscheidungsmerkmale (Komponenten) dargestellt werden. Da es in der Regel mehr als drei Unterscheidungsmerkmale innerhalb eines Experimentes gibt, können mehrere PCA-Analysen entstehen, je nach dem welche Komponenten in der dreidimensionalen Darstellung ausgewählt wurden. Den einzelnen Unterscheidungskomponenten werden außerdem unterschiedliche Wertigkeiten zugeordnet. Das heißt, Komponente 1 ist auch immer das Merkmal nach dem sich die Genexpressionen der Proben eines Experimentes am stärksten unterscheiden lassen. Die nachfolgenden Komponenten weisen eine prozentual geringere Unterscheidungskraft auf.

2.2.3.5. Ermittlung von Gengruppen mittels vergleichender Genexpressionsanalyse

In Kapitel 3.3 werden die zu den biologischen Fragestellungen (Tabelle 3.3) entstanden Gengruppen vorgestellt. Die Ermittlung der Gengruppen umfasst eine Reihe von Arbeitsabläufen, welche sich in jeder Analyse wiederholen.

In Tabelle 3.4 wurden für jeden Zelltyp die Probe Sets (Gene) zusammengefasst, welche in dem jeweiligen Zelltyp, nach 48h hypoxischer Kultivierung eine mehr als 1,5-fache Veränderung ihrer Expression aufwiesen. Diese Hypoxie-regulierten Gene sind Ausgangspunkt für jede weitere Analyse und wurden entsprechend der biologischen Fragestellung und der damit verbundenen Filterkriterien weiter untersucht. Nachdem die endgültige Anzahl von Genen, welche den Kriterien der einzelnen biologischen Fragen entsprechen, herausgefiltert wurden, erfolgte eine erste funktionelle Validierung der ermittelten Gene mit Hilfe der Signalweg-Software *GeneGo* (MetaCore). Die Funktion der Hypoxie-regulierten Gene und deren Bedeutung für die

Tumorentwicklung wurde weiter verifiziert durch eine ausführliche Literaturrecherche für jedes Gen, anhand derer die Einteilung der identifizierten Gene nach ihrer Funktion erfolgte. Ebenfalls wurde mit Hilfe der Literatur eine bereits bekannte Hypoxie-Regulation, unabhängig vom untersuchten Zellsystem, überprüft. Im Anhang findet sich zu allen genannten Genen eine kurze Beschreibung der zellulären Funktion.

2.2.4 RNA-Interferenz und Transfektion

Unter Verwendung der RNA Interferenz Technologie wurde in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP die mRNA-Expression von HIF-1 α und SOX4 spezifisch inhibiert (Knockdown). Der dieser Methode zu Grunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass kurze RNA-Doppelstränge (small interfering RNA, siRNA) in den so genannten „RNA-induced silencing complex“ (RISC) eingebaut werden und nach Aktivierung des RISC spezifisch mit der komplementären mRNA-Sequenz hybridisieren. Die von RISC beherbergte Endonuklease-Aktivität löst den Abbau der gebildeten doppelsträngigen RNA aus. Das von der mRNA codierte Protein kann nicht synthetisiert werden (47).

Die Reduzierung der HIF-1 α und SOX4 mRNA erfolgte in unterschiedlichen Versuchsansätzen mit Hilfe der *On-Targetplus SMARTpool*[®] und *On-Targetplus Single siRNA* der Firma Dharmacon, welche spezifisch gegen die HIF-1 α oder SOX4 mRNA gerichtet war. Kennzeichnend für den siRNA *SMARTpool*[®] ist die gleichzeitige Transfektion von vier verschiedene siRNAs, welche spezifisch, jedoch gegen unterschiedliche Bereiche der zu untersuchenden mRNA gerichtet sind. Mit Hilfe der *SMARTpools*[®] gegen HIF-1 α und SOX4 mRNA konnte eine schnelle Aussage über die Effizienz des jeweiligen Knockdowns getroffen werden. Anschließend wurden die siRNAs des jeweiligen *SMARTpools*[®] in einem weiteren Versuchsansatz separat getestet. Die siRNAs, welche die effizientesten Knockdown-Raten in der Tumorzelllinie

LNCaP erbrachten, wurden in den folgenden Zellkulturexperimenten eingesetzt. Die Transfektion erfolgte in jedem der Versuche mit 50 nM siRNA und unter Verwendung des Transfektionsreagenz *Dharmafect*^{®2}, welches nach Herstellerangaben benutzt wurde. Die Verwendung des *SiGlo green Transfection Indicators* (Dharmacon) ermöglichte die Fluoreszenz-basierende, mikroskopische Bestimmung der Transfektions-Effizienz. Die Transfektions-Effizienz lag in den durchgeführten Knockdown-Versuchen zwischen 70% und 90%. Als Kontrollen dienten Zellen, die zum einen nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (Transfektionskontrolle, TK) oder Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, welche zu keiner zellulären RNA Sequenz komplementär ist (NTC – „non targeting control“). Nach der Transfektion inkubierten die Zellen stets 4h unter normoxischen Bedingungen um den vollständigen Abbau der HIF-1 α mRNA zu gewährleisten. Danach wurden die Zellen jeweils 24h, 48h und 72h unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert. Des Weiteren erhielten die Zellen 24h nach Durchführung der Transfektion ein äquivalentes Volumen an Zellkulturmedium um die toxischen Effekte der Transfektion zu reduzieren.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorgelegten Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte. Der erste Abschnitt befasst sich mit der Etablierung eines zellulären Modells zur Betrachtung hypoxischer Einflüsse. Im zweiten Teil wird die Analyse der *Affymetrix GeneChip* Hybridisierung und die daraus resultierenden bekannten und neu identifizierten Hypoxie-regulierten Gene vorgestellt sowie hinsichtlich der biologischen Funktion ihrer Genprodukte unterteilt. Der dritte, abschließende Teil beschäftigt sich mit der Validierung ausgewählter Hypoxie-regulierter Gene, sowie mit der funktionellen Charakterisierung des neu identifizierten, Sauerstoff-abhängig regulierten Transkriptionsfaktor SOX4.

3.1. Charakteristika der verwendeten Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen

In dieser Arbeit kommen vier humane Prostata-Tumorzelllinien und primäre Prostata-Epithelzellen von vier verschiedenen menschlichen Spendern zum Einsatz. Die verwendeten Tumorzelllinien lassen sich nach ihren zellspezifischen Eigenschaften in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden DU145 und PC3. Beide Zelllinien wachsen unabhängig vom Steroidhormon Androgen und besitzen kein funktionelles p53 Protein (48, 49). Zur zweiten Gruppe gehören LNCaP und 22RV1. Im Gegensatz zur ersten Gruppe besitzen sie ein funktionsfähiges p53 Protein und zeichnen sich durch ihre Androgensensitivität aus (50-52). Die Primärzellen PrEC_2, PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 werden in einer dritten Gruppe zusammengefasst. Es handelt sich dabei um unveränderte Prostata-Epithelzellen, die ein funktionelles p53 Protein besitzen und Androgen-abhängig wachsen. Die verwendeten Primärzellen stammen

von vier verschiedenen Spendern und weisen deutliche Unterschiede in ihrem Proliferationsverhalten auf. Selbst Schwankungen der Verdopplungszeit innerhalb einer Zellcharge sind auf Grund der Lagerung in flüssigem Stickstoff und dem damit verbundenem Auftauprozess möglich. Um die Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wurden die entsprechenden Zellversuche aus einer Passage der jeweiligen Primärzellspender-Zellen durchgeführt. In Tabelle 3.1 sind die untersuchungsrelevanten Zellcharakteristika von Tumorzelllinien und Primärzellen zusammengefasst. Die Androgenabhängigkeit der Tumorzelllinien wurde experimentell im nachfolgenden Kapitel untersucht, während die Funktionalität des p53 Proteins mit Hilfe von Literaturreferenzen verifiziert wurde (Tabelle 3.1).

Tab 3.1 Zellspezifische Charakteristika der verwendeten Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen. (- = Androgen-unabhängiges Wachstum, + = Androgen-abhängiges Wachstum, PrEC = Prostate Epithelial Cells)

Prostata-Tumorzelllinie	Androgen-abhängiges Wachstum	p53	Referenz / Bezugsquelle
Zellgruppe I			
DU145	-	mutiert	(48, 49)
PC3	-	negativ	(48, 49)
Zellgruppe II			
LNCaP	+	Wildtyp	(48)
22RV1	+	Wildtyp	(50-52)
Zellgruppe III			
PrEC	+	Wildtyp	Lonza

3.1.1 Androgenabhängigkeit der Prostata-Tumorzelllinien

Die Proliferation der Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 ist unterschiedlich stark von der Zugabe des Wachstumshormons Androgen abhängig. Die Beeinflussung des Wachstumsverhaltens wurde mit Hilfe eines Proliferations-

Assays überprüft. Dazu wurden die Zellen in dem für jede Zelllinie spezifischen Zellkulturmedium, jedoch mit unterschiedlichen Androgenkonzentrationen, kultiviert. Nach der Zellaussaat wuchsen die Zellen zunächst 24h unter Vollmedium. Danach wurde das Medium entsprechend der Angaben in Tabelle 3.2 ersetzt und die Zellproliferation über 72h bestimmt.

Tabelle 3.2 Zellkulturmedien mit unterschiedlichen Androgengehalten (R1881 = Methyltrienolon, synthetisches Androgen)

Medium-Name	Beschreibung	Gehalt an Androgen
10% CCS	Medium mit 10% Aktivkohle-gefiltertem fetalen Kälberserum.	Kein Androgen
10% CCS 0,1nM R1881	Medium mit 10% Aktivkohle-gefiltertem fetalen Kälberserum und 0,1 nM R1881.	0,1 nM synthetisches Androgen
10% FCS	Medium mit 10% fetalem Kälberserum.	natürlich vorhandener Androgengehalt
10% FCS 0,1nM R1881	Medium mit 10% fetalem Kälberserum und 0,1nM R1881.	natürlich vorhandenes Androgen und 0,1 nM synthetisches Androgen

In Abbildung 3.1 ist die Verdopplungszeit der Tumorzelllinien unter Zugabe unterschiedlicher Androgenkonzentrationen dargestellt. Die vier Tumorzelllinien proliferieren in jedem der verwendeten Medien. DU145 und PC3 zeigen keine Veränderung der Verdopplungszeit durch das zugegebene Androgen. In der Zelllinie LNCaP hingegen sinkt die Verdopplungszeit von 3,9 Tage (10% CCS) auf 1,5 Tage (10% FCS + 0,1nM R1881) in Gegenwart von Androgen. Die Proliferation von 22RV1 wird ebenfalls durch Androgenzugabe beschleunigt. Die Verdopplungszeit sinkt von 2,5 Tage (10% CCS) auf 1,6 Tage (10% FCS + 0,1nM R1881).

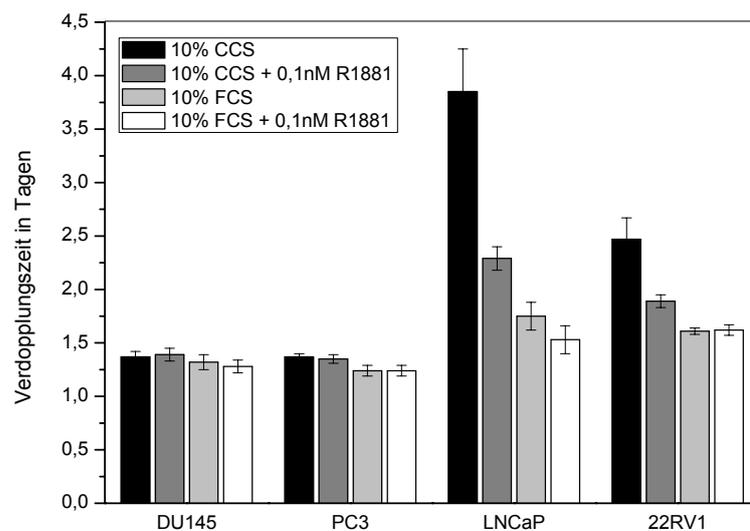


Abb. 3.1 Androgenabhängigkeit von Prostata-Tumorzelllinien. Verdopplungszeit von Tumorzelllinien unter Zugabe unterschiedlicher Androgenkonzentrationen. N = 5. (CCS – Aktivkohle-filtriertes Medium, FCS – Fetales Kälberserum, R1881 – synthetisches Androgen, Methyltrienolon)

3.2. Etablierung eines zellulären Modells zur Analyse hypoxischer Einflüsse

Zu Beginn dieser Arbeit wurde sichergestellt, dass der Hypoxie-Signalweg unter den gewählten Sauerstoffbedingungen von 1% O₂ aktiviert wird. Von zentraler Bedeutung bei der Aktivierung des zellulären Hypoxie-Signalweges ist der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1). Die Stabilisierung der α -Untereinheit von HIF-1 und die Induktion von HIF-1 Zielmolekülen dienen im nachfolgenden als Maß für die Aktivierung des zellulären Hypoxie-Signalweges. Im Anschluss daran erfolgte die Betrachtung verschiedener zellulärer Grundprozesse, um die Auswirkungen der hypoxischen Kulturbedingungen genauer charakterisieren zu können. Die Untersuchung der Proliferation, des Apoptoseverhaltens und der Zellzykluspassage von Tumorzelllinien und Primärzellen unter Hypoxie dienen dieser Charakterisierung.

3.2.1 Expression von HIF-1 α regulierten Zielgenen in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 beeinflusst die Expression von 1-2% der Gene des gesamten humanen Genoms (4). Die HIF-1 regulierten Gene VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (5) und CA9 (Carboanhydrase 9) (53) dienen auf mRNA-Ebene als Kontrollgene für eine zelluläre Hypoxie-Antwort.

Die Bestimmung der mRNA-Expression von VEGF und CA9 erfolgte unter Einsatz der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR). Die Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und die Primärzellen PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 wurden in drei unabhängigen Zellkulturexperimenten jeweils 24h, 48h und 72h unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.3.1; 2.2.3.2). Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte zu jedem der drei Zellexperimente in wiederum 3 unabhängigen Replikaten (Kapitel 2.2.3.3).

In Abbildung 3.2 ist die Expressionsänderung der HIF-1 α Zielgene VEGF und CA9 nach 24h, 48h und 72h Hypoxie dargestellt. Die Expression in den Primärzellen PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 wird als Mittelwert wiedergegeben.

Die mRNA-Expression von VEGF wird in den Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 zu jedem Zeitpunkt unter Hypoxie induziert. Nach 72h hypoxischer Kultivierung hat sich die VEGF Expression in den Tumorzelllinien DU145, LNCaP und 22RV1 um mehr als das 4-fache und in PC3 Zellen um mehr als das 2-fache erhöht. In den Primärzellen zeigt sich ebenfalls eine deutliche Erhöhung der VEGF Expression, welche nach 24h Hypoxie um mehr als das 3-fache angestiegen ist und nach 48h und 72h auf eine 2-fache Induktion absinkt. Die CA9 Expression wird in den Tumorzelllinien DU145, PC3 und LNCaP zu jedem Zeitpunkt deutlich induziert und zeigt nach 72h hypoxischer Kultivierung in der Tumorzelllinie DU145 eine mehr als 6-fache, in PC3 Zellen eine >50-fache und in der Zelllinie LNCaP eine >30-fache Induktion. In der Tumorzelllinie 22RV1 wird CA9 ebenfalls unter Hypoxie induziert, jedoch nur um den

Faktor zwei nach 72h Hypoxie. In den Primärzellen PrEC erhöht sich die CA9 Expression nach 24h, 48h und 72h Hypoxie um den Faktor zehn.

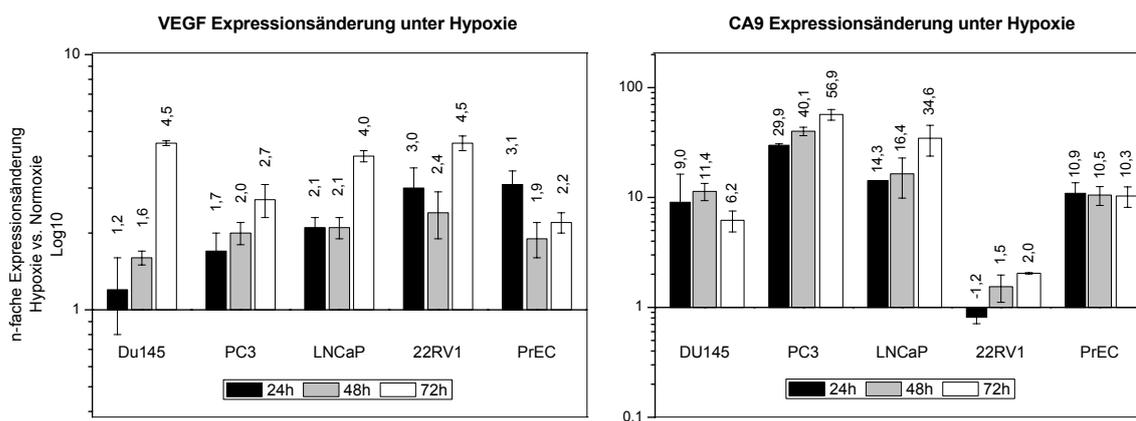


Abb. 3.2 Expressionsänderung der HIF-1 α Zielgene VEGF (Vascular endothelial growth factor) und CA9 (Carbonic anhydrase 9) zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h hypoxischer Kultivierung. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und wird als n-fache Regulation unter Hypoxie dargestellt. (N = 3)

3.2.2 Protein-Expression von HIF-1 α und seines Zielgens Redd1 in Prostata-Tumorzelllinien

Im Nachfolgenden wurde die Protein-Expression von HIF-1 α und dem HIF-1 abhängig regulierten Protein Redd1 (54, 55), mit Hilfe des Immuno-Blot Verfahrens, betrachtet (Kapitel 2.2.2.5).

In Abbildung 3.3 ist die HIF-1 α und Redd1 Proteinexpression in den Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 unter Normoxie und Hypoxie zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h dargestellt. In der Zelllinie DU145 wird das HIF-1 α Protein nach 24h Hypoxie verglichen mit Zellen unter Normoxie um den Faktor 2 in seiner Expression induziert. Zum Zeitpunkt 48h Hypoxie nähert sich diese Induktion auf ein

gemeinsames Niveau zwischen Normoxie und Hypoxie (-1fach) an. Nach 72h nimmt die HIF-1 α Proteinexpression unter Hypoxie sichtbar ab und verglichen zur Normoxie wird HIF-1 α um das 9fache herunterreguliert. PC3, LNCaP und 22RV1 Zellen weisen zu allen gemessenen Zeitpunkten eine deutliche HIF-1 α Expressionsinduktion auf. In der Zelllinie PC3 steigt die HIF-1 α Expression nach 24h Hypoxie im Vergleich zur Normoxie um das 4fache, nach 48h um das 9fache und nach 72h Hypoxie wird HIF-1 α um den Faktor 8 verstärkt exprimiert. LNCaP Zellen zeigen nach 24h Hypoxie eine 5fach stärkere HIF-1 α Expression als Zellen die unter Normoxie wuchsen. Nach 48h und 72h Hypoxie zeigt sich eine 3fache Proteininduktion. Auch in der Zelllinie 22RV1 wird HIF-1 α nach 24h (9fach), 48h (11fach) und 72h (6fach) durch Hypoxie induziert. Bei Betrachtung der HIF-1 α Expression über alle Zelllinien fällt auf, dass HIF-1 α in DU145 bereits unter Normoxie exprimiert wird, während PC3, LNCaP und 22RV1 nur eine schwache oder keine Expression des HIF-1 α Proteins unter Normoxie zeigen.

Weiterhin zeigt Abbildung 3.3 die Expression des HIF-1 abhängig regulierten Proteins Redd1 in den Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 24h, 48h und 72h nach normoxischer oder hypoxischer Kultivierung. Redd1 wird in jeder der betrachteten Tumorzelllinie exprimiert. In DU145 Zellen zeigt sich nach 24h hypoxischer Kultivierung, verglichen mit Zellen unter Normoxie, eine 12fache Induktion des Redd1 Proteins. Diese Induktion sinkt nach 48h und 72h Hypoxie auf eine 3fache bzw. 2fache Induktion ab. In der Tumorzelllinie PC3 wird das Redd1 Protein nach 48h und 72h Hypoxie quantifizierbar detektiert und weist nach 48h eine Induktion um den Faktor 13 und nach 72h um den Faktor 17 auf, verglichen mit der Expression der jeweiligen Kontrollen unter Normoxie. Nach 24h und 72h Hypoxie ist in der Zelllinie LNCaP eine Erhöhung der Redd1 Expression, im Vergleich zur Normoxie, um den Faktor 6 bzw. 16 erkennbar. Die Expression nach 48h kann nicht eindeutig geklärt werden, da auch unter Normoxie Redd1 detektiert wurde. In der Zelllinie 22RV1 wird Redd1, verglichen mit den Zelllinien DU145, PC3 und LNCaP, insgesamt schwächer exprimiert. Jedoch kann nach 48h und 72h Hypoxie eine 17fache bzw. 6fache Induktion des Redd1

Proteins beobachtet werden. Der Nachweis des β -Actin Proteins dient der Kontrolle einer gleichmäßig aufgetragenen Proteinmenge und zur Normalisierung der HIF-1 α und Redd1 Proteinbanden.

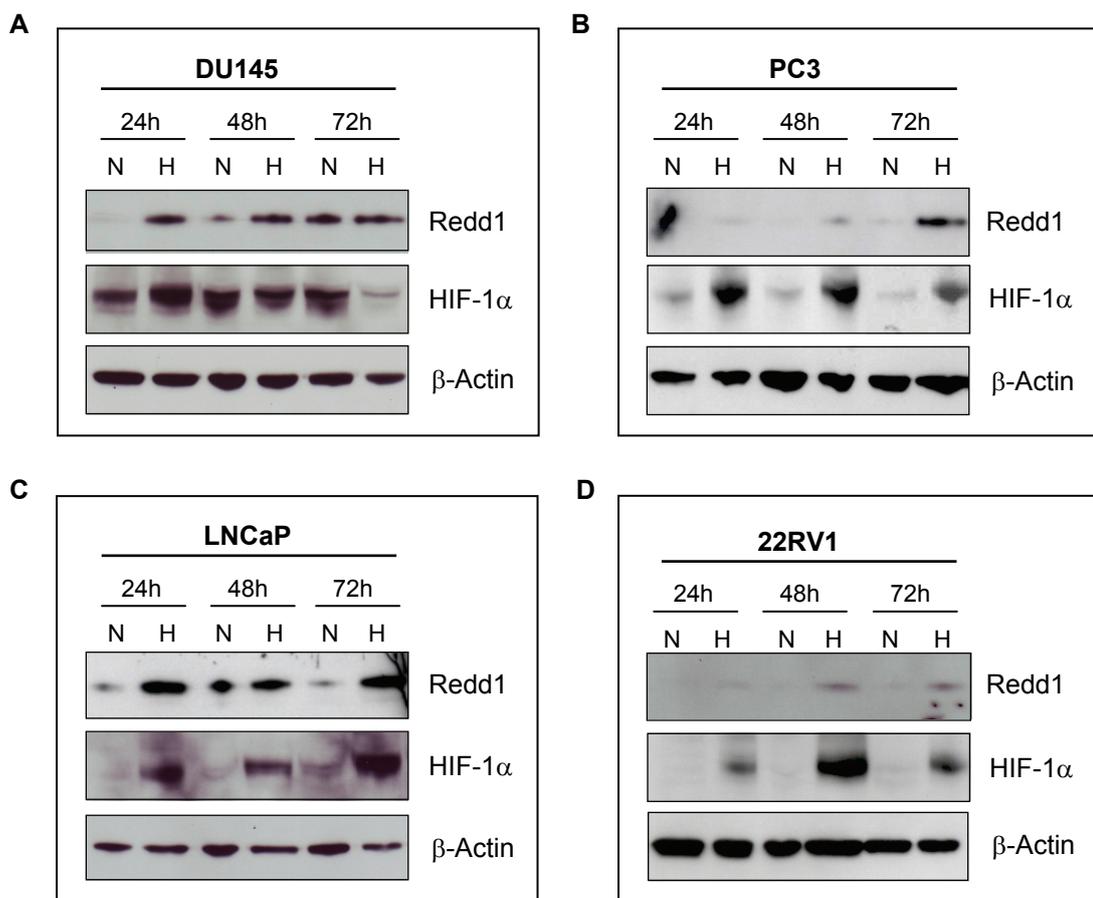


Abb. 3.3 Expression der Proteine HIF-1 α (120 kDa) und Redd1 (35 kDa) unter Normoxie und Hypoxie zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1. Die Expression des β -Actin Proteins (47 kDa) dient der Kontrolle einer gleichmäßig aufgetragenen Proteinkonzentration. Repräsentative Darstellung aus jeweils dreifach durchgeführten Immuno-Blots. (N = Normoxie; H = Hypoxie; HIF-1 α = Hypoxia-inducible factor 1 alpha, Redd1 = DNA-damage-inducible transcript 4)

3.2.3 HIF-1 α Protein-Expression in Prostata-Primärzellen

Der Nachweis des HIF-1 α Proteins in den Prostata-Primärzellen PrEC_2, PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 erfolgte ebenfalls unter Verwendung des Immuno-Blot Verfahrens.

Abbildung 3.4 zeigt die HIF-1 α Proteinexpression der Prostata-Primärzellen zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h nach normoxischer und hypoxischer Kultivierung. In allen verwendeten Primärzellenspendern wird HIF-1 α bereits unter normoxischen Bedingungen deutlich exprimiert. In PrEC_2 Zellen wird das HIF-1 α Protein nach 48h und 72h Hypoxie im Vergleich zur Normoxie um den Faktor -1,3 bzw. -1,4 verringert exprimiert. Bei alleiniger Betrachtung der Expression unter Normoxie fällt jedoch auf, dass die HIF-1 α Proteinkonzentration mit dem Zeitverlauf ansteigt, wohingegen der Proteingehalt unter Hypoxie zu allen Zeitpunkten gleich bleibt. Die Primärzellen PrEC_3 weisen keinen Unterschied in ihrer HIF-1 α Proteinexpression zwischen Normoxie und Hypoxie zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h auf. Im Gegensatz dazu zeigt das HIF-1 α Protein in PrEC_4 nach 24h Hypoxie eine leicht verringerte Expression (-1,2fach), welche jedoch über den zeitlichen Verlauf in eine Proteininduktion umschlägt. So wird HIF-1 α nach 48h Hypoxie um den Faktor 1,1 und nach 72h um den Faktor 1,6 verstärkt exprimiert. In PrEC_5 Zellen zeigt sich zunächst eine 1,2fache (48h) Induktion des HIF-1 α Proteins, welche nach 72h Hypoxie in eine -1,4fache Repression umschlägt. Jedoch zeigt sich auch in PrEC_5 ein leichter Anstieg der HIF-1 α Expression mit der Zeit unter alleiniger Betrachtung der Normoxie, wohingegen die Expression unter Hypoxie konstant bleibt.

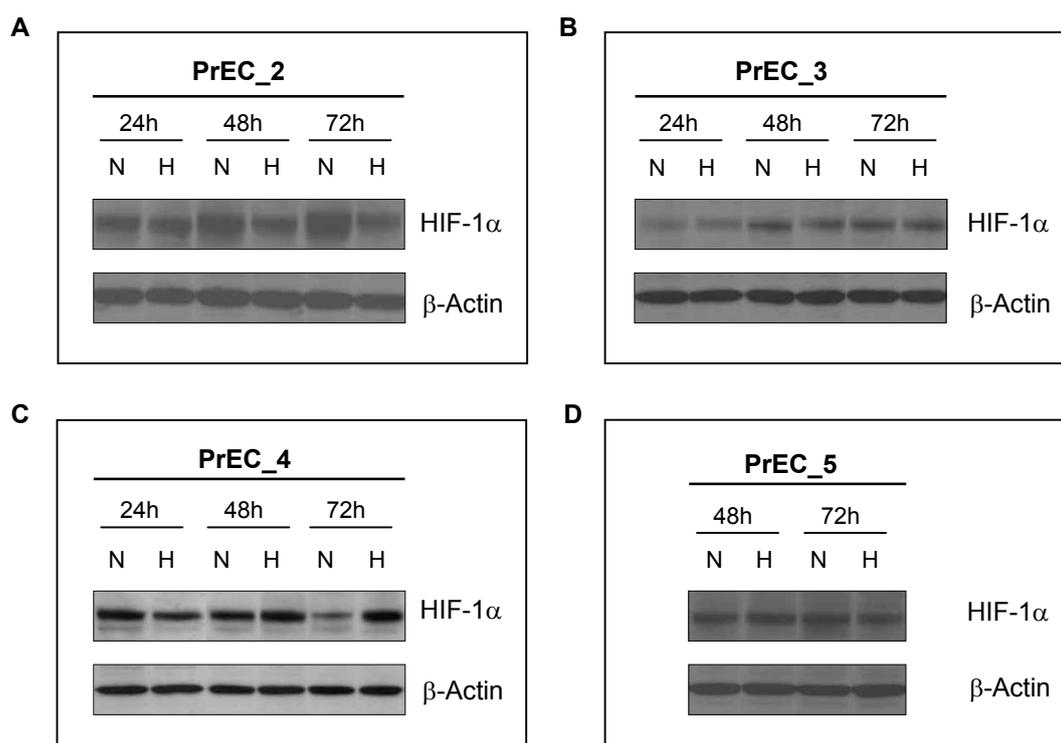


Abb.3.4 HIF-1 α Protein-Expression (120 kDa) in den Prostata-Primärzellen PrEC_2, PrEC_3 und PrEC_4 unter Normoxie und Hypoxie zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h (PrEC_5 Zeitpunkte 48h und 72h). Die Expression des β -Actin Proteins (47 kDa) dient der Kontrolle einer gleichmäßig aufgetragenen Proteinkonzentration. Repräsentative Darstellung aus jeweils dreifach durchgeführten Immuno-Blots. (HIF-1 α = Hypoxia-inducible factor 1 alpha; N = Normoxie, H = Hypoxie)

3.2.4 Proliferation von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen unter Hypoxie

Im Nachfolgenden stehen die zellulären Auswirkungen der hypoxischen Kulturbedingungen auf Proliferation, Apoptoseverhalten und Zellzykluspassage im Mittelpunkt. Zur Untersuchung der Proliferation unter hypoxischen Kulturbedingungen wurden die Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1, sowie die Primärzellen PrEC_2, PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 als 5-fach Wiederholungen im 96-Well Format ausgesät. Die verwendeten Zellen wuchsen in Vollmedium und befanden sich während des gesamten Versuchs im linearen Bereich ihrer Wachstumskurve. Nach

24h normoxischer Kultivierung wurde ein Teil der Zellen in eine 1%ige Sauerstoffatmosphäre überführt (Kapitel 2.2.2.1). Als Kontrolle dienten Zellen, die unter normoxischen Kulturbedingungen (21% O₂) wuchsen. Die Zellvermehrung wurde sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie nach 72h Wachstum mittels eines Proliferations-Assays analysiert.

Abbildung 3.5A zeigt die Verdopplungszeit in Tagen unter Normoxie und Hypoxie in den verwendeten Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen. Die Zunahme der Verdopplungszeit, ebenfalls in Tagen, ist in Abbildung 3.5B aufgeführt. Tumorzellen und Primärzellen proliferieren sowohl unter normoxischen, als auch hypoxischen Zellkulturbedingungen. Die Tumorzelllinien benötigen für ihre Verdopplung unter Hypoxie im Durchschnitt 0,9 Tage (\pm 0,2 d) länger, als unter Normoxie. Die Beeinflussung der Verdopplungszeit der Primärzellen weist eine deutliche Abhängigkeit vom Zellspender auf. Die Primärzellen PrEC_2 und PrEC_4 zeigen eine Verlängerung der Verdopplungszeit unter Hypoxie von 1,9 bzw. 1,7 Tagen, während sich die Verdopplungszeit der Spenderzellen PrEC_3 und PrEC_5 lediglich um 1,0 und 0,7 Tage verlängert.

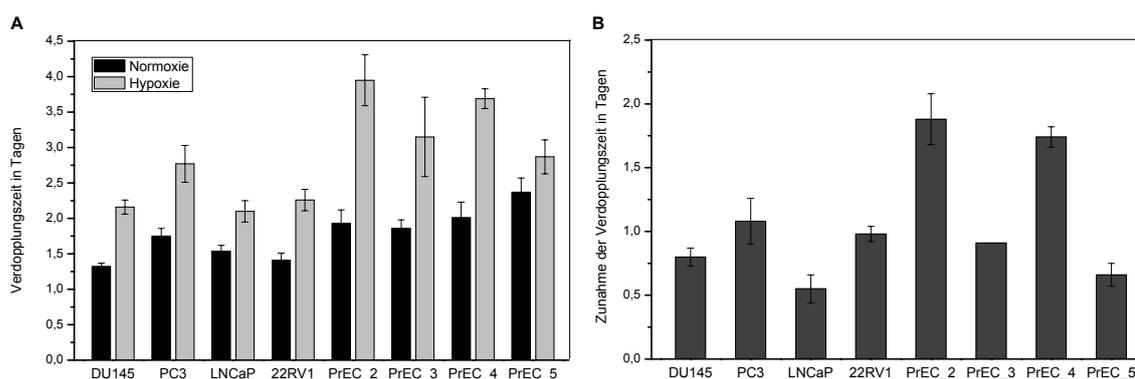


Abb. 3.5 Verdopplungszeit von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen unter Normoxie und Hypoxie. **A** – Verdopplungszeit unter Normoxie und Hypoxie in Tagen. **B** – Zunahme der Verdopplungszeit unter Hypoxie in Tagen. (N = 5)

3.2.5 Apoptoseverhalten von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen unter Hypoxie

Die Bestimmung der Apoptose erfolgte mit Hilfe einer Annexin V-FITC – Propidiumjodid – Färbung, welche eine Detektion von nicht-apoptotischen (Annexin V-FITC negativ / PI negativ), früh-apoptotischen (Annexin V-FITC positiv / PI negativ), spät-apoptotischen (Annexin V-FITC positiv / PI positiv) und nekrotischen Zellen (Annexin V-FITC negativ / PI positiv) erlaubt. Die Tumorzelllinie LNCaP zeigt keine Apoptose-assoziierte Phosphatidylserin-Externalisierung und konnte in diesem Versuch nicht mittels der Annexin V Färbetechnik untersucht werden. Ebenfalls konnte die Zelllinie 22RV1 nicht berücksichtigt werden, da die Zellen während des Aufarbeitungsprotokolls in jedem der mehrfach durchgeführten Versuche mit einem starken Vitalitätsverlust reagierten. Die Tumorzelllinien DU145 und PC3, sowie die Primärzellen PrEC_4 wurden in drei biologisch unabhängigen Experimenten für 24h, 48h und 72h unter Normoxie und Hypoxie kultiviert. Die Analyse im Durchflusszytometer erfolgte mit je 3 Replikaten pro Wert. Da die Primärzellen nur in einer beschränkten Chargengröße (Anzahl der kryokonservierten Zell-Aliquots) zur Verfügung standen, konnte die Annexin V-FITC – Propidiumjodid - Färbung für die Primärzellen PrEC_2, PrEC_3 und PrEC_5 lediglich in einem Experiment mit 3-fach Werten durchgeführt werden.

In Abbildung 3.6 ist der prozentuale Anteil nicht-apoptotischer (Abb. 3.6A, B) und apoptotischer Zellen (Abb. 3.6C, D) gemessen an der Gesamtzellpopulation unter Normoxie und Hypoxie dargestellt. Die Primärzellspender PrEC_2, PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 wurden separat im Durchflusszytometer analysiert, jedoch in der Darstellung zu einem Mittelwert zusammengefasst. Der prozentuale Anteil nicht-apoptotischer Zellen liegt bei den Tumorzelllinien DU145 und PC3, sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie, bei über 80%. Demzufolge liegt der apoptotische Anteil in diesen beiden Zelllinien unter 20%. Die Primärzellen weisen über alle gemessenen Zeitwerte mehr als 70% nicht-apoptotische und weniger als 30%

apoptotische Zellen unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen auf. Der nekrotische Anteil liegt sowohl in den Tumorzellen als auch in den Primärzellen bei unter einem Prozent und wurde in der Darstellung nicht berücksichtigt. Das Verhältnis nicht-apoptotischer zu apoptotischer Zellen verändert sich unter hypoxischen Kulturbedingungen weder in den Tumorzelllinien DU145 und PC3, noch in den Primärzellen PrEC.

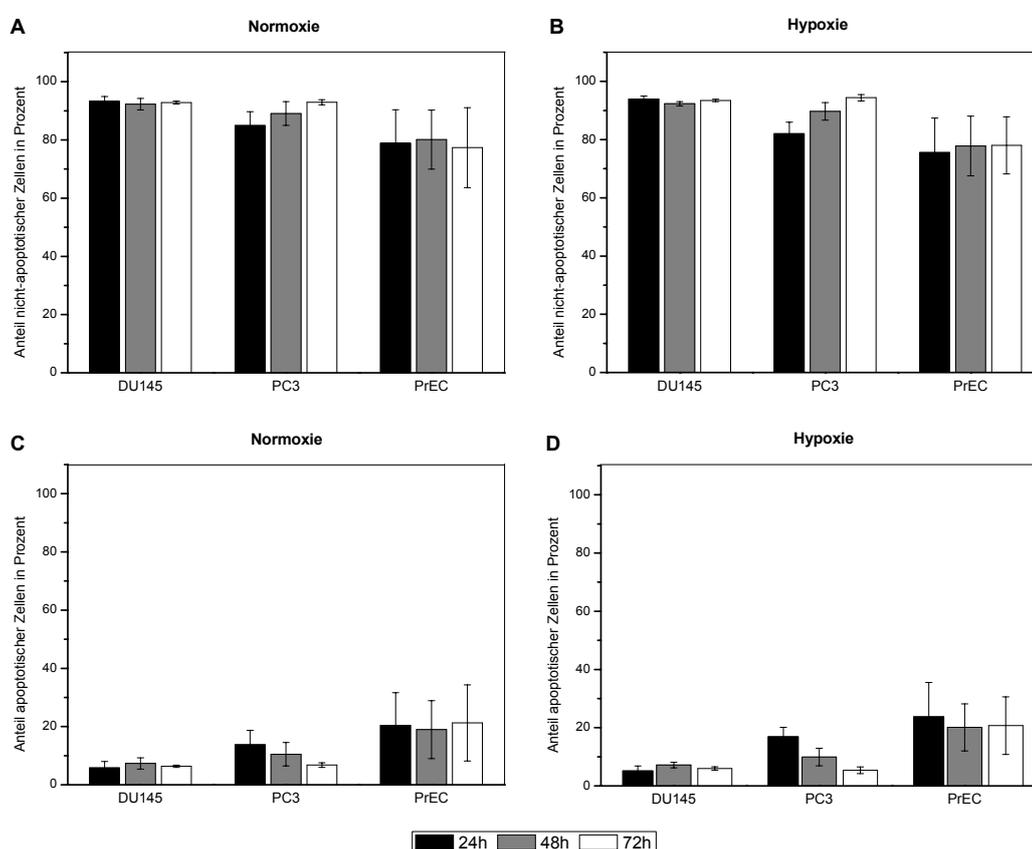


Abb. 3.6 Darstellung des prozentualen Anteils nicht-apoptotischer (A,B) und apoptotischer Zellen (C,D) in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3 und Prostata-Primärzellen PrEC (Mittelwert aus PrEC_2, PrEC_3 und PrEC_5) unter Normoxie und Hypoxie. Die prozentuale Verteilung bezieht sich auf die Gesamtpopulation einer Zellprobe unter normoxischen oder hypoxischen Kulturbedingungen. (N = 3; Annexin V – Propidiumjodid – Färbung)

3.2.6 Auswirkungen der Hypoxie auf den Zellzyklus von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen

Die Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte mittels einer Propidiumjodid-Färbung über die Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Zelle. Die Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1, sowie die Primärzellen PrEC_4 wurden in 3-fach Werten für je 24h, 48h und 72h unter Normoxie und Hypoxie kultiviert. Die Färbung der Zellen und anschließende Analyse im Durchflusszytometer erfolgt wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben.

Abbildung 3.7 zeigt die prozentuale Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Mehr als 60% der Tumorzellen LNCaP und 22RV1 (> 50%) als auch der Primärzellen PrEC_4 befinden sich in der G₀/G₁-Phase. In den Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 liegt der Anteil, der sich in der S-Phase befindenden Zellen bei 10% und bei den Primärzellen PrEC_4 bei 5%. In den drei getesteten Zellsystemen befinden sich jeweils 20% der Zellen in der G₂/M-Phase. In den durchgeführten Versuchen lag der Anteil von Zellen, die weniger als einen diploiden (subG₀/G₁, Apoptose) oder mehr als einen tetraploiden Chromosomensatz (polyploide Zellen) besitzen unterhalb von 10% und wurde in die Auswertung nicht miteinbezogen. Die prozentuale Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen entspricht der Verteilung in einer wachsenden Zellpopulation. Hypoxische Kulturbedingungen (1% O₂) führen nicht zu einer ausgeprägten Arretierung der Tumorzellen in einer spezifischen Zellzyklusphase. Bei den Primärzellen PrEC_4 fällt im Gegensatz zu den Tumorzelllinien auf, dass sich nach 72h Hypoxie, im Vergleich zur Normoxie, die Zahl der Zellen in der S-Phase um den Faktor 1,6, von 5,8 % auf 3,7 %, verringert. In Primärzellen ist somit eine Reduzierung der S-Phase Aktivität durch Hypoxie zu beobachten, welche jedoch nicht zu einem Zellzyklusarrest führt.

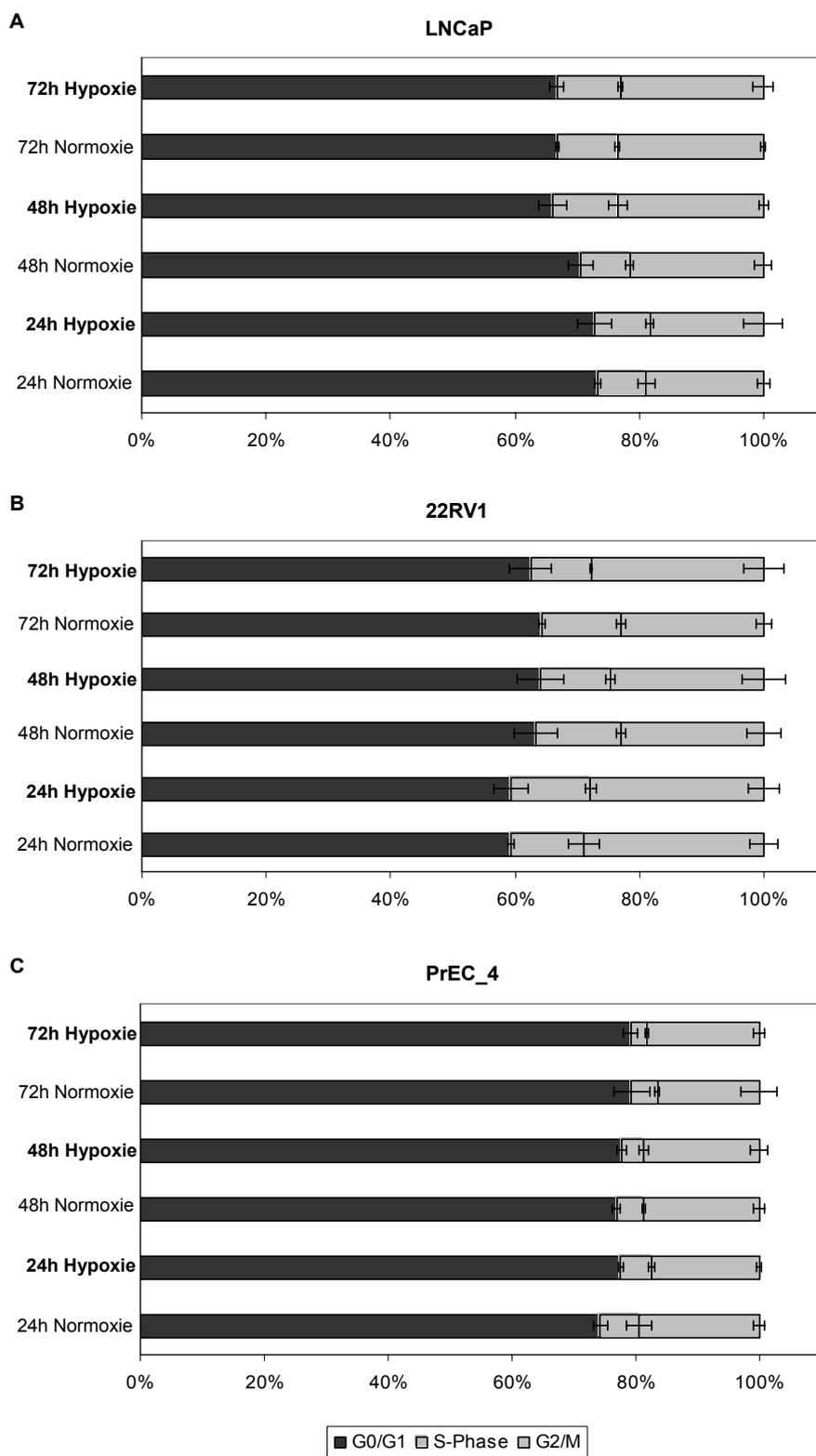


Abb. 3.7 Darstellung der prozentualen Verteilung von Zellen einer Gesamtpopulation auf unterschiedliche Stadien des Zellzyklus. Die Zellzyklusverteilung der Prostata-Tumorzelllinien LNCaP (A) und 22RV1 (B) sowie der Prostata-Primärzellen PrEC_4 (C) wurden unter Normoxie und Hypoxie untersucht. (N = 3; Propidiumjodid-Färbung)

3.3. Genexpressionsanalyse von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen unter Hypoxie

Hauptbestandteil dieser Arbeit ist die Identifizierung von Genen, welche unter hypoxischen Bedingungen in Tumorzellen reguliert werden und durch ihre veränderte Aktivität zu einem Überlebensvorteil der Tumorzellen gegenüber untransformierten Zellen unter Hypoxie beitragen könnten.

Die Verwendung der DNA-Microarray-Technologie ermöglichte die Erstellung vergleichender Genexpressionsprofile zwischen Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen sowie innerhalb der unterschiedlichen Tumorzelllinien und Primärzellspendern selbst. Die Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und die Primärzellen PrEC_2, PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 wurden unter normoxischen (21% O₂) und hypoxischen (1% O₂) Bedingungen in drei Wiederholungen kultiviert. Die Dauer der hypoxischen Kulturbedingungen umfasste 24h oder 48h. Als Kontrolle dienten Zellen, welche über den gleichen Zeitraum unter normoxischen Bedingungen wuchsen. Als Hypoxie-reguliert gelten im nachfolgenden Gene, deren Expression sich nach 48h hypoxischer Kultivierung um mehr als das 1,5-fache, positiv oder negativ, verändert hat (p-Wert $\leq 0,05$). Die Auswertung der Microarray Hybridisierung der zu untersuchenden Tumorzelllinien und Primärzellen erfolgte unter Berücksichtigung verschiedener biologischer Fragestellungen. Die erste Analyse beschäftigte sich mit dem Vergleich der Genexpressionsänderung von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen nach hypoxischer Kultivierung. In einer zweiten Analyse waren Gene von Interesse, die in allen Tumorzelllinien unter Hypoxie reguliert werden, ungeachtet ihrer Regulation in Primärzellen. Ebenfalls wurde der entgegengesetzte Fall, die Regulation in allen Primärzellspendern, unabhängig von der Regulation in Tumorzellen, untersucht. Darüber hinaus erfolgte in einer vierten Analyse die Betrachtung einer unterschiedlichen Expressionsänderung in Abhängigkeit des p53- und Androgenrezeptor-Status der Tumorzelllinien nach hypoxischer Inkubation. Es ergeben sich somit vier unterschiedliche thematische Analysen

hinsichtlich einer veränderten Genexpression unter Hypoxie in den gewählten Zellsystemen. Tabelle 3.3 zeigt eine Zusammenfassung der biologischen Fragestellungen. Die Ermittlung der in Tabelle 3.3 aufgezeigten Gengruppen und die funktionelle Klassifizierung nach ihren Genprodukten beinhaltete das Durchlaufen sich wiederholender Arbeitsabläufe, welche im Methodenteil unter Kapitel 2.2.3.5 beschrieben sind.

Tabelle 3.3 Biologische Fragestellungen zur Microarray Hybridisierung in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen nach hypoxischer Kultivierung. Die resultierenden Gengruppen sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet (I – VI).

Analyse	Kapitel	Beschreibung der identifizierten Expressionsgruppen (Gengruppen)
1	3.3.2	Vergleich der Genexpressionsänderung von Tumorzellen vs. Primärzellen Expressionsänderung unter Hypoxie: I. in Tumorzelllinien, nicht in Primärzellen II. in Primärzellen, nicht in Tumorzelllinien
2	3.3.3	III. Expressionsänderung unter Hypoxie in allen Tumorzelllinien
3	3.3.4	IV. Expressionsänderung unter Hypoxie in allen Primärzellspendern
4	3.3.5	Vergleich der Expressionsänderung von Androgen-abhängigen, p53-positiven vs. Androgen-unabhängigen, p53-negativen Tumorzellen unter Hypoxie: V. in Androgen-abhängigen, p53-positiven, aber nicht in Androgen-unabhängigen, p53-negativen Tumorzellen VI. in Androgen-unabhängigen, p53-negativen, aber nicht in Androgen-abhängigen, p53-positiven Tumorzellen

3.3.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Qualität der vorliegenden Microarray-Studie wurde mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (Principle component analysis, PCA) untersucht, welche in Kapitel 2.2.3.4. beschrieben wurde.

In Abbildung 3.8 ist die Hauptkomponentenanalyse der Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 sowie der vier verschiedenen Prostata-Primärzellspendern dargestellt. In Abbildung 3.8A zeigt sich eine deutliche Abgrenzung der verschiedenen Zelltypen voneinander. Die Behandlungswerte (Normoxie, Hypoxie) der Proben einer Zelllinie clustern zusammen, unterscheiden sich jedoch deutlich von den Proben der anderen Zelllinien / Primärzellen. Weiterhin liegen die Tumorzelllinien DU145 und PC3 dichter beieinander verglichen mit dem räumlichen Abstand zu den Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 als auch zu den Primärzellen. Die Primärzellen werden ebenfalls deutlich getrennt von den Tumorzelllinien im Raum dargestellt. Die Hauptkomponentenanalyse in Abbildung 3.8B zeigt die Tumorzelllinien mit einer farblichen Kennzeichnung von normoxisch und hypoxisch kultivierten Proben. Zum einen grenzen sich die Zelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 deutlich voneinander ab und zum anderen zeigt sich eine Verschiebung der Hypoxie behandelten Proben. Diese Veränderung wird jedoch erst nach Auftragung der vierten Komponente deutlich. Die durch Hypoxie ausgelöste Veränderung, verläuft in allen Zelllinien in die gleiche Richtung. Die PCA-Analyse der Primärzellspender, hinsichtlich ihrer normoxischen und hypoxischen Kultivierung, ist in Abbildung 3.8C dargestellt. Besonders auffällig ist die deutliche Abtrennung der Primärzellen PrEC_4 von den übrigen Primärzellspendern. Da die verwendeten Primärzellen von unterschiedlichen humanen Spendern stammen, ist diese Abgrenzung auf die damit verbundene genetische Varianz zurückzuführen. Die Veränderung der Genexpression unter Hypoxie zeigt sich auch bei den Primärzellen erst nach Auftragung der vierten Unterscheidungskomponente. Zusammenfassend zeigen sich eine sehr gute Abgrenzung der Zelllinien und Primärzellen nach ihren spezifischen Zelleigenschaften, sowie eine deutliche Beeinflussung der Genexpression auf Grund der hypoxischen Kulturbedingungen.

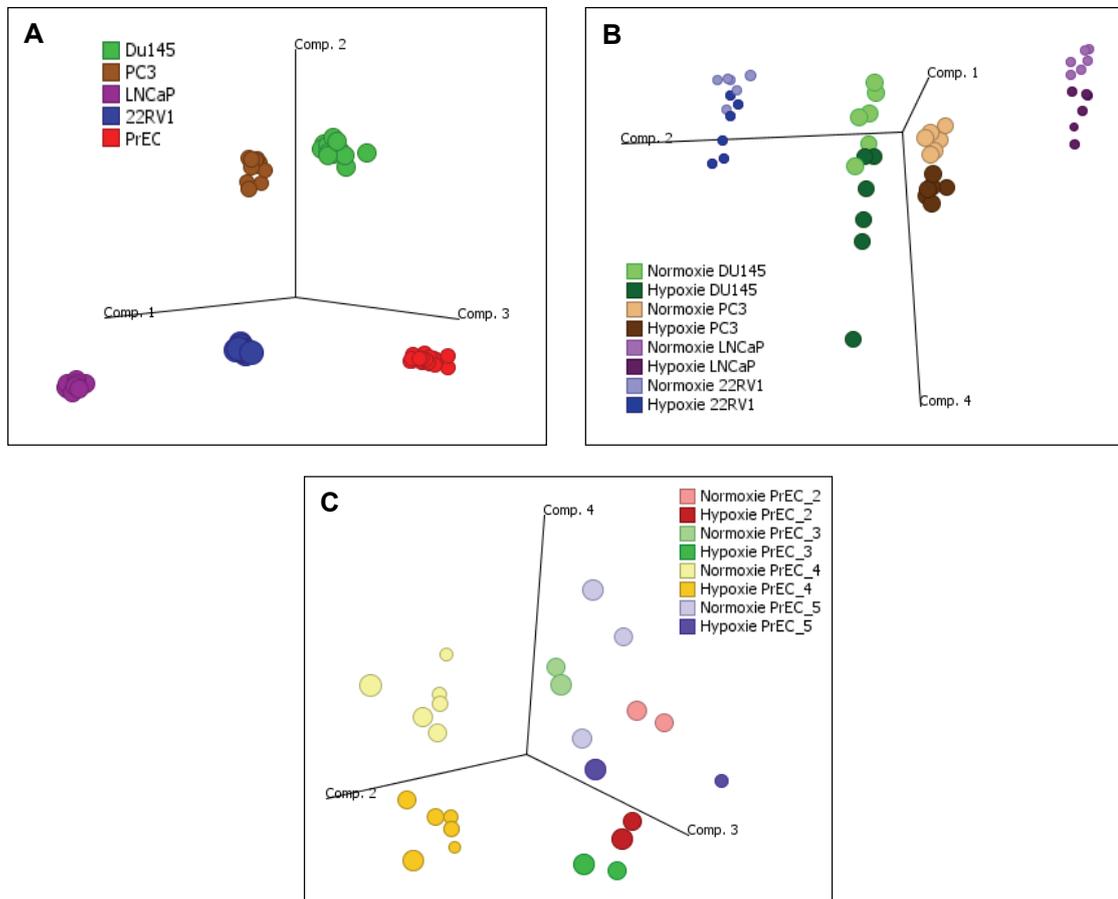


Abb. 3.8 Hauptkomponenten Analyse (Principle Component Analysis, PCA). Vergleich der Genexpression über alle behandelten Proben hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit bzw. ihrer Unterscheidungskraft. Je näher zwei Objekte zusammen liegen, desto stärker ähneln sie sich hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils (Kapitel 2.2.3.4.). A – Auftragung aller in der Microarray-Studie analysierten Tumor- und Primärzellen. B - Auftrennung der Prostata-Tumorzelllinien hinsichtlich Normoxie und Hypoxie behandelten Proben. C – Auftrennung der Prostata-Primärzellen unterschiedlicher humaner Spender nach Normoxie oder Hypoxie.

3.3.2 Vergleich der Genexpressionsänderung in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen nach hypoxischer Kultivierung

Das Hauptanliegen dieser Genexpressionsstudie besteht darin Gene zu identifizieren, welche in den Tumorzellen durch hypoxische Bedingungen in ihrer Expression verändert werden, aber keine oder eine entgegengesetzte Veränderung in untransformierten Zellen aufweisen (Gengruppe I, siehe Tabelle 3.3).

Nach der unter Abschnitt 2.2.3.4 beschriebenen Validitäts- und Signifikanzprüfungen der Proben von Tumorzelllinien und Primärzellen stehen 338 Probe Sets (Gene) zur Verfügung, die nach 48h Hypoxie um mehr als das 1,5-fache, positiv oder negativ, reguliert werden ($p \leq 0,05$). Interessanterweise werden durch hypoxische Kulturbedingungen deutlich mehr Gene in ihrer Expression induziert als reprimiert (Tabelle 3.4). In den Tumorzelllinien DU145, LNCaP und den Primärzellen werden mehr als 70% der regulierten Gene induziert und 30% in ihrer Expression reduziert. In der Tumorzelllinie 22RV1 werden lediglich 20% und in PC3 10% der regulierten Gene reprimiert. Auffallend ist ebenfalls, dass in den Tumorzelllinien DU145 und PC3 mehr als 100 Gene durch Hypoxie beeinflusst werden, in LNCaP dagegen nur 47 und in 22RV1 18 Gene. In den Primärzellen werden insgesamt 90 Gene durch hypoxische Kulturbedingungen beeinflusst.

Tabelle 3.4 Anzahl der Hypoxie-regulierten Probe Sets (Gene) für jeden Zelltyp nach dem Vergleich 48h Normoxie vs. 48h Hypoxie (n-fache Veränderung > 1,5; $p \leq 0,05$)

Analyse	Expressionsinduktion	Expressionsrepression
DU145 48h Normoxie vs. 48h Hypoxie	91	39
PC3 48h Normoxie vs. 48h Hypoxie	102	15
LNCaP 48h Normoxie vs. 48h Hypoxie	35	12
22RV1 48h Normoxie vs. 48h Hypoxie	14	4
PrEC 48h Normoxie vs. 48h Hypoxie	67	23

3.3.2.1. Genexpressionsänderung *nur* in Prostata-Tumorzelllinien unter Hypoxie (Gengruppe I)

Für den Vergleich der Prostata-Tumorzelllinien mit den Prostata-Primärzellspendern wurden folgende Kriterien aufgestellt. Ein Gen (Probe Set) gilt als in Tumorzellen reguliert, wenn sich seine Expression in 3 von 4 Tumorzelllinien in die gleiche Richtung verändert und in 3 von 4 Primärzellspendern nicht oder in die entgegengesetzte Richtung reguliert wird. Die n-fache Veränderung ist größer als 1,5 mit einer Signifikanz von $p \leq 0,05$. Diese Kriterien erfüllten, von den ursprünglichen 338 Probe Sets, insgesamt 23 Gene, wovon 22 hochreguliert und 1 Gen herunterreguliert wird. In Tabelle 3.5 ist die n-fache Änderung der identifizierten Gene zum Zeitpunkt 48h Hypoxie dargestellt (3.5a induzierte Gene, 3.5b reprimierte Gene).

Die funktionelle Analyse der Gene weist den Hauptteil der Gene, deren Expression durch Hypoxie induziert wird, dem Kohlenhydratmetabolismus zu. Dazu gehören unter anderem die Enzyme Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI) und Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1). In einer weiteren funktionellen Gruppe wurden Gene zusammengefasst, deren induzierte Expression zur Inhibierung des Zellwachstums beitragen (BNIP3L, C3orf28, BTG1). Eine dritte funktionelle Gruppe, deren Expression induziert wird, fördert wiederum das Überleben von Zellen (VEGF, SOX4, Redd1). Darüber hinaus ist die Induktion von Genen zu beobachten, welche eine bedeutende funktionelle Rolle in der HIF-1 α Signalkaskade spielen (P4HA2, EGLN1). Die abschließende funktionelle Gruppe in Tabelle 3.5a enthält Gene, die keiner der oben erwähnten funktionellen Gruppen zugeordnet werden konnten. Das einzige, in dieser Gengruppe herunterregulierte Gen, ist der Aminosäuretransporter SLC7A11 (solute carrier family 7, [cationic amino acid transporter] member 11). Von den in dieser Gengruppe identifizierten Genen wurden 11 bisher in der Literatur nicht als Hypoxie-reguliert in Prostata-Tumoren beschrieben.

Tabelle 3.5a N-fache Änderung der Gene, deren Expression in drei von vier Prostata-Tumorzelllinien nach 48h Hypoxie *induziert* wird, aber keine oder eine entgegengesetzte Regulation in drei von vier Prostata-Primärzellspendern aufweist ($p \leq 0,05$). Die n-fache Änderung ergibt sich aus dem Verhältnis von Zellen die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden zu Zellen, welche unter Hypoxie wuchsen. Eine Expressionsänderung um den Faktor 1,5 entspricht einer Expressionsinduktion (grün), wo hingegen die Änderung um den Faktor -1,5 eine Repression der Expression bedeutet (rot). Werden mehr als eine Expressionsänderung pro Gen dargestellt, waren mehrere Probe Sets für ein Gen auf dem Microarray Chip vorhanden. Gene, welche mit dem Symbol * gekennzeichnet sind, wurden bisher in der Literatur nicht als Hypoxie-reguliert beschrieben. Die Einteilung der identifizierten Gene erfolgte hinsichtlich der beschriebenen Funktion ihrer Genprodukte. (Gengruppe I; gelb = keine Expressionsänderung -1,5 – 1,5; Ø = Probe Set erfüllt Validitätskriterien nicht)

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie								beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		DU145	PC3	LNCaP	22RV1	PrEC_2	PrEC_3	PrEC_4	PrEC_5	
Metabolismus /Glykolyse										
SLC16A3	solute carrier family 16 member 3 (monocarboxylic acid transporters), (202856_s_at; 202855_s_at)	1,65	2,69	Ø	5,17	1,33	1,34	1,34	1,67	Induktion (56)
		1,69	2,82	Ø	3,26	1,13	1,07	1,48	1,08	
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (226452_at)	2,47	4,72	4,77	3,63	1,43	1,48	1,46	2,04	Induktion (57)
PGM1	phosphoglucomutase 1 (201968_s_at)	1,54	1,59	2,30	1,68	1,16	1,31	1,26	1,30	Reduktion (Mais) (58)
PGK1	phosphoglycerate kinase 1 (217356_s_at)	2,30	2,28	2,61	2,30	1,43	1,25	1,40	1,51	Induktion (59)
GPI	glucose phosphate isomerase (208308_s_at)	1,65	1,65	1,74	1,42	1,23	1,36	1,36	1,14	Induktion (60)
Wachstumshinhibition, pro-apoptotisch										
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like (221478_at)	1,78	2,79	3,47	4,10	1,41	1,47	1,49	1,64	Induktion (61)
C3orf28	Chromosome 3 open reading frame 28 (223193_x_at; 224345_x_at)	2,35	2,31	1,40	1,67	1,29	1,54	1,36	1,25	Induktion (62)
		2,15	2,38	1,35	1,63	1,34	1,31	1,32	1,26	
BTG1*	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative (200920_s_at)	2,07	1,57	1,49	1,64	1,49	1,46	1,71	1,49	Induktion (Carassius auratus) (63)

Fortsetzung auf Seite 59

Angiogenese, anti-apoptotisch, Proliferation

VEGF	Vascular endothelial growth factor (212171_x_at)	2,22	1,85	1,90	1,91	1,47	1,48	1,80	1,49	Induktion (5, 64)
SOX4*	SRY (sex determining region Y)-box 4 (201416_at)	2,07	1,57	3,71	2,19	1,27	1,41	1,28	1,42	mRNA Induktion in vaskulären Endothelzellen, nicht validiert (65)
Redd1	DNA-damage-inducible transcript 4 (202887_s_at)	2,92	6,12	1,64	7,81	1,56	1,45	1,40	1,40	Induktion (55)

HIF-1 α Signaltransduktion

P4HA2	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II (202733_at)	1,79	2,52	2,63	2,32	1,02	1,36	1,33	1,34	Induktion (66)
EGLN1	Egl nine homolog 1 (C, elegans); Prolyl 4-hydroxylase alpha (221497_x_at)	1,13	2,86	2,61	1,71	1,48	1,31	1,36	1,33	Induktion (67)

sonstige / unbekannte Funktion

WSB1*	WD repeat and SOCS box-containing 1 (210561_s_at)	1,63	1,93	1,38	1,60	1,26	1,26	1,19	-1,07	
AK3L1	Adenylate kinase 3-like 1 (225342_at)	1,71	2,80	1,92	1,97	1,21	1,20	1,17	-1,03	Induktion (68)
NARF*	Nuclear prelamin A recognition factor (219862_s_at)	1,96	1,45	1,91	1,87	1,32	1,59	1,44	1,30	
LOC401152*	HCV F-transactivated protein 1 (224602_at)	2,20	2,31	2,18	1,84	1,25	1,47	1,35	1,57	
WDR54*	WD repeat domain 54 (225898_at)	2,46	1,76	1,73	2,42	1,11	1,72	1,32	1,06	
SEC24C*	SEC24 related gene family, member C (S, cerevisiae) (238551_at)	2,07	3,80	4,55	2,23	1,32	1,44	1,22	1,56	
FLJ41603*	FLJ41603 protein (227717_at)	2,20	1,51	2,05	1,13	1,12	-1,04	1,08	1,00	
ZNF654*	Zinc finger protein 654 (219239_s_at)	1,31	1,85	1,59	1,52	-1,22	1,19	1,10	1,06	
EIF2C4*	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 4 (227930_at)	1,30	1,92	1,84	1,51	-1,04	1,33	1,20	1,42	

Tabelle 3.5b N-fache Änderung der Gene, deren Expression in mindestens drei von vier Prostata-Tumorzelllinien nach 48h Hypoxie *reprimiert* wird, aber keine oder eine entgegengesetzte Regulation in mindestens drei von vier Prostata-Primärzellspendern aufweist. Nähere Erläuterungen siehe Tabelle 3.5a.

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie								beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		Du145	PC3	LNCaP	22RV1	PrEC_2	PrEC_3	PrEC_4	PrEC_5	
SLC7A11*	Solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11 (209921_at)	-1,79	-1,37	-1,64	-2,08	-1,27	-1,48	-1,87	1,19	

3.3.2.2. Genexpressionsänderung *nur* in Prostata-Primärzellen (Gengruppe II)

Bei der vergleichenden Betrachtung der Hypoxie-bedingten Genexpressionsänderung von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen entstand neben der oben besprochenen Gengruppe I eine zweite Gruppe. In dieser Gengruppe II (siehe Tabelle 3.3) werden die Gene dargestellt, deren Expression sich in mindestens drei von vier Prostata-Primärzellspendern nach 48h Hypoxie um mehr als den Faktor 1,5 verändert, aber keine oder eine entgegengesetzte Regulation in mindestens drei von vier Prostata-Tumorzelllinien zeigt. Diese Bedingungen erfüllten insgesamt 11 Probe Sets, wovon 5 Probe Sets eine hochregulierte und 6 eine herunterregulierte Genexpression aufweisen. In Tabelle 3.6a und 3.6b werden die ermittelten induzierten als auch reprimierten Gene dargestellt und nach ihrer biologischen Funktion unterteilt. Die Hypoxie-induzierten Gene (Tabelle 3.6a) KLF11 (Krüppel-like factor 11) und ETS2 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 [avian]) bewirken beide eine Inhibierung der Zellproliferation und wurden zu einer funktionellen Gruppe zusammengefasst. Die weiterhin in dieser Gengruppe identifizierten Hypoxie-induzierten Gene besitzen sehr unterschiedliche zelluläre Funktionen. Dies ermöglichte keine weitere funktionelle Unterteilung der Gene GPRC5A (G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A), GALNT1 (G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A) und FAM46A (Family with sequence similarity 46, member A). In Tabelle 3.6b sind die Gene zusammengefasst, die in Primärzellen nach 48h hypoxischer Kultivierung in ihrer Expression um mehr als das 1,5-fache reprimiert werden, aber keine oder eine entgegengesetzte Regulation in Prostata-Tumorzellen zeigen. Die Gene CPT1A (Carnitine palmitoyltransferase 1A [liver]) und LIAS (Lipoic acid synthetase) wurden zu einer funktionellen Gruppe zusammengefasst, da beide Gene funktionelle Bedeutung im Lipidmetabolismus zukommt. Des Weiteren wird die Genexpression der Ubiquinol-Cytochrom C Reduktase (UCRC/HSPC051, ubiquinol-cytochrome C reductase complex) durch hypoxische Kulturbedingungen differenziell in

Prostata-Primär- und Tumorzellen inhibiert. Da die UCRC eine Schlüsselrolle im mitochondrialen Elektronentransport einnimmt, ist sie als separate funktionelle Gruppe aufgeführt. Die Gene IFI30 (Interferon, gamma-inducible protein 30), FSHPRH1 (FSH primary response 1) und TFRC (Transferrin receptor [p90, CD71]) werden ebenfalls im Vergleich Prostata-Primärzellen vs. Prostata-Tumorzellen ausschließlich in den Primärzellen herunterreguliert. Acht der in Gengruppe II ermittelten Gene wurden bisher in der Literatur nicht als Hypoxie-reguliert beschrieben.

Tabelle 3.6a N-fache Änderung der Gene, deren Expression in mindestens drei von vier Prostata-Primärzellspendern nach 48h Hypoxie *induziert* wird, aber keine Regulation oder eine entgegengesetzte Regulation in mindestens drei von vier Prostata-Tumorzelllinien aufweist ($p \leq 0,05$). Die n-fache Änderung ergibt sich aus dem Verhältnis von Zellen die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden zu Zellen, welche unter Hypoxie wuchsen. Eine Expressionsänderung um den Faktor 1,5 entspricht einer Expressionsinduktion (grün), wo hingegen die Änderung um den Faktor -1,5 eine Repression der Expression bedeutet (rot). Werden mehr als eine Expressionsänderung pro Gen dargestellt, waren mehrere Probe Sets für ein Gen auf dem Microarray Chip vorhanden. Gene, welche mit dem Symbol * gekennzeichnet sind, wurden bisher in der Literatur nicht als Hypoxie-reguliert beschrieben. Die Einteilung der identifizierten Gene erfolgte hinsichtlich der beschriebenen Funktion ihrer Genprodukte. (Gengruppe II; gelb = keine Expressionsänderung -1,5 – 1,5; Ø = Probe Set erfüllt Validitätskriterien nicht)

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie								beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		DU145	PC3	LNCaP	22RV1	PrEC_2	PrEC_3	PrEC_4	PrEC_5	
Inhibierung des Zellwachstums										
KLF11*	Kruppel-like factor 11 (218486_at)	1,12	1,51	1,37	1,27	1,99	1,52	1,50	1,64	
ETS2*	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian) (201328_at; 201329_s_at)	-1,10	1,09	Ø	1,23	1,80	1,53	1,83	1,45	
		-1,13	-1,13	Ø	1,07	1,66	1,20	1,52	1,64	
Sonstige / unbekannte Funktion										
GPRC5A*	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A (212444_at)	1,47	1,63	Ø	-1,10	2,03	1,72	1,92	2,19	
GALNT1*	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1); (1568618_a_at)	1,05	1,01	-1,07	1,10	1,60	1,54	1,67	1,32	
FAM46A*	Family with sequence similarity 46, member A (224973_at)	-1,12	1,67	Ø	-1,07	3,54	1,43	2,04	1,68	

Tabelle 3.6b N-fache Änderung der Gene, deren Expression in mindestens drei von vier Prostata-Primärzellspendern nach 48h Hypoxie *reprimiert* wird, aber keine oder eine entgegengesetzte Regulation in mindestens drei von vier Prostata-Tumorzelllinien aufweist. Nähere Erläuterungen siehe Tabelle 3.6a.

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie								beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		DU145	PC3	LNCaP	22RV1	PrEC_2	PrEC_3	PrEC_4	PrEC_5	
Lipidmetabolismus										
CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver) (203633_at)	-2,07	-1,47	-1,49	-1,20	-2,17	-1,59	-2,04	-2,52	Gesteigerte Enzymaktivität (Herzmuskelzellen) (69)
LIAS*	Lipoic acid synthetase(214045_at)	-1,65	-1,28	-1,45	-1,17	-1,60	-1,55	-1,51	-1,40	
Mitochondrialer Elektronentransport										
HSPC051*	ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD) (228142_at)	-1,26	-1,08	-1,10	-1,23	-1,61	-1,44	-1,50	-1,80	
Sonstige / unbekannte Funktion										
IFI30*	Interferon, gamma-inducible protein 30 (201422_at)	1,04	-1,61	Ø	-1,11	-2,57	-1,82	-1,51	-2,15	
FSHPRH1	FSH primary response (LRPR1 homolog, rat) 1(207590_s_at)	-1,42	1,07	1,06	-1,52	-1,58	-1,60	-1,45	-1,91	
TFRC	Transferrin receptor (p90, CD71) (208691_at; 237215_s_at)	-1,41	-1,02	-1,05	1,01	-1,36	-1,77	-1,65	-1,86	Induktion (70)
		-2,47	1,10	-1,08	1,40	-1,31	-2,71	-1,67	-2,58	

3.3.3 Änderung der Genexpression von Prostata-Tumorzelllinien unter Hypoxie (Gengruppe III)

Eine weitere Aufgabe dieser Genexpressionsstudie besteht darin Gene zu identifizieren, welche in allen Prostata-Tumorzelllinien gleich reguliert werden, unabhängig von ihrer Regulation in Prostata-Primärzellen (Gengruppe III siehe Tabelle 3.3). Gene, die in dieser Gruppe zusammengefasst werden, zeigen in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 eine Veränderung ihrer Expression in die gleiche Richtung um mindestens den Faktor 1,5 ($p < 0,05$). Diese Eigenschaften erfüllten insgesamt 29 Gene, wovon alle 29 Gene unter Hypoxie in ihrer Expression induziert werden. Es gibt keine Gene in dieser Analyse, welche unter hypoxischen Bedingungen in allen Prostata-Tumorzelllinien in ihrer Expression gehemmt werden. Die ermittelten Gene stellen keine echte Teilmenge der Gengruppe I dar. Jedoch gibt es auf Grund der Auswahlparameter Überlappungen, so dass Gene sowohl in Gruppe I als auch Gruppe II auftreten.

In Tabelle 3.7 ist die n-fache Änderung der identifizierten Gene dargestellt. Außerdem werden die ermittelten Gene, nach ihrer biologischen Funktion unterteilt. Die größte funktionelle Gruppe bilden Gene, welche wichtige Funktionen im Kohlenhydratmetabolismus ausüben. Wichtige regulatorische und energiebildende Enzyme der Glykolyse, wie zum Beispiel die Hexokinase (HK2), Glucosephosphat-Isomerase (GPI), Phosphofruktokinase (PFKFB4, PFKFB3) und die Phosphoglycerat-Kinase (PGK1) werden in ihrer Genexpression um mehr als das 1,5-fache induziert. Weiterhin umfasst diese funktionelle Gruppe die Gene Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK1), Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1), „Glycogen branching enzyme 1“ (GBE1) sowie die Phosphoglucomutase 1 (PGM1). In einer zweiten Gruppe werden die funktionell identischen Gene BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3) und BNIP3L (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like) als pro-apoptotisch wirkende Gene zusammengefasst. Zur Inhibierung des Zellwachstums

tragen ebenfalls die Induktion von Redd1 (DNA-damage-inducible transcript 4) und SOX4 (SRY [sex determining region Y]-box 4) bei. Die dritte funktionelle Gruppe bilden Gene, welche eine wichtige Rolle in der HIF-1 α Signaltransduktion zeigen. So werden unter anderem die Prolyl-Hydroxylasen P4HA1 (Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase, alpha polypeptide I) und P4HA2 (Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase, alpha polypeptide II) in allen Tumorzelllinien durch Hypoxie induziert. In den beiden letzteren Gruppierungen von Tabelle 3.7 wurden zum einen Gene zusammengefasst, die funktionell nicht zu den beschriebenen Gruppen passen oder deren zelluläre Bedeutung bisher unbekannt ist. Neun der 29 identifizierten Gene wurden bisher in keinem Hypoxie Kontext in der Literatur erwähnt.

Tabelle 3.7 N-fache Änderung der Gene, deren Expression in allen zu untersuchenden Prostata-Tumorzelllinien nach 48h Hypoxie induziert wird ($p \leq 0,05$). Die n-fache Änderung ergibt sich aus dem Verhältnis von Zellen die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden zu Zellen, welche unter Hypoxie wuchsen. Eine Expressionsänderung um den Faktor 1,5 entspricht einer Expressionsinduktion (grün). Werden mehr als eine Expressionsänderung pro Gen dargestellt, waren mehrere Probe Sets für ein Gen auf dem Microarray Chip vorhanden. Gene, welche mit dem Symbol * gekennzeichnet sind, wurden bisher in der Literatur nicht als Hypoxie-reguliert beschrieben. Die Einteilung der identifizierten Gene erfolgte hinsichtlich der beschriebenen Funktion ihrer Genprodukte. (Gengruppe III)

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie				beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		DU145	PC3	LNCaP	22RV1	
Intermediärstoffwechsel /Glykolyse						
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 (228499_at)	3,57	5,38	7,02	2,94	Induktion (71)
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (202464_s_at)	1,93	3,83	4,22	3,33	Induktion (71)
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (226452_at)	2,47	4,72	4,77	3,63	Induktion(57)
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1 (227068_at; 217356_s_at; 200737_at)	2,66	3,23	4,40	2,55	Induktion (59)
		2,30	2,28	2,61	2,30	
		2,52	3,21	3,96	2,75	
GBE1	Glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1 (glycogen branching enzyme, Andersen disease, glycogen storage disease type IV); (203282_at)	1,95	2,29	2,03	1,79	Induktion (72)
HK2	Hexokinase 2 (202934_at)	2,04	1,70	2,18	1,86	Induktion (73)
PGM1	Phosphoglucomutase 1 (201968_s_at)	1,54	1,59	2,30	1,68	Reduktion (Mais) (58)
GPI	Glucose phosphate isomerase (208308_s_at)	1,65	1,65	1,74	1,42	Induktion (60)
Wachstumshinhibition, pro-apoptotisch						
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 (201848_s_at; 201849_at)	2,34	5,90	5,14	7,64	Induktion (61)
		1,74	3,56	2,76	5,55	
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like (221479_s_at; 221478_at)	1,90	2,83	3,62	4,87	Induktion (61)
		1,78	2,79	3,47	4,10	
Redd1	DNA-damage-inducible transcript 4 (202887_s_at)	2,92	6,12	1,64	7,81	Induktion(55)
SOX4*	SRY (sex determining region Y)-box 4 (201416_at)	2,07	1,56	4,59	3,08	s. Tabelle 3.5a (65)

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 3.7 Fortsetzung

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie				beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		DU145	PC3	LNCaP	22RV1	
HIF-1α Signaltransduktion						
P4HA1	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I (207543_s_at)	2,42	2,55	4,47	2,83	Induktion(66)
P4HA2	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II (202733_at)	1,79	2,52	2,63	2,32	Induktion (66)
Sonstige Funktion						
AK3L1	Adenylate kinase 3-like 1 (225342_at; 204348_s_at)	1,71 1,48	2,80 3,15	1,92 1,95	1,97 1,50	Induktion (68)
KISS1R*	KISS1 receptor (242517_at)	8,62	4,05	12,99	2,82	
STC2	Stanniocalcin 2 (203438_at)	2,37	3,35	1,49	1,74	Aktivierung (74)
SEC24C*	SEC24 related gene family, member C (S. cerevisiae) (226348_at; 238551_at; 226347_at)	2,94 2,07	3,86 3,80	4,73 4,55	2,91 2,23	
ADM	Adrenomedullin (202912_at)	3,64	5,54	1,53	1,51	Induktion (75)
JMJD1A	Jumonji domain containing 1A (212689_s_at)	2,10	2,39	3,48	2,87	Induktion (76)
FBXO16*	F-box protein 16 (223216_x_at)	2,98	2,99	2,63	1,78	
PLOD1	Procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 (200827_at)	1,78	1,76	2,86	1,63	Induktion (66)
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1 (200632_s_at)	7,80	8,59	8,21	2,36	Induktion (77)
NARF*	Nuclear prelamin A recognition factor(219862_s_at)	1,96	1,45	1,91	1,87	
Unbekannte Funktion						
TMEM45A	Transmembrane protein 45A (219410_at)	3,86	5,32	8,13	1,96	Induktion (78)
LOC401152*	HCV F-transactivated protein 1 (224604_at; 224602_at)	2,70 2,20	2,70 2,31	2,24 2,18	1,97 1,84	
WDR54*	WD repeat domain 54 (225898_at)	2,46	1,76	1,73	2,42	
FAM80A*	Family with sequence similarity 80, member A (235948_at)	2,02	2,18	1,85	1,88	
OBSL1*	Obscurin-like 1 (212775_at)	1,46	1,81	1,76	1,54	

3.3.4 Änderung der Genexpression von Prostata-Primärzellen unter Hypoxie (Gengruppe IV)

Die dritte biologische Fragestellung führt zur Identifizierung von Genen, die in allen Prostata-Primärzellspendern in die gleiche Richtung reguliert sind, ungeachtet ihrer Regulation in Prostata-Tumorzelllinien (Gengruppe IV siehe Tabelle 3.3). Für diese Analyse gelten Gene als in allen Primärzellspendern reguliert, wenn ihre Expressionsänderung in 3 von 4 Primärzellspendern auftritt. Diese Einschränkung dient zur Berücksichtigung der Spendervarianz der Prostata-Primärzellen. Darüber hinaus verändert sich die Genexpression um mindestens den Faktor 1,5 in positiver oder negativer Richtung ($p < 0,05$). Diese Kriterien erfüllten insgesamt 49 Gene, von denen 36 in ihrer Genexpression durch Hypoxie induziert werden und 13 Gene eine Reduktion ihrer Expression durch die gewählten Bedingungen erfahren. Gene, die in dieser Gengruppe erscheinen, können auf Grund der Analysekriterien auch in der Gengruppe II erscheinen. Dennoch ist Gengruppe IV keine echte Teilmenge der Gengruppe II.

In Tabelle 3.8 werden die n-fache Regulation und die funktionelle Unterteilung der identifizierten Gene dargestellt. Tabelle 3.8a zeigt die Gene, deren Expression sich nach 48h hypoxischer Kultivierung um mehr als das 1,5-fache erhöht. Die größte funktionelle Gruppe bilden in Prostata-Primärzellen Gene, die durch ihre induzierte Genexpression unter Hypoxie zu einer verstärkten Inhibierung des Zellwachstums und zur Apoptose-Auslösung führen können. Dazu gehören zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren ETS2 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 [avian]), FOSL2 (FOS-like antigen 2) und FOS (v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog). Weitere Gene, welche zur Inhibierung des Zellwachstums führen sind KLF11 (Kruppel-like factor 11), KISS1R (KISS1 receptor), KCTD11 (Potassium channel tetramerisation domain containing 11), NDRG1 (N-myc downstream regulated gene 1), TXNIP (Thioredoxin interacting protein) und ERO1L (ERO1-like [S.

cerevisiae]). Im Gegensatz zu den beschriebenen Genen werden ebenfalls Gene induziert, die auf unterschiedlichen funktionellen Wegen, zum Überleben einer Zelle beitragen. Dazu zählen die Gene CA9 (Carbonic anhydrase IX), ANG (Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5) und PIM-1 (PIM-1 oncogene). Funktionelle Bedeutung im Kohlenhydratmetabolismus besitzen die Gene PGK1 (Phosphoglycerate kinase 1) und ALDOC (Aldolase C, fructose-bisphosphate), welche durch Hypoxie induziert und zu einer funktionellen Gruppe zusammengefasst werden. Weiterhin werden die Prolyl-Hydroxylasen EGLN3 (Egl nine homolog 3 [C. elegans]) und EGLN1 (Egl nine homolog 1 [C. elegans]) durch hypoxische Bedingungen induziert und bilden eine funktionelle Gruppe.

Tabelle 3.8b zeigt die in dieser Gruppe herunterregulierten Gene und ihre funktionelle Bedeutung. Die erste funktionelle Gruppe beinhaltet die Gene CPT1A (Carnitine palmitoyltransferase 1A [liver]), MVD (Mevalonate [diphospho] decarboxylase) und LIAS (Lipoic acid synthetase). Diese Gene besitzen Schlüsselfunktionen innerhalb des Lipidmetabolismus. In einer weiteren funktionellen Gruppe werden die Enzyme NQO1 (NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1) und UCRC / HSPC051 (Ubiquinol-cytochrome c reductase complex) zusammengefasst, da sie wichtige regulatorische Bedeutung innerhalb des mitochondrialen Elektronentransports besitzen. Die unter Zelldifferenzierung zusammengefassten Gene NRG1 (Neuregulin 1) und EREG (Epiregulin) spielen insbesondere bei der epithelialen Zellproliferation und Zelldifferenzierung eine funktionelle Rolle. Von den in dieser Gengruppe identifizierten Genen wurden 28 Gene bisher in der Literatur nicht als durch hypoxische Bedingungen reguliert beschrieben.

Tabelle 3.8a N-fache Änderung der Gene, deren Expression in mindestens drei von vier Prostata-Primärzellspendern nach 48h Hypoxie *induziert* wird ($p \leq 0,05$). Die n-fache Änderung ergibt sich aus dem Verhältnis von Zellen die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden zu Zellen, welche unter Hypoxie wuchsen. Eine Expressionsänderung um den Faktor 1,5 entspricht einer Expressionsinduktion (grün). Werden mehr als eine Expressionsänderung pro Gen dargestellt, waren mehrere Probe Sets für ein Gen auf dem Microarray Chip vorhanden. Gene, welche mit dem Symbol * gekennzeichnet sind, wurden bisher in der Literatur nicht als Hypoxie-reguliert beschrieben. Die Einteilung der identifizierten Gene erfolgte hinsichtlich der beschriebenen Funktion ihrer Genprodukte. (Gengruppe IV; gelb = keine Expressionsänderung -1,5 – 1,5; Ø = Probe Set erfüllt Validitätskriterien nicht)

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie				beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		PrEC_2	PrEC_3	PrEC_4	PrEC_5	
Inhibierung des Zellwachstums						
ETS2*	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian) (201328_at; 201329_s_at)	1,80 1,66	1,53 1,20	1,83 1,52	1,45 1,64	
FOSL2*	FOS-like antigen 2 (228188_at)	1,18	1,94	1,68	1,69	
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (209189_at)	1,85	2,01	2,15	1,67	Induktion (79)
KLF11*	Kruppel-like factor 11 (218486_at)	1,99	1,52	1,50	1,64	
KISS1R*	KISS1 receptor (242517_at)	2,52	Ø	2,45	4,18	
KCTD11*	Potassium channel tetramerisation domain containing 11 (235857_at)	1,33	1,92	2,27	2,13	
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1 (200632_s_at; 240991_at)	2,16 3,10	2,29 2,02	2,92 Ø	2,56 2,70	Induktion (80)
TXNIP	Thioredoxin interacting protein (201008_s_at; 201009_s_at; 201010_s_at)	2,21 2,66 2,56	2,77 2,86 2,54	2,06 2,23 1,96	1,84 1,92 1,58	Induktion (81, 82)
ERO1L	ERO1-like (S. cerevisiae) (218498_s_at)	1,39	1,54	1,82	1,52	Induktion (83)
Angiogenese, Proliferation, Sicherung des Überlebens						
CA9	Carbonic anhydrase IX (205199_at)	5,52	10,95	7,79	6,77	Induktion (84)
ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 (213397_x_at)	2,44	1,61	2,03	2,00	Induktion (85)
PIM1	Pim-1 oncogene (209193_at)	1,96	2,09	1,68	1,56	Induktion (86)
Intermediärstoffwechsel / Glykolyse						
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1 (200737_at)	1,75	1,65	1,55	2,14	Induktion (59)
ALDOC	Aldolase C, fructose-bisphosphate (202022_at)	1,89	1,96	1,97	1,88	Induktion (87)

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 3.8a Fortsetzung

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie				beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		PrEC_2	PrEC_3	PrEC_4	PrEC_5	
HIF-1α Signaltransduktion						
EGLN3	Egl nine homolog 3 (C. elegans) (219232_s_at; 222847_s_at)	2,38	3,76	3,44	2,26	Induktion (88)
		2,44		3,32	2,91	
EGLN1	Egl nine homolog 1 (C. elegans); HIF-Prolyl hydroxylase 2 (224314_s_at)	2,03	1,85	1,39	1,52	Induktion (89)
Sonstige Funktion						
LOXL2	Lysyl oxidase-like 2 (202998_s_at)	1,52	3,87	2,33	2,64	Induktion (90)
PPP1R3C*	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C (204284_at)	2,12	2,45	2,58	1,96	
SLC6A8*	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 (202219_at)	1,68	2,58	2,57	1,96	
CMKOR1*	Chemokine orphan receptor 1 (212977_at)	1,92	2,35	1,77	2,76	
ADM	Adrenomedullin (202912_at)	1,64	1,38	2,08	1,92	Induktion (91)
RALGDS*	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator (209050_s_at)	1,62	1,64	1,77	1,19	
JMJD1A	Jumonji domain containing 1A (212689_s_at)	1,60	1,39	1,64	1,65	Induktion (76)
SSPN	Sarcospan (Kras oncogene-associated gene) (226932_at)	1,78	1,04	1,67	1,87	Repression (92)
GALNT1*	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1) (1568618_a_at)	1,60	1,54	1,67	1,32	
PRDM1*	PR domain containing 1, with ZNF domain (228964_at)	1,71	1,26	1,68	1,91	
HIG2	Hypoxia-inducible protein 2 (218507_at; 1554452_a_at)	1,71	1,65	1,79	1,58	Induktion (93)
		1,63	1,45	1,71	1,86	
Unbekannte Funktion						
ARRDC3*	Arrestin domain containing 3 (224797_at)	2,72	1,67	1,78	2,52	
ARRDC4*	Arrestin domain containing 4 (225283_at)	1,84	2,01	1,65	2,24	
ANKRD37	Ankyrin repeat domain 37 (227337_at)	1,74	1,83	2,44	1,66	Induktion (94)
FAM84A*	Family with sequence similarity 84, member A (229546_at)	2,38	1,91	1,68	1,69	
LBH*	Likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene (221011_s_at)	1,84	1,39	2,09	2,05	
FAM46A*	Family with sequence similarity 46, member A (224973_at)	3,54	1,43	2,04	1,68	
FAM83A*	Family with sequence similarity 83, member A (238460_at)	1,46	2,35	1,78	2,63	
LOC401152*	HCV F-transactivated protein 1 (224605_at)	1,36	1,66	1,65	1,53	

Tabelle 3.8b N-fache Änderung der Gene, deren Expression in mindestens drei von vier Prostata-Primärzellspendern nach 48h Hypoxie *reprimiert* wird. Nähere Erläuterungen siehe Tabelle 3.8a.

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie				beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		PrEC_2	PrEC_3	PrEC_4	PrEC_5	
Lipidmetabolismus						
CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver) (203633_at)	-2,17	-1,59	-2,04	-2,52	gesteigerte Enzymaktivität (69)
MVD*	Mevalonate (diphospho) decarboxylase (203027_s_at)	-1,51	-2,58	-1,49	-1,64	
LIAS*	Lipoic acid synthetase (214045_at)	-1,60	-1,55	-1,51	-1,40	
Elektronentransport						
NQO1*	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (201467_s_at; 201467_s_at)	-1,84	-1,95	-1,87	-1,53	
		-1,94	-1,81	-1,99	-1,61	
HSPC051*	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD) (228142_at)	-1,61	-1,44	-1,50	-1,80	
Zelldifferenzierung						
NRG1	Neuregulin 1 (206237_s_at; 206343_s_at)	-1,57	∅	-1,70	-2,41	Induktion (95)
		-1,98	-1,88	-2,21	-1,66	
EREG*	Epiregulin (205767_at)	-1,67	-1,97	-2,06	-1,31	
Sonstige Funktion						
IFI30*	Interferon, gamma-inducible protein 30 (201422_at)	-2,57	-1,82	-1,51	-2,15	
K6HF*	Cytokeratin type II (207065_at)	-3,10	-1,95	-2,28	-3,02	
TAF9B*	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa (221618_s_at; 226037_s_at)	-1,55	-1,98	-1,67	-2,50	
		-2,68	-2,03	-2,23	-2,81	
SH2D5*	SH2 domain containing 5 (230973_at)	-1,56	-1,69	-1,57	-2,05	
FSHPRH1*	FSH primary response (LRPR1 homolog, rat) 1 (207590_s_at)	-1,58	-1,60	-1,45	-1,91	
TFRC	Transferrin receptor (p90, CD71) (208691_at; 237215_s_at)	-1,36	-1,77	-1,65	-1,86	
		-1,31	-2,71	-1,67	-2,58	Induktion (70)

3.3.5 Vergleich der Genexpressionsänderung von Androgen-abhängigen, p53-positiven gegen Androgen-unabhängigen, p53-negativen Prostata-Tumorzelllinien unter Hypoxie

Die verwendeten Prostata-Tumorzelllinien zeichnen sich durch einen unterschiedlichen p53-Status als auch eine unterschiedliche Androgensensitivität aus. Dies ermöglicht es den Einfluss des Androgenrezeptor- und p53-Statuses von Tumorzelllinien in Zusammenhang mit einer hypoxischen Kultivierung zu untersuchen. Die Prostata-Tumorzelllinien DU145 und PC3 proliferieren unabhängig von einer Androgenzugabe und besitzen kein funktionelles p53 Protein. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die Prostata-Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 durch ein Androgen-abhängiges Wachstum und den Besitz eines intakten p53 Gens aus. In Kapitel 3.1 wurden die Zellcharakteristika zusammengefasst und unter Abschnitt 3.1.1 wurde die Androgenabhängigkeit der verwendeten Tumorzelllinien untersucht.

3.3.5.1. Genexpressionsänderung in den Androgen-abhängigen, p53-positiven Prostata-Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 (Gengruppe V)

Gene, die in dieser Gengruppe zusammengefasst werden, zeigen in den Androgen-abhängig wachsenden und p53-positiven Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 eine Veränderung ihrer Genexpression unter Hypoxie um mindestens den Faktor 1,5 wohingegen sie in den Androgen-unabhängig wachsenden, p53-negativen Tumorzelllinien DU145 und PC3 nicht oder in die entgegengesetzte Richtung reguliert werden ($p < 0,05$). Diesen Kriterien entsprechen insgesamt 5 Probe Sets, von denen drei in ihrer Expression induziert und zwei reprimiert werden.

Nach 48h hypoxischer Kultivierung werden in den Prostata-Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 die Gene ENO1 (Enolase1, alpha), C5orf13 (Chromosome 5 open reading frame 13) und TM4SF1 (Transmembrane 4 L six family member 1) in ihrer Expression induziert. Diese Gene lassen sich, wie in Tabelle 3.9a dargestellt, zwei funktionellen

Gruppen zuordnen. Die Gene C5orf13 und TM4SF1 besitzen eine funktionelle Bedeutung für die Bewegung von Zellen. Im Unterschied dazu zeigt das Gen ENO1 zum einen funktionelle Bedeutung bei der Glykolyse und ist das einzige in dieser Gengruppe bekannte Hypoxie-regulierte Gen (96, 97). In Tabelle 3.9b werden zwei Gene aufgeführt, die nach 48h hypoxischer Kultivierung in den Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 herunterreguliert werden. Die zytoplasmatische 2-Elektronen-Reduktase NQO1 reduziert Quinon zu Hydroquinon. Diese Reaktion führt im mitochondrialen Elektronentransport zur Entstehung von Wasserstoff-Protonen und ist Grundlage der ATP-Produktion unter aeroben Bedingungen. Die Funktion des Proteins KIAA0746 wurde bisher nicht beschrieben.

Tabelle 3.9a N-fache Änderung der Gene, deren Expression in den Androgen-abhängigen, p53-positiven Prostata-Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 nach 48h Hypoxie *induziert* wird, jedoch keine oder eine entgegengesetzte Regulation in den Androgen-unabhängigen, p53-negativen Prostata-Tumorzelllinien DU145 und PC3 aufweisen ($p \leq 0,05$). Die n-fache Änderung ergibt sich aus dem Verhältnis von Zellen die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden zu Zellen, welche unter Hypoxie wuchsen. Eine Expressionsänderung um den Faktor 1,5 entspricht einer Expressionsinduktion (grün). Gene, welche mit dem Symbol * gekennzeichnet sind, wurden bisher in der Literatur nicht als Hypoxie-reguliert beschrieben. Die Einteilung der identifizierten Gene erfolgte hinsichtlich der beschriebenen Funktion ihrer Genprodukte. (Gengruppe V; gelb = keine Expressionsänderung -1,5 – 1,5)

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie				beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		DU145	PC3	LNCaP	22RV1	
Zellbewegung						
C5orf13*	Chromosome 5 open reading frame 13 (201309_x_at)	1,43	1,43	2,11	2,05	
TM4SF1*	Transmembrane 4 L six family member 1 (209386_at)	1,20	1,19	5,49	1,58	
Glykolyse						
ENO1	Enolase 1, (alpha) (201231_s_at)	1,19	1,35	1,59	1,51	Induktion (97)

Tabelle 3.9b N-fache Änderung der Gene, deren Expression in den Androgen-abhängigen, p53-positiven Prostata-Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 nach 48h Hypoxie *reprimiert* wird, jedoch keine oder eine entgegengesetzte Regulation in den Androgen-unabhängigen, p53-negativen Prostata-Tumorzelllinien DU145 und PC3 aufweisen ($p \leq 0,05$). Eine Expressionsänderung um den Faktor -1,5 entspricht einer Expressionsreduktion (rot). Ausführliche Erläuterungen siehe Tabelle 3.9a.

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie				beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		DU145	PC3	LNCaP	22RV1	
Mitochondrialer Elektronentransport						
NQO1*	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (210519_s_at)	-1,15	-1,28	-2,61	-1,91	
Unbekannte Funktion						
KIAA0746*	KIAA0746 protein	1,46	1,02	-1,54	-1,62	

3.3.5.2. Genexpressionsänderung in den Androgen-unabhängigen, p53-negativen Prostata-Tumorzelllinien DU145 und PC3 (Gengruppe VI)

In diesem Kapitel werden Gene vorgestellt, die in den Androgen-unabhängig wachsenden und p53-negativen Tumorzelllinien DU145 und PC3 um mehr als das 1,5fache unter Hypoxie reguliert werden. Diese Gene zeigen jedoch keine oder eine entgegengesetzte Regulation in den Androgen-abhängig wachsenden und p53-positiven Zelllinien LNCaP und 22RV1. Diesen Anforderungen entsprechen insgesamt 12 Gene, von denen acht in ihrer Expression induziert und vier reprimiert werden. Von den identifizierten Genen könnten neun Gene als potenziell neue Hypoxie-regulierte Gene betrachtet werden, da sie bisher in der Literatur nicht im Zusammenhang mit Hypoxie beschrieben wurden.

In Tabelle 3.10a sind die Gene aufgeführt, die nach 48h Hypoxie eine Expressions-Induktion aufweisen. Die induzierten Gene IGFBP3 (Insulin-like growth factor binding protein 3) und BTG1 (B-cell translocation gene 1, anti-proliferative) konnten einer gemeinsamen Funktion zugeordnet werden, da beide Gene zur Proliferationshemmung von Zellen führen. Tabelle 3.10b zeigt die Gene, die nach 48h Hypoxie in den Tumorzelllinien DU145 und PC3 herunterreguliert werden. Das Gen COX5A (Cytochrome c oxidase subunit Va) wurde einer eigenen funktionellen Gruppe zugeordnet, da es eine zentrale funktionelle Bedeutung in der mitochondrialen Atmungskette besitzt. Darüber hinaus wurden die Gene RRS1 (Ribosome biogenesis regulator homolog [*S. cerevisiae*]), MGC5528 (Defective in sister chromatid cohesion homolog [*s. cerevisiae*]) und GPATCA (G patch domain containing 4) identifiziert, jedoch ist ihre Funktion bisher unbekannt.

Tabelle 3.10a N-fache Änderung der Gene, deren Expression in den Androgen-unabhängigen, p53-negativen Prostata-Tumorzelllinien DU145 und PC3 nach 48h Hypoxie induziert wird, jedoch keine oder eine entgegengesetzte Regulation in den Androgen-abhängigen, p53-positiven Prostata-Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 aufweisen ($p \leq 0,05$). Die n-fache Änderung ergibt sich aus dem Verhältnis von Zellen die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden zu Zellen, welche unter Hypoxie wuchsen. Eine Expressionsänderung um den Faktor 1,5 entspricht einer Expressionsinduktion (grün). Werden mehr als eine Expressionsänderung pro Gen dargestellt, waren mehrere Probe Sets für ein Gen auf dem Microarray Chip vorhanden. Gene, welche mit dem Symbol * gekennzeichnet sind, wurden bisher in der Literatur nicht als Hypoxie-reguliert beschrieben. Die Einteilung der identifizierten Gene erfolgte hinsichtlich der beschriebenen Funktion ihrer Genprodukte. (Gengruppe VI; gelb = keine Expressionsänderung -1,5 – 1,5)

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie				beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		DU145	PC3	LNCaP	22RV1	
Inhibierung des Zellwachstums						
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3 (210095_s_at; 212143_s_at)	10,64	2,83	-1,25	1,14	Induktion (81)
		11,82	2,67	-1,05	1,01	
BTG1*	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative (200921_s_at)	2,04	1,75	1,35	1,26	Induktion (Carassius auratus) (63)
Sonstige / Unbekannte Funktion						
CHES1*	Checkpoint suppressor 1 (218031_s_at)	1,95	1,59	1,01	1,16	Repression (98)
CSPG5	Chondroitin sulfate proteoglycan 5 (neuroglycan C) (39966_at)	2,05	1,68	1,50	1,23	
ATP2B4*	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4 (212136_at)	1,92	1,63	1,25	1,11	Aktivitätssteigerung (99)
SLC25A36*	Solute carrier family 25, member 36 (201917_s_at)	1,54	1,68	1,26	1,37	
PAM	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (212958_x_at)	1,98	1,92	1,16	1,07	Aktivitätssteigerung (99)
TCEA3*	Transcription elongation factor A (SII), 3 (226388_at)	3,97	1,69	1,24	1,19	

Tabelle 3.10b N-fache Änderung der Gene, deren Expression in den Androgen-unabhängigen, p53-negativen Prostata-Tumorzelllinien DU145 und PC3 nach 48h Hypoxie *reprimiert* wird, jedoch keine oder eine entgegengesetzte Regulation in Androgen-abhängigen, p53-positiven Prostata-Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 aufweisen ($p \leq 0,05$). Eine Expressionsänderung um den Faktor -1,5 entspricht einer Expressionsreduktion (rot). Ausführliche Erläuterungen siehe Tabelle 3.10a.

Gensymbol	Genname (Probe Set)	n-fache Regulation nach 48h Hypoxie				beschriebene Hypoxie-Regulation (Referenz)
		DU145	PC3	LNCaP	22RV1	
Mitochondrialer Elektronentransport						
COX5A*	Cytochrome c oxidase subunit Va (229426_at)	-1,95	-2,23	-1,07	-1,06	
Unbekannte Funktion						
RRS1*	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae) (209567_at)	-2,95	-1,51	-1,26	-1,22	
MGC5528*	defective in sister chromatid cohesion homolog 1 (S. cerevisiae) (219000_s_at)	-2,07	-1,56	-1,07	-1,16	
GPATC4*	G patch domain containing 4 (224634_at)	-2,06	-1,67	-1,50	-1,23	

3.4. Validierung und Charakterisierung Hypoxie-regulierter Gene in Prostata-Tumorzelllinien

Die Genexpressionsanalyse in den Prostata-Tumorzelllinien Du145, PC3, LNCaP, 22RV1 und den primären Prostata-Epithelzellen ergab 98 Gene, die hinsichtlich der in Tabelle 3.3 gewählten biologischen Fragestellungen eine unter hypoxischen Bedingungen veränderte Genexpression aufweisen. Von diesen Hypoxie-abhängig regulierten Genen wurden 54 bisher in der Literatur nicht in Zusammenhang mit einer Hypoxie-Regulation beschrieben. Im folgenden Abschnitt steht die Validierung, der unter Kapitel 3.3 ermittelten Hypoxie-regulierten Gene und die funktionelle Charakterisierung des neu identifizierten Hypoxie-regulierten Genes SOX4 (SRY [sex determining region Y]-box 4) im Mittelpunkt.

3.4.1 Validierung von HIF-1 α Zielgenen mittels quantitativer Real-Time PCR

In Abbildung 3.9 sind die Expressionsprofile von bekannten Hypoxie-regulierten Genen, welche mit Hilfe der GeneChip-Hybridisierung ermittelt wurden, dargestellt. Dazu zählen VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor), CA9 (Carbonic Anhydrase 9), ADM (Adrenomedullin), ERO1L (Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin-1 alpha-like), HK2 (Hexokinase 2), PGK1 (Phosphoglycerate kinase 1) und Redd1 (DNA-damage-inducible transcript 4). Die Betrachtung der Genexpression erfolgte in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und den Prostata-Primärzellen PrEC nach 24h und 48h Hypoxie. Die Gruppierung der ausgewählten HIF-1 α Zielgene in Abbildung 3.9 erfolgt hinsichtlich der Funktion ihrer Genprodukte.

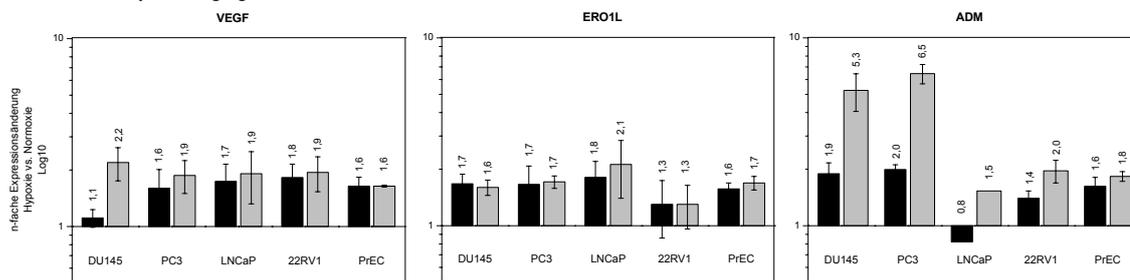
VEGF und ERO1L werden in allen getesteten Tumorzelllinien und den Primärzellen nach 48h Hypoxie um etwa das 2-fache induziert. Eine Ausnahme bildet die ERO1L Expression in der Tumorzelllinie 22RV1, da sie lediglich um den Faktor 1,3 verstärkt exprimiert wird und somit nicht eindeutig als induziert bezeichnet werden kann.

Auffällig bei der Betrachtung der ADM-Expression ist eine 2-fache Expressionsinduktion nach 24h hypoxischer Kultivierung in den Tumorzelllinien DU145 und PC3, welche nach 48h Hypoxie auf eine 5-fache Induktion ansteigt. In 22RV1 Zellen und den Prostata-Primärzellen ist eine Expressionsinduktion nach 48h Hypoxie um das 2-fache bzw. 1,8-fache erkennbar. In LNCaP Zellen hingegen erfolgt die ADM Induktion nur um den Faktor 1,5 nach 48h Hypoxie.

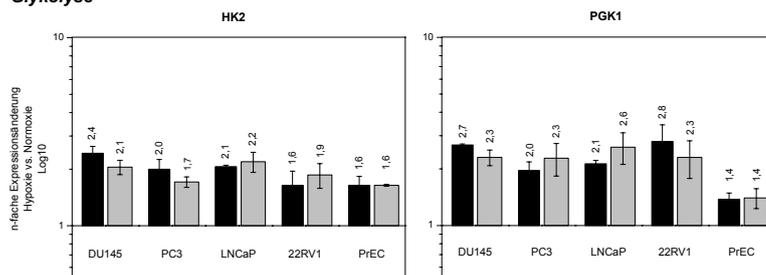
Die HK2 Genexpression wird nach 24h und 48h Hypoxie in allen Tumorzelllinien um das 2-fache und in den Prostata-Primärzellen um das 1,6-fache induziert. Die Expressionsänderung von PGK1 liegt in allen Tumorzelllinien bei einer 2fachen Induktion nach 24h und 48h Hypoxie. Die Primärzellen PrEC zeigen tendenziell ebenfalls eine verstärkte PGK1 Expression (1,4fach), da diese jedoch unterhalb des Schwellenwertes von 1,5 liegt, ist sie nicht eindeutig.

Die CA9 Expression wird in der Tumorzelllinie PC3 um das 1,5-fache und in den Primärzellen um das 8-fache nach 48h hypoxischer Kultivierung induziert. In den Tumorzelllinien DU145, LNCaP und 22RV1 konnte die CA9 Genexpression nicht ausgewertet werden, da die Einzelwerte nicht den Validitätskriterien der Microarray Analyse entsprachen (siehe Abschnitt 2.2.3.4.). Die Expression von Redd1 wird in den Tumorzelllinien PC3 und 22RV1 um mehr als das 6-fache und in DU145 um den Faktor 2,9 nach 48h Hypoxie induziert. In LNCaP Zellen verstärkt sich die Genexpression von Redd1 um den Faktor 1,6 nach 48h hypoxischer Kultivierung. In den Primärzellen zeigt sich nach 24h Hypoxie eine 1,6fache Induktion, welche nach 48h Hypoxie auf den Faktor 1,4 absinkt.

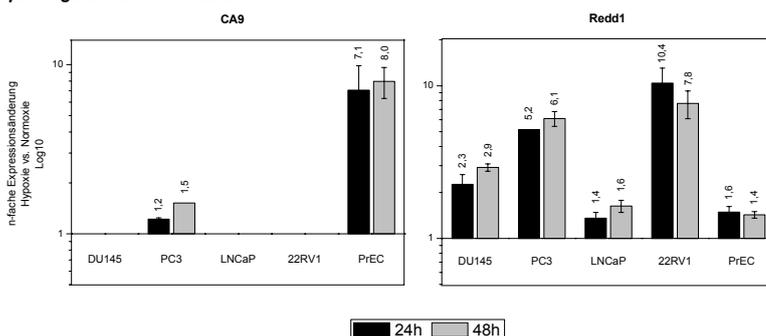
• **Sauerstofftransport / Angiogenese**



• **Glykolyse**



• **pH-Regulation / Stressantwort**



■ 24h ■ 48h

Abb. 3.9 Expressionsänderung von HIF-1 α Zielgenen nach 24h und 48h Hypoxie in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen. Die Genexpression wurde mit Hilfe einer Microarray GeneChip Hybridisierung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen ermittelt und wird als n-fache Regulation unter Hypoxie dargestellt. Die n-fache Regulation wird als Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Zellkulturversuchen gezeigt. Die Genexpression in den Prostata-Primärzellen PrEC stellt den Mittelwert aus vier verschiedenen Zellspendern dar. (VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor, ERO1L - Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin-1 alpha - like, ADM – Adrenomedullin, HK2 – Hexokinase 2, PGK1 - Phosphoglycerate kinase 1, CA9 – Carbonic anhydrase 9, Redd1 - DNA-damage-inducible transcript 4)

Nach Betrachtung der Microarray-Expressionsprofile erfolgte die technische Validierung einzelner Hypoxie-Markergene mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR).

In Abbildung 3.10 ist die Expressionsänderung der Gene VEGF, CA9 und Redd1 in den Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und den Prostata-Primärzellen PrEC unter hypoxischen Bedingungen dargestellt. Abbildung 3.10 zeigt sowohl die Expressionsänderung, welche mittels der GeneChip-Hybridisierung ermittelt wurde, als

auch die Validierung der Regulation dieser Gene mit Hilfe der qRT-PCR. Die Microarray-Hybridisierung und die qRT-PCR wurden mit RNA-Lysaten, die aus dem gleichen Zellexperiment stammten, realisiert. Zusätzlich, zu der Betrachtung der Genexpressionsänderung nach 24h und 48h Hypoxie des Microarray-Versuches wurde mit Hilfe der qRT-PCR auch die Expression nach 72h hypoxischer Kultivierung analysiert. Die VEGF GeneChip Expressionsinduktion nach 24h und 48h hypoxischer Kultivierung (~2-fach) konnte in den Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 bestätigt werden. Nach 72h hypoxischer Kultivierung steigt die VEGF Expression in den Tumorzelllinien DU145, LNCaP und 22RV1 weiter an und wird um das 4-fache induziert. In PC3 Zellen wird die VEGF Expression ebenfalls nach 72h Hypoxie am stärksten induziert, um den Faktor 2,7. In den Primärzellen PrEC wird VEGF am stärksten nach 24h Hypoxie induziert (3-fach) und sinkt danach auf eine 2-fache Induktion nach 48h und 72h hypoxischer Kultivierung ab.

Die qRT-PCR ermöglichte, im Gegensatz zur GeneChip-Hybridisierung, die Betrachtung der CA9 Expression in allen Tumorzelllinien und in den Primärzellen nach hypoxischer Kultivierung. In der Tumorzelllinie PC3 wird die CA9 Expression nach 72h Hypoxie, gesehen über alle verwendeten Tumorzellen, am Stärksten um das 57-fache induziert. Danach folgt die Expressionsänderung in LNCaP um das 35-fache und in DU145 um das 6-fache. In der Tumorzelllinie 22RV1 wird die CA9 Expression nach 72h Hypoxie um das 2-fache induziert. Weiterhin wird die CA9 mRNA in den Prostata-Primärzellen um das 10-fache verstärkt exprimiert.

Die ermittelte Induktion (qRT-PCR) der Redd1 Expression ist in den Tumorzelllinien PC3 (9-fach) und 22RV1 (8-fach) nach 72h Hypoxie am deutlichsten erkennbar. Gefolgt von einer 3fachen Induktion nach 72h Hypoxie in DU145 und LNCaP Zellen. In den Prostata-Primärzellen wird die Redd1 Expression um den Faktor 2 nach 72h hypoxischer Kultivierung induziert. Somit konnte auch die GeneChip ermittelte Redd1 Expression mittels qRT-PCR bestätigt werden.

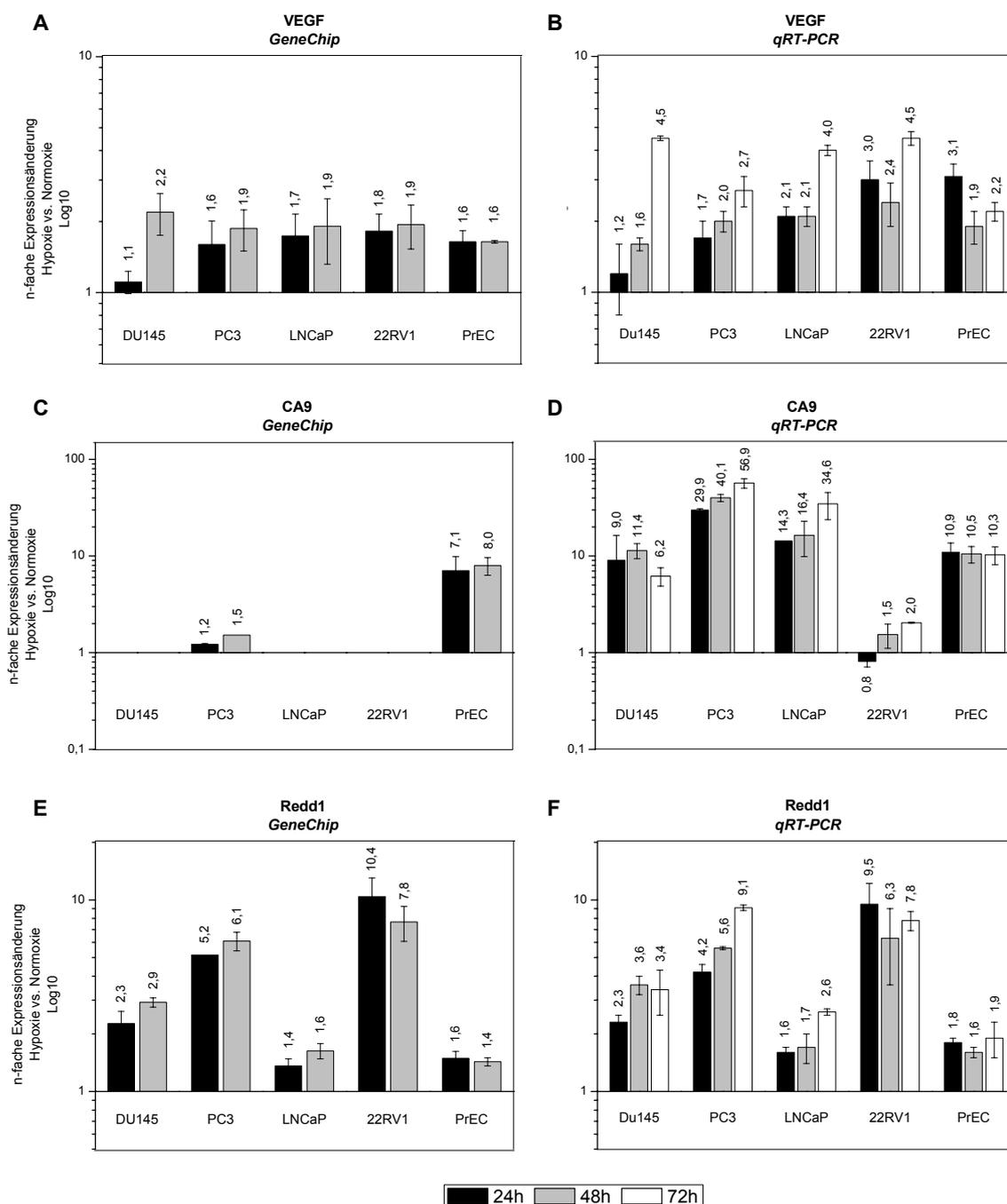


Abb. 3.10 Expressionsänderung unter Hypoxie der HIF-1 α Zielgene VEGF, CA9 und Redd1 in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und den Prostata-Primärzellen PrEC. Die Genexpression wurde zunächst mittels GeneChip-Hybridisierung (A, C, E) bestimmt und anschließend mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR; B, D, F) validiert. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte jeweils unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und wird als n-fache Regulation unter Hypoxie dargestellt. Die Genexpression in den Prostata-Primärzellen PrEC stellt den Mittelwert aus vier verschiedenen Zellspendern dar. Die Mittelwerte der Tumorzelllinien beziehen sich auf drei unabhängige biologische Replikate. (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor; CA9 - Carbonic Anhydrase 9; Redd1 - DNA- damage-inducible transcript 4)

3.4.2 Identifizierung und Validierung des Hypoxie-regulierten Transkriptionsfaktors SOX4

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wird das Genexpressionsprofil des Transkriptionsfaktors SOX4 (SRY [sex determining region Y]-box 4) vorgestellt, welches mit Hilfe der GeneChip-Hybridisierung identifiziert werden konnte (Tabelle 3.5a). Abbildung 3.11A zeigt die Änderung der SOX4 Genexpression unter Hypoxie in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und den Prostata-Primärzellen PrEC. In Abbildung 3.11A wurde die Genexpression mit Hilfe der GeneChip-Hybridisierung ermittelt und Abbildung 3.11B zeigt die Validierung mittels qRT-PCR. Das Microarray Expressionsprofil zeigt nach 48h Hypoxie eine Induktion der SOX4 mRNA Expression in den Prostata-Tumorzelllinien DU145 (2,1-fach), PC3 (1,6-fach), LNCaP (3,7-fach) und 22RV1 (2,1-fach). Die SOX4 Expressionsänderung in den Prostata-Primärzellen PrEC_2, PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 wird als Mittelwert dargestellt und weist nach 48h Hypoxie eine Änderung um den Faktor 1,3 auf. Der Schwellenwert für eine eindeutige Änderung der Genexpression, unter den gewählten Bedingungen, liegt bei einer Änderung um den Faktor 1,5 sowohl in positiver als auch negativer Richtung (Abschnitt 2.2.3.4.). Demzufolge bleibt die SOX4 Genexpression in den Prostata-Primärzellen PrEC unter hypoxischen Kulturbedingungen unverändert.

Die technische Validierung der SOX4 Expressionsinduktion erfolgte zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h Hypoxie mittels qRT-PCR. Diese ergab eine Induktion der SOX4 mRNA Expression nach 48h Hypoxie in DU145 um das 2,1-fache, in LNCaP um den Faktor 4,7 und in 22RV1 um das 2,8-fache. Die Tumorzelllinie PC3 (1,1-fach) als auch die Primärzellen PrEC (1,4-fach) weisen keine Änderung der SOX4 Expression nach 48h Hypoxie auf. Weiterhin wurde die SOX4 Expression nach 72h hypoxischer Kultivierung mittels qRT-PCR analysiert. In den Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 wird die Induktion von SOX4 nach 72h Hypoxie, im Vergleich zur Induktion nach 48h Hypoxie, weiter verstärkt und liegt in LNCaP bei einer Induktion um das 4,8-fache und in 22RV1 um das 5,1-fache. In DU145 sinkt die SOX4 Induktion nach 72h Hypoxie

leicht ab, auf eine Induktion um das 1,5-fache. In PC3 und PrEC Zellen ist auch nach 72h Hypoxie keine Beeinflussung der SOX4 mRNA Expression zu beobachten.

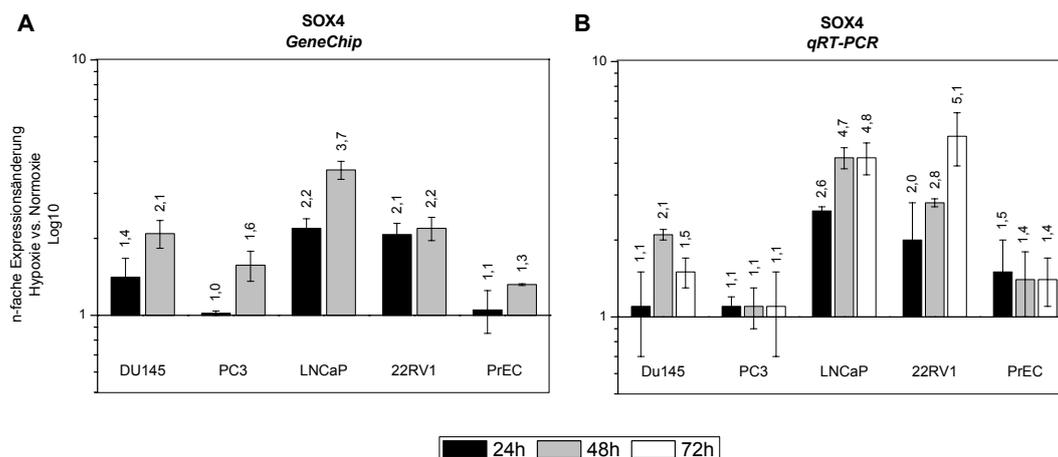


Abb. 3.11 SOX4 Expressionsänderung unter hypoxischen Bedingungen in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und den Prostata-Primärzellen PrEC. Die Genexpressionen wurden zunächst mittels GeneChip-Technologie (A) ermittelt und mit Hilfe der qRT-PCR (B) validiert. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte jeweils unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und wird als n-fache Regulation unter Hypoxie dargestellt. Die Genexpression in den Prostata-Primärzellen PrEC stellt den Mittelwert aus vier verschiedenen Zellspendern dar. Die Mittelwerte der Tumorzelllinien beziehen sich auf drei unabhängige biologische Replikate.

3.4.2.1. Verminderung der HIF-1 α Genexpression in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP mittels RNA-Interferenz

Zur Klärung einer HIF-1 α abhängigen SOX4 mRNA Induktion unter hypoxischen Bedingungen, wurde die spezifische Inaktivierung der HIF-1 α mRNA in der Tumorzelllinie LNCaP etabliert („HIF-1 α Knockdown“).

Die Etablierung des HIF-1 α Knockdowns mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi) Technologie untergliedert sich in 3 Abschnitte. Zunächst erfolgte die Reduktion der HIF-1 α Genaktivität unter Verwendung eines siRNA-Pools (SMARTpool[®]). Daraufhin wurden die vier Pool-siRNAs in separaten Versuchsansätzen getestet, um mit den zwei

effizientesten Einzel-siRNAs weiter arbeiten zu können. Die Transfektion einer fluoreszierenden RNA-Duplex, die ihre fluoreszierenden Eigenschaften nach erfolgreicher Prozessierung entwickelt, ergab eine Transfektionseffizienz in allen durchgeführten Experimenten von 70 - 90% transfizierten Zellen (Abbildung 3.12)

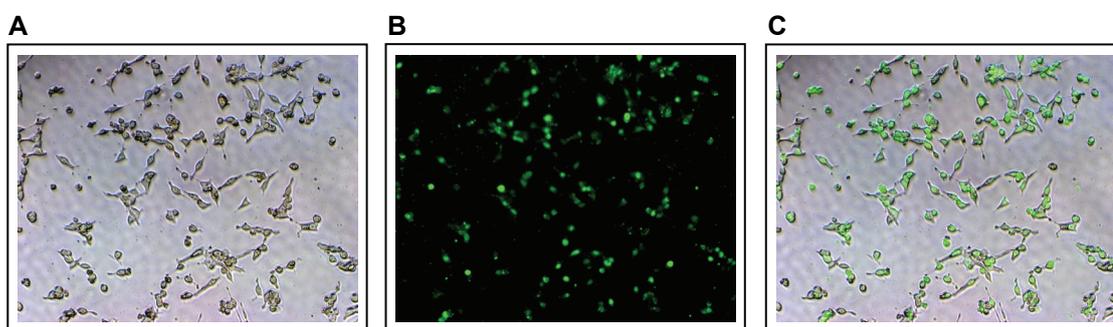


Abb. 3.12 Bestimmung der Transfektionseffizienz unter Verwendung einer fluoreszierenden RNA-Duplex in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP 24h nach Transfektion der RNA-Duplex. Die Entstehung der Fluoreszenz basiert auf einer erfolgreichen intrazellulären Prozessierung der FAM-markierten RNA-Duplex. A – Phasenkontrast-Bild; B- Fluoreszenz-Bild; C- Übereinander gelagertes Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Bild.

Zur Negativ-Kontrolle der Transfektionsreaktion diente zum einen die alleinige Verwendung der Transfektionsreagenzien ohne Transfektion einer siRNA (Transfektions-Kontrolle, TK) als auch die Transfektion einer nicht-komplementären siRNA (NTC – „non targeting control“). Nach Reduktion der HIF-1 α mRNA mittels des siRNA-Pools und nach Auftrennung des siRNA-Pools wurde die HIF-1 α mRNA Expression analysiert. Nach Durchführung des Knockdowns mit zwei ausgewählten Einzel-siRNAs erfolgte die Betrachtung der HIF-1 α Expression auf RNA- und Protein-Ebene.

In Abbildung 3.13 ist die HIF-1 α Genexpression 24h und 48h nach Reduzierung der HIF-1 α mRNA mit Hilfe des siRNA-Pools unter Normoxie und Hypoxie in der Tumorzelllinie LNCaP dargestellt. Die HIF-1 α Expression der Transfektionskontrolle

und der Behandlungswerte ist relativ zur NTC-Probe aufgetragen. Die Genexpression liegt somit in der NTC-Probe bei 100%. Die Transfektion des siRNA-Pools erreicht nach 24h eine Verminderung der HIF-1 α Genexpression auf 9,4% unter Normoxie und auf 8,0% unter Hypoxie. Auch 48h nach der Transfektion ist die HIF-1 α Expression deutlich reduziert und liegt unter Normoxie bei 12,5% und unter Hypoxie bei 4,2%.

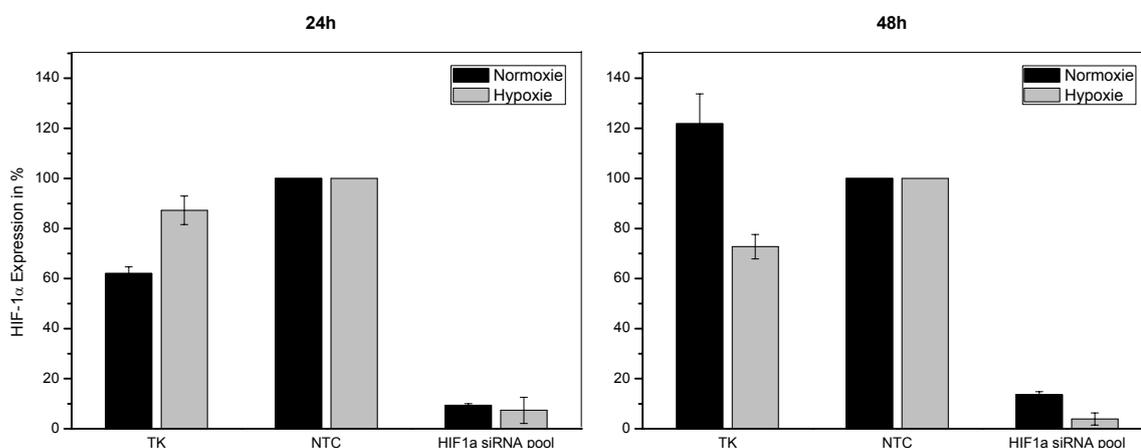


Abb. 3.13 HIF-1 α Genexpression 24h und 48h nach Reduzierung der HIF-1 α RNA-Expression mittels HIF-1 α SMARTpool[®] siRNA in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP. Die Verwendung des siRNA-Pools erlaubt die gleichzeitige Transfektion vier verschiedener HIF-1 α siRNAs. Die Genexpression wurde unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit Hilfe der qRT-PCR ermittelt. Die HIF-1 α Expression ist prozentual zur NTC-Probe dargestellt. Die mitgeführte Transfektionskontrolle (TK) enthält nur die Transfektionsreagenzien wohin gegen mit der NTC-Kontrolle eine nicht bindende siRNA transfiziert wurde. (NTC – non-targeting control)

Die Auftrennung des HIF-1 α siRNA-Pools ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Prostata-Tumorzelllinie PC3 wurde mit den vier unterschiedlichen HIF-1 α siRNAs des zuvor verwendeten siRNA-Pools in separaten Zellansätzen transfiziert und inkubierten für 24h unter normoxischen Bedingungen. Die verwendeten siRNA2, siRNA3 und siRNA4 vermindern die HIF-1 α Genexpression um mehr als 90% bezogen auf die Expression der NTC-Kontrolle. Die mit siRNA2 transfizierten Zellen weisen eine relative HIF-1 α Genexpression von 5,7%, mit siRNA3 von 6,0% und mit siRNA4 von

5,5% auf. Die Transfektion mit siRNA1 reduziert die HIF-1 α Expression um lediglich 57%. Eine adäquate Verminderung der HIF-1 α Genexpression konnte unter Verwendung der siRNAs 2, 3 und 4 erreicht werden.

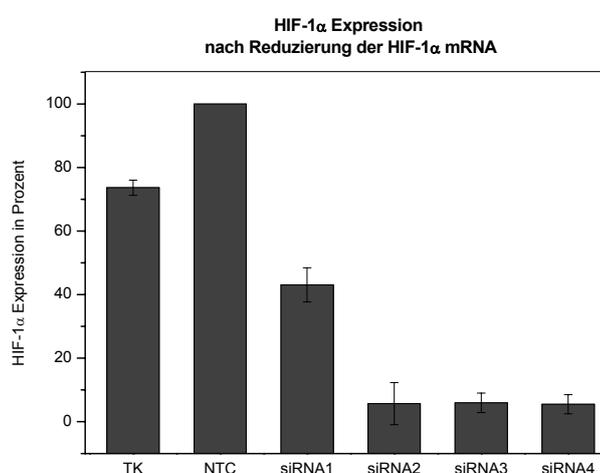


Abb. 3.14 HIF-1 α Genexpression 24h nach Reduzierung der HIF-1 α mRNA Expression mittels vier separater Einzel-siRNAs in der Prostata-Tumorzelllinie PC3 unter normoxischen Bedingungen. Die vier Einzel-siRNAs bildeten den in Abb. 3.13 beschriebenen HIF-1 α siRNA-Pool. Die Bestimmung der HIF-1 α mRNA Expression erfolgte mit Hilfe der qRT-PCR und ist prozentual zur NTC-Probe dargestellt. Die mitgeführte Transfektionskontrolle TK enthält lediglich die Transfektionsreagenzien wohin gegen mit der NTC-Kontrolle eine nicht bindende siRNA transfiziert wurde. (NTC – non-targeting control)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass drei von vier Pool-siRNAs zur Reduktion der HIF-1 α mRNA Expression führen, wurde die Prostata-Tumorzelllinie LNCaP mit der HIF-1 α siRNA2 und siRNA3 in separaten Versuchsansätzen transfiziert. Die Analyse der HIF-1 α Expression erfolgte daraufhin nach 24h, 48h und 72h normoxischer und hypoxischer Kultivierung auf mRNA- und Protein-Ebene. Abbildung 3.15A, C und E zeigt die HIF-1 α mRNA-Expression nach Transfektion von siRNA2 und siRNA3 in LNCaP Zellen unter Normoxie und Hypoxie. Die HIF-1 α Expression der Transfektionskontrolle TK und der Behandlungswerte ist relativ zur NTC - Kontrolle

dargestellt. Die siRNA2-transfizierten Zellen zeigen unter Normoxie 24h und 48h nach der Transfektion eine relative HIF-1 α Expression von 5%, sowie 72h nach Transfektion von 6%. Unter hypoxischen Bedingungen wird die HIF1 α mRNA 24h nach der Transfektion auf 3%, 48h nach Transfektion auf 8% und 72h nach Transfektion auf 6% reduziert. Die Zellen, welche mit siRNA3 transfiziert wurden, weisen eine HIF-1 α mRNA Expression, relativ zur NTC-Kontrolle, unter Normoxie 24h nach der Transfektion von 11%, 48h nach Transfektion von 22% und 72h nach Transfektion von 18% auf. Unter Hypoxie zeigen siRNA3 transfizierte LNCaP Zellen 24h nach Transfektion 10%, 48h nach Transfektion 22% und 72h nach Transfektion 24% der HIF-1 α mRNA Expression in den NTC behandelten Proben auf. Somit wurde die HIF-1 α Expression mit Hilfe der Einzel-siRNAs zwischen 76% und 97% in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP reduziert. Die Reduktion hält die betrachteten 72h nach Transfektion an und erfolgte unabhängig von der Sauerstoffkonzentration.

Abbildung 3.15B, D und F zeigt die HIF-1 α Proteinexpression nach Blockierung der HIF-1 α mRNA Expression in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP unter Normoxie und Hypoxie. Da der Transkriptionsfaktor HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen einem raschen proteosomalen Abbau unterliegt (Halbwertszeit < 5min), dient der Proteinnachweis unter Normoxie der Vervollständigung. Zur Kontrolle einer gleichmäßig aufgetragenen Proteinkonzentration wurde β -Actin detektiert. Die verwendeten HIF-1 α siRNAs siRNA2 und siRNA3 zeigen 24h, 48h und 72h nach der Transfektion eine deutliche Reduktion der HIF-1 α Proteinexpression im Vergleich zu den Transfektionskontrollen TK und NTC. Beim Vergleich der verwendeten siRNAs fällt auf, dass nach Transfektion der siRNA3 die HIF-1 α Proteinexpression 72h nach der Transfektion wieder leicht ansteigt. Diese ist jedoch im Vergleich zur TK- und NTC-Kontrolle weiterhin reduziert.

Abschließend kann davon ausgegangen werden, dass LNCaP Zellen, nach Reduzierung der HIF-1 α mRNA Expression mittels RNA-Interferenz, eine deutliche Beeinträchtigung der HIF-1 α Stabilisierung unter Hypoxie aufweisen.

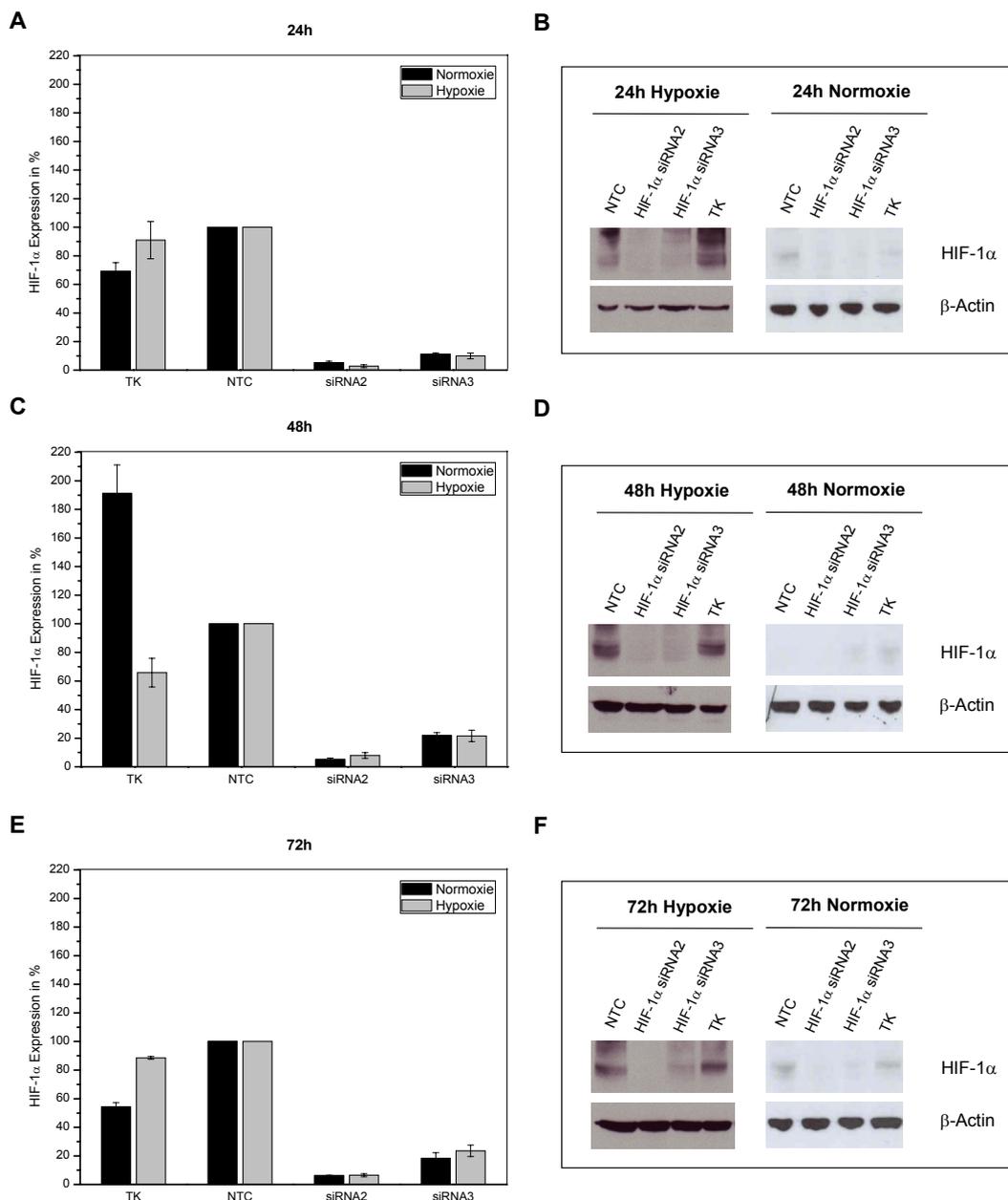


Abb. 3.15 HIF-1 α Expression 24h, 48h und 72h nach Reduzierung der HIF-1 α mRNA-Expression mit den Einzel-siRNAs siRNA2 und siRNA3 in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP. Die HIF-1 α mRNA Expression (A, C, E) wurde mittels qRT-PCR bestimmt und ist prozentual zur NTC-Probe aufgetragen. Mit Hilfe der Immuno-Blot Analyse ist die HIF-1 α (120 kDa) Proteinexpression unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen dargestellt (B, D, F). Die Expression des β -Actin Proteins (47 kDa) dient der Kontrolle einer gleichmäßig aufgetragenen Proteinmenge. (TK – Transfektionskontrolle, NTC – non-targeting control)

3.4.2.2. HIF-1 α -abhängige Induktion des Transkriptionsfaktors SOX4 unter Hypoxie

Die beschriebene Blockierung der HIF-1 α mRNA Expression in der Tumorzelllinie LNCaP dient der Überprüfung einer möglichen HIF-1 α abhängigen Regulation des Transkriptionsfaktors SOX4. In Abbildung 3.16 ist die Expressionsänderung der Gene SOX4 und VEGF in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP unter hypoxischen Bedingungen dargestellt, nachdem die HIF-1 α mRNA Expression in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen reduziert wurde. VEGF ist ein bekanntes Zielgen des Transkriptionsfaktors HIF-1 α und wird unter Hypoxie in seiner Expression gesteigert (Abbildung 3.10). Die Betrachtung der VEGF mRNA Expression dient in diesem Versuch als funktionelle Kontrolle. In Abbildung 3.16A und 3.16B ist die SOX4 bzw. VEGF mRNA Expression nach Blockierung der HIF-1 α Genexpression mittels des siRNA-Pools dargestellt, während Abbildung 3.16C und 3.16D ihre Expression nach Blockierung mittels der HIF-1 α Einzel-siRNAs zeigt. In den Transfektionskontrollen TK und NTC zeigt sich in jedem durchgeführten Knockdown-Experiment die charakteristische Hypoxie-abhängige Induktion der SOX4 oder VEGF mRNA nach 24h, 48h und 72h hypoxischer Kultivierung. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen, die mit dem HIF-1 α siRNA-Pool transfiziert wurden nach 24h Hypoxie nur eine Änderung der SOX4 Expression um den Faktor 1,7 und nach 48h Hypoxie um den Faktor 1,2 (Abb. 3.16A). Ebenfalls zeigt die VEGF Genexpression eine Reduzierung der Hypoxie-abhängigen Induktion und wird nach Transfektion des HIF-1 α siRNA-Pools nach 24h und 48h Hypoxie lediglich um den Faktor 1,3 verändert (Abb. 3.16B). Die Transfektion der HIF-1 α siRNA2 führt ebenfalls zu einer starken Verminderung der SOX4 Induktion, welche nach 24h (1,0-fach), 48h (0,9-fach) und 72h (1,0-fach) hypoxischer Kultivierung keine veränderte mRNA Expression mehr aufweist. Die Hypoxie-abhängige Induktion des Kontrollgens VEGF weist nach Transfektion der HIF-1 α siRNA2 ebenfalls eine verminderte Induzierbarkeit nach 48h (1,4-fach) und 72h (1,6-fach) hypoxischer Kultivierung auf. Die Blockierung der HIF-1 α mRNA Expression mittels siRNA3 hat

unterschiedliche Effekte auf die Hypoxie-abhängige SOX4 bzw. VEGF Genexpressionsinduktion. So wird die SOX4 mRNA nach 24h und 48h Hypoxie, verglichen mit den Transfektionskontrollen, deutlich vermindert induziert, wohingegen nach 72h Hypoxie keine Beeinträchtigung der SOX4 Induktion erkennbar ist. Ebenso hat die Transfektion der siRNA3 keinen Einfluss auf die Hypoxie-abhängige Induktion des Kontrollgens VEGF.

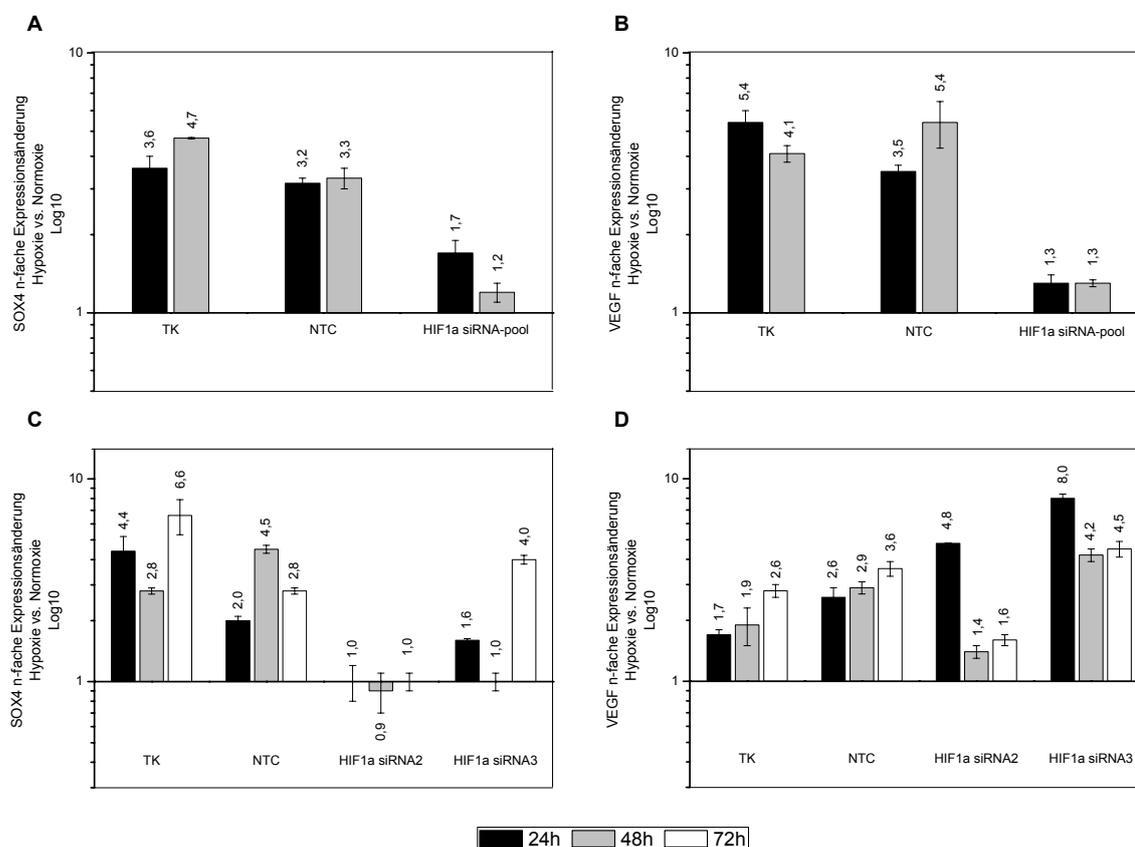


Abb. 3.16 Expressionsänderung der Gene SOX4 und VEGF unter hypoxischen Bedingungen nach Reduzierung der HIF-1 α mRNA in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte jeweils unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und wird als n-fache Regulation unter Hypoxie dargestellt. Eine durchschnittliche Änderung > 1,5-fach beschreibt eine Induktion und eine Änderung < 0,6-fach eine Repression der Genexpression. Blockierung der HIF-1 α mRNA-Expression erfolgte mittels HIF-1 α SMARTpool[®] siRNA sowie mit zwei unterschiedlichen HIF-1 α Einzel-siRNAs. A – SOX4 Genexpression nach HIF-1 α Knockdown via HIF-1 α SMARTpool[®] siRNA. B – VEGF Genexpression nach HIF-1 α Knockdown via HIF-1 α SMARTpool[®] siRNA. C – SOX4 Genexpression nach HIF-1 α Knockdown mittels den HIF-1 α siRNA2 und siRNA3. D – VEGF Genexpression nach HIF-1 α Knockdown mittels zwei unterschiedlichen HIF-1 α siRNA2 und siRNA3. Unter Verwendung der qRT-PCR erfolgte die Bestimmung der Expression aller dargestellter Gene. Darstellung des HIF-1 α Knockdowns siehe Abbildungen 3.13 und 3.15. N = 3. (TK – Transfektionskontrolle, NTC – non targeting control siRNA)

Neben der Analyse der Hypoxie-abhängigen SOX4 mRNA Induktion mittels RNA-Interferenz wurde ebenfalls der SOX4 Genbereich auf potentielle „Hypoxia Response Elements“ (HRE) mit der Kernsequenz 5' CGTG 3' untersucht. Mit Hilfe der Genomatix MatInspector Software wurde die SOX4 DNA-Sequenz als auch die Genbereiche vor und nach dem SOX4 Gen auf potenzielle HRE-Sequenzen untersucht. Es wurde die Gensequenz, welche für das SOX4 Protein selbst sowie 7.000 nt vor und 4.000 nt nach der kodierenden Region analysiert. Insgesamt konnten 11 mögliche HRE-Sequenzen im umliegenden SOX4 Genbereich identifiziert werden (Tabelle 3.11). Vier der 11 identifizierten HRE-Sequenzen liegen vor der SOX4 kodierenden Region (HRE1-4). Die HRE-Sequenzen HRE5 und HRE8 liegen innerhalb des SOX4 Exons und die restlichen drei Sequenzen konnten 300 nt (HRE9) und 3.300 nt (HRE10, HRE11) nach der kodierenden Region bestimmt werden.

Tabelle 3.11 Bioinformatisch identifizierte HIF-1 α HRE-Sequenzen innerhalb der kodierenden als auch in den umliegenden SOX4 Genbereichen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Genomatix MatInspector Software in dem Bereich 7.000 nt vor bis 4.000 nt nach der SOX4 kodierenden Genregion (21.693.979 nt – 21.710.829 nt). Das SOX4 Gen umfasst die Nukleotidspanne von 21.700.979 nt bis 21.706.829 nt. Die verwendeten Nukleotid-Angaben beziehen sich auf die Veröffentlichung des „National Center for Biotechnology Information“. (UTR – „untranslated region“, TSS – Transkriptionsstart, „upstream“ – Genbereich vor dem SOX4 Gen, „downstream“ – Genbereich nach dem SOX4 Gen)

Chromosome 6				
HRE-Nr.	HRE-Lokalisierung in Abhängigkeit zum TSS	Start bp	Ende bp	HRE-Sequenz
1	5' upstream (6594 bp)	21,694,385	21,694,373	5' CCTAGTAC CGT GTG 3'
2	5' upstream (5558 bp)	21,695,421	21,695,409	5' AGTCAGAC CGT CAC 3'
3	5' upstream (4762 bp)	21,696,217	21,696,229	5' GCGCCTCC CGT GGC 3'
4	5' upstream (4666 bp)	21,696,313	21,696,301	5' GGACAGAC CGT GCA 3'
5	Exon 1	21,704,804	21,704,792	5' TCGCCTGC CGT GGA 3'
6	Exon 1	21,705,028	21,705,016	5' TCCCCAAC CGT GCA 3'
7	Exon 1	21,706,283	21,706,295	5' GCAAAAAC CGT GCC 3'
8	Exon 1	21,706,582	21,706,570	5' AGGCAGAC CGT CT 3'
9	3' UTR (286 bp)	21,707,115	21,707,127	5' GGGGCAAC CGT GGA 3'
10	3' downstream (3279 bp)	21,710,108	21,710,120	5' AGCGGCAC CGT GTG 3'
11	3' downstream (3294 bp)	21,710,123	21,710,111	5' TCACACAC CGT GCC 3'

3.4.3 Verminderung der SOX4 Genexpression in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP mittels RNA Interferenz

Mit Hilfe der RNA-Interferenz Technologie wird der Einfluss der Hypoxie-abhängigen SOX4 Induktion auf das Apoptose- und Proliferations-Verhalten der Tumorzelllinie LNCaP untersucht. Zu diesem Zweck wurde die SOX4 Genexpression in der Tumorzelllinie LNCaP blockiert („SOX4 Knockdown“). Die Etablierung des SOX4 Knockdowns erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise, welche unter Kapitel 3.4.2.1 für den HIF-1 α Knockdown beschrieben wurde. Die Transfektion einer fluoreszierenden RNA-Duplex ergab eine Transfektionseffizienz in allen durchgeführten Experimenten von 70% - 90% (ohne Abbildung, beispielhaft für HIF-1 α Knockdown siehe Abb. 3.12).

In Abbildung 3.17 ist die SOX4 Genexpression nach Inaktivierung der selbigen mit Hilfe des SOX4 siRNA-Pools in der Tumorzelllinie LNCaP dargestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach der Transfektion des siRNA-Pools für 24h (Abb. 3.17A) und 48h (Abb. 3.17B) unter Normoxie als auch Hypoxie. Die Expression der Transfektionskontrolle TK sowie der siRNA behandelten Proben werden relativ zur NTC-Probe dargestellt. Die Transfektion des SOX4 siRNA-Pools erreicht nach 24h eine Verminderung der SOX4 Expression auf 16,2% unter Normoxie und 23,4% unter Hypoxie. Auch 48h nach Transfektion ist die SOX4 Expression reduziert und liegt unter Normoxie bei 10,8% und unter Hypoxie bei 18,1%. Abbildung 3.17C zeigt die SOX4 Genexpression 24h nach Transfektion der vier Einzel-siRNAs (siRNA5, siRNA6, siRNA7, siRNA8) aus dem SOX4 siRNA-Pool. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter normoxischen Bedingungen. Die siRNA5 transfizierten Proben weisen eine SOX4 Expression von 28,1%, siRNA6 transfizierten von 15,2%, siRNA7 transfizierten von 24,5% und die siRNA8 transfizierten Zellen von 23% bezogen auf die NTC-Kontrolle auf.

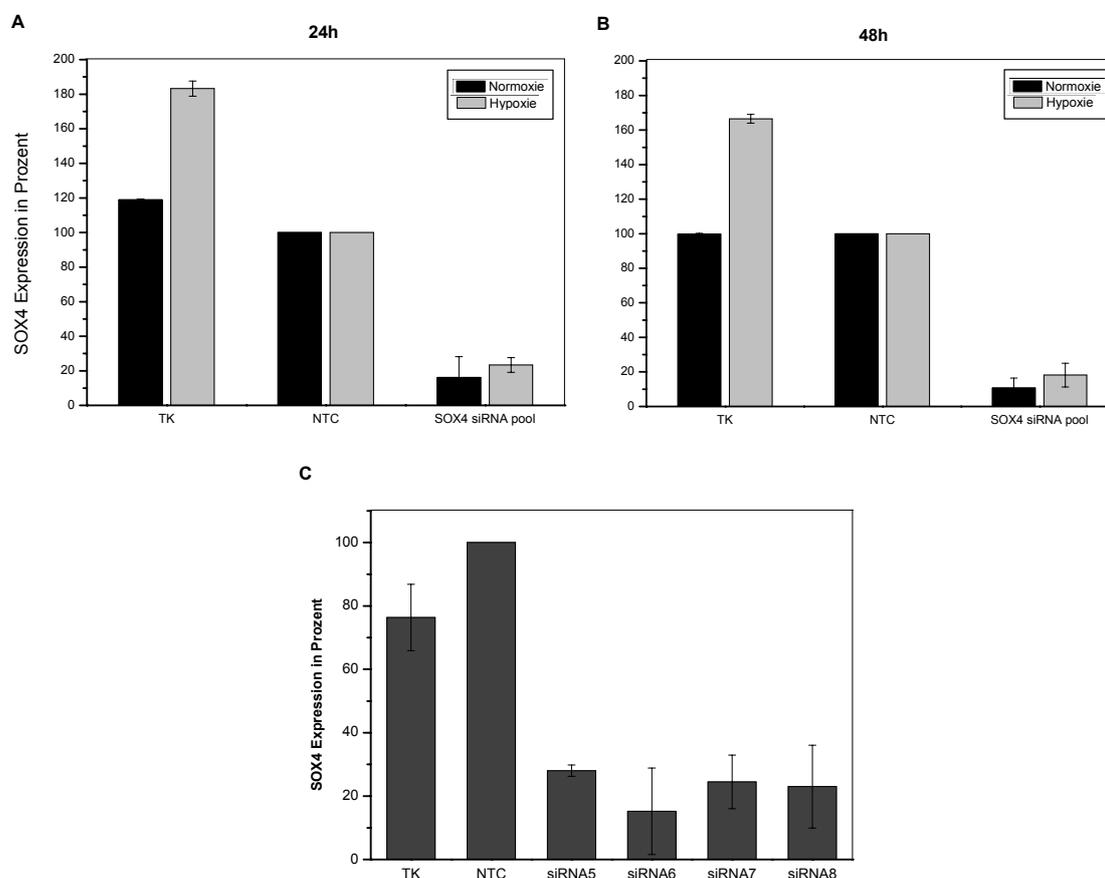


Abb. 3.17 Blockierung der SOX4 mRNA Expression in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP mittels SOX4 SMARTpool® siRNA 24h (A) und 48h (B) nach Transfektion des siRNA-Pools unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. C – SOX4 Knockdown mittels vier separater Einzel-siRNAs unter normoxischen Bedingungen. Die vier Einzel-siRNAs bildeten den unter A und B verwendeten SOX4 siRNA SMARTpool®. Die Bestimmung der SOX4 Genexpression erfolgte mit Hilfe der qRT-PCR und ist prozentual zur NTC-Probe dargestellt. Die mitgeführte Transfektions-Kontrolle TK enthält lediglich die Transfektionsreagenzien wohin gegen mit der NTC-Kontrolle eine nicht bindende siRNA transfiziert wurde. N=3 (NTC – non-targeting control)

Abbildung 3.18 zeigt die SOX4 Expression nach Inaktivierung der SOX4 Genaktivität mittels siRNA6 und siRNA7 zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h unter Normoxie und Hypoxie, relativ bezogen auf die Expression der NTC-Kontrolle. Die siRNA6 transfizierten Zellen weisen 24h nach Transfektion eine residuelle SOX4 Expression von 22,6% unter Normoxie und 11% unter Hypoxie auf. Die Reduktion der SOX4 Expression hält auch 48h nach Transfektion an und liegt unter Normoxie bei 19,3% und unter Hypoxie bei 11,9%. 72h nach Transfektion wird die Reduktion der SOX4

Expression mittels siRNA6 unter normoxischen Bedingungen weiter verstärkt und liegt bei 2,5%. Unter Hypoxie bleibt die Reduktion erhalten und SOX4 wird zu 23,1% im Vergleich zur NTC-Kontrolle exprimiert. Die Transfektion der siRNA7 ergibt ein ähnliches Expressionsverhalten des Gens SOX4. Bereits 24h nach der Transfektion zeigt sich unter Normoxie eine SOX4 Expression von nur 24,3% und unter Hypoxie von 13,6%. Die Expressionsreduktion setzt sich auch 48h nach Transfektion fort und liegt unter Normoxie bei 19,6% und unter Hypoxie bei 19,8%. Die Inhibierung der SOX4 Expression wird auch 72h nach Transfektion mit der siRNA7 unter normoxischen Bedingungen verstärkt und liegt bei 5,9%. Unter Hypoxie lässt sich eine SOX4 Expression von 20,3% nachweisen.

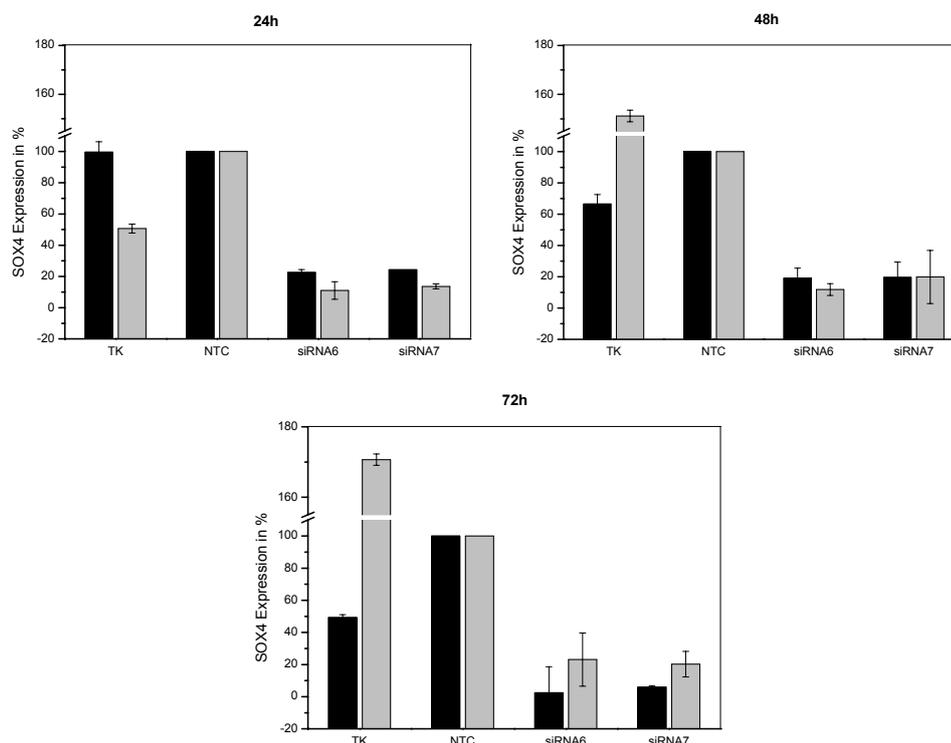


Abb. 3.18 SOX4 mRNA Expression 24h, 48h und 72h nach Reduzierung der SOX4 mRNA mittels den Einzel-siRNAs siRNA6 und siRNA7 in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP. Die Ermittlung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der qRT-PCR unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen und ist prozentual zur NTC-Kontrolle aufgetragen. Die mitgeführte Transfektions-Kontrolle TK enthält lediglich die Transfektionsreagenzien wohin gegen mit der NTC-Kontrolle eine nicht bindende siRNA transfiziert wurde. (NTC – non-targeting control)

3.4.4 Auswirkungen der SOX4 Genexpressions-Inaktivierung auf die Prostata-Tumorzelllinie LNCaP

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung einer erhöhten SOX4 Genexpression unter hypoxischen Bedingungen wird im nachfolgenden Abschnitt das Proliferations- und Apoptoseverhalten in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP nach Reduzierung der SOX4 mRNA Expression (Kapitel 3.4.3.) betrachtet. In den folgenden Versuchen werden die ausgewählten SOX4-siRNAs, sechs und sieben, zur Inaktivierung der mRNA Expression genutzt.

3.4.4.1. Änderung der Proliferation unter Hypoxie nach Inhibierung der SOX4 mRNA Expression

Nach Transfektion der spezifisch gegen die SOX4 mRNA gerichteten siRNAs (siRNA6, siRNA7), sowie der Kontrollwerte (TK, NTC) wurde die Proliferation über 72h in der Tumorzelllinie LNCaP unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen dokumentiert. Abbildung 3.19A zeigt die Verdopplungszeit der Tumorzelllinie LNCaP nach Blockierung der SOX4 mRNA Expression unter Normoxie und Hypoxie. Die Zunahme der Verdopplungszeit und damit die Inhibierung der Proliferation unter Hypoxie wird in Abbildung 3.19B dargestellt. Wie bereits unter Kapitel 3.2.3 beschrieben, geht auch aus Abbildung 3.19 hervor, dass die Kultivierung unter Hypoxie eine verlangsamte Proliferation zur Folge hat. In der Transfektionskontrolle TK verlängert sich die Verdopplungszeit unter hypoxischen Bedingungen um 1,3 Tage und in der NTC-Kontrolle um 1,1 Tage. In den mit den SOX4-siRNAs transfizierten Proben verlängert sich die Verdopplungszeit um 1,0 (siRNA6) und 0,7 Tage (siRNA7). Es zeigt sich damit, dass die Transfektion beider SOX4 siRNAs eine Reduktion der Proliferationsinhibierung unter Hypoxie, bezogen auf die NTC-Kontrolle, zur Folge hat. Die Reduktion der SOX4 mRNA mittels siRNA7 verursacht eine Reduzierung der Verdopplungszeit von 1,1 Tagen in der NTC-Kontrolle auf 0,7 Tage in den siRNA7

transfizierten Zellen. Dies entspricht einer prozentualen Änderung von 38%. In den siRNA6 transfizierten Zellen reduziert sich die Änderung der Verdopplungszeit lediglich um 9% von 1,1 Tagen in der NTC-Kontrolle auf 1,0 Tage.

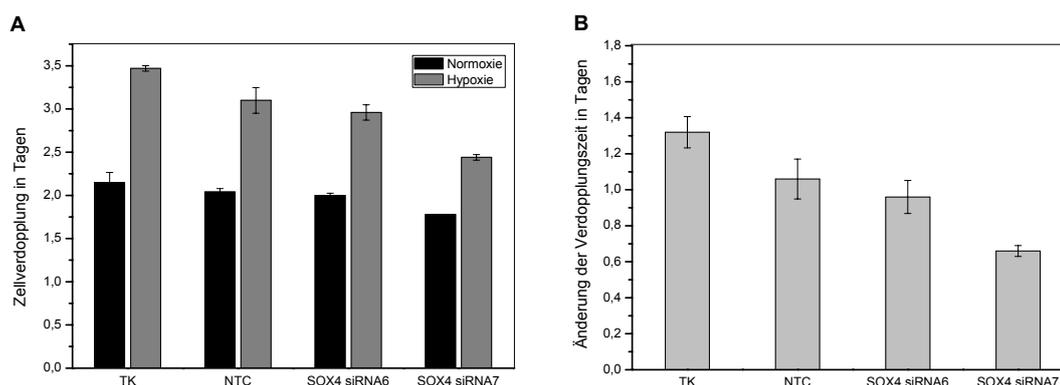


Abb. 3.19 Verdopplungszeit der Tumorzelllinie LNCaP nach Reduzierung der SOX4 mRNA-Expression unter Normoxie und Hypoxie (A) sowie die Darstellung der Zunahme der Verdopplungszeit in der Tumorzelllinie LNCaP nach Blockierung der SOX4 mRNA-Expression unter hypoxischen Kulturbedingungen (B). Die mitgeführte Transfektions-Kontrolle TK enthält lediglich die Transfektionsreagenzien wohin gegen mit der NTC-Kontrolle eine nicht bindende siRNA transfiziert wurde. N = 3. (NTC – non-targeting control)

3.4.4.2. Beeinflussung der Apoptose unter Hypoxie nach Inhibierung der SOX4 mRNA Expression

Neben der Analyse der Proliferation wurde ebenfalls das Apoptoseverhalten nach Inhibierung der SOX4 mRNA Expression mittels RNA-Interferenz untersucht. Als Parameter zur Messung des apoptotischen Zelltodes wurde die DNA-Fragmentierung, gemessen als Anstieg der Fragmentierung von DNA-Histon-Komplexen, verwendet. In Abbildung 3.20 ist die Anreicherung von DNA-Histon-Fragmenten nach Reduzierung der SOX4 mRNA Expression in der Tumorzelllinie LNCaP zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h unter Normoxie (A) und Hypoxie (B) dargestellt. Eine mit Staurosporin (100nM) behandelte Probe diente als Positiv-Kontrolle zur Detektion des apoptotischen Zelltods. Bei alleiniger Betrachtung der Staurosporin behandelten Zellen, weisen diese

über den Zeitverlauf eine Verstärkung der Nukleosomen-Fragmentierung und damit der Apoptoserate, unter Normoxie und Hypoxie auf. Im Vergleich der Staurosporin behandelten Proben mit den Proben des Transfektionsversuches fällt auf, dass die Apoptoserate, welche durch Staurosporin ausgelöst wird, unterhalb der Apoptoserate der Zellen, welche mit den Transfektionsreagenzien behandelt worden sind, liegt. In den Proben, welche unter normoxischen Bedingungen wuchsen, zeichnet sich zunächst nach 48h eine Verstärkung der Nukleosomen-Fragmentierung in den Kontrollwerten TK und NTC als auch in den siRNA transfizierten Proben ab. Diese sinkt jedoch nach 72h Normoxie deutlich unter das Niveau der 24h Proben. Unter Hypoxie weisen die Transfektionskontrollen TK und NTC sowie die SOX4 siRNA transfizierten Proben, betrachtet über den Zeitverlauf, eine Verringerung der Nukleosomen-Fragmentierung auf. Abbildung 3.20C zeigt die durch Hypoxie verursachte n-fache Änderung der Nukleosomen-Fragmentierung nach Inhibierung der SOX4 mRNA Expression. Nach 24h Hypoxie zeigen die Kontrollwerte TK und NTC eine Induktion der Apoptoserate um den Faktor 1,4 bzw. 1,3. Die mit den siRNA6 oder siRNA7 transfizierten Proben weisen eine n-fache Änderung um den Faktor 1,5 und 1,3 auf. Eine Verminderung der Apoptoserate ist nach 48h hypoxischer Kultivierung zu erkennen. So zeigen die Kontrollwerte TK und NTC eine n-fache Änderung um -1,5 und -1,9 auf und in den siRNA transfizierten Proben vermindert sich die Apoptoserate um den Faktor -1,6 (siRNA6) und -1,9 (siRNA7). Diese n-fache Verminderung wird nach 72h Hypoxie wieder aufgehoben und die Änderung beträgt in den Transfektionskontrollen nur noch -1,1 (TK) und -1,0 (NTC). Auch die Transfektion der siRNA6 zeigt nach 72h Hypoxie keine Veränderung der Apoptoserate (1,0), während die siRNA7 transfizierten Proben eine Verminderung der Apoptoserate um den Faktor -1,3 aufweisen.

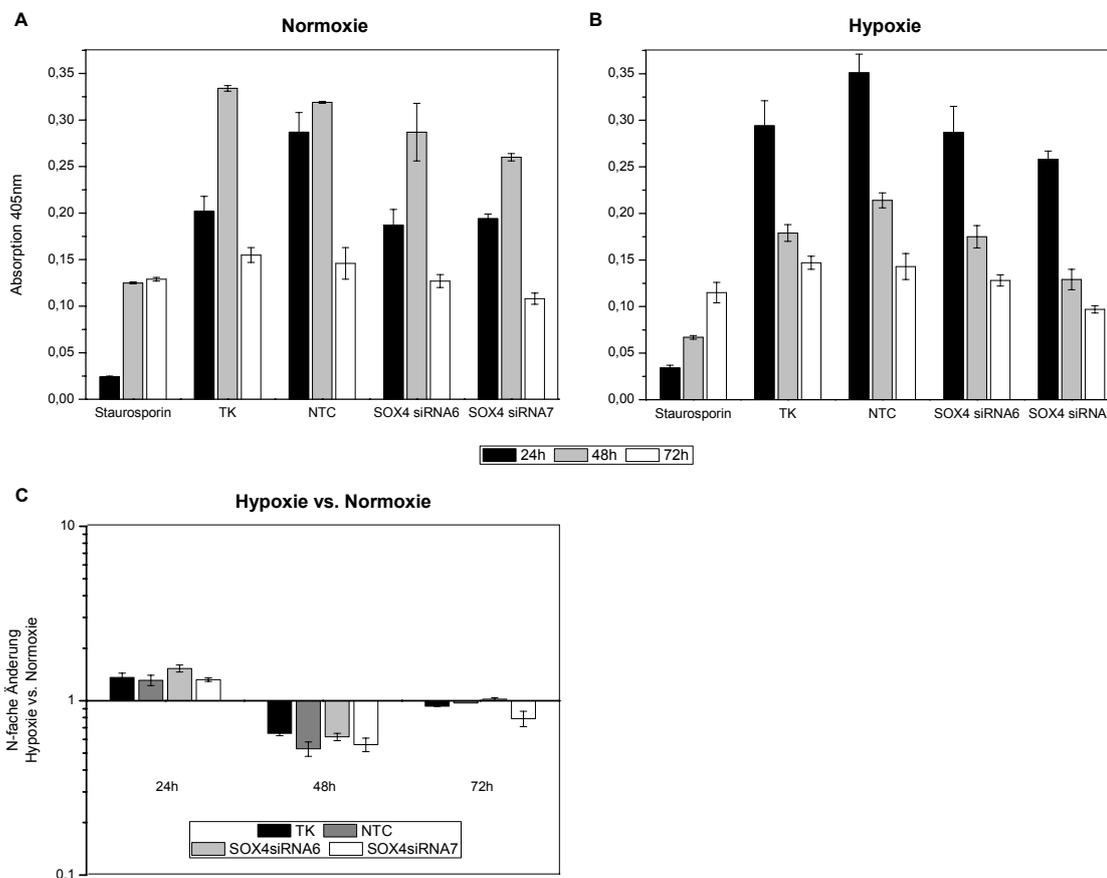


Abb. 3.20 Nucleosomen-Fragmentierung im Cytoplasma der Tumorzelllinie LNCaP nach Inhibierung der SOX4 mRNA Expression 24h, 48h und 72h nach normoxischer (A) und hypoxischer (B) Kultivierung. Die Nucleosomen-Anreicherung stellt ein Maß für die Apoptoserate innerhalb einer Zellpopulation dar. Die Behandlung von LNCaP Zellen mit 100nM Staurosporin für 24h, 48h und 72h dient als Positiv-Kontrolle zur Induktion des apoptotischen Zelltods. C – N-fache Änderung der Apoptoserate nach 24h, 48h und 72h Hypoxie nach Reduktion der SOX4 mRNA Expression. (TK - Transfektionskontrolle, NTC = „non-targeting control“; N = 3)

3.5. SOX4 Proteinexpression in Prostata-Tumorzelllinien

Zum Abschluss der experimentellen Arbeit stand ein polyklonaler Antikörper zum Nachweis des SOX4 Proteins zur Verfügung mit dessen Hilfe die Proteinexpression in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 untersucht werden konnte. Darüber hinaus diente die SOX4 Proteinexpression in den primären vaskulären

Endothelzellen MVEC (Microvascular Endothelial Cells) zur Identifizierung des korrespondierenden SOX4 Proteins in den verwendeten Tumorzelllinien.

Abbildung 3.21 zeigt die SOX4 als auch HIF-1 α Proteinexpression zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h unter normoxischer und hypoxischer Zellkultivierung. Aus Abbildung 3.21 geht hervor, dass das SOX4 Protein in den Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen wird SOX4 in DU145 und PC3 Zellen sehr schwach exprimiert. Unter strenger Berücksichtigung der schwachen Proteinexpression ist in den Tumorzelllinien PC3 und DU145 eine Hypoxie-abhängige Regulation des SOX4 Proteins erkennbar. Nachdem die detektierte SOX4 Protein-Bande auf die β -Actin Bande normalisiert wurde, zeigt sich in PC3 Zellen nach 48h Hypoxie eine 10-fache Induktion des SOX4 Proteins. Nach 72h hypoxischer Kultivierung verkehrt sich die SOX4 Induktion ins Gegenteil und wird um den Faktor 4 reduziert. In DU145 Zellen zeigt sich nach Normalisierung mit der korrespondierenden Ladekontrolle β -Actin keine Veränderung (\pm 1,0) der SOX4 Expression nach 72h Hypoxie. Des Weiteren zeigt Abbildung 3.21 die SOX4 Expression in den Endothelzellen MVEC zum Zeitpunkt 48h Normoxie und Hypoxie. Mit Hilfe der Detektion von SOX4 in MVEC Zellen und eines Proteinmarkers konnte das SOX4 Protein in den Immuno-Blots der Proteinlysate der Tumorzelllinien bestimmt werden. Die SOX4 Proteinexpression zeigt in MVEC Zellen keine Veränderung durch eine hypoxische Kultivierung, jedoch wird das HIF-1 α Protein nach 48h Hypoxie deutlich induziert. Der Vollständigkeit wegen wird ebenfalls die HIF-1 α Proteinexpression in den Tumorzelllinien aus Abbildung 3.3 übernommen, welche aus denselben Proteinlysaten stammen.

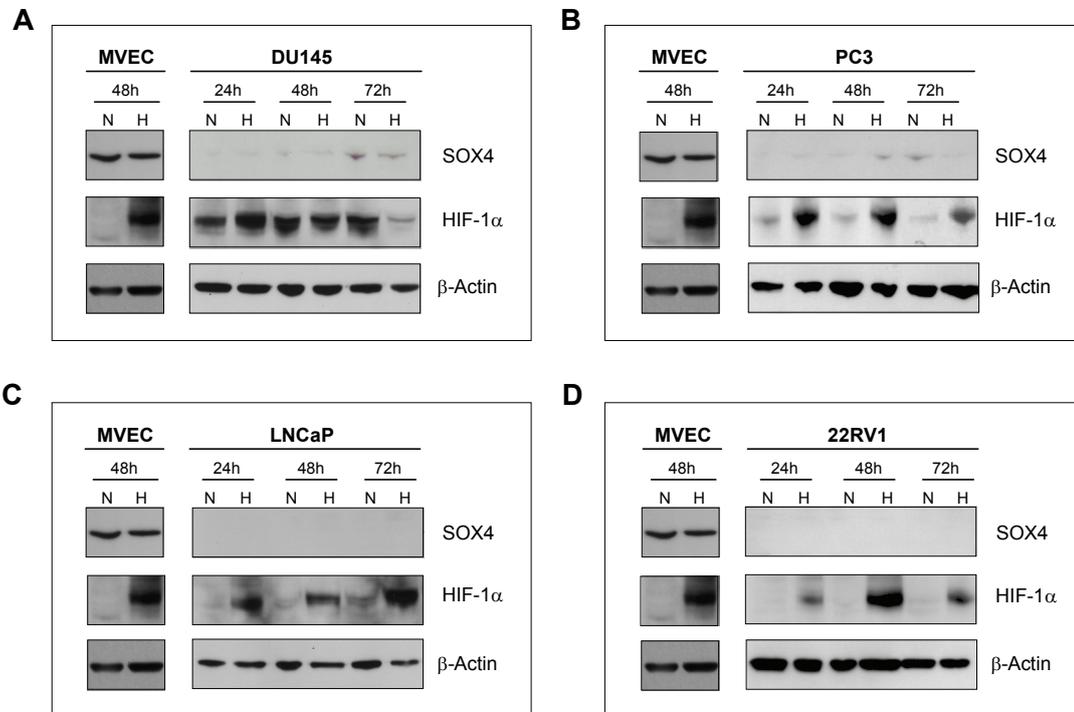


Abb. 3.21 SOX4 Proteinexpression (47 kDa) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1. Die Darstellung der SOX4 Expression in den Endothelzellen MVEC dient als Positivkontrolle für den Nachweis des Proteins SOX4. Die HIF-1α Proteinexpression entspricht Abb. 3.3. Die Expression des β-Actin Proteins (47 kDa) dient der Kontrolle einer gleichmäßig aufgetragenen Proteinmenge. Repräsentative Darstellung aus jeweils dreifach (HIF-1α) / zweifach (SOX4) durchgeführten Immuno-Blots. (N = Normoxie; H = Hypoxie)

4. Diskussion

Die Entstehung hypoxischer, das heißt mit Sauerstoff unterversorgten Tumorgeweberegionen hat verschiedene Auswirkungen auf die Behandlung und den Verlauf einer Tumorerkrankung. Unter anderem weisen hypoxische Geweberegionen eine erschwerte therapeutische Erreichbarkeit, eine erhöhte Bereitschaft zur Metastasierung sowie eine verminderte Apoptoseinduzierbarkeit auf (5). Die Sauerstoff-abhängige Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) nimmt während der vielfältigen zellulären Veränderungen unter Hypoxie eine Schlüsselposition ein. Die Aktivierung von HIF-1 ist streng Sauerstoff-abhängig reguliert und erfolgt sowohl in Tumorzellen als auch in untransformierten Zellen. Resultat der HIF-1 Stabilisierung ist die Aktivierung oder Inhibierung von mehr als 100 Zielgenen, deren Genprodukte funktionelle Bedeutung in verschiedensten zellulären Prozessen besitzen (16, 100).

Tumorerkrankungen der Prostata weisen, gesehen über alle Tumorarten beim männlichen Erwachsenen, die höchste Inzidenzrate auf und stellen die zweithäufigste Todesursache, auf Grund einer Tumorerkrankung, beim Mann dar (101). Mit Hilfe von immunhistochemischen (anti-VEGF, anti-CA9) als auch physikalischen Messmethoden (Eppendorf pO₂ Mikroelektrode, Positronemissionstomographie) konnten zum einen hypoxische Areale in Prostata-Tumoren identifiziert werden als auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen steigender Hypoxie, malignem klinischen Krankheitsgrad und fortgeschrittenem Patientenalter hergestellt werden (102-104). Damit einhergehend wird die α -Untereinheit des Transkriptionsfaktor HIF-1, verglichen mit Prostata-Epithel- und Stroma-Zellen als auch benignen Prostata-Hyperplasien, in Prostata-Tumoren verstärkt exprimiert. Die erhöhte HIF-1 α Expression korreliert zudem mit einer verringerten Funktionalität des Tumorsuppressorproteins p53 und einer erhöhten Zellproliferationsrate (10, 105). Bei der Betrachtung von untransformierten Prostata-Epithelzellen (PrEC), Androgen abhängig- und unabhängigwachsenden

Prostata-Tumorzelllinien wurde weiterhin eine steigende HIF-1 α Aktivität in Zusammenhang mit der Tumorzellmalignität nachgewiesen (106).

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit den Genexpressionsänderungen in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen unter hypoxischen Bedingungen. Weiterhin soll der Vergleich der Genexpressionsprofile Aufschluss über einen unterschiedlichen Umgang mit hypoxischen Kulturbedingungen zwischen Tumor- und Primärzellen ermöglichen. Darüber hinaus steht die Identifizierung von Hypoxie-regulierten Genen, deren Expression in Tumorzellen verändert wird, jedoch keine Veränderung in Primärzellen aufweisen im Fokus dieser Arbeit. Die Analyse der funktionellen Bedeutung dieser veränderten Genexpression an einem neu identifizierten Hypoxie-Zielgen bildet den Abschluss der Arbeit.

4.1. Aktivierung des Hypoxie-Signalweges in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Epithelzellen

Zur Untersuchung der zellulären Auswirkungen hypoxischer Umweltbedingungen wurden die Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und die Prostata-Primärzellen PrEC einer 1%igen Sauerstoffatmosphäre ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression der HIF-1 Zielgene VEGF und CA9 in den Tumorzelllinien als auch in den Prostata-Epithelzellen nach 48h und 72h hypoxischer Kultivierung in ihrer mRNA Expression induziert werden (Abbildung 3.2). Weiterhin zeigte sich in den Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 eine Induktion des HIF-1 α Proteins selbst (Abbildung 3.3). Der zeitliche Verlauf und die Intensität der HIF-1 α Induktion vollziehen sich in den einzelnen Tumorzelllinien jedoch unterschiedlich. Die androgensensitiv wachsenden Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1, sowie die androgenunabhängig wachsende Zelllinie PC3 weisen über alle Zeitwerte eine deutliche und konsistent verlaufende Proteininduktion unter Hypoxie auf und

zeigen keine oder eine sehr schwache Proteinexpression unter normoxischen Bedingungen. Im Gegensatz dazu wird HIF-1 α in den androgenunabhängig wachsenden Tumorzellen DU145 auch unter normoxischen Bedingungen exprimiert. So wird HIF-1 α in DU145 Zellen zu allen getesteten Zeitpunkten unter Normoxie exprimiert, jedoch verstärkt sich diese Expression nach 24h Hypoxie um weitere 62%. Nach 48h gleicht sich das Expressionsniveau an und es ist keine eindeutige Expressionsänderung zwischen Normoxie und Hypoxie zu erkennen, während nach 72h Hypoxie HIF-1 α unter Hypoxie herunter reguliert wird und nur noch 10% der Expression unter Normoxie aufweist. In den letzten Jahren zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Steroidhormonen und der HIF-1 α Expression (107). So kann die HIF-1 α Proteinexpression durch Zugabe von Androgenen induziert werden. Darüber hinaus besteht eine signifikante Korrelation zwischen der HIF-1 α Expression und dem Vorhandensein des Androgenrezeptors (108). Die Korrelation zwischen Hormonstatus eines Tumors und HIF-1 α Expression wird weiterhin gestützt durch die Tatsache, dass Tumorzellen, welche nach Androgenentzug ein hormonunabhängiges Wachstum entwickelten, Mutationen in der sauerstoffempfindlichen ODD-Proteindomäne aufweisen. Dies resultiert in einer O₂-unabhängigen HIF-1 α Stabilisierung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (109). Die HIF-1 α Expression, unter normoxischen Bedingungen in der Prostata-Tumorzelllinie DU145 weist eindeutig auf eine veränderte HIF-1 α Regulation unabhängig von der umgebenden Sauerstoffkonzentration hin.

Neben der HIF-1 α Induktion unter hypoxischen Bedingungen, konnte ebenfalls eine Hypoxie-abhängige Expression des HIF-1 α Zielproteins Redd1 (55) in allen getesteten Prostata-Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Die Induktion tritt etwa 24h nach Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α ein und wurde in Abhängigkeit zum Zellsystem bereits nach 24h (DU145, LNCaP) oder erst nach 48h (PC3, 22RV1) hypoxischer Kultivierung beobachtet. Wie bereits beschrieben wird

HIF-1 α in DU145 Zellen bereits unter Normoxie überexprimiert. Die Redd1 Expression korrespondiert mit der HIF-1 α Expression und ist am Stärksten nach 24h Hypoxie. Über den Zeitverlauf betrachtet verringert sich die Hypoxie-abhängige Induktion und nach 72h wird Redd1 unter Normoxie und Hypoxie gleich stark exprimiert, bedingt durch eine bereits nach 48h eintretende gleich starke HIF-1 α Expression sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie. Auf Grund der Hypoxie-abhängigen Stabilisierung des HIF-1 α Proteins als auch der Induktion der HIF-1 Zielgene VEGF, CA9 (mRNA-Expression) und Redd1 (Protein-Expression) kann davon ausgegangen werden, dass die zelluläre Hypoxie-Signaltransduktion in Folge der gewählten Kulturbedingungen von 1% Sauerstoff in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 aktiviert wird.

In den Prostata-Primärzellen wurde das HIF-1 α Protein sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen exprimiert (Abbildung 3.4). Bei alleiniger Betrachtung der HIF-1 α Expression unter Normoxie wird HIF-1 α je nach Zellspender über den zeitlichen Verlauf gesehen verstärkt (PrEC_2, PrEC_5), verringert (PrEC_4) oder konstant (PrEC_3) exprimiert. Eine mögliche Ursache für die HIF-1 α Expression unter normoxischen Bedingungen ist die für das Wachstum der Primärzellen erforderliche Zugabe von Wachstumsfaktoren. Aus der Literatur ist bekannt, dass HIF-1 α nicht nur durch hypoxische Kulturbedingungen stabilisiert wird, sondern ebenfalls durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie den „Epidermal Growth Factor“, welcher im Medium der Prostata-Epithelzellen enthalten ist (110). Dennoch lässt sich in Abhängigkeit zum Zellspender eine veränderte HIF-1 α Expression zwischen Normoxie und Hypoxie erkennen. So wird das HIF-1 α Protein in PrEC_2 und PrEC_5 Zellen nach 72h Hypoxie um 40% vermindert exprimiert, während sich in PrEC_4 Zellen nach 72h Hypoxie eine 60%ige Induktion der HIF-1 α Expression zeigt. Trotz der unterschiedlichen HIF-1 α Expression konnte die charakteristische Hypoxie-Induktion der HIF-1 α Zielgene VEGF (2-3fach) und CA9 (10fach) in den Primärzellspendern

nachgewiesen werden (Abbildung 3.2). Dies steht nicht im Widerspruch zur HIF-1 α Stabilisierung unter Normoxie und Hypoxie, denn die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α ist abhängig von der Interaktion mit den Co-Aktivatoren „CREB [cAMP-response element] binding protein“ (CBP) und p300. Diese Interaktion wird erst unter hypoxischen Bedingungen möglich und führt zur vollständigen transkriptionellen Aktivität von HIF-1 α . Im Kapitel 4.4.1. wird auf dieses Phänomen noch einmal ausführlich eingegangen. Demzufolge deutet die Hypoxie-abhängige Induktion der HIF-1 α Zielgene VEGF und CA9 ebenfalls auf einen aktiven Hypoxie-Signalweg in den verwendeten Primärzellen hin.

4.2. Beeinflussung von Proliferation, Apoptose und Zellzyklus durch Hypoxie in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Epithelzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Hypoxie-Signalweg unter den gewählten hypoxischen Kulturbedingungen aktiviert wird, wurden die zellulären Auswirkungen der Hypoxie auf Proliferation, Apoptoseverhalten und Zellzykluspassage untersucht.

Es konnte gezeigt werden (Abbildung 3.5), dass die Proliferation sowohl in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 als auch in den Prostata-Primärzellen PrEC durch hypoxische Kultivierung verlangsamt wird. Die Proliferationsinhibierung der Tumorzellen untereinander verändert sich ähnlich stark und weist eine mittlere Verlangsamung von 55% (0,9d) auf. In den Prostata-Primärzellen erfolgt die Proliferationsinhibierung unter Hypoxie in starker Abhängigkeit zum Zellspender. So zeigten PrEC_2 Zellen eine Wachstumsinhibierung um 104% (1,9d) und PrEC_5 Zellen um 21% (0,7d). Die mittlere Wachstumsreduzierung, gesehen über alle verwendeten Primärzellspender, beträgt 70% (1,5d). Neben der Betrachtung der Zellproliferation erfolgte ebenfalls die Untersuchung der Zellzyklusphasen nach hypoxischer Kultivierung in den Prostata-Tumorzelllinien

LNCaP und 22RV1 als auch in den Primärzellen PrEC (Kapitel 3.2.5). Unter den gewählten Sauerstoffbedingungen konnte keine signifikante Änderung der Zellzyklusverteilung in den untersuchten Tumorzelllinien ermittelt werden. Die Prostata-Primärzellen zeigten nach 72h hypoxischer Kultivierung einen Rückgang der S-Phase Aktivität um 36%, welche jedoch nicht zu einem Zellzyklusarrest unter Hypoxie führte (Abbildung 3.7). Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Proliferation auf Grund der hypoxischen Kultivierung in Prostata-Tumorzellen als auch in untransformierten Prostata-Epithelzellen inhibiert wird. Darüber hinaus zeichnet sich die Tendenz ab, dass die Proliferation in Prostata-Primärzellen unter Hypoxie stärker inhibiert wird. Die Proliferationsinhibierung führt unter den gewählten Sauerstoffbedingungen nicht zum Zellzyklusarrest.

Untersuchungen zur Apoptose unter Hypoxie (Kapitel 3.2.4.) ergaben in den getesteten Prostata-Tumorzelllinien DU145 und PC3 als auch in den Prostata-Primärzellen PrEC_2, PrEC_3, PrEC_4 und PrEC_5 keine Hinweise auf eine Induktion der Apoptose nach 24h, 48h oder 72h hypoxischer Kultivierung. Der Anteil vitaler Zellen unter Hypoxie lag in den Tumorzelllinien bei über 80% und in den Primärzellen über 70% (Abbildung 3.6). Ein leicht erhöhter apoptotischer Zellanteil innerhalb der Primärzellen, verglichen mit den Tumorzelllinien, lässt sich mit einer allgemein stärkeren Stresssituation für die Primärzellen auf Grund der unnatürlichen Kultivierung außerhalb ihres Ursprunggewebes erklären und wurde sowohl unter normoxischer als auch hypoxischer Kultivierung gemessen. Die Betrachtungen zur Zelltod-Induzierung unter hypoxischen Bedingungen werden unter Kapitel 4.3.2 weiter vertieft.

Die Behandlung der Prostata-Tumorzellen als auch der Prostata-Primärzellen mit 1% Sauerstoff gilt als moderate Hypoxie und führte in den vorliegenden Versuchen zur Inhibierung der Zellproliferation als auch zur Aktivierung des zellulären Hypoxie-Signalweges durch Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α und der damit verbundenen Beeinflussung seiner Zielgene VEGF, CA9 und Redd1. Unter den gegebenen Bedingungen kommt es jedoch in Prostata-Tumorzellen und Prostata-

Primärzellen nicht zur Apoptoseinduktion oder zum Zellzyklusarrest. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die vorliegenden Sauerstoffbedingungen für die nachfolgende Genexpressionsanalyse geeignet sind und nicht durch einen übermäßigen Zelltod verfälscht werden.

4.3. Hypoxie-abhängige Genexpressionsänderung in Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen

Hauptziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung einer durch hypoxische Bedingungen veränderten Genexpression in Prostata-Tumorzelllinien und untransformierten Prostata-Epithelzellen. Zu Beginn der vergleichenden Genexpressionsuntersuchung ermöglichte die Hauptkomponentenanalyse eine Betrachtung jedes Probenwertes über alle auf dem Microarray Chip aufgetragenen Gene nach normoxischer als auch hypoxischer Kultivierung (Abbildung 3.8). Die Genexpressionsprofile der Tumorzelllinien grenzen sich deutlich von einander ab. Jedoch lagern sich die einzelnen Versuchswerte einer jeden Zelllinie in einer Punktwolke zusammen. Das bedeutet, dass sich jede Tumorzelllinie durch ihr zellspezifisches Expressionsprofil auszeichnet. Darüber hinaus zeigt sich die Abgrenzung zwischen den Androgen-unabhängig wachsenden, p53-negativen Tumorzelllinien DU145, PC3 und den Androgen-abhängig wachsenden, p53-positiven Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1. Die untransformierten Prostata-Epithelzellen weisen ebenfalls zellspezifische Expressionscharakteristika auf, die sich von denen der Tumorzellen unterscheiden und werden getrennt von den Tumorzelllinien im drei-dimensionalen Diagramm dargestellt. Die allgemeine Betrachtung mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse zeigt somit, dass die Genexpression unterschiedlicher Zelltypen analysiert wurde. Die detailliertere Betrachtung zeigte weiterhin in den Tumorzelllinien als auch Primärzellen eine deutliche Genexpressionsänderungen nach hypoxischer Kultivierung. Jedoch zeigt sich

diese Veränderung erst nach Betrachtung der vierten Unterscheidungskomponente, so dass Expressionsänderungen auf Grund zellspezifischer Eigenschaften stärker sind, als die Änderungen, welche durch hypoxische Kulturbedingungen verursacht werden. Dies lässt sich zurückführen auf die Tatsache, dass Hypoxie und die daraus resultierende Aktivierung des Hypoxie-Antwortsignalweges nicht nur während pathophysiologischen Erscheinungen, wie koronaren Herzerkrankungen, chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen oder Tumorerkrankungen auftritt, sondern dass hypoxische Bedingungen auch eine physiologische Bedeutung haben und unablässig für eine vollständige Embryogenese und Differenzierung sind (111). Die Hypoxie-abhängige Veränderung der Genexpression ermöglicht in erster Linie das Überleben von Zellen und passt die zellulären Prozesse allmählich an die erschwerten Umgebungsbedingungen an.

Weiterhin zeigt die unterschiedliche Anzahl von regulierten Genen (Tabelle 3.4) in den einzelnen Zelltypen eine deutliche Abhängigkeit der Hypoxie bedingten Genexpressionsregulation zum gewählten Zellsystem. So werden in den Androgen-unabhängig wachsenden, p53 negativen Tumorzelllinien Du145 und PC3 viermal mehr Gene in ihrer Expression durch Hypoxie verändert als in den Androgen-abhängig wachsenden, p53 positiven Zelllinien LNCaP und 22RV1.

Die vorliegende Auswahl von Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Epithelzellen ermöglichte die Erstellung von verschiedenen vergleichenden Expressionsprofilen hinsichtlich einer veränderten Genexpression unter Hypoxie, welche in Tabelle 3.3 zusammengefasst wurden. Insgesamt resultierte die vergleichende Genexpressionsanalyse in der Bildung von sechs thematischen Gengruppen mit 98 Hypoxie-regulierten Genen von denen 54 bisher in der Literatur nicht als durch hypoxische Bedingungen reguliert beschrieben sind. Die Einteilung der identifizierten Gene hinsichtlich der Funktion ihrer Genprodukte erfolgte mit Hilfe der Literatur. Auffällig war der hohe Anteil von Hypoxie-regulierten Genen, welche funktionelle Bedeutung im Kohlenhydrat-Metabolismus und für das Zellüberleben sowie den Zelltod

besitzen. Im Nachfolgenden werden diese zellulären Prozesse und ihr Bedeutung für das Überleben von Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen vorgestellt.

Im Anhang findet sich zu jedem der aufgeführten Gene eine kurze funktionelle Zusammenfassung. Die Bewertung der Gene hinsichtlich einer bisher nicht beschriebenen Hypoxie-Regulation basiert ebenfalls auf Literaturrecherchen. Auf Grund der Vielzahl von Publikationen zum Thema Hypoxie, wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Unterscheidung der identifizierten Gene nach ihrer Hypoxie-Regulation lediglich als einen ersten Hinweis auf ein mögliches neues Hypoxie-abhängig reguliertes Gen zu verstehen ist.

4.3.1 Kohlenhydrat-Metabolismus und Energiegewinnung unter Hypoxie

Eine der wichtigsten Änderungen unter Hypoxie ist der metabolische Wechsel von aerober Energiegewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung zur anaeroben glykolytischen ATP-Produktion. Das Ausgangsprodukt der zellulären Energiegewinnung, Glukose, wird in eukaryotischen Organismen über eine Reihe von Stoffwechselschritten metabolisiert. Zunächst wird Glukose über spezifische Glukose-Transporter in die Zelle aufgenommen. In der sich anschließenden Glykolyse erfolgt die Umsetzung der Glukose in Pyruvat. Pyruvat wird unter aeroben Bedingungen zu Acetyl-CoA, O₂-abhängig, decarboxyliert, welches das Ausgangssubstrat des Tricarbonsäurezyklus (TCA) darstellt. Aufgabe des TCA ist die ständige Wiederbereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NAD⁺, FAD) und die damit verbundene Bildung von Protonen (H⁺). Mit Hilfe von Protonen und Reduktionsäquivalenten wird im letzten Schritt der Metabolisierungskette durch oxidative Phosphorylierung Adenosintriphosphat (ATP) gebildet. Der vollständige Abbau von Glukose zu H₂O und CO₂ ist der energetisch günstigste Weg den zellulären Energieträger ATP zu bilden, welcher jedoch über die oxidative Phosphorylierung

streng von Sauerstoff abhängig ist. Zellen unter hypoxischen Bedingungen steht die Energiegewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung nicht mehr zur Verfügung und sie müssen einen alternativen Weg zur ATP-Bildung finden. Die im Zytoplasma ablaufende Glykolyse produziert bereits bei der Metabolisierung von Glukose zu Pyruvat ATP, jedoch ist die energetische Ausbeute 19-fach geringer verglichen mit der Umsetzung mittels des TCA. Bei der sich anschließenden Reduktion von Pyruvat zu Lactat wird das für die Glykolyse benötigte Reduktionsäquivalent NAD^+ aus NADH regeneriert. Katalysiert wird diese Reaktion von dem Enzym Lactatdehydrogenase.

Die metabolische Umstellung unter sauerstoffarmen Bedingungen wird an mehreren Stoffwechselschnittpunkten von HIF-1 realisiert. An Hand der Hypoxie-regulierten Gene der Gengruppe I und III zeigt sich in den Prostata-Tumorzelllinien eine Expressionsinduktion verschiedener glykolytischer Schlüsselenzyme wie zum Beispiel der Phosphoglycerat-Kinase (PGK1), Hexokinase (HK2) und der Phosphofruktokinase (PFKFB3, PFKFB3). Eine Schlüsselposition nimmt jedoch die durch HIF-1 vermittelte Induktion der Enzyme Lactatdehydrogenase A (LDHA) und Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 (PDK1) ein (57, 112). LDH katalysiert, wie bereits erwähnt, die Umsetzung von Pyruvat in Lactat und ermöglicht somit die Regenerierung des in der Glykolyse benötigten Reduktionsäquivalents NAD^+ . PDK1 ist ein regulatorisches Enzym des TCA. Durch Phosphorylierung und der damit verbundenen Inhibierung der Pyruvatkinase, wird die Umsetzung von Pyruvat in Acetyl-CoA unterbunden. Die Umsetzungsrate des Tricarbonsäurezyklus wird auf Grund des fehlenden Substrats vermindert. In Folge dessen die oxidative Phosphorylierung ebenfalls inhibiert wird. Die Hypoxie-abhängige Induktion von PDK1 konnte sowohl in der Gengruppe I als auch III nachgewiesen werden. Der durch die Aktivierung der anaeroben Glykolyse stark erhöhte Glukosebedarf wird zum einen durch die Induzierung von Genen gedeckt, die für Glukosetransporter (SLC16A3, Gengruppe I) kodieren aber auch durch die Induzierung von Enzymen, die aus gespeichertem zellulärem Glykogen wieder Glukose bereitstellen können. Dazu gehört die Induzierung

der Phosphoglucomutase 1 (PGM1, Gengruppe I, III), welche Glukose-1-Phosphat in Glukose-6-Phosphat umsetzt. Hypoxie beeinflusst somit den Kohlenhydrat-Metabolismus an unterschiedlichen regulatorischen Schlüsselpositionen. Die resultierende Umstellung des zellulären Stoffwechsels auf eine anaerobe, glykolytische Energiegewinnung trägt entscheidend zur Anpassung und zum Überleben von Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen bei.

Neben der Induktion der Glykolyse in hypoxischen Tumorregionen weisen solide Tumore auch in gut oxygenierten Regionen eine erhöhte aerobe Glykolyse auf, welches als Warburg Effekt bezeichnet wird. Die Bedeutung des Warburg Effektes ist noch unklar, jedoch korreliert der erhöhte Glukoseeinstrom in die Zelle mit einer schlechten Prognose für den Erkrankungsverlauf als auch mit einem aggressiveren Tumorwachstum (113).

4.3.2 Beeinflussung von Zellüberleben und Zelltod unter Hypoxie

Hypoxie kann je nach Stärke und Dauer des Sauerstoffentzugs zum Zelltod oder zum Überleben einer Zelle sowie zur Entstehung von Apoptose-resistenten Zellpopulationen führen. Von zentraler Bedeutung ist der Transkriptionsfaktor HIF-1, welcher einerseits Zielgene aktiviert, die das Überleben einer Zelle fördern (Glykolyse) und zum anderen induziert HIF-1 zelluläre Signalwege, welche im Zelltod resultieren (Apoptose, Nekrose).

Die pro-apoptotischen Gene BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3) und BNIP3L wurden in der vorliegenden Genexpressionsstudie unter hypoxischen Bedingungen in den Prostata-Tumorzelllinien induziert, zeigen jedoch keine veränderte Genexpression in den Prostata-Primärzellen (Gengruppe I, III). BNIP3 und BNIP3L gehören zur Bcl2 Proteinfamilie, welche sich aus pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern zusammensetzt. Beide Mitglieder gelten als HIF-1 Zielgene und werden in

ihrer Expression unter Hypoxie induziert (30). Neuere Untersuchungen bringen BNIP3 und BNIP3L mit einem weiteren Mechanismus, der Autophagy, in Verbindung (114). Als Autophagy wird die zelluläre Verdauung von Zellorganellen bezeichnet, welche in geringem Maße in jeder Zelle auftritt. Mit Hilfe von autophagischen Prozessen wird die Akkumulierung von abnormen Proteinaggregaten verhindert und intrazelluläre Pathogene können abgebaut werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Tumorsuppressoren wie p53 oder PTEN die zelluläre Autophagy fördern (115). Neben der Beschreibung der Autophagy als Tumorsuppressor-Signalweg dient die Autophagy ebenfalls dem Überleben einer Zelle unter Glukose- und Wachstumsfaktorentzug. Hypoxische Bedingungen gehen immer einher mit einer Unterversorgung von Glukose und dem zellulären Energieträger ATP. Die Selbstverdauung ermöglicht den Aufschluss und die Wiederverwertung von zellulären Grundmolekülen wie Glukose und Aminosäuren. Somit trägt Autophagy zum Schutz vor dem apoptotischen Zelltod bei und stellt eine weitere Überlebensstrategie für Tumorzellen unter Hypoxie dar. Die Hypoxie-abhängig regulierten Proteine BNIP3 und BNIP3L induzieren die zelluläre Autophagy durch Inhibierung der Interaktion zwischen dem pro-apoptotisch wirkenden Protein Beclin-1 mit seinen Reaktionspartnern Bcl2 und Bcl-X_L und inhibieren somit die Auslösung der Hypoxie-induzierten Apoptose (116). Eine verstärkte Autophagy stellt somit einen weiteren Mechanismus dar, welcher zum Überleben von Tumorzellen unter Hypoxie beitragen kann. Jedoch kann eine lang andauernde Autophagy auch zum Zelltod führen.

Eine moderate Hypoxie (2% O₂) hat die Aktivierung des Hypoxie-Signalweges zur Folge, jedoch muss sie nicht zwingend zur Induktion des programmierten Zelltods führen. Erst die weitere Reduktion der Sauerstoffbedingungen bis hin zur Anoxie führen zu einer vermehrten Expression von pro-apoptotischen Proteinen. Darüber hinaus tragen die umgebenden Milieubedingungen, wie Azidose oder Glukoseentzug, entscheidend dazu bei, ob und wie lange eine Zelle unter hypoxischen Bedingungen überleben kann. Weiterhin führt eine lang anhaltende Sauerstoffunterversorgung zur

Selektion von Tumorzellen, die Mechanismen entwickeln konnten, die sie gegen eine Apoptoseinduktion schützen (37). Dazu zählt die HIF-1 α abhängige Induktion des anti-apoptotischen Proteins IAP-2 (Inhibitor of Apoptosis Protein 2), welches die Blockierung des pro-apoptotischen Proteins Bax zur Folge hat (117).

Die Hypoxie-abhängige Induktion von Apoptose und die Ausbildung von Apoptose-resistenten Zellpopulationen unter hypoxischen Bedingungen wird kontrovers diskutiert und es konnte bis heute kein abschließendes Urteil über die Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-1 gefällt werden. Nach dem heutigen Kenntnisstand trägt HIF-1 über die Inhibierung der Hypoxie-induzierten Apoptose zu einem verstärkten Tumorwachstum bei und fördert durch Aktivierung von pro-apoptotischen Genen die Entstehung von Tumorzellpopulationen mit einem aggressiveren Wachstumspotential.

4.4. Prostata-Tumorzellen und Prostata-Primärzellen zeigen unterschiedliche Genexpressionsänderungen nach hypoxischer Kultivierung

Die Kultivierung der Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und der Prostata-Primärzellen PrEC unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) resultiert in einer veränderten Genexpression. Die Genexpressionsänderung durch Hypoxie wurde zum einem in den Prostata-Tumorzelllinien und Prostata-Primärzellen unabhängig voneinander analysiert. Daraus resultierten die Gengruppen III und IV. Zum anderen waren insbesondere Gene von Interesse, die in Tumorzellen einer Hypoxie-abhängigen Regulation unterliegen, jedoch diese Regulation nicht in Primärzellen zeigen. Der direkte Vergleich der Genexpressionsänderungen nach hypoxischer Kultivierung von Tumorzellen und Primärzellen ergab die Gengruppen I und II. Demzufolge stellen ein Teil der Gene von Gruppe I eine Untergruppe der Gengruppe III dar und ebenso sind Gene aus Gruppe II in der Gengruppe IV zu finden. Die Anpassung von Tumorzellen und Primärzellen an hypoxische Umweltbedingungen

erfolgte jedoch durch Regulation unterschiedlicher zellulärer Signalwege. In den Tumorzelllinien ist auffällig, dass sowohl bei dem Vergleich der Tumorzellen gegen die Primärzellen (Gengruppe I; Tabelle 3.5) als auch bei alleiniger Betrachtung der Tumorzelllinien (Gengruppe III; Tabelle 3.7) die Umstellung des Intermediärstoffwechsels auf anaerobe Energiegewinnung im Vordergrund steht. So haben 10 von 53 Genen, welche als in Tumorzellen als Hypoxie-abhängig reguliert identifiziert werden konnten, funktionelle Bedeutung im Kohlenhydratmetabolismus. Darüber hinaus wurden verschiedene Gene induziert, deren Expression das Überleben von Zellen fördern. Dazu gehört unter anderem die Induzierung des vaskulären Wachstumsfaktors für Endothelzellen (VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor) und die damit verbundene Induktion der Angiogenese (5). Die Funktion der Hypoxie-abhängig induzierten Gene BNIP3 und BNIP3L kann sowohl zum Überleben (Autophagy) von Tumorzellen als auch zur Induktion des apoptotischen Zelltods beitragen (Kapitel 4.3.2).

Im Gegensatz zu den Tumorzellen induzieren Primärzellen unter Hypoxie vorrangig die Expression von Genen, die zu einer Inhibierung des Zellwachstums beitragen (Gengruppe II, IV; Tabelle 3.6, 3.8). Die Induktion des Transkriptionsfaktors KLF11 (TIEG2) wird in Zusammenhang mit einer Inhibierung der Zellproliferation in kultivierten Epithelzellen gebracht (118). Der ebenfalls induzierte Transkriptionsfaktor ETS2 reguliert Gene, die während der Stammzell-Regulation, Zellseneszenz, Zelltod und bei der Tumorentstehung eine funktionelle Bedeutung aufweisen. ETS2 besitzt die Fähigkeit den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p16^(INK4A) zu aktivieren und somit zur Auslösung eines permanenten Zellzyklusarrestes beizutragen (119). Ein auffälliger Unterschied zwischen Tumorzellen und Primärzellen ist darüber hinaus die in den Primärzellen beobachtete Inhibierung von Genen, welche im Lipidmetabolismus und innerhalb der oxidativen Phosphorylierung eine Rolle spielen. Ausschließlich die Prostata-Primärzellen zeigen eine deutliche Expressionsreduktion der Gene CPT1A (Carnitine Palmitoyltransferase 1A) und LIAS (Lipoic Acid Synthetase). Die Carnitin-

Palmitoyl-Transferase vermittelt den Transfer von langkettigen Fettsäuren vom Cytosol zur Mitochondrienmatrix. In den Mitochondrien dienen die Fettsäuren über die β -Oxidation der Energiegewinnung. Die Reduzierung der CPT1A Expression hat eine Verringerung der β -Oxidation von Fettsäuren zur Folge. Die Fettsäuresynthetase (LIAS) stellt das Schlüsselenzym der Fettsäurebiosynthese dar. Die Reduktion der Expression dieser beiden Gene bedeutet eine Inhibierung des Fettsäuremetabolismus und die damit verbundene Reduktion der AcetylCoA-Entstehung, denn AcetylCo kann auf Grund der hypoxischen Bedingungen nicht über den Tricarbonsäurezyklus umgesetzt werden. Zum einen schützt sich die Zelle so vor der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen, aber es bedeutet auch eine verminderte Zellproliferation auf Grund der fehlenden energetisch günstigen ATP-Produktion mittels oxidativer Phosphorylierung. Die eingeschränkte Expression der Gene NQO1 (NAD[P]H Dehydrogenase, Quinone 1) und HSPC051/UCRC (Ubiquinol-Cytochrome C Reductase) hat eine Verringerung der Elektronentransportvorgänge an der inneren Mitochondrienmembran und das Absinken des Protonengradienten zwischen Mitochondrienintermembranraum und Matrixraum zur Folge. Die Inhibition der Elektronentransportkette an der inneren Mitochondrienmembran resultiert in einem verminderten Membranpotential zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran und führt in letzter Konsequenz zum Cytochrom-C-Ausstoß und zur Induktion der Apoptose (120). Grundsätzlich lässt sich bei der Betrachtung von Prostata-Tumorzellen und Prostata-Primärzellen unter hypoxischen Kulturbedingungen erkennen, dass die Tumorzellen ihre Genexpression an ein Überleben und eine weitere Proliferation unter sauerstoffreduzierten Bedingungen anpassen. Während die veränderte Genexpression in Primärzellen die Schlussfolgerung einer vorrangigen Wachstumsinhibierung zulässt.

4.4.1 Sauerstoff-abhängige und -unabhängige HIF-1 α Stabilisierung

Die Analyse der Hypoxie-abhängigen Genexpressionsänderung in den Prostata-Primärzellen PrEC weist auf einen weiteren Aspekt der zellulären Hypoxie-Signaltransduktion hin. Wie aus Abbildung 3.4 hervorgeht, wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 α in PrEC Zellen sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie stabilisiert. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass HIF-1 α nicht nur durch sauerstoffreduzierte Bedingungen, sondern auch von Onkogenen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren stabilisiert und in seiner Aktivität beeinflusst wird (16). Da die Kultivierung der Prostata-Primärzellen nur unter Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren (EGF, FGF-B, IGF-1, TGF- β 1) möglich war, kann die Detektion des HIF-1 α Proteins unter normoxischen Bedingungen auf diesem Umstand beruhen. Trotz dieser Tatsache führte die Analyse der Genexpression unter Hypoxie in den Prostata-Primärzellen zur Identifizierung von 50 regulierten Genen. Die Beeinflussung der Expression von Zielgenen erfolgt nicht nur durch die Stabilisierung von Transkriptionsfaktoren durch spezifische zelluläre Signale, sondern jeder Transkriptionsfaktor wird durch Interaktion mit transkriptionellen Cofaktoren in seiner Aktivität beeinflusst. Die HIF-1 α Proteinstabilisierung unterliegt einer streng O₂-abhängigen Regulation mittels der HIF Prolyl-Hydroxylasen (PHD). Die ebenfalls Sauerstoff-abhängig arbeitende Hydroxylase FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1) verhindert darüber hinaus die Interaktion von HIF-1 α mit seinen Co-Aktivatoren CBP/p300 und blockiert somit seine transkriptionelle Aktivität unter Normoxie. Der Vergleich der Michaeliskonstanten (K_m) für FIH-1 und den PHDs in Bezug auf Sauerstoff zeigte, dass die PHDs deutlich mehr Sauerstoff benötigen um ihre halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen als FIH-1 (121). Das bedeutet, dass bei einem geringen Absinken der Sauerstoffkonzentration die Enzymaktivität der PHDs, auf Grund ihrer hohen K_m -Werte, sofort sinkt. Erst bei einem weiteren Absinken der O₂-Konzentration wird die FIH-1 Enzymaktivität reduziert (geringe K_m in Vergleich zu K_m von PHDs). Demnach wird das HIF-1 α Protein bereits bei geringen

Sauerstoffschwankungen oder durch andere Faktoren wie Wachstumsfaktoren stabilisiert, aber die Transaktivierungseigenschaften der C-TAD-Proteindomäne von HIF-1 α bleiben davon unbeeinflusst und durch FIH-1 weiterhin inhibiert. Erst durch stärker reduzierte Sauerstoffkonzentrationen wird die Enzymaktivität von FIH-1 beeinträchtigt und HIF-1 α erlangt seine vollständige Funktionalität. In den letzten Jahren wurde neben der HIF-1 vermittelten zellulären Hypoxie-Antwort ebenfalls die Bedeutung des Transkriptionsfaktors HIF-2 und die HIF-1 unabhängige Hypoxie-Regulation beschrieben (122, 123). Im Fall der HIF-1 α Stabilisierung in den Primärzellen PrEC wird HIF-1 α unter Normoxie nicht durch ein Absinken der Sauerstoffkonzentration stabilisiert, sondern durch die Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren, jedoch erlangt HIF-1 α dadurch nicht seine transkriptionelle Aktivität. Dies erfolgt erst durch Kultivierung der PrEC Zellen in einer sauerstoffarmen Atmosphäre und der daraus folgenden eingeschränkten FIH-1 Aktivität. Somit muss die Detektion von HIF-1 α in den Prostata-Primärzellen unter Normoxie keinen Widerspruch zu den identifizierten Hypoxie-regulierten Genen darstellen.

4.5. Einfluss von p53- und Androgen-Status auf eine Genexpressionsänderungen unter Hypoxie

Die verwendeten Prostata-Tumorzelllinien ließen sich auf Grund ihrer zellspezifischen Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilen. Aus Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1 geht hervor, dass die Tumorzelllinien DU145 und PC3 androgenunabhängig wachsen und kein funktionelles p53 Protein besitzen (Zellgruppe I). Im Gegensatz dazu zeichnen sich die Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 durch ein androgensensitives Wachstum und ein funktionelles p53 Protein aus (Zellgruppe II). Der Verlust der p53 Funktionalität als auch der Androgensensitivität von Prostata-Tumoren steht in direktem Zusammenhang mit einem aggressiveren und unkontrollierten Tumorwachstum.

Demnach symbolisieren die Tumorzelllinien DU145 und PC3 einen aggressiveren Tumorphänotyp, wohingegen die Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 einer stärkeren zellulären Kontrolle unterliegen.

Das Wachstum von untransformierten als auch Tumor-Prostatagewebe ist stark abhängig von dem Steroidhormon Testosteron. Nach Diagnose eines Prostatakarzinoms ist die Reduzierung der Androgenkonzentration mit Hilfe von Gonadotropin-Releasing-Hormon - Agonisten oder Anti-Androgenen die Therapie der ersten Wahl. Der Entzug von androgenen Wachstumshormonen führt zu einem raschen apoptotischen Zelltod und zur Reduzierung des Tumolvolumens (124). Es konnte gezeigt werden, dass der Androgenentzug zur Degeneration von Gefäßkapillaren und zur Vasokonstriktion in Androgen-sensitiven Geweben führt. An die resultierende, schnelle Reduktion des Blutflusses schließt sich die Entstehung von hypoxischen Regionen an (125, 126). Es besteht somit die Möglichkeit, dass die Induktion des programmierten Zelltods Folge der entstehenden Hypoxie nach Androgenentzug ist. Gleichzeitig kommt es in denen mit Sauerstoff unterversorgten Tumorregionen zur Aktivierung des Hypoxie-Signalweges und zur Selektion von Tumorzellen, welche sich der Apoptoseinduktion nach Androgenentzug entziehen und proliferieren können. Die klinische Praxis zeigt, dass es während einer Hormontherapie bei ca. 30% der Prostata-Tumorerkrankungen, nach einem anfänglichen Tumorrückgang, zur Ausbildung einer Androgen-unabhängig wachsenden Tumorform kommt (109). Jedoch spielen bei der Ausbildung von Androgen-unabhängig wachsenden Tumoren vor allem Veränderungen am Androgenrezeptor selbst eine große Rolle. Die Amplifikation, Überexpression oder Mutation des Androgenrezeptors ermöglicht eine erhöhte Sensitivität gegenüber jeglichen Steroidhormonen, so dass ein Tumorwachstum auch unter Androgenentzug stattfindet (127).

Das Tumorsuppressorprotein p53 fungiert in untransformierten Zellen als „Wächter der Genomintegrität“, indem es die Zellzykluspassage stoppt und zur Induktion des programmierten Zelltods führt, wenn Schädigungen der DNA vorliegen. Das

p53-Protein verhindert somit die Etablierung geschädigter Zellen mit potentiellen Mutationen in Oncogenen oder Tumorsuppressorgenen, welche weitere Wachstumsvorteile für transformierte Zellen bedeuten würden. Bis zu 50% aller humanen Tumore zeigen Mutationen im p53-Genlocus und besitzen kein oder ein funktionell verändertes p53-Protein (128). Unklar ist jedoch, ob p53 unter hypoxischen Bedingungen in der Zelle akkumuliert oder transkriptionell aktiviert wird. Es konnte experimentell sowohl eine HIF-1 α abhängige p53 Induktion gezeigt werden, als auch die Unveränderlichkeit der p53 Expression nach HIF-1 α Stabilisierung und Transaktivierung (36, 129). Als gesichert gilt, dass die Stabilisierung von p53 nur unter starken, lang anhaltenden hypoxischen oder anoxischen Bedingungen eintritt und die transkriptionelle Aktivierung von begleitenden Faktoren, wie zum Beispiel einer Azidose abhängig ist (130). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass p53 die transkriptionelle Aktivität als auch die Proteinkonzentration von HIF-1 α reduziert. Es wird davon ausgegangen, dass geringe Konzentrationen von p53 mit HIF-1 α um den transkriptionellen Co-Aktivatoren p300 konkurrieren und so die Transkriptionsaktivität von HIF-1 α geschwächt wird (131, 132). Dagegen fördern hohe Konzentrationen von p53 den proteosomalen Abbau von HIF-1 α (133). Während einer beginnenden Hypoxie scheinen Zellen auf Grund der HIF-1 α Stabilisierung in der Lage zu sein, dem programmierten Zelltod zu entkommen. Mit zunehmender Stärke und Dauer der Hypoxie kommt es jedoch, direkt oder indirekt durch HIF-1 α selbst vermittelt, zur Stabilisierung von p53 und zum Abbau von HIF-1 α . Die gesteigerte p53 Aktivität ist daraufhin Ursache für den apoptotischen Zelltod unter Hypoxie. Bis heute konnte jedoch noch keine direkte p53-abhängig vermittelte Apoptoseinduktion unter Hypoxie beobachtet werden. Gezeigt werden konnte aber, dass p53 die Expression des pro-apoptotischen Faktors BNIP3L (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like) induziert (134).

Die vergleichende Expressionsanalyse ergab 17 Gene, welche in den Tumorzellgruppen DU145/PC3 und LNCaP/22RV1 unterschiedlich reguliert wurden.

Diese Gene ließen sich unterschiedlichen zellulären Funktionen zuordnen. Die Gene C5orf13 (Chromosome 5 open reading frame 13) und TM4SF1 (Transmembrane 4 L six family member 1) werden in den Tumorzellen LNCaP und 22RV1 nach hypoxischer Kultivierung in ihrer Expression induziert, zeigen jedoch keine Regulation in den Tumorzellen DU145 und PC3. Die translatierten Produkte dieser Gene besitzen eine funktionelle Bedeutung für die Bewegung von Zellen. Das Gen C5orf13 kodiert ein Protein, welches durch die Vermittlung von Reorganisationsprozessen im peripheren Aktinzytoskelett, zur Zellbewegung beiträgt (135). Das Oberflächen-Antigen TM4SF1 ist in verschiedenen Tumoren stark exprimiert und spielt eine Rolle bei der Zellentwicklung, Zellwachstum und Zellmotilität (136).

Ebenfalls konnten Gene identifiziert werden, welche in den Tumorzelllinien DU145 und PC3 unter Hypoxie reguliert wurden, jedoch keine veränderte Expression in den Zelllinien LNCaP und 22RV1 aufwiesen. Dazu gehören die Gene IGFBP3 (Insulin-like growth factor binding protein 3), BTG1 (B-cell translocation gene 1, anti-proliferative) und CHES1 (Checkpoint suppressor 1). Die induzierten Gene IGFBP3 und BTG1 konnten einer gemeinsamen Funktion zugeordnet werden, da beide Gene zur Proliferationshemmung von Zellen führen. Die wichtigste Aufgabe von IGFBP3 ist die Modulierung der Bioaktivität des „Insulin Growth factors“ (IGF), welche direkt zur Verringerung des Zellwachstums beiträgt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IGFBP3 in Prostata-Tumorzellen und anderen Zellsystemen den apoptotischen Zelltod induziert, unabhängig von seiner IGF-bindenden Funktion (137, 138). Ebenfalls wird IGFBP3 als Zielgen des Tumorsuppressors p53 eine Proliferations-inhibierende Funktion zugeschrieben (139). Jedoch stützt die Hypoxie-abhängige IGFBP3 Regulation in den p53-negativen Tumorzellen DU145 und PC3 Ergebnisse einer p53-unabhängigen Apoptoseinduktion durch IGFBP3 (140). Das Gen BTG1 übt seine anti-proliferative Funktion über die Beeinflussung des Zellzyklus aus. BTG1 ist am stärksten in der G₀/G₁ Phase exprimiert und wird während der G₁ Passage in seiner Expression verringert. Über die funktionelle Bedeutung von CHES1 ist bisher wenig

beschrieben, jedoch wird CHES1 in Verbindung mit einer möglichen Supprimierung von Zellzyklus-Checkpoint-Mutationen genannt (141). Die geringe Anzahl von Hypoxie-abhängig regulierten Gene der Gengruppen V und VI ließen keine eindeutige Aussage über unterschiedlich regulierte Signaltransduktionswege in Zusammenhang mit den Zellcharakteristika p53-Status und Androgenabhängigkeit unter Hypoxie zu. Auffällig ist jedoch, dass in den p53-negativen/androgenunabhängig wachsenden Tumorzelllinien DU145/PC3 vier mal mehr Gene durch hypoxische Bedingungen reguliert werden als in den p53-positiven/androgenabhängig wachsenden LNCaP/22RV1 Zellen. In Zusammenhang mit der O₂-unabhängigen HIF-1 α Stabilisierung in DU145 Zellen, zeichnet sich die Tendenz ab, dass hypoxische Bedingungen in den maligneren Zelltypen DU145/PC3 ausgeprägtere Genexpressionsänderung verursachen als in den Zelltypen LNCaP/22RV1 und somit zu einem aggressiveren Tumorphänotyp beitragen könnten. Im Fall der Androgenabhängigkeit wäre eine weiterführende Genexpressionsstudie in Gegenwart oder Entzug von Androgen aufschlussreich.

4.6. Validierung von bekannten Hypoxie-Markergenen

Mit Hilfe der Microarray Technologie konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, welche unter hypoxischen Bedingungen sowohl in Prostata-Tumorzellen als auch in Prostata-Primärzellen reguliert werden. Darunter befinden sich Gene, deren Hypoxie-abhängige Regulation mehrfach eindeutig nachgewiesen werden konnte und ausführlich in der Literatur beschrieben ist.

Zu diesen Hypoxie-Markergenen zählen unter anderem der Transkriptionsfaktor VEGF, die Enzyme HK2, PGK1 und CA9, als auch die zellulären Proteine ERO11, ADM und Redd1. Die Genprodukte von VEGF und ERO1L nehmen eine Schlüsselrolle bei der Induktion der Blutgefäßbildung (Angiogenese) ein, wohingegen das hypotensive Peptid ADM zur Erweiterung von Blutgefäßen und somit zu einem gesteigerten Bluttransport

beiträgt. Die verstärkte Expression dieser Gene führt unter Hypoxie zu einer Erhöhung der O₂-Konzentration in den betroffenen Geweberegionen. Einer der am Stärksten durch hypoxische Bedingungen beeinflusste zelluläre Prozess ist die Aktivierung der Glykolyse (siehe Kapitel 4.3.1). Die verstärkte glykolytische Aktivität, in den gewählten Zellsystemen, wird durch die Expressionsinduktion der Gene, die für die glykolytischen Enzyme HK2 und PGK1 kodieren, verdeutlicht. Ein dritter zellulärer Prozess, welcher durch Hypoxie verändert wird, ist die intra- und extrazelluläre pH-Wert Regulation. Die Expression der Carboanhydrase 9 ist besonders in Tumorzellen zu finden und trägt durch Umsetzung von Kohlendioxid zu Wasserstoff- und Bicarbonat-Ionen zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes bei (142). Ebenfalls als Hypoxie-reguliert ist die Expression des Stressgens Redd1 beschrieben, welches unter hypoxischen Bedingungen zur Reduzierung der stark energieverbrauchenden Proteinbiosynthese führt. Die mit Hilfe der Microarray-Technologie ermittelte Expressionsänderung der Hypoxie-Markergene VEGF, CA9 und Redd1 konnte mittels quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) validiert werden (Abbildung 3.10). In den Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 und den Primärzellen PrEC zeigt sich sowohl unter Einsatz der GeneChip-Hybridisierung als auch der qRT-PCR eine VEGF Expressionsinduktion nach 48h Hypoxie um den Faktor 2. Die CA9 Expression konnte mittels GeneChip-Hybridisierung nur in der Zelllinie PC3 und den Primärzellen PrEC bestimmt werden und liegt nach 48h Hypoxie bei einer 1,5fachen bzw. einer 8fachen Induktion. Die Betrachtung mittels qRT-PCR ließ einen genaueren Einblick zu und zeigt nach 48h Hypoxie eine Induktion der CA9 Expression in DU145 um das 11fache, in PC3 um das 40fache, in LNCaP um das 16fache, in 22RV1 um das 2fache und in PrEC um den Faktor 11. So konnte die CA9 Expressionsinduktion in PC3 und PrEC bestätigt werden, jedoch zeigt sich eine deutliche Schwankung des Absolutwertes in der Tumorzelllinie PC3. Die Validierung der Redd1 Expressionsinduktion nach 48h Hypoxie zeigt wiederum eine Übereinstimmung der Absolutwerte der n-fachen Regulationsänderung. So wird die Redd1 Expression nach der Genchip-Auswertung

(n-fache Regulation qRT-PCR) in Du145 um das 3fache (4fache), in PC3 um das 6fache (6fache), in LNCaP um das 2fache (2fach), in 22RV1 um das 8fache (7fach) und in PrEC um den Faktor 1,4 (1,6) induziert.

In Verbindung mit der bereits beschriebenen Proteinexpressionsinduktion von HIF-1 α selbst und seinem Zielprotein Redd1 unter Hypoxie (Kapitel 4.1), stellt die Identifizierung und Validierung von bekannten Hypoxie-Markergenen mit Hilfe der Microarray-Technologie als auch qRT-PCR einen weiteren unabhängigen Beweis für einen aktiven Hypoxie-Signalweg in den gewählten Zellsystemen dar. Darüber hinaus bekräftigt die Validierbarkeit der Microarray-Expressionsdaten die Aussagekraft der durchgeführten GeneChip-Hybridisierungs-Studie, so das die Identifizierung von bisher nicht in der Literatur beschriebenen Hypoxie-regulierten Genen als potenziell neue Mitglieder im komplexen zellulären Hypoxie-Signalweg angesehen werden können.

4.7. Identifizierung und Charakterisierung des Hypoxie-abhängig induzierten Transkriptionsfaktor SOX4

Von besonderem Interesse bei der Betrachtung von Hypoxie-abhängig regulierten Genexpressionsprofilen, waren Gene deren Expression sich unter Hypoxie in den Prostata-Tumorzelllinien verändert, jedoch keine oder eine entgegengesetzte Beeinflussung in Prostata-Primärzellen aufweisen (Tabelle 3.5). Der Transkriptionsfaktor SOX4 (SRY [sex determining region Y]-box 4) zeigte unter Hypoxie in der analysierten Genexpressionsstudie eine eindeutige Induktion in Prostata-Tumorzellen, wohingegen in Prostata-Primärzellen keine Veränderung der SOX4 Genexpression vorlag. Die validierte Hypoxie-abhängige SOX4 Genexpressionsinduktion weist jedoch deutliche Unterschiede in Abhängigkeit des Zellsystems auf (Abbildung 3.11). Die Induktion der Genexpression unter Hypoxie tritt

am Deutlichsten in den Androgen-abhängigen Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 auf (~4-fach). In der Androgen-unabhängig proliferierenden Zelllinie DU145 lässt sich ebenfalls eine Induktion erkennen, welche jedoch deutlich schwächer ausfällt (~2-fach). In der Tumorzelllinie PC3 (1,1-fach) und den Primärzellen PrEC (1,4-fach) verändert sich die SOX4 Genexpression unter hypoxischen Bedingungen nicht.

SOX4 gehört zur Familie der SOX Transkriptionsfaktoren, welche durch eine HMG (High Mobility Group) Proteindomäne gekennzeichnet sind und funktionelle Bedeutung während verschiedenen embryonalen und zellulären Entwicklungsprozessen besitzen (143). Ursprünglich wurden SOX (Sry-like HMG box) Proteine auf Grund ihrer Homologie der HMG-Domäne zum „Testis-determining factor“, SRY, entdeckt (144). SRY ist verantwortlich für die Differenzierung von Sertoli-Zellen und die embryonale Entwicklung des Testis (145). Die HMG-Proteindomäne ist Bestandteil vieler verschiedener Proteine, welche zur HMG Superfamilie zusammengefasst werden. HMG-Proteine werden als nicht-Histon-Proteine verstanden, die genregulatorische Funktionen besitzen, sowie zur Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur beitragen. Teile der für alle HMG-Proteine charakteristischen DNA-bindende HMG-Domäne sind über alle Mitglieder konserviert, wohin gegen andere Bereich stark variieren (146). Demzufolge lässt sich die HMG Proteinsuperfamilie in verschiedene Untergruppen einteilen. Eine dieser Untergruppen wird von den SOX Proteinen gebildet.

Die HMG-Domäne aller SOX Proteinfamilienmitglieder weisen eine mehr als 50%ige Ähnlichkeit zur HMG-Domäne des ursprünglich identifizierten Proteins SRY auf. Bis heute konnten 20 SOX Proteine identifiziert werden, die mit Hilfe der 79 Aminosäure langen, DNA bindende HMG-Domäne die Transkription ihrer Zielgene beeinflussen und somit als Transkriptionsfaktoren fungieren (147). SOX Transkriptionsfaktoren binden spezifisch an das DNA Motiv 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' innerhalb der kleinen DNA-Helix-Furche und fördert die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren und/oder regulatorischer Elemente (148, 149). Die SOX Proteinfamilie wird in acht Gruppen unterteilt, A – H. Mitglieder derselben Gruppe weisen eine mehr als 80%ige

Sequenzübereinstimmung innerhalb der HMG-Domäne auf sowie eine signifikante Ähnlichkeit außerhalb der HMG-Domäne. Die Transkriptionsfaktoren SOX4, SOX11 und SOX12 bilden gemeinsam die C-Gruppe und zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit innerhalb der HMG-Domäne als auch im C-terminalen Proteinbereich (150).

4.7.1 Die zelluläre Funktion des Transkriptionsfaktors SOX4

Das für den Transkriptionsfaktor SOX4 kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 6 (6p22.3) und besteht aus lediglich einem Exon (Gen-ID 6659). Das translatierte Protein ist 47 kDa groß, im Zellkern als auch Zytoplasma lokalisiert und trägt die charakteristische HMG-Proteindomäne (151, 152).

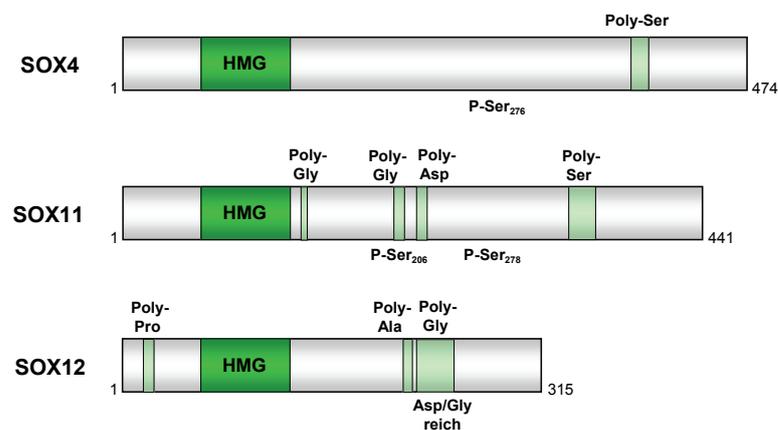


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Proteindomänen der SOX-C Untergruppe. (Ser – Serin, Gly – Glycin, Asp – Asparagin, Pro – Prolin, Ala – Alanin; P – phosphoryliert)

SOX4 wird während der Embryogenese des Gehirns, der Gonaden sowie von Lunge, Herz und Thymus exprimiert. Darüber hinaus wird SOX4 während der Differenzierung von B- und T-Lymphocyten exprimiert (153). Mäuse, die kein funktionelles SOX4 Protein besitzen („Knockout“) sterben bereits während der embryonalen Entwicklung (Tag E14) auf Grund einer fehlerhaften Herzblutkreislauf. Ursächlich ist eine verminderte Entwicklung der Endokardialleiste in Folge dessen es zu einer beeinträchtigten Ausbildung von Herzklappen und Ventrikelseptum kommt. Weiterhin weisen SOX4-Knockout Mäuse eine unvollständige B-Zell Differenzierung auf, wohin gegen die T-Zell Differenzierung weitestgehend unverändert bleibt (154). Eine mögliche mechanistische Erklärung für die eingeschränkte B-Zell Differenzierung ist die Interaktion von SOX4 mit dem Interleukin-5 Rezeptor- α (IL-5R α). IL-5R α wird auf B-Zellen sowie eosinophilen und basophilen Granulozyten exprimiert. Durch Bindung seines Liganden Interleukin-5 (IL-5) induziert IL-5R α die Proliferation und Differenzierung von B-Vorläuferzellen. Es konnte gezeigt werden, dass IL-5 die Expression von SOX4 induziert, welches daraufhin über ein weiteres Protein, Syntenin, mit IL-5R α interagiert und zur Regulation von IL-5R α Zielgenen beiträgt (155). Das Fehlen von SOX4 könnte zu einer verminderten Funktionalität des IL-5R α beitragen und so in einer gestörten B-Zellproliferation und Differenzierung resultieren.

In Colonkarzinomzellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass SOX4 mit dem Effektorprotein des Wnt Signalweges, β -Catenin, interagiert und die Proliferation von Colonkarzinomzellen fördert (156). Die Wnt Signaltransduktion spielt eine große Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, darunter auch in embryonalen Entwicklungsprozessen und innerhalb der Aufrechterhaltung von pluripotenten Stammzellen. Die Gewebe-spezifische SOX4 Expressionsblockierung in der Bauchspeicheldrüse zeigte eine gestörte Entwicklung von Pankreas Inselzellen (157) und heterozygote SOX4-Mäuse wiesen eine beeinträchtigte Knochenentwicklung auf (158). Die Überexpression von SOX4 hat ebenfalls Einfluss auf eine normale Entwicklung und resultiert unter anderem in einer gestörten neuronalen Differenzierung

(159). Jüngste Untersuchungen konzentrieren sich auf die Identifizierung von SOX4 Zielgenen. Genexpressionsstudien in Karzinomzellen der Blase führten zur Aufdeckung von möglichen SOX4 Zielgenen, die vorrangig funktionelle Bedeutung bei der Transkription und Signaltransduktion besitzen (152). Weiterhin konnten in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP mögliche SOX4 Zielgene mittels Genexpressionsanalysen identifiziert werden, die bei einer SOX4 Überexpression verstärkt exprimiert wurden und nach Blockierung der SOX4 mRNA (RNAi) herunter reguliert waren (160). Die Genprodukte der validierten, möglichen SOX4 Zielgene spielen ebenfalls eine funktionelle Rolle innerhalb der Rezeptor-Signaltransduktion. So wurden die „Frizzled Family“ Rezeptoren FZD3, FZD5 und FZD8 als mögliche SOX4 Zielgene identifiziert. „Frizzled Family“ Rezeptoren sind integrale Membran-Rezeptoren an denen unter anderem sezernierte Wnt Proteine binden können. Die Gene der „Frizzled Family“ Rezeptoren besitzen große funktionelle Bedeutung während der embryonalen Entwicklung, bei der Ausbildung von Gewebe- und Zellpolaritäten sowie bei der Proliferationsregulation (161). Ebenfalls wurde der Transkriptionsfaktor TCF3 als SOX4 Zielgen identifiziert, welcher „downstream“ der „Frizzled Family“ Rezeptoren liegt und eine direkte Verbindung zum Wnt Signalweg bildet. Neben der Beeinflussung von Rezeptoren scheint SOX4 auch Rezeptorliganden, wie zum Beispiel den Notch Ligand DLL1, zu regulieren. Des Weiteren konnten Komponenten des RISC-Komplexes und des miRNA Signalweges als mögliche SOX4 Zielgene identifiziert und validiert werden. Dazu zählt unter anderem die zum RISC-Komplex gehörende Ribonuklease DICER, welche prä-miRNA in ihre funktionelle Form umwandelt. Weitere RISC-Mitglieder, welche mögliche SOX4 Zielgene darstellen könnten sind Ago1 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2C, 1; EIF2C1) und die RNA Helikase A (RHA/DHX9). Interessant ist auch die Beschreibung, dass der „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR) durch SOX4 einer direkten transkriptionellen Aktivierung unterliegt (160). EGFR ist in vielen Tumoren konstitutiv aktiv und trägt durch die ständige Übermittlung von mitogenen Signalen zur abnormen

Zellteilung bei. Das EGFR Gen wird ebenfalls durch hypoxische Bedingungen verstärkt exprimiert und fördert die Zellproliferation unter Hypoxie (162).

Eine weitere funktionelle Bedeutung von SOX4 wird innerhalb der weiblichen Reproduktionsorgane vermutet, da gezeigt werden konnte, dass die SOX4 mRNA Expression im Verlaufe des monatlichen Zyklus von weiblichen Mäusen variiert und von den ovariellen Hormonen Progesteron und Estradiol reguliert wird (163).

4.7.2 Die Rolle von SOX4 in der Tumorigenese

Viele Proteine, deren physiologische Funktion für die zellulären Entwicklung und Differenzierung unerlässlich ist, konnten ebenfalls für die Entstehung von Tumorerkrankungen verantwortlich gemacht werden. Dazu zählen Wachstumsfaktoren, Membranproteine, Signaltransduktionsmoleküle und Transkriptionsfaktoren. In den letzten Jahren mehrten sich Hinweise, dass der Transkriptionsfaktor SOX4 bei der Tumorentstehung eine bedeutende Rolle spielt. SOX4 wird in verschiedenen Tumoren verglichen mit dem umgebenden Normalgewebe verstärkt exprimiert. Dazu zählen Tumore des Gehirns und Pankreas (164), der Lunge (165), der Speicheldrüsen (166) und der Blase (152) sowie Brust (167) und Prostata Tumoren (168). Darüber hinaus wurde SOX4 bei retroviralen Insertionsmutagenese Studien als eines der häufigsten identifizierten Gene beobachtet (169). Ebenfalls scheint SOX4 an der Transformation von hematopoetischen Zellen beteiligt zu sein (170). Ferner resultierte die Überexpression von SOX4 in Knochenmarkszellen der Maus zur Entwicklung von myeloiden Leukämien (171). Das SOX4 Gen wurde ebenfalls als Bestandteil einer Genexpression „Tumor-Signatur“ identifiziert (172).

In Prostata-Tumorzelllinien als auch in Prostata-Tumorgewebe wird der Transkriptionsfaktor SOX4 auf mRNA- und Proteinebene signifikant überexprimiert. In der Literatur werden sieben Genexpressionsstudien beschrieben in denen SOX4

verglichen mit untransformiertem Ursprungsgewebe in Prostata-Tumoren verstärkt exprimiert wird (173-179). Es konnte ebenso nachgewiesen werden, dass die SOX4 Überexpression mit einem erhöhten aggressiveren Potential von Prostata-Tumoren einhergeht. Die Betrachtung der Expression von weiteren SOX Transkriptionsfaktoren zeigte, dass ausschließlich SOX4 in Prostata-Tumoren induziert wird. Nach Verminderung der SOX4 mRNA in Prostata-Tumorzellen konnte eine signifikante Verringerung der Zellvitalität beobachtet werden, welche zur Induktion des programmierten Zelltods führte. Die Überexpression von SOX4 in untransformierten Prostatazellen resultiert dagegen in einem Matrix-unabhängigen Wachstum und fördert die Bildung von Zellkolonien. Somit zeichnet sich die Tendenz ab, dass SOX4 in Prostata-Tumoren als transformierendes Onkogen fungieren könnte (168).

4.7.3 Der Transkriptionsfaktor SOX4 wird HIF-1 α abhängig reguliert

Die bisherigen in der Literatur beschriebenen Daten zeigten in verschiedenen Tumorarten eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors SOX4 verglichen mit der Expression in untransformiertem Gewebe. Die funktionelle Bedeutung dieser veränderten Expression wurde bisher in nur sehr wenigen Untersuchungen betrachtet und zu keinem Zeitpunkt wurde eine veränderte SOX4 Expression in Zusammenhang mit hypoxischen Bedingungen in Tumoren besprochen. Bisher wurde der Transkriptionsfaktor SOX4 einmalig in einer Genexpressionsanalyse in Endothelzellen von pulmonalen Arterien als Hypoxie-induziert beschrieben. Diese Beschreibung beschränkt sich jedoch auf eine tabellarische Aufzählung und umfasst keine weitere Validierung oder funktionelle Charakterisierung (65).

Die GeneChip-Hybridisierung als auch die Validierung mittels qRT-PCR zeigt, in dem vorgelegten Versuchsaufbau, eine eindeutige Hypoxie-abhängige Induktion des Transkriptionsfaktors SOX4 in den Prostata-Tumorzelllinien LNCaP (5fach), 22RV1

(5fach) und DU145 (2fach), wohingegen die SOX4 Expression in den Prostata-Primärzellen unbeeinflusst durch hypoxische Bedingungen blieb (Abbildung 3.11). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α stellt das Schlüsselprotein im zellulären Hypoxie-Signalweg dar. Daher sollte daraufhin die Abhängigkeit der SOX4-Regulation von HIF-1 α geklärt werden. Da SOX4 deutlich stärker in den Hormon-abhängig wachsenden Tumorzelllinien LNCaP und 22RV1 unter Hypoxie induziert wurde, erfolgte die weitere Charakterisierung der SOX4 Genexpression in der Zelllinie LNCaP. Der Nachweis einer HIF-1 α abhängigen SOX4 Regulation wurde mit Hilfe der RNA-Interferenz Technologie (RNAi) realisiert. Dazu erfolgte die Verminderung der HIF-1 α mRNA Expression zum einen mit einem siRNA-Pool und zum anderen durch Transfektion zweier separater Einzel-siRNAs, welche gegen unterschiedliche Bereiche der HIF-1 α mRNA gerichtet sind (Abbildung 3.13, 3.15). Auf Grund der durch die mRNA Blockierung verminderten Transkription konnte sich das HIF-1 α Protein unter hypoxischen Bedingungen durch Proteinstabilisierung nicht anreichern und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 wurde unter Hypoxie verhindert. Die anschließende Analyse der SOX4 Genexpression als auch der Expression des Hypoxie-Markergens VEGF zeigte eine deutliche Verminderung der Hypoxie-abhängigen mRNA Induktion von SOX4 und VEGF. So zeigte sich nach Reduzierung der HIF-1 α Expression mittels des siRNA-Pools eine 64%ige Verringerung der Hypoxie-abhängigen SOX4 Induktion (48h Hypoxie). Unter Verwendung der HIF-1 α Einzel-siRNAs wird die HIF-1 α Abhängigkeit ebenfalls deutlich und die Hypoxie-abhängige SOX4 Induktion kann nach 48h Hypoxie um 80% zurückgedrängt werden. Das Hypoxie-Markergen VEGF weist eine ähnliche Reaktion auf und zeigt unter Verwendung des HIF-1 α siRNA-Pools eine 76%ig schwächere Induktion nach 48h Hypoxie verglichen mit der NTC-Kontrolle. Die Verwendung der HIF-1 α siRNA2 lässt eine 52% abgeschwächte Hypoxie-abhängige VEGF Induktion zu. Wohingegen der HIF-1 α Knockdown mittels HIF-1 α siRNA3 zu keiner eingeschränkten VEGF

Induzierbarkeit nach 48h Hypoxie führt. Dies geht jedoch einher mit einer nicht vollständigen Reduzierung des HIF-1 α Proteingehaltes nach Transfektion der siRNA3 (Abbildung 3.15). Die bioinformatische Identifizierung von 11 potentiellen „Hypoxia Response Elements“ (HRE) im SOX4 kodierenden Genbereich deutete ebenfalls auf eine HIF-1 α abhängige Genregulation hin (Tabelle 3.11). Darüber hinaus konnten Liu et al neben der Identifizierung von HREs auch Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ b, LEF/TCF, E2F und HOX nachweisen (168). Somit kann geschlussfolgert werden, dass der Transkriptionsfaktor SOX4 unter hypoxischen Bedingungen in seiner Genexpression induziert wird und das diese Induktion HIF-1 α abhängig erfolgt.

4.7.4 Funktionelle Bedeutung einer Hypoxie-abhängigen SOX4 Regulation

Zur Klärung der funktionellen Bedeutung der Hypoxie-abhängigen SOX4 Expressionsinduktion wurde in der Tumorzelllinie LNCaP die Reduzierung der SOX4 mRNA Expression mittels RNAi etabliert. Die SOX4 Genexpression konnte sowohl unter Verwendung des SOX4 siRNA-Pools als auch mittels zweier separater SOX4 siRNAs unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen um mehr als 70% inhibiert werden (Kapitel 3.4.3). Anschließend erfolgte die Betrachtung des Proliferations- und Apoptoseverhaltens nach Reduzierung der SOX4 mRNA mit Hilfe zweier separater Einzel-siRNAs (siRNA6, siRNA7) in der Prostata-Tumorzelllinie LNCaP.

Die Analyse der Proliferation von LNCaP Zellen nach Blockierung der SOX4 mRNA Expression zeigte sich unter Verwendung der SOX4 siRNA7 eine Verringerung der durch hypoxische Bedingungen verursachten Proliferationsinhibierung um 38% (Abbildung 3.19). Die ebenfalls gegen die SOX4 mRNA gerichtete siRNA6 wies zwar gleichermaßen eine Reduzierung der Proliferationsinhibierung auf, jedoch lediglich um 9%. Demnach führt die Inaktivierung der SOX4 mRNA Expression tendenziell zu einer

beschleunigten Proliferation von LNCaP Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Die Analyse des Apoptoseverhaltens von LNCaP Zellen nach Hemmung der SOX4 mRNA Expression erfolgte unter Normoxie und Hypoxie (Abbildung 3.20). Bei separater Betrachtung der Ergebnisse ist eine Reduzierung der Apoptoserate nach Hemmung der SOX4 mRNA sowohl unter normoxischer als auch hypoxischer Kultivierung zu erkennen. Dies wird am Deutlichsten bei dem Gebrauch der SOX4 siRNA7, die eine mittlere Verringerung der Apoptoserate von 30%, bezogen auf Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden sind (NTC-Kontrolle), sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie zur Folge hatte. Der Einsatz der zweiten SOX4 siRNA6 wies ebenfalls eine 20%ige Inhibierung der Apoptose in LNCaP Zellen unter Normoxie und Hypoxie auf. Der relative Vergleich der Ergebnisse aus normoxischer mit denen aus hypoxischer Kultivierung ergab keine eindeutige Veränderung des Apoptoseverhaltens unter Hypoxie, die auf die Reduzierung der SOX4 mRNA zurückzuführen ist.

Die tendenzielle Verringerung der Apoptoserate nach Hemmung der SOX4 mRNA Expression steht im Gegensatz zu bereits publizierten Ergebnissen. So wurde gezeigt, dass die Reduzierung der SOX4 mRNA Expression mittels RNAi in LNCaP Zellen zu einer Abnahme der Proliferation führt. Die Färbung von LNCaP Zellen mit Propidiumjodid nach Transfektion mit einem SOX4 siRNA-Pool (bestehend aus 8 verschiedenen siRNAs) zeigte einen Anstieg der subG₀/G₁ Zellpopulation um 35% verglichen mit Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Der Nachweis des gespaltenen PARP Proteins ließ den Schluss zu, dass die Inhibierung der SOX4 mRNA Expression zur Induzierung der Apoptose führte (168). Die Cotransfektion von LNCaP Zellen mit dem SOX4 siRNA-Pool als auch mit einem SOX4 exprimierenden DNA-Vektor ergab eine teilweise Aufhebung dieser Apoptoseinduktion verglichen mit Zellen, welche mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden sind. Somit kann von einem spezifischen Effekt durch die Reduzierung der SOX4 mRNA ausgegangen werden. Ebenso resultierte der SOX4 Knockdown in der Speichdrüsentumor-Zelllinie ACC3 in einer reduzierten Zellvitalität und einer verstärkten apoptotischen Rate (180).

Die vorliegenden Ergebnisse werden jedoch gestützt durch die Erkenntnis, dass SOX4 ebenfalls eine pro-apoptotische Wirkung besitzt. So wurde in Leberkarzinomzellen gezeigt, dass nach einer SOX4 Überexpression eine verstärkte Apoptoserate beobachtet werden konnte (181). Ebenso zeigte die Überexpression von SOX4 in Blasentumorzellen eine verminderte Zellvitalität, welche auf eine verstärkte Apoptose zurückzuführen war (152). Die Inaktivierung der SOX4 Transaktivierungs-Proteindomäne hatte keinen Einfluss auf die pro-apoptotischen Eigenschaften von SOX4. Demnach erfolgt die SOX4-vermittelte Apoptoseinduktion unabhängig von seiner transkriptionellen Aktivität (182). Die pro- und/oder anti-apoptotischen Eigenschaften des Transkriptionsfaktors SOX4 konnten bisher nicht abschließend geklärt werden. Neben einer möglichen Rolle SOX4 während des apoptotischen Zelltods konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Überexpression von SOX4 die Differenzierung von Gliazellen und Astrocyten hemmt (159). Somit bleibt ebenfalls zu klären, ob SOX4 zur Entstehung von undifferenzierteren Tumorzellen beitragen könnte.

4.7.5 SOX4 Proteinexpression

Zum Abschluss der experimentellen Arbeit konnte mit Hilfe der primären vaskulären Endothelzellen MVEC und eines kommerziellen Antikörpers die SOX4 Proteinexpression in den Prostata-Tumorzelllinien DU145, PC3, LNCaP und 22RV1 betrachtet werden (Abbildung 3.21). In den Tumorzelllinien DU145 und PC3 konnte eine sehr schwache SOX4 Expression detektiert werden. Wohingegen die SOX4 Proteinmenge in LNCaP und 22RV1 Zellen unterhalb der Nachweisgrenze des Immuno-Blot Verfahrens lag. Unter Berücksichtigung der sehr schwachen Proteindetektion zeigt sich in PC3 Zellen eine transiente SOX4 Proteininduktion unter hypoxischen Bedingungen. Bezogen auf Zellen unter Normoxie zeigt sich nach 48h Hypoxie eine 10-fache Induktion des SOX4 Proteins. Die SOX4 Proteininduktion

verkehrt sich jedoch bereits nach 72h Hypoxie ins Gegenteil und SOX4 weist eine 4-fache Repression auf. Dieser Hypoxie-abhängige Effekt in PC3 Zellen zeigte sich nicht in den mRNA Expressionsanalysen, in denen SOX4 nicht eindeutig unter Hypoxie induziert wurde. In der Tumorzelllinie DU145 konnte nach 72h Normoxie und Hypoxie SOX4 detektiert werden, jedoch zeigte SOX4 keine Veränderung nach hypoxischer Kultivierung. Unter der Annahme, dass sich die HIF-1 α Expression verzögert auf die SOX4 Expression auswirkt, könnte der gleich bleibende SOX4 Gehalt in DU145 Zellen auf die HIF-1 α Expression sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie zurückzuführen sein.

In untransformierten primären MVEC Zellen konnte das SOX4 Protein nach 48h Normoxie und Hypoxie eindeutig detektiert werden, unterlag jedoch keiner Veränderung durch hypoxische Kulturbedingungen, obwohl in MVEC Zellen eine eindeutige HIF-1 α Induktion unter Hypoxie nachgewiesen werden konnte. Die fehlende Hypoxie-Regulation von SOX4 in den primären MVEC Zellen steht mit der fehlenden Hypoxie-Regulation in den Prostata-Primärzellen PrEC in Übereinstimmung und belegt den Befund der tumorzellspezifischen Regulation des Transkriptionsfaktor SOX4 unter Hypoxie. Allerdings wäre die Analyse der SOX4 Proteinexpression für eine abschließende Beurteilung einer Hypoxie-abhängigen SOX4 Regulation von großer Wichtigkeit. Die Betrachtung der SOX4 Proteinexpression konnte in dieser Arbeit nicht weiter fortgeführt werden. Methodisch könnte das Problem der limitierenden Nachweisgrenze für SOX4 im Immuno-Blot Verfahren durch die Anreicherung des SOX4 Proteins mittels einer Immunpräzipitation bewältigt werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Ausbildung von hypoxischen Bereichen in soliden Tumoren stellt einen kritischen Aspekt bei dem Verlauf einer Tumorerkrankung dar. Hypoxische Tumorzellen zeichnen sich durch ein verringertes apoptotisches Potential und eine erhöhte Resistenz gegen konventionelle Therapien, wie Bestrahlung und Chemotherapie, aus. Darüber hinaus begünstigt eine Sauerstoffunterversorgung die Entstehung von weiteren zellulären Mutationen als auch die Bildung von Metastasen und trägt somit zum Fortschreiten der Tumorerkrankung bei. Das Prostata-Karzinom ist die häufigste Tumorerkrankung beim männlichen Erwachsenen und die zweithäufigste Todesursache auf Grund einer neoplastischen Erkrankung. Hypoxie in Prostata-Tumoren trägt entscheidend zur einem aggressiveren Wachstum als auch einer erschwerten Behandlung bei. Mit Hilfe der vorliegenden vergleichenden Genexpressionsstudie zwischen den Prostata-Tumorzelllinien Du145, PC3, LNCaP, 22RV1 und den primären Prostata-Epithelzellen PrEC gelang neben der Identifizierung von bekannten Hypoxie-regulierten Genen (VEGF, PDK1) auch die Beschreibung von 54 bisher nicht bekannten Hypoxie-abhängig regulierten Genen. Der Transkriptionsfaktor SOX4 konnte in dieser Arbeit erstmalig als Hypoxie-reguliert in Tumorzellen identifiziert werden. Die SOX4 mRNA zeigte in den Prostata-Tumorzelllinien Du145, LNCaP und 22RV1 eine deutliche Induktion, wohingegen keine veränderte Expression in Prostata-Primärzellen nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus zeigte die Reduzierung der HIF-1 α mRNA mittels RNA Interferenz (RNAi) eine eindeutige Abhängigkeit zum regulatorischen Schlüsseltranskriptionsfaktor HIF-1 α unter Hypoxie. Die Blockierung der SOX4 mRNA und die anschließende Analyse des Apoptose- und Proliferationsverhaltens in LNCaP Zellen ergab ein leicht beschleunigtes Wachstum unter Hypoxie. Zur weiterführenden Charakterisierung einer Hypoxie-abhängigen SOX4 Regulation ist die Überexpression von SOX4 in Prostata-Tumorzellen unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen von großem Interesse. Darüber

hinaus kann die Analyse von Genexpressionsänderungen nach Verminderung oder Überexpression von SOX4 zur Identifizierung von möglichen SOX4 Zielgenen führen, welche ebenfalls für die Anpassung an hypoxische Kulturbedingungen von Bedeutung sind. So wird, wie bereits erwähnt, der Rezeptor des Wachstumsfaktor EGF sowohl unter hypoxischen Bedingungen als auch durch SOX4 selbst in seiner Expression induziert. Die Identifizierung und Charakterisierung der Hypoxie-abhängigen SOX4 Induktion kann zu einem verbesserten Verständnis über bestehende oder wenig erforschte Signaltransduktions- und Regulationsmöglichkeiten unter Hypoxie beitragen. Darüber hinaus konnte mit dieser Arbeit verdeutlicht werden, dass die Therapie von Tumorerkrankungen nicht nur vom Zelltyp oder der Malignität eines Tumors abhängt sondern auch das den Tumor umgebene Milieu für den Verlauf einer Tumorerkrankung von Bedeutung ist.

6. Abstract

Hypoxic areas in solid tumours represent a frequent feature during tumour progression. At hypoxic conditions tumour cells show a decreased apoptotic potential and resistance against conventional therapies such as irradiation and chemotherapy. In addition, low oxygen levels lead to an increased rate of mutations and contribute to accelerated tumour progression as well as increased potential for metastasis formation. Prostate cancer is the most common tumour type of the western man and is the second cause of death following tumour development.

To investigate the differential response to hypoxia of tumour cells as compared to normal cells we performed a comparative gene expression analysis in the prostate cancer cell lines DU145, PC3, LNCaP, 22RV1 and in primary prostate epithelial cells (PrEC) by Affymetrix microarray hybridisation. In addition to well known hypoxia-responsive genes such as vascular endothelial growth factor and pyruvate dehydrogenase kinase 1 we identified the developmental transcription factor and transforming oncogene sex determining region Y box 4 (SOX4) as a novel hypoxia induced gene in prostate cancer cell lines. In particular, SOX4 mRNA showed a differential induction pattern comparing prostate cancer cells and primary prostate cells: in prostate cancer cell lines subjected to hypoxic growth conditions SOX4 mRNA was induced, whereas no induction of SOX4 mRNA was observed in primary prostate epithelial cells. By RNA interference mediated shut down of the key hypoxia transcription factor “hypoxia inducible factor 1” (HIF-1), we demonstrated that increased SOX4 gene expression in prostate cancer cells at hypoxia is dependent on HIF-1. The SOX4 knockdown in LNCaP cells followed by analysis of apoptosis and proliferation shows a decreased proliferation under hypoxia. These results suggest SOX4 as a candidate gene mediating adaptation of prostate cancer cells to hypoxia. In addition this study demonstrates that cancer therapy is not only dependent on cell type or malignancy of the tumour but also on the tumour microenvironment.

7. Literaturverzeichnis

1. Varmus H WR. Genes and Biology of Cancer. New York: Scientific American Library; 1993.
2. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994;372(6502):143-9.
3. Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 2007;448(7155):767-74.
4. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 2007;85(12):1301-7.
5. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2(1):38-47.
6. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 1998;58(7):1408-16.
7. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* 2004;14(3):198-206.
8. Rajendran JG, Mankoff DA, O'Sullivan F, *et al.* Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res* 2004;10(7):2245-52.
9. Schmidt T. *Physiologie des Menschen*: Springer Verlag; 1997.
10. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59(22):5830-5.
11. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):225-39.
12. Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 1996;76(3):839-85.
13. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(12):5510-4.
14. Hopfl G, Ogunshola O, Gassmann M. HIFs and tumors--causes and consequences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286(4):R608-23.
15. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(14):7987-92.
16. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(10):721-32.
17. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005;2005(306):re12.
18. Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 2002;277(42):39792-800.
19. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294(5545):1337-40.
20. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002;16(12):1466-71.
21. Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* 2005;17(1):1-9.
22. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001;276(12):9519-25.
23. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999;24(2):68-72.

24. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, *et al.* Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000;60(24):7075-83.
25. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006;281(14):9030-7.
26. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995;270(34):19761-6.
27. Mandriota SJ, Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* 1998;83(8):852-9.
28. 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(12):5447-54.
29. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1997;272(32):20055-62.
30. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001;61(18):6669-73.
31. Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(20):12825-30.
32. Papandreou I, Krishna C, Kaper F, Cai D, Giaccia AJ, Denko NC. Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. *Cancer Res* 2005;65(8):3171-8.
33. Tannock H, Bristow, Harrington. *The Basic Science of Oncology*: McGraw-Hill Companies; 2005.
34. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54(18):4855-78.
35. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, *et al.* Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379(6560):88-91.
36. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α . *Nature* 1998;392(6674):405-8.
37. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004;57(10):1009-14.
38. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):319-31.
39. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, *et al.* Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006;440(7088):1222-6.
40. Rofstad EK, Rasmussen H, Galappathi K, Mathiesen B, Nilsen K, Graff BA. Hypoxia promotes lymph node metastasis in human melanoma xenografts by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator receptor. *Cancer Res* 2002;62(6):1847-53.
41. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):241-8.
42. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 1986;159(1):109-13.
43. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184(1):39-51.
44. Salgame P, Varadhachary AS, Primiano LL, Fincke JE, Muller S, Monestier M. An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Res* 1997;25(3):680-1.
45. Rabinovitch PS. DNA content histogram and cell-cycle analysis. *Methods Cell Biol* 1994;41:263-96.
46. Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 2002;32 Suppl:496-501.
47. Lottspeich F. *Bioanalytik*. München: ELSEVIER Spektrum Akademischer Verlag; 2006.

48. Peehl DM. Atlas of Human Tumor Cell Lines. London: Academic Press; 1994.
49. Rubin SJ, Hallahan DE, Ashman CR, *et al.* Two prostate carcinoma cell lines demonstrate abnormalities in tumor suppressor genes. *J Surg Oncol* 1991;46(1):31-6.
50. Cronauer MV, Schulz WA, Burchardt T, Ackermann R, Burchardt M. Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines. *Oncogene* 2004;23(20):3541-9.
51. Sramkoski RM, Pretlow TG, 2nd, Giaconia JM, *et al.* A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999;35(7):403-9.
52. Tepper CG, Boucher DL, Ryan PE, *et al.* Characterization of a novel androgen receptor mutation in a relapsed CWR22 prostate cancer xenograft and cell line. *Cancer Res* 2002;62(22):6606-14.
53. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, *et al.* Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001;158(3):905-19.
54. Jin HO, An S, Lee HC, *et al.* Hypoxic condition- and high cell density-induced expression of Redd1 is regulated by activation of hypoxia-inducible factor-1alpha and Sp1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Cell Signal* 2007;19(7):1393-403.
55. Shoshani T, Faerman A, Mett I, *et al.* Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22(7):2283-93.
56. Ord JJ, Streeter EH, Roberts IS, Cranston D, Harris AL. Comparison of hypoxia transcriptome in vitro with in vivo gene expression in human bladder cancer. *Br J Cancer* 2005;93(3):346-54.
57. 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(3):177-85.
58. Manjunath S, Lee CH, VanWinkle P, Bailey-Serres J. Molecular and biochemical characterization of cytosolic phosphoglucosyltransferase in maize. Expression during development and in response to oxygen deprivation. *Plant Physiol* 1998;117(3):997-1006.
59. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994;269(38):23757-63.
60. Yoon DY, Buchler P, Saarikoski ST, Hines OJ, Reber HA, Hankinson O. Identification of genes differentially induced by hypoxia in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288(4):882-6.
61. Mellor HR, Harris AL. The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(3-4):553-66.
62. Lee MJ, Kim JY, Suk K, Park JH. Identification of the hypoxia-inducible factor 1 alpha-responsive HGTD-P gene as a mediator in the mitochondrial apoptotic pathway. *Mol Cell Biol* 2004;24(9):3918-27.
63. Zhong XP, Wang D, Zhang YB, Gui JF. Identification and characterization of hypoxia-induced genes in *Carassius auratus* blastulae embryonic cells using suppression subtractive hybridization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008.
64. Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, *et al.* HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* 2005;24(19):3110-20.
65. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, *et al.* Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105(2):659-69.
66. Hofbauer KH, Gess B, Lohaus C, Meyer HE, Katschinski D, Kurtz A. Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *Eur J Biochem* 2003;270(22):4515-22.
67. del Peso L, Castellanos MC, Temes E, *et al.* The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem* 2003;278(49):48690-5.
68. Wu EH, Li HS, Zhao T, *et al.* [Effect of hypoxia on the gene profile of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.]. *Sheng Li Xue Bao* 2007;59(2):227-32.

69. Wang D, Xia Y, Buja LM, McMillin JB. The liver isoform of carnitine palmitoyltransferase I is activated in neonatal rat cardiac myocytes by hypoxia. *Mol Cell Biochem* 1998;180(1-2):163-70.
70. Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1999;274(34):24142-6.
71. Bobarykina AY, Minchenko DO, Opentanova IL, *et al.* Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. *Acta Biochim Pol* 2006;53(4):789-99.
72. Zhao J, Chen H, Davidson T, Kluz T, Zhang Q, Costa M. Nickel-induced 1,4-alpha-glucan branching enzyme 1 up-regulation via the hypoxic signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196(3):404-9.
73. Dang CV. The interplay between MYC and HIF in the Warburg effect. *Ernst Schering Found Symp Proc* 2007(4):35-53.
74. Law AY, Lai KP, Ip CK, Wong AS, Wagner GF, Wong CK. Epigenetic and HIF-1 regulation of stanniocalcin-2 expression in human cancer cells. *Exp Cell Res* 2008;314(8):1823-30.
75. Oehler MK, Norbury C, Hague S, Rees MC, Bicknell R. Adrenomedullin inhibits hypoxic cell death by upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells: a possible promotion mechanism for tumour growth. *Oncogene* 2001;20(23):2937-45.
76. Beyer S, Kristensen MM, Jensen KS, Johansen JV, Staller P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *J Biol Chem* 2008;283(52):36542-52.
77. Caruso RP, Levinson B, Melamed J, *et al.* Altered N-myc downstream-regulated gene 1 protein expression in African-American compared with caucasian prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 1):222-7.
78. Martin-Rendon E, Hale SJ, Ryan D, *et al.* Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells* 2007;25(4):1003-12.
79. Premkumar DR, Adhikary G, Overholt JL, Simonson MS, Cherniack NS, Prabhakar NR. Intracellular pathways linking hypoxia to activation of c-fos and AP-1. *Adv Exp Med Biol* 2000;475:101-9.
80. Ellen TP, Ke Q, Zhang P, Costa M. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis* 2008;29(1):2-8.
81. Le Jan S, Le Meur N, Cazes A, *et al.* Characterization of the expression of the hypoxia-induced genes neuritin, TXNIP and IGFBP3 in cancer. *FEBS Lett* 2006;580(14):3395-400.
82. Baker AF, Koh MY, Williams RR, *et al.* Identification of thioredoxin-interacting protein 1 as a hypoxia-inducible factor 1alpha-induced gene in pancreatic cancer. *Pancreas* 2008;36(2):178-86.
83. Gess B, Hofbauer KH, Wenger RH, Lohaus C, Meyer HE, Kurtz A. The cellular oxygen tension regulates expression of the endoplasmic oxidoreductase ERO1-Lalpha. *Eur J Biochem* 2003;270(10):2228-35.
84. Potter C, Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle* 2004;3(2):164-7.
85. Hartmann A, Kunz M, Kostlin S, *et al.* Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1999;59(7):1578-83.
86. Reiser-Erkan C, Erkan M, Pan Z, *et al.* Hypoxia-inducible proto-oncogene Pim-1 is a prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008;7(9):1352-9.
87. Jean JC, Rich CB, Joyce-Brady M. Hypoxia results in an HIF-1-dependent induction of brain-specific aldolase C in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291(5):L950-6.
88. Pescador N, Cuevas Y, Naranjo S, *et al.* Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem J* 2005;390(Pt 1):189-97.

89. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, *et al.* Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 7):1319-26.
90. Salnikow K, Aprelikova O, Ivanov S, *et al.* Regulation of hypoxia-inducible genes by ETS1 transcription factor. *Carcinogenesis* 2008;29(8):1493-9.
91. Cormier-Regard S, Nguyen SV, Claycomb WC. Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1998;273(28):17787-92.
92. Zhou D, Wang J, Zapala MA, Xue J, Schork NJ, Haddad GG. Gene expression in mouse brain following chronic hypoxia: role of sarcospan in glial cell death. *Physiol Genomics* 2008;32(3):370-9.
93. Denko N, Schindler C, Koong A, Laderoute K, Green C, Giaccia A. Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):480-7.
94. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res* 2009.
95. Nadri C, Belmaker RH, Agam G. Oxygen restriction of neonate rats elevates neuregulin-1alpha isoform levels: possible relationship to schizophrenia. *Neurochem Int* 2007;51(6-7):447-50.
96. Ejeskar K, Krona C, Caren H, *et al.* Introduction of in vitro transcribed ENO1 mRNA into neuroblastoma cells induces cell death. *BMC Cancer* 2005;5:161.
97. 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(51):32529-37.
98. Matsui F, Kakizawa H, Nishizuka M, *et al.* Changes in the amounts of chondroitin sulfate proteoglycans in rat brain after neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci Res* 2005;81(6):837-45.
99. Sharma SD, Raghuraman G, Lee MS, Prabhakar NR, Kumar GK. Intermittent hypoxia activates peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase in rat brain stem via reactive oxygen species-mediated proteolytic processing. *J Appl Physiol* 2009;106(1):12-9.
100. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006;70(5):1469-80.
101. Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58(2):71-96.
102. Movsas B, Chapman JD, Horwitz EM, *et al.* Hypoxic regions exist in human prostate carcinoma. *Urology* 1999;53(1):11-8.
103. Movsas B, Chapman JD, Greenberg RE, *et al.* Increasing levels of hypoxia in prostate carcinoma correlate significantly with increasing clinical stage and patient age: an Eppendorf pO(2) study. *Cancer* 2000;89(9):2018-24.
104. Rasey JS, Koh WJ, Evans ML, *et al.* Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [18F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;36(2):417-28.
105. Zhong H, Semenza GL, Simons JW, De Marzo AM. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is an early event in prostate carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 2004;28(2):88-93.
106. Salnikow K, Costa M, Figg WD, Blagosklonny MV. Hyperinducibility of hypoxia-responsive genes without p53/p21-dependent checkpoint in aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60(20):5630-4.
107. Kimbro KS, Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006;13(3):739-49.
108. Boddy JL, Fox SB, Han C, *et al.* The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via hypoxia-inducible factors HIF-1a, HIF-2a, and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(21):7658-63.
109. Anastasiadis AG, Stisser BC, Ghafar MA, Burchardt M, Buttyan R. Tumor hypoxia and the progression of prostate cancer. *Curr Urol Rep* 2002;3(3):222-8.

110. Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007;581(19):3582-91.
111. Cejudo-Martin P, Johnson RS. A new notch in the HIF belt: how hypoxia impacts differentiation. *Dev Cell* 2005;9(5):575-6.
112. 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(6):425-34.
113. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4(11):891-9.
114. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, *et al.* Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 2009;29(10):2570-81.
115. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004;23(16):2891-906.
116. Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, *et al.* BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 2007;3(4):374-6.
117. Dong Z, Wang JZ, Yu F, Venkatachalam MA. Apoptosis-resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role for IAP-2. *Am J Pathol* 2003;163(2):663-71.
118. Cook T, Gebelein B, Mesa K, Mladek A, Urrutia R. Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J Biol Chem* 1998;273(40):25929-36.
119. Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 2001;409(6823):1067-70.
120. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, *et al.* Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* 1998;17(26):3401-15.
121. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* 2004;279(11):9899-904.
122. Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell Death Differ* 2008;15(4):628-34.
123. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8(11):851-64.
124. Denmeade SR, Isaacs JT. Activation of programmed (apoptotic) cell death for the treatment of prostate cancer. *Adv Pharmacol* 1996;35:281-306.
125. Shabsigh A, Chang DT, Heitjan DF, *et al.* Rapid reduction in blood flow to the rat ventral prostate gland after castration: preliminary evidence that androgens influence prostate size by regulating blood flow to the prostate gland and prostatic endothelial cell survival. *Prostate* 1998;36(3):201-6.
126. Ghafar MA, Anastasiadis AG, Chen MW, *et al.* Acute hypoxia increases the aggressive characteristics and survival properties of prostate cancer cells. *Prostate* 2003;54(1):58-67.
127. Culig Z, Hobisch A, Hittmair A, *et al.* Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. *Prostate* 1998;35(1):63-70.
128. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, *et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989;342(6250):705-8.
129. Wenger RH, Camenisch G, Desbaillets I, Chilov D, Gassmann M. Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha is not sufficient for hypoxic/anoxic p53 induction. *Cancer Res* 1998;58(24):5678-80.
130. Pan Y, Oprysko PR, Asham AM, Koch CJ, Simon MC. p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment. *Oncogene* 2004;23(29):4975-83.
131. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000;14(1):34-44.
132. Schmid T, Zhou J, Kohl R, Brune B. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J* 2004;380(Pt 1):289-95.

133. Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T, Neckers L. p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem* 1998;273(20):11995-8.
134. Fei P, Wang W, Kim SH, *et al.* Bnip3L is induced by p53 under hypoxia, and its knockdown promotes tumor growth. *Cancer Cell* 2004;6(6):597-609.
135. McDonough WS, Tran NL, Berens ME. Regulation of glioma cell migration by serine-phosphorylated P311. *Neoplasia* 2005;7(9):862-72.
136. Lekishvili T, Fromm E, Mujoomdar M, Berditchevski F. The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 5):685-94.
137. Hong J, Zhang G, Dong F, Rechler MM. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277(12):10489-97.
138. Kim HS, Ingermann AR, Tsubaki J, Twigg SM, Walker GE, Oh Y. Insulin-like growth factor-binding protein 3 induces caspase-dependent apoptosis through a death receptor-mediated pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 2004;64(6):2229-37.
139. Grimberg A. P53 and IGFBP-3: apoptosis and cancer protection. *Mol Genet Metab* 2000;70(2):85-98.
140. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997;272(18):12181-8.
141. Busygina V, Kottemann MC, Scott KL, Plon SE, Bale AE. Multiple endocrine neoplasia type 1 interacts with forkhead transcription factor CHES1 in DNA damage response. *Cancer Res* 2006;66(17):8397-403.
142. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):299-310.
143. Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell* 2002;3(2):167-70.
144. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, *et al.* A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990;346(6281):245-50.
145. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 1991;351(6322):117-21.
146. Laudet V, Stehelin D, Clevers H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 1993;21(10):2493-501.
147. Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 1999;27(6):1409-20.
148. Denny P, Swift S, Brand N, Dabhade N, Barton P, Ashworth A. A conserved family of genes related to the testis determining gene, *SRY*. *Nucleic Acids Res* 1992;20(11):2887.
149. Giese K, Cox J, Grosschedl R. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 1992;69(1):185-95.
150. Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H, Pedraza CE, Macklin WB, Lefebvre V. The three SoxC proteins--Sox4, Sox11 and Sox12--exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Res* 2008;36(9):3101-17.
151. Pan X, Li H, Zhang P, *et al.* Ubc9 interacts with SOX4 and represses its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344(3):727-34.
152. Aaboe M, Birkenkamp-Demtroder K, Wiuf C, *et al.* SOX4 expression in bladder carcinoma: clinical aspects and in vitro functional characterization. *Cancer Res* 2006;66(7):3434-42.
153. van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers H. Sox-4, an *Sry*-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J* 1993;12(10):3847-54.
154. Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, *et al.* Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 1996;380(6576):711-4.

155. Geijsen N, Uings IJ, Pals C, *et al.* Cytokine-specific transcriptional regulation through an IL-5R α interacting protein. *Science* 2001;293(5532):1136-8.
156. Sinner D, Kordich JJ, Spence JR, *et al.* Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 2007;27(22):7802-15.
157. Wilson ME, Yang KY, Kalousova A, *et al.* The HMG box transcription factor Sox4 contributes to the development of the endocrine pancreas. *Diabetes* 2005;54(12):3402-9.
158. Nissen-Meyer LS, Jemtland R, Gautvik VT, *et al.* Osteopenia, decreased bone formation and impaired osteoblast development in Sox4 heterozygous mice. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 16):2785-95.
159. Hoser M, Baader SL, Bosl MR, Ihmer A, Wegner M, Sock E. Prolonged glial expression of Sox4 in the CNS leads to architectural cerebellar defects and ataxia. *J Neurosci* 2007;27(20):5495-505.
160. Scharer CD, McCabe CD, Ali-Seyed M, Berger MF, Bulyk ML, Moreno CS. Genome-wide promoter analysis of the SOX4 transcriptional network in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2009;69(2):709-17.
161. Huang HC, Klein PS. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol* 2004;5(7):234.
162. Franovic A, Gunaratnam L, Smith K, Robert I, Patten D, Lee S. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(32):13092-7.
163. Hunt SM, Clarke CL. Expression and hormonal regulation of the Sox4 gene in mouse female reproductive tissues. *Biol Reprod* 1999;61(2):476-81.
164. Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI, Scotting PJ. Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. *J Neurooncol* 2002;57(3):201-14.
165. Bangur CS, Switzer A, Fan L, Marton MJ, Meyer MR, Wang T. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene* 2002;21(23):3814-25.
166. Frierson HF, Jr., El-Naggar AK, Welsh JB, *et al.* Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol* 2002;161(4):1315-23.
167. Graham JD, Hunt SM, Tran N, Clarke CL. Regulation of the expression and activity by progestins of a member of the SOX gene family of transcriptional modulators. *J Mol Endocrinol* 1999;22(3):295-304.
168. Liu P, Ramachandran S, Ali Seyed M, *et al.* Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006;66(8):4011-9.
169. Lund AH, Turner G, Trubetskoy A, *et al.* Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice. *Nat Genet* 2002;32(1):160-5.
170. Suzuki T, Shen H, Akagi K, *et al.* New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet* 2002;32(1):166-74.
171. Du Y, Spence SE, Jenkins NA, Copeland NG. Cooperating cancer-gene identification through oncogenic-retrovirus-induced insertional mutagenesis. *Blood* 2005;106(7):2498-505.
172. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, *et al.* Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(25):9309-14.
173. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, *et al.* Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001;412(6849):822-6.
174. Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62(15):4427-33.
175. Ernst T, Hergenbahn M, Kenzelmann M, *et al.* Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma: a gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue. *Am J Pathol* 2002;160(6):2169-80.
176. Lapointe J, Li C, Higgins JP, *et al.* Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(3):811-6.

177. Luo J, Duggan DJ, Chen Y, *et al.* Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res* 2001;61(12):4683-8.
178. Magee JA, Araki T, Patil S, *et al.* Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61(15):5692-6.
179. Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, *et al.* Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61(16):5974-8.
180. Pramoonjago P, Baras AS, Moskaluk CA. Knockdown of Sox4 expression by RNAi induces apoptosis in ACC3 cells. *Oncogene* 2006;25(41):5626-39.
181. Ahn SG, Kim HS, Jeong SW, *et al.* Sox-4 is a positive regulator of Hep3B and HepG2 cells' apoptosis induced by prostaglandin (PG)A(2) and delta(12)-PGJ(2). *Exp Mol Med* 2002;34(3):243-9.
182. Hur EH, Hur W, Choi JY, *et al.* Functional identification of the pro-apoptotic effector domain in human Sox4. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325(1):59-67.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-X _L	Bcl2-like 1
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CCS	Aktivkohle-gefiltertes fetales Kälberserum
C _T	Schwellenzyklus
cRNA	complementary RNA
bHLH	Basic helix-loop-helix
CA9	Carbonic Anhydrase 9
CBP	CREB-binding protein
CREB	cAMP-response element
d	Tage
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E3	Ubiquitin Ligase
E2F	E2F Transkriptionsfaktoren
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
FIH-1	Factor Inhibiting HIF-1
H	Hypoxie
h	Stunden
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor 1
HOX	Homeobox transkription factors
HRP	Horseradish Peroxidase
HRE	Hypoxia Response Element
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo Dalton
L	Leucin
LEF/TCF	Lymphoid enhancer-binding factor / Transcription factor
LDH	Lactatdehydrogenase
mRNA	messenger RNA

MVEC	Microvascular endothelial cells
N	Normoxie
N=	Anzahl der Wiederholungen
N ^{xx}	Stickstoffrest
NF- κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NLS	Kernlokalisierungssignal
nt	Nukleotide
NTC	Non-Targeting Control
ODD	Oxygen-dependent Degradation Domain
OH-	Hydroxylrest
P	Prolin
p	p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
p ^{xx}	Phosphatrest
PAS	PER-ARNT-SIM Proteindomäne
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Principle Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHD	HIF Prolyl-Hydroxylase
PI	Propidiumjodid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PrEC	Prostata-Epithelzellen
pVHL	von Hippel-Lindau Protein
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
R1881	synthetisches Testosteron
Redd1	DNA- damage-inducible transcript 4
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
siRNA	Small Interfering RNA
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOX4	Sex-Determining region Y (SRY) Box 4
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris Buffered Saline
TK	Transfektionskontrolle
Ub	Ubiquitin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

8.2. Funktioneller Überblick der beschriebenen Gene

Die im folgenden Kapitel aufgeführte Zusammenfassung der zellulären Funktion aller in dieser Arbeit aufgeführten Gene dient der schnellen Orientierung und wurde der PubMed Datenbank des National Centre for Biotechnology Information (NCBI) entnommen.

Gensymbol	Genname	PubMed Gen ID	PubMed Zusammenfassung zelluläre Funktion	Gengruppe
SLC16A3	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	9123	Lactic acid and pyruvate transport across plasma membranes is catalyzed by members of the proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family, which has been designated solute carrier family-16. Each MCT appears to have slightly different substrate and inhibitor specificities and transport kinetics, which are related to the metabolic requirements of the tissues in which it is found. The MCTs, which include MCT1 (SLC16A1; MIM 600682) and MCT2 (SLC16A7; MIM 603654), are characterized by 12 predicted transmembrane domains.	I
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	5163	Pyruvate dehydrogenase (PDH) is a mitochondrial multienzyme complex that catalyzes the oxidative decarboxylation of pyruvate and is one of the major enzymes responsible for the regulation of homeostasis of carbohydrate fuels in mammals. The enzymatic activity is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation cycle. Phosphorylation of PDH by a specific pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) results in inactivation.	I, III
PGM1	Phosphoglucomutase 1	5236	Catalyzes the transfer of a phosphate group between the 1- and 6-positions of glucose.	I, III
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	5230	The protein encoded by this gene is a glycolytic enzyme that catalyzes the conversion of 1,3-diphosphoglycerate to 3-phosphoglycerate. The encoded protein may also act as a cofactor for polymerase alpha. This gene lies on the X-chromosome, while a related pseudogene also has been found on the X-chromosome and another on chromosome 19.	I, III, IV
GPI	Glucose phosphate isomerase	2821	This gene belongs to the GPI family whose members encode multifunctional phosphoglucose isomerase proteins involved in energy pathways. The protein encoded by this gene is a dimeric enzyme that catalyzes the reversible isomerization of glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate. The protein functions in different capacities inside and outside the cell. In the cytoplasm, the gene product is involved in glycolysis and gluconeogenesis, while outside the cell it functions as a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. Defects in this gene are the cause of nonspherocytic hemolytic anemia and a severe enzyme deficiency can be associated with hydrops fetalis, immediate neonatal death and neurological impairment.	I, III

AK3L1	Adenylate kinase 3-like 1	205	This gene encodes a member of the adenylate kinase family of enzymes. The encoded protein is localized to the mitochondrial matrix. Adenylate kinases regulate the adenine and guanine nucleotide compositions within a cell by catalyzing the reversible transfer of phosphate group among these nucleotides. Five isozymes of adenylate kinase have been identified in vertebrates. Expression of these isozymes is tissue-specific and developmentally regulated. A pseudogene for this gene has been located on chromosome 17. Three transcript variants encoding the same protein have been identified for this gene. Sequence alignment suggests that the gene defined by NM_013410, NM_203464, and NM_001005353 is located on chromosome 1.	I, III
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	665	This gene is a member of the BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein (BNIP) family. It interacts with the E1B 19 kDa protein which is responsible for the protection of virally-induced cell death, as well as E1B 19 kDa-like sequences of BCL2, also an apoptotic protector. The protein encoded by this gene is a functional homolog of BNIP3, a proapoptotic protein. This protein may function simultaneously with BNIP3 and may play a role in tumor suppression.	I, III
C3orf28	Chromosome 3 open reading frame 28	26355	Molecular function unknown. HGTD-P could be a new HIF-1 alpha-responsive proapoptotic molecule that activates mitochondrial apoptotic cascades (GeneRIF).	I
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	694	This gene is a member of an anti-proliferative gene family that regulates cell growth and differentiation. Expression of this gene is highest in the G0/G1 phases of the cell cycle and downregulated when cells progressed through G1. The encoded protein interacts with several nuclear receptors, and functions as a coactivator of cell differentiation. This locus has been shown to be involved in a t(8;12)(q24;q22) chromosomal translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia.	I, VI
VEGF	Vascular endothelial growth factor	7422	This gene is a member of the PDGF/VEGF growth factor family and encodes a protein that is often found as a disulfide linked homodimer. This protein is a glycosylated mitogen that specifically acts on endothelial cells and has various effects, including mediating increased vascular permeability, inducing angiogenesis, vasculogenesis and endothelial cell growth, promoting cell migration, and inhibiting apoptosis. Elevated levels of this protein is linked to POEMS syndrome, also known as Crow-Fukase syndrome. Mutations in this gene have been associated with proliferative and nonproliferative diabetic retinopathy. Alternatively spliced transcript variants, encoding either freely secreted or cell-associated isoforms, have been characterized. There is also evidence for the use of non-AUG (CUG) translation initiation sites upstream of, and in-frame with the first AUG, leading to additional isoforms.	I
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	6659	This intronless gene encodes a member of the SOX (SRY-related HMG-box) family of transcription factors involved in the regulation of embryonic development and in the determination of the cell fate. The encoded protein may act as a transcriptional regulator after forming a protein complex with other proteins, such as syndecan binding protein (syntenin). The protein may function in the apoptosis pathway leading to cell death as well as to tumorigenesis and may mediate downstream effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) in bone development. The solution structure has been resolved for the HMG-box of a similar mouse protein.	I

Redd1	DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4)	54541	Ellisen et al. (2002) REDD1 is a transcriptional target of p53 induced following DNA damage. Shoshani et al. (2002) detected strong upregulation of Rtp801 by hypoxia both in vitro and in vivo in an animal model of ischemic stroke. Reiling and Hafen (2004) found that simultaneous loss of <i>Drosophila</i> scylla and charybdis, which are homologs of the human REDD1 and REDD2 genes, generated flies that were more susceptible to hypoxia and that showed mild overgrowth. Conversely, overactivation of scylla and charybdis reduced growth. The authors showed that scylla and charybdis were induced by hypoxia.	I, III
P4HA2	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II	8974	This gene encodes a component of prolyl 4-hydroxylase, a key enzyme in collagen synthesis composed of two identical alpha subunits and two beta subunits. The encoded protein is one of several different types of alpha subunits and provides the major part of the catalytic site of the active enzyme. In collagen and related proteins, prolyl 4-hydroxylase catalyzes the formation of 4-hydroxyproline that is essential to the proper three-dimensional folding of newly synthesized procollagen chains. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been described.	I, III
EGLN1	Egl nine homolog 1 (<i>C. elegans</i>); Prolyl 4-hydroxylase alpha	54583	In mammalian cells, they showed that the HIF-prolyl hydroxylases are represented by 3 proteins with a conserved 2-histidine-1-carboxylate iron coordination motif at the catalytic site. The genes encoding these proteins were cloned and termed PHD1, PHD2 (EGLN1), and PHD3 by the authors. Direct modulation of recombinant enzyme activity by graded hypoxia, iron chelation, and cobaltous ions mirrored the characteristics of HIF induction in vivo, fulfilling requirements for these enzymes being oxygen sensors that regulate HIF; Epstein et al. (2001). EGLN1 is an essential component of the pathway through which cells sense oxygen; Bruick and McKnight (2001).	I, IV
WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1	26118	This gene encodes a member of the WD-protein subfamily. This protein shares a high sequence identity to mouse and chick proteins. It contains several WD-repeats spanning most of the protein and an SOCS box in the C-terminus. Alternatively spliced transcript variants encoding distinct isoforms have been found for this gene.	I
NARF	Nuclear prelamin A recognition factor	26502	Several proteins have been found to be prenylated and methylated at their carboxyl-terminal ends. Prenylation was initially believed to be important only for membrane attachment. However, another role for prenylation appears to be its importance in protein-protein interactions. The only nuclear proteins known to be prenylated in mammalian cells are prelamin A- and B-type lamins. Prelamin A is farnesylated and carboxymethylated on the cysteine residue of a carboxyl-terminal CaaX motif. This post-translationally modified cysteine residue is removed from prelamin A when it is endoproteolytically processed into mature lamin A. The protein encoded by this gene binds to the prenylated prelamin A carboxyl-terminal tail domain. It may be a component of a prelamin A endoprotease complex. The encoded protein is located in the nucleus, where it partially colocalizes with the nuclear lamina. It shares limited sequence similarity with iron-only bacterial hydrogenases. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been identified for this gene, including one with a novel exon that is generated by RNA editing.	I
LOC401152	HCV F-transactivated protein 1 (Chromosome 4 open reading frame 3)	401152	Molecular function unknown.	I, III, IV
WDR54	WD repeat domain 54	84058	Molecular function unknown.	I, III

SEC24C	SEC24 related gene family, member C (<i>S. cerevisiae</i>)	9632	The protein encoded by this gene is a member of the SEC24 subfamily of the SEC23/SEC24 family, which is involved in vesicle trafficking. The encoded protein has similarity to yeast Sec24p component of COPII. COPII is the coat protein complex responsible for vesicle budding from the ER. The product of this gene may play a role in shaping the vesicle, as well as in cargo selection and concentration. Alternatively spliced transcript variants encoding the same protein have been identified.	I, III
FLJ41603	FLJ41603 protein	389337	Molecular function unknown.	I
ZNF654	Zinc finger protein 654	55279	DNA binding; Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	I
EIF2C4	eukaryotic translation initiation factor 2C, 4	192670	This gene encodes a member of the Argonaute family of proteins which play a role in RNA interference. The encoded protein is highly basic containing PAZ and PIWI domains, and it may play a role in short-interfering-RNA-mediated gene silencing. This gene is located on chromosome 1 in a cluster of closely related family members including argonaute 3, and eukaryotic translation initiation factor 2C, 1.	I
SLC7A11	Solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, γ^+ system) member 11	23657	SLC7A11 is a member of a heteromeric Na(+)-independent anionic amino acid transport system highly specific for cystine and glutamate. In this system, designated system Xc(-), the anionic form of cystine is transported in exchange for glutamate.	I
KLF11	Kruppel-like factor 11	8462	Cook et al. (1998) identified KLF11, which they called TIEG2, a novel, ubiquitously expressed SP1-like zinc finger protein related to TIEG1. TIEG2 overexpression in cultured epithelial cells inhibited cell proliferation. Expression of TIEG2 is upregulated by TGF-beta-1 and by serum deprivation.	II, IV
ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	2114	ETS transcriptions factors, such as ETS2, regulate numerous genes and are involved in stem cell development, cell senescence and death, and tumorigenesis. The conserved ETS domain within these proteins is a winged helix-turn-helix DNA-binding domain that recognizes the core consensus DNA sequence GGAA/T of target genes. Transcription of Prdx (Peroxiredoxin) genes mediated by Ets/HMG proteins might protect cells from oxidative stress (Shiota, 2008).	II, IV
GPRC5A	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	9052	This gene encodes a member of the type 3 G protein-coupling receptor family, characterized by the signature 7-transmembrane domain motif. The encoded protein may be involved in interaction between retinoid acid and G protein signalling pathways. Retinoic acid plays a critical role in development, cellular growth, and differentiation. This gene may play a role in embryonic development and epithelial cell differentiation.	II
GALNT1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)	2589	This gene encodes a member of the UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T) family of enzymes. GalNAc-Ts initiate mucin-type O-linked glycosylation in the Golgi apparatus by catalyzing the transfer of GalNAc to serine and threonine residues on target proteins. They are characterized by an N-terminal transmembrane domain, a stem region, a luminal catalytic domain containing a GT1 motif and Gal/GalNAc transferase motif, and a C-terminal ricin/lectin-like domain. GalNAc-Ts have different, but overlapping, substrate specificities and patterns of expression. Transcript variants derived from this gene that utilize alternative polyA signals have been described in the literature.	II, IV

FAM46A	Family with sequence similarity 46, member A	55603	Molecular function unknown.	II
CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	1374	The mitochondrial oxidation of long-chain fatty acids is initiated by the sequential action of carnitine palmitoyltransferase I (which is located in the outer membrane and is detergent-labile) and carnitine palmitoyltransferase II (which is located in the inner membrane and is detergent-stable), together with a carnitine-acylcarnitine translocase. CPT I is the key enzyme in the carnitine-dependent transport across the mitochondrial inner membrane and its deficiency results in a decreased rate of fatty acid beta-oxidation. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene.	II, IV
LIAS	Lipoic acid synthetase	11019	The protein encoded by this gene belongs to the biotin and lipoic acid synthetases family. It localizes in mitochondrion and plays an important role in alpha-(+)-lipoic acid synthesis. It may also function in the sulfur insertion chemistry in lipoate biosynthesis. Alternative splicing occurs at this locus and two transcript variants encoding distinct isoforms have been identified.	II, IV
HSPC051	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex (UCRC)	29796	UCRC is a subunit of mitochondrial complex III (ubiquinol-cytochrome c reductase; EC 1.10.2.2), which forms the middle segment of the respiratory chain of the inner mitochondrial membrane.	II,IV
IFI30	Interferon, gamma-inducible protein 30	10437	The protein encoded by this gene is a lysosomal thiol reductase that at low pH can reduce protein disulfide bonds. The enzyme is expressed constitutively in antigen-presenting cells and induced by gamma-interferon in other cell types. This enzyme has an important role in MHC class II-restricted antigen processing.	II, IV
FSHPRH1	FSH primary response (LRPR1 homolog, rat) 1	2491	The product of this gene is involved in the response of gonadal tissues to follicle-stimulating hormone. This gene is also a potential candidate for human X-linked disorders of gonadal development and gametogenesis.	II, IV
TFRC	Transferrin receptor (p90, CD71)	7037	Cellular iron ion homeostasis	II
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	5210	The bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) regulates the steady-state concentration of fructose-2,6-bisphosphate, a potent activator of a key regulatory enzyme of glycolysis, phosphofructokinase. Isozymes of PFKFB differ in the regions surrounding the catalytic core, which are important for the differential response to allosteric effectors and hormonal signals in different tissues.	III
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	5209	The bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) regulates the steady-state concentration of fructose-2,6-bisphosphate, a potent activator of a key regulatory enzyme of glycolysis, phosphofructokinase. Isozymes of PFKFB differ in the regions surrounding the catalytic core, which are important for the differential response to allosteric effectors and hormonal signals in different tissues.	III
GBE1	Glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1 (glycogen branching enzyme, Andersen disease, glycogen storage disease type IV)	2632	The protein encoded by this gene is a glycogen branching enzyme that catalyzes the transfer of alpha-1,4-linked glucosyl units from the outer end of a glycogen chain to an alpha-1,6 position on the same or a neighboring glycogen chain. Branching of the chains is essential to increase the solubility of the glycogen molecule and, consequently, in reducing the osmotic pressure within cells. Highest level of this enzyme are found in liver and muscle. Mutations in this gene are associated with glycogen storage disease IV (also known as Andersen's disease).	III

HK2	Hexokinase 2	3099	Hexokinases phosphorylate glucose to produce glucose-6-phosphate, thus committing glucose to the glycolytic pathway. This gene encodes hexokinase 2, the predominant form found in skeletal muscle. It localizes to the outer membrane of mitochondria. Expression of this gene is insulin-responsive, and studies in rat suggest that it is involved in the increased rate of glycolysis seen in rapidly growing cancer cells.	III
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	664	This gene is a member of the BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein (BNIP) family. It interacts with the E1B 19 kDa protein which is responsible for the protection of virally-induced cell death, as well as E1B 19 kDa-like sequences of BCL2, also an apoptotic protector. This gene contains a BH3 domain and a transmembrane domain, which have been associated with pro-apoptotic function. The dimeric mitochondrial protein encoded by this gene is known to induce apoptosis, even in the presence of BCL2.	III
P4HA1	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I	5033	This gene encodes a component of prolyl 4-hydroxylase, a key enzyme in collagen synthesis composed of two identical alpha subunits and two beta subunits. The encoded protein is one of several different types of alpha subunits and provides the major part of the catalytic site of the active enzyme. In collagen and related proteins, prolyl 4-hydroxylase catalyzes the formation of 4-hydroxyproline that is essential to the proper three-dimensional folding of newly synthesized procollagen chains. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been described.	III
KISS1R	KISS1 receptor	84634	The protein encoded by this gene is a galanin-like G protein-coupled receptor that binds metastin, a peptide encoded by the metastasis suppressor gene KISS1. The tissue distribution of the expressed gene suggests that it is involved in the regulation of endocrine function, and this is supported by the finding that this gene appears to play a role in the onset of puberty. Mutations in this gene have been associated with hypogonadotropic hypogonadism and central precocious puberty.	III, IV
STC2	Stanniocalcin 2	8614	This gene encodes a secreted, homodimeric glycoprotein that is expressed in a wide variety of tissues and may have autocrine or paracrine functions. The encoded protein has 10 of its 15 cysteine residues conserved among stanniocalcin family members and is phosphorylated by casein kinase 2 exclusively on its serine residues. Its C-terminus contains a cluster of histidine residues which may interact with metal ions. The protein may play a role in the regulation of renal and intestinal calcium and phosphate transport, cell metabolism, or cellular calcium/phosphate homeostasis. Constitutive overexpression of human stanniocalcin 2 in mice resulted in pre- and postnatal growth restriction, reduced bone and skeletal muscle growth, and organomegaly. Expression of this gene is induced by estrogen and altered in some breast cancers.	III
ADM	Adrenomedullin	133	Adrenomedullin, a hypotensive peptide found in human pheochromocytoma, consists of 52 amino acids, has 1 intramolecular disulfide bond, and shows a slight homology with the calcitonin gene-related peptide. It may function as a hormone in circulation control because it is found in blood in a considerable concentration. The precursor, called proadrenomedullin, is 185 amino acids long. By RNA-blot analysis, human adrenomedullin mRNA was found to be highly expressed in several tissues. Genomic ADM DNA consists of 4 exons and 3 introns, with the 5-prime flanking region containing TATA, CAAT, and GC boxes. There are also multiple binding sites for activator protein-2 and a cAMP-regulated enhancer element.	III, IV
JMJD1A	Jumonji domain containing 1A	55818	This gene encodes a zinc finger protein that contains a jumonji domain. Histone demethylases	III, IV

FBXO16	F-box protein 16	157574	This gene encodes a member of the F-box protein family, members of which are characterized by an approximately 40 amino acid motif, the F-box. The F-box proteins constitute one of the four subunits of ubiquitin protein ligase complex called SCFs (SKP1-cullin-F-box), which function in phosphorylation-dependent ubiquitination. The F-box proteins are divided into three classes: Fbws containing WD-40 domains, Fbls containing leucine-rich repeats, and Fbxs containing either different protein-protein interaction modules or no recognizable motifs. The protein encoded by this gene belongs to the Fbx class.	III
PLOD1	Procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	5351	Lysyl hydroxylase is a membrane-bound homodimeric protein localized to the cisternae of the endoplasmic reticulum. The enzyme (cofactors iron and ascorbate) catalyzes the hydroxylation of lysyl residues in collagen-like peptides. The resultant hydroxylysyl groups are attachment sites for carbohydrates in collagen and thus are critical for the stability of intermolecular crosslinks. Some patients with Ehlers-Danlos syndrome type VI have deficiencies in lysyl hydroxylase activity.	III
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	10397	This gene is a member of the N-myc downregulated gene family which belongs to the alpha/beta hydrolase superfamily. The protein encoded by this gene is a cytoplasmic protein involved in stress responses, hormone responses, cell growth, and differentiation. It is necessary for p53-mediated caspase activation and apoptosis. Mutation in this gene has been reported to be causative for hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. Multiple alternatively spliced variants, encoding the same protein, have been identified.	III, IV
NARF	Nuclear prelamin A recognition factor	26502	Several proteins have been found to be prenylated and methylated at their carboxyl-terminal ends. Prenylation was initially believed to be important only for membrane attachment. However, another role for prenylation appears to be its importance in protein-protein interactions. The only nuclear proteins known to be prenylated in mammalian cells are prelamin A- and B-type lamins. Prelamin A is farnesylated and carboxymethylated on the cysteine residue of a carboxyl-terminal CaaX motif. This post-translationally modified cysteine residue is removed from prelamin A when it is endoproteolytically processed into mature lamin A. The protein encoded by this gene binds to the prenylated prelamin A carboxyl-terminal tail domain. It may be a component of a prelamin A endoprotease complex. The encoded protein is located in the nucleus, where it partially colocalizes with the nuclear lamina. It shares limited sequence similarity with iron-only bacterial hydrogenases. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been identified for this gene, including one with a novel exon that is generated by RNA editing.	III
TMEM45A	Transmembrane protein 45A	55076	Molecular function unknown	III
FAM80A (RIMKLA)	Family with sequence similarity 80, member A (Ribosomal modification protein rimK-like family member A)	284716	Molecular function unknown	III
OBSL1	Obscurin-like 1		The obscurin gene spans more than 150 kb, contains over 80 exons and encodes a protein of approximately 720 kDa. The encoded protein contains 68 Ig domains, 2 fibronectin domains, 1 calcium/calmodulin-binding domain, 1 RhoGEF domain with an associated PH domain, and 2 serine-threonine kinase domains. This protein belongs to the family of giant sacromeric signaling proteins that includes titin and nebulin, and may have a role in the organization of myofibrils during assembly and may mediate interactions between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been identified. Molecular function of Obscurin-like 1 unknown	III

FOSL2	FOS-like antigen 2	2355	The Fos gene family consists of 4 members: FOS, FOSB, FOSL1, and FOSL2. These genes encode leucine zipper proteins that can dimerize with proteins of the JUN family, thereby forming the transcription factor complex AP-1. As such, the FOS proteins have been implicated as regulators of cell proliferation, differentiation, and transformation.	IV
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2353	The Fos gene family consists of 4 members: FOS, FOSB, FOSL1, and FOSL2. These genes encode leucine zipper proteins that can dimerize with proteins of the JUN family, thereby forming the transcription factor complex AP-1. As such, the FOS proteins have been implicated as regulators of cell proliferation, differentiation, and transformation. In some cases, expression of the FOS gene has also been associated with apoptotic cell death.	IV
KCTD11	Potassium channel tetramerisation domain containing 11	147040	KCTD11 seems to inhibit medulloblastoma growth by negatively regulating the Hedgehog pathway (Di Marcotullio et al, 2004)	IV
TXNIP	Thioredoxin interacting protein	10628	TXNIP functions as an oxidative stress mediator by inhibiting TRX (Thioredoxin) activity (Junn et al 2000) Adenovirus-mediated overexpression of TXNIP suppressed Trx activity and induced cardiomyocyte apoptosis. Furthermore, TXNIP overexpression sensitized cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis, whereas Trx overexpression protected cells against injury. We concluded that TXNIP is a key stress-responsive inhibitor of thioredoxin activity in cardiomyocytes. (Wang et al., 2002	IV
ERO1L	ERO1-like (S. cerevisiae)	30001	Enzyme: Oxidoreductase Metabolism ; Energy pathways Hypoxic induction of Ero1-L alpha is key adaptive response in a previously unrecognized HIF-1-mediated pathway that operates to improve protein secretion under hypoxia and might be used for inhibiting tumor growth via inhibiting VEGF-driven angiogenesis	IV
CA9	Carbonic anhydrase IX	768	Carbonic anhydrases (CAs) are a large family of zinc metalloenzymes that catalyze the reversible hydration of carbon dioxide. They participate in a variety of biological processes, including respiration, calcification, acid-base balance, bone resorption, and the formation of aqueous humor, cerebrospinal fluid, saliva, and gastric acid. They show extensive diversity in tissue distribution and in their subcellular localization. CA IX is a transmembrane protein and the only tumor-associated carbonic anhydrase isoenzyme known. It is expressed in all clear-cell renal cell carcinoma, but is not detected in normal kidney or most other normal tissues. It may be involved in cell proliferation and transformation. This gene was mapped to 17q21.2 by fluorescence in situ hybridization, however, radiation hybrid mapping localized it to 9p13-p12.	IV
ANG	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	283	The protein encoded by this gene is an exceedingly potent mediator of new blood vessel formation. It hydrolyzes cellular tRNAs resulting in decreased protein synthesis and is similar to pancreatic ribonuclease. Alternative splicing results in two transcript variants encoding the same protein. This gene and the gene that encodes ribonuclease, RNase A family, 4 share promoters and 5' exons. Each gene splices to a unique downstream exon that contains its complete coding region.	IV
PIM1	pim-1 oncogene	5292	Proto-Oncogene, Serin/Threonin Kinase, cell communication, signal transduction, drug metabolism	IV
ALDOC	Aldolase C, Fructose-bisphosphate	230	This gene encodes a member of the class I fructose-biphosphate aldolase gene family. Expressed specifically in the hippocampus and Purkinje cells of the brain, the encoded protein is a glycolytic enzyme that catalyzes the reversible aldol cleavage of fructose-1,6-biphosphate and fructose 1-phosphate to dihydroxyacetone phosphate and either glyceraldehyde-3-phosphate or glyceraldehyde, respectively.	IV

EGLN3	Egl nine homolog 3 (C. elegans)	112399	HIF prolyl hydroxylase 3, Ubiquitin-specific protease activity	IV
LOXL2	Lysyl oxidase-like 2	4017	This gene encodes a member of the lysyl oxidase gene family. The prototypic member of the family is essential to the biogenesis of connective tissue, encoding an extracellular copper-dependent amine oxidase that catalyses the first step in the formation of crosslinks in collagens and elastin. A highly conserved amino acid sequence at the C-terminus end appears to be sufficient for amine oxidase activity, suggesting that each family member may retain this function. The N-terminus is poorly conserved and may impart additional roles in developmental regulation, senescence, tumor suppression, cell growth control, and chemotaxis to each member of the family.	IV
PPP1R3C	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	5507	Protein phosphatase-1 (PP1; see MIM 176875) participates in the regulation of a wide variety of cellular functions by reversible protein phosphorylation. The ability of PP1 to regulate diverse functions resides in its capacity to interact with a variety of regulatory subunits that may target PP1 to specific subcellular locations, modulate its substrate specificity, and allow its activity to be responsive to extracellular signals. Several targeting subunits of PP1 have been identified.	IV
SLC6A8	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8	6535	The protein encoded by this gene is a plasma membrane protein whose function is to transport creatine into and out of cells. Defects in this gene can result in X-linked creatine deficiency syndrome. Multiple transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene.	IV
CMKOR1	Chemokine orphan receptor 1	57007	This gene encodes a member of the G-protein coupled receptor family. Although this protein was earlier thought to be a receptor for vasoactive intestinal peptide (VIP), it is now considered to be an orphan receptor, in that its endogenous ligand has not been identified. The protein is also a coreceptor for human immunodeficiency viruses (HIV). Translocations involving this gene and HMGA2 on chromosome 12 have been observed in lipomas.	IV
RALGDS	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator	5900	Guanyl-nucleotide exchange factor activity, Cell communication ; Signal transduction	IV
SSPN	Sarcospan (Kras oncogene-associated gene)	8082	This gene encodes a member of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC). The DGC spans the sarcolemma and is comprised of dystrophin, syntrophin, alpha- and beta-dystroglycans and sarcoglycans. The DGC provides a structural link between the subsarcolemmal cytoskeleton and the extracellular matrix of muscle cells. Two alternatively spliced transcript variants that encode different protein isoforms have been described.	IV
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain	639	This gene encodes a protein that acts as a repressor of beta-interferon gene expression. The protein binds specifically to the PRD1 (positive regulatory domain 1 element) of the beta-IFN gene promoter. Transcription of this gene increases upon virus induction. Two alternatively spliced transcript variants that encode different isoforms have been reported.	IV
HIG2	Hypoxia-inducible protein 2 (Chromosome 7 open reading frame 68)	29923	Molecular function unknown	IV
ARRDC3	Arrestin domain containing 3	57561	Molecular function unknown	IV
ARRDC4	Arrestin domain containing 4	91947	Molecular function unknown	IV

ANKRD37	Ankyrin repeat domain 37	353322	Uncharacterized protein that contains four ankyrin repeats. Ankyrin repeats are thought to mediate protein–protein interactions and they are involved in regulation of key transcription factors	IV
FAM84A	Family with sequence similarity 84, member A	151354	Molecular function unknown	IV
LBH	Likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene	81606	These results suggest that hLBH proteins may act as a transcriptional activator in mitogen-activated protein kinase signaling pathway to mediate cellular functions. LBH is implicated as a candidate gene for congenital heart disease associated with partial trisomy 2p syndrome. (GeneRIFs)	IV
FAM46A	Family with sequence similarity 46, member A	55603	Molecular function unknown	IV
FAM83A	Family with sequence similarity 83, member A	84985	Molecular function unknown	IV
MVD	Mevalonate (diphospho) decarboxylase	4597	The enzyme mevalonate pyrophosphate decarboxylase catalyzes the conversion of mevalonate pyrophosphate into isopentenyl pyrophosphate in one of the early steps in cholesterol biosynthesis. It decarboxylates and dehydrates its substrate while hydrolyzing ATP.	IV
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	1728	This gene is a member of the NAD(P)H dehydrogenase (quinone) family and encodes a cytoplasmic 2-electron reductase. This FAD-binding protein forms homodimers and reduces quinones to hydroquinones. This protein's enzymatic activity prevents the one electron reduction of quinones that results in the production of radical species. Mutations in this gene have been associated with tardive dyskinesia (TD), an increased risk of hematotoxicity after exposure to benzene, and susceptibility to various forms of cancer. Altered expression of this protein has been seen in many tumors and is also associated with Alzheimer's disease (AD). Alternate transcriptional splice variants, encoding different isoforms, have been characterized.	IV, V
NRG1	Neuregulin 1	3084	The protein encoded by this gene was originally identified as a 44-kD glycoprotein that interacts with the NEU/ERBB2 receptor tyrosine kinase to increase its phosphorylation on tyrosine residues. This protein is a signaling protein that mediates cell-cell interactions and plays critical roles in the growth and development of multiple organ systems. It is known that an extraordinary variety of different isoforms are produced from this gene through alternative promoter usage and splicing. These isoforms are tissue-specifically expressed and differ significantly in their structure, and thereby these isoforms are classified into types I, II, III, IV, V and VI. The gene dysregulation has been linked to diseases such as cancer, schizophrenia and bipolar disorder (BPD).	IV
EREG	Epiregulin	2069	Epiregulin is a member of the epidermal growth factor family. Epiregulin can function as a ligand of EGFR (epidermal growth factor receptor), as well as a ligand of most members of the ERBB (v-erb-b2 oncogene homolog) family of tyrosine-kinase receptors.	IV
KRT75 (K6HF)	Keratin 75 (Cytokeratin type II)	9119	This gene is a member of the type II keratin family clustered on the long arm of chromosome 12. Type I and type II keratins heteropolymerize to form intermediate-sized filaments in the cytoplasm of epithelial cells. This gene is expressed in the companion layer, upper germinative matrix region of the hair follicle, and medulla of the hair shaft. The encoded protein plays an essential role in hair and nail formation. Variations in this gene have been associated with the hair disorders pseudofolliculitis barbae (PFB) and loose anagen hair syndrome (LAHS).	IV

TAF9B	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	51616	Initiation of transcription by RNA polymerase II requires the activities of more than 70 polypeptides. The protein that coordinates these activities is transcription factor IID (TFIID), which binds to the core promoter to position the polymerase properly, serves as the scaffold for assembly of the remainder of the transcription complex, and acts as a channel for regulatory signals. TFIID is composed of the TATA-binding protein (TBP) and a group of evolutionarily conserved proteins known as TBP-associated factors or TAFs. TAFs may participate in basal transcription, serve as coactivators, function in promoter recognition or modify general transcription factors (GTFs) to facilitate complex assembly and transcription initiation. This gene encodes a protein that is similar to one of the small subunits of TFIID, TBP-associated factor 9, and is also a subunit of TFIID. TAF9 and TAF9b share some functions but also have distinct roles in the transcriptional regulatory process.	IV
SH2D5	SH2 domain containing 5	400745	Molecular function unknown	IV
C5orf13	Chromosome 5 open reading frame 13	9315	Molecular function unknown	V
TM4SF1	Transmembrane 4 L six family member 1	4071	The protein encoded by this gene is a member of the transmembrane 4 superfamily, also known as the tetraspanin family. Most of these members are cell-surface proteins that are characterized by the presence of four hydrophobic domains. The proteins mediate signal transduction events that play a role in the regulation of cell development, activation, growth and motility. This encoded protein is a cell surface antigen and is highly expressed in different carcinomas.	V
ENO1	Enolase 1, (alpha)	2023	This gene encodes one of three enolase isoenzymes found in mammals; it encodes alpha-enolase, a homodimeric soluble enzyme, and also encodes a shorter monomeric structural lens protein, tau-crystallin. The two proteins are made from the same message. The full length protein, the isoenzyme, is found in the cytoplasm. The shorter protein is produced from an alternative translation start, is localized to the nucleus, and has been found to bind to an element in the c-myc promoter.	V
KIAA0746	KIAA0746 protein	23231	Molecular function unknown	V
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	3486	This gene is a member of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) family and encodes a protein with an IGFBP domain and a thyroglobulin type-I domain. The protein forms a ternary complex with insulin-like growth factor acid-labile subunit (IGFALS) and either insulin-like growth factor (IGF) I or II. In this form, it circulates in the plasma, prolonging the half-life of IGFs and altering their interaction with cell surface receptors.	VI
CHES1	Checkpoint suppressor 1 (FOXN3, Forkhead box N3)	1112	This gene is a member of the forkhead/winged helix transcription factor family. Checkpoints are eukaryotic DNA damage-inducible cell cycle arrests at G1 and G2. Checkpoint suppressor 1 suppresses multiple yeast checkpoint mutations including mec1, rad9, rad53 and dun1 by activating a MEC1-independent checkpoint pathway.	VI
CSPG5	Chondroitin sulfate proteoglycan 5 (neuroglycan C)	10675	Molecular function unknown	VI
ATP2B4	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	493	The protein encoded by this gene belongs to the family of P-type primary ion transport ATPases characterized by the formation of an aspartyl phosphate intermediate during the reaction cycle. These enzymes remove bivalent calcium ions from eukaryotic cells against very large concentration gradients and play a critical role in intracellular calcium homeostasis.	VI

SLC25A36	Solute carrier family 25, member 36	55186	Transporter activity	VI
PAM	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	5066	This gene encodes a multifunctional protein. It has two enzymatically active domains with catalytic activities - peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase (PHM) and peptidyl-alpha-hydroxyglycine alpha-amidating lyase (PAL). These catalytic domains work sequentially to catalyze neuroendocrine peptides to active alpha-amidated products.	VI
TCEA3	Transcription elongation factor A (SII), 3	6920	Transcription regulator activity	VI
COX5A	Cytochrome c oxidase subunit Va	9377	Cytochrome c oxidase (COX) is the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain. It is a multi-subunit enzyme complex that couples the transfer of electrons from cytochrome c to molecular oxygen and contributes to a proton electrochemical gradient across the inner mitochondrial membrane. The complex consists of 13 mitochondrial- and nuclear-encoded subunits. The mitochondrially-encoded subunits perform the electron transfer of proton pumping activities. The functions of the nuclear-encoded subunits are unknown but they may play a role in the regulation and assembly of the complex. This gene encodes the nuclear-encoded subunit Va of the human mitochondrial respiratory chain enzyme.	VI
RRS1	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	23212	RNA interference experiments revealed that RRS1-depleted cells show abnormalities in chromosome alignment and spindle organization, which result in mitotic delay; Ribonucleoprotein	VI
MGC5528	Defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	79075	Cell cycle control protein; Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	VI
GPATCH4	G patch domain containing 4	54865	Molecular function unknown	VI

8.3. Publikationen

Aus der vorgelegten Arbeit ging die folgende Publikation hervor:

"Sex-Determining Region Y Box 4 is induced by Hypoxia-Inducible Factor 1 α in Prostate Cancer Cell Lines"; U. Pflugrad, A. Sommer, B. Weiss, D. Mumberg, P. Knaus, G. Siemeister

Eingereicht und im Bearbeitungsprozess beim Journal of Cellular Biochemistry.

8.4. Lebenslauf

Name: Ulrike Pflugrad
e-mail: ulrike.pflugrad@googlemail.com

8.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig durchgeführt und verfasst habe. Dabei wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Berlin, den 05.10.2009



Ulrike Pflugrad