Mechanismen der Hypoxie-induzierten Chemoresistenz in Lungenkarzinomzellen -Die Rolle von HIF-1, COX-2 und S1P

Dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte

Dissertation

vorgelegt von Dipl.-Biol. Steffen Erik Schnitzer

Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Brüne

Frankfurt am Main, im März 2008

Eingereicht am 24. Januar 2008

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus 1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Brüne 2. Gutachter: Prof. Dr. Timm Anke

Danksagung

Am Ende dieses Weges blickt man auf die bisher zurückgelegte Wegstrecke zurück und stellt fest, dass man diese nicht allein bewältigt hat. Im Leben ist man immer von zahlreichen, hilfsbereiten Menschen umgeben, die einen auf diesem Weg in irgendeiner Form begleiten und immer mit Rat und Tat zur Seite stehen. All diesen Menschen möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernhard Brüne dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Labor an meiner Dissertation zu arbeiten. Ein offenes Ohr für alle Fragen, die Bereitschaft zur Diskussion und Anregungen zu meiner Arbeit trugen zum Verfassen dieser Dissertationsschrift ebenso bei wie die Bereitstellung aller nötigen finanziellen Mittel.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Timm Anke, der sich bereit erklärt hat, die Bewertung meiner Arbeit zu übernehmen, ebenso wie Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus, der freundlicherweise den Vorsitz meiner Prüfungskommission übernommen hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Jie Zhou, der mich als Betreuer während der letzten 4 Jahre stets unterstützt hat. Auch Dr. habil. Andreas von Knethen danke ich für das Wissen, dass er, aber ich nicht hatte.

Die Arbeit im Labor ist natürlich nicht ohne unzählige helfende Hände zu bewältigen. Ich danke dem ganze ,Brüne-Lab', besonders dem 3. Stock, auch denen, die uns bereits verlassen haben – Tobias, Andrea, Sandra und Axel.

Mathias, Nico, Anne-Marie, Carla, Vera, Teckel, Barbara und Andi möchte ich danken, dass wir beweisen konnten, dass Arbeit auch Freundschaft bedeuten kann. Und natürlich danke ich allen, die ich jetzt vergessen habe.

Nicht zuletzt möchte ich Euch danken, Mama, Papa und Christian, dass Ihr immer da wart, als ich Euch gebraucht habe. Ich durfte durch Euch eine Unterstützung erfahren, wie sie nicht selbstverständlich ist. Erst durch Euch bin ich der Mensch geworden, der ich heute bin, Danke!

Noch eines zum Schluss: Oma, ich hab's geschafft!

INHALTSVERZEICHNIS

INHA	_TSVERZEICHNIS	I
ABBII	_DUNGEN	V
TABE	LLEN	VII
ΑΒΚÜ	IRZUNGEN	VIII
1 E	NLEITUNG	13
1.1	Die Rolle der Hypoxie/HIF-1 in der Tumorbiologie	
1.2	Der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1)	
1.2.1	Domänenstruktur von HIF-1	
1.2.2	Regulation des Proteingehaltes von HIF-1a	
1.2.3	Transaktivierung von HIF-1	
1.3	Sphingosine-1-Phosphat – Metabolismus und Funktion	
1.3.1	Die Synthese von Sphingosin-1-Phosphat durch Sphingosin-Kinasen	
1.3.2	Der Abbau von Sphingosin-1-Phosphat	
1.3.3	Sphingosin-1-Phosphat (S1P) als Botenstoff	
1.3.4	S1P in der Tumorbiologie	
1.4	Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Prostaglandine	
1.5	Zielsetzung	
2 M	ATERIAL UND METHODEN	32
2.1	Material	
2.1.1	Antikörper	
2.1.2	Primer	
2.1.3	siRNA-Sequenzen	
2.1.4	Liste der verwendeten Inhibitoren	
2.1.5	Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen	
2.2	Methoden	

2.2.1	Kultivierur	ng der Zellen	
2.2.	1.1 Inkub	pationen unter Hypoxie	
2.2.	1.2 Herst	tellung von konditioniertem Medium (CM)	
2.2.	1.3 Extra	ktion von Lipiden aus Medium	
2.2.2	Bestimmur	ng des Proteingehaltes	
2.2.3	Analyse de	er Proteinexpression mittels Western-Blot	
2.2.	3.1 Extra	ktion von Zellproteinen	
2.2.	3.2 Gelel	ektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	
2.2.	3.3 Blotte	en der Proteine	
2.2.	3.4 Detek	ktion der Proteine auf der Membran	
2.2.4	Bestimmur	ng des mRNA-Gehalts von Zellen	
2.2.	4.1 Isolat	tion der mRNA	
2.2.	4.2 Reven	rse Transkription	
2.2.	4.3 Quan	titative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	
2.2.5	Messungen	n der Vitalität von Zellen	
2.2.	5.1 Bestin	mmung der Caspase3-Aktivität	
2.2.	5.2 Detek	ktion des mitochondriellen Membranpotentials ($\Delta \Psi M$)	
2.2.	5.3 Färbu	ing der Zellkerne mit DAPI	
2.2.6	Transiente	Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA	
2.2.	5.1 Trans	sfektion mit siRNA durch DharmaFECT1	
2.2.	5.2 Nukle	eofektion mit siRNA	
2.2.7	Messungen	n der Sphingosin-Kinase Aktivität	
2.2.8	Statistische	e Auswertung	
3 ER	GEBNIS	SE	46
3.1 I	ie Expressio	on von HIF-1 in A549 Zellen	
3.2 I	er Hypoxie	e-vermittelte Schutz vor Apoptose	47
3.2.1	Zeitabhäng	gige Entwicklung der Chemoresistenz unter Hypoxie	
3.3 I	ie Rolle vor	n HIF-1 bei der Chemoresistenz unter Hypoxie	
3.3.1	Auto- oder	parakrine Resistenzmechanismen unter Hypoxie	
3.3.2	Identifizier	rung des sekretierten Schutzfaktors	
3.3.	2.1 Die B	Beteiligung von HIF-1 bei der Konditionierung des Mediums	
3.4 (harakterisi	erung der Stoffklasse des Schutzfaktors	
3.4.1	Screening	möglicher Lipidmediatoren	
3.5 I	ie Bedeutur	ng von PGE ₂ für die Chemoresistenz unter Hypoxie	60
3.5.1	Expression	ı von COX-2 unter Hypoxie	
3.5.2	Die Rolle v	von COX-2 bei der Weiterleitung des Schutzsignals	

3.6	Die Funktion von S1P während der Enstehung der Chemoresistenz	64
3.6.1	Expression und Aktivität der Sphingosin-Kinasen	64
3.6.2	2 Der Einfluss der SphK-Aktivität auf die Vitalität der Zellen	66
3.6.3	Enzymaktivität der SphK unter Hypoxie	67
3.6.4	Die Rolle der SphK2 in dem Auftreten der Chemoresistenz und der Sekretion des Schu	tzfaktors unter
	Hypoxie	68
3.0	6.4.1 SphK2-vermittelter Schutz vor Apoptose unter Hypoxie	68
3.0	6.4.2 Die Beteiligung der SphK2 an der Freisetzung des Schutzfaktors	70
3.7	Signalweiterleitung der Schutzfaktoren in Zielzellen	71
4 D	ISKUSSION	74
4.1	HIF-1 vermittelt intrazellulär anti-apoptotische Signale unter Hypoxie	75
4.2	HIF-1-unabhängiger Schutz vor Apoptose	77
4.3	Sekretierte Lipide vermitteln einen auto-/parakrinen Schutz unter Hypoxie	
4.4	COX-2 vermittelt über PGE2 anti-apoptotische Signale	79
4.4.1	Die Akkumulation der Cyclooxygenase-2 unter Hypoxie	80
4.4.2	2 Synthese und Funktion von PGE ₂ unter Hypoxie	80
4.5	Die Funktion der Sphingosin-Kinasen in A549 Zellen	82
4.5.1	Die Bedeutung der Sphingosin-Kinasen auf die Zellvitalität	83
4.5.2	2 Die Transkription der Sphingosin-Kinase unter Hypoxie	83
4.5.3	Induktion der Enzymaktivität der SphK2	85
4.6	Weiterleitung des freigesetzten Schutzsignals in Zielzellen	86
5 Z	USAMMENFASSUNG	89
6 LI	ITERATUR	90
7 A	NHANG	113
7.1	Chemikalien	113
7.2	Geräte	115
PUBL	IKATIONSLISTE	116

CURRICULUM VITAE	117
ERKLÄRUNG	119

ABBILDUNGEN

Abb. 1: Proteinstruktur von humanem HIF-1 α und HIF-1 β	16
Abb.2: Das Gleichgewicht zwischen Ceramid und S1P (,Sphingolipid Rheostat')	21
Abb.3: Proteinstruktur der humanen Sphingosin-Kinasen 1 und 2	23
Abb.4: Induzierte Synthese und Freisetzung von S1P und dessen Signalwege in Zielzellen 2	26
Abb.5: Regulation und Funktion der Cyclooxygenase-2	29
Abb.6: Zeitlicher Verlauf der HIF-1α-Expression in A549 Zellen unter Hypoxie	46
Abb.7: Hypoxie-vermittelter Schutz vor induzierter Apoptose	47
Abb.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von A549 Zellen nach DAPI-Färbung	49
Abb.9: Resistenz gegenüber Apoptose nach Vorinkubation unter Hypoxie	50
Abb.10: Hemmung der HIF-1α Expression durch spezifische siRNA	51
Abb.11: Die Rolle von HIF-1α während des Hypoxie-vermittelten Schutzes vor Apoptose	52
Abb.12: Der Einfluss von DFX auf Etoposid-induzierte Caspase3-Aktivität	53
Abb.13: Schutz vor Apoptose induziert durch konditioniertes Medium (CM)	55
Abb.14: Die Wirkung von CM nach Konditionierung in Zellen mit unterdrückter HIF-1 α	
Expression	56
Abb.15: Charakterisierung der Stoffklasse des Schutzfaktors im CM	57
Abb.16: Wirkung unterschiedlicher Lipide auf Etoposid-induzierte Apoptose	58
Abb.17: Die protektive Wirkung von Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) in A549 Zellen	59
Abb.18: S1P reduziert konzentrationsabhängig die Caspase3-Aktivität nach Etoposid-	
Behandlung	60
Abb.19: Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) unter Hypoxie	61
Abb.20: Die Rolle von COX-2 bei der Hypoxie-induzierten Chemoresistenz und der Sekretic	วท
des Schutzfaktors	62
Abb. 21: HIF-1 und COX-2 vermitteln unabhängig voneinander der Schutz vor Apoptose	
unter Hypoxie	63
Abb.22: Bestimmung des mRNA-Gehaltes von SphK1 und SphK2 unter Hypoxie	64
Abb.23: Protein-Expression von HIF-1α, SphK1, SphK2 und Aktin unter Hypoxie	65
Abb.24: Hemmung der SphK-Aktivität durch DMS und die Auswirkungen auf die Zellvitalität	66
Abb.25: Messungen der Sphingosin-Kinase Aktivität unter Hypoxie	67
Abb.26: Wirksamkeit der spezifischen SphK2-siRNA	69
Abb.27: Die Rolle der SphK2 bezüglich der Chemoresistenz unter Hypoxie	69
Abb.28: Sekretion des Schutzfaktors durch SphK2	71
Abb.29: Beteiligung des ERK1/2-Signalweges an der Induktion der Chemoresistenz in	
Zielzellen	72

Abb.30: Aktivierung des ERK1/2-Signalweges durch CM und Lip-CM	73
Abb. 31: HIF-1-vermittelte Chemoresistenz unter Hypoxie	76
Abb. 32: Die Rolle von COX-2 bei der Entstehung der Chemoresistenz	81
Abb. 33: Die Funktion der Sphningosin-Kinasen in A549 Zellen	84

TABELLEN

Tabelle 1: Verwendete Antikörper, deren Konzentrationen und Inkubationsbedingungen	32
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primer	32
Tabelle 3: Auflistung der eingesetzten siRNA	33
Tabelle 4: Auflistung der eingesetzten Inhibitoren	33
Tabelle 5: Zusammensetzung der SDS-Gele	39
Tabelle 6: Reaktionsansatz der qPCR-Reaktion	41
Tabelle 7: Amplifikationsprotokoll der qPCR-Reaktion	42
Tabelle 8: Liste der eingesetzten Chemikalien und deren Hersteller	.113
Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller	.115

ABKÜRZUNGEN

15δ-PGJ ₂	15δ-rrostaglandine J_2
2-OG	2-oxoglutarate
ABC	ATP binding cassette
AC	adenylyl cyclase
Ac-DEVD-Amc	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarine
ADM	adrenomedulline
AMF	autocrine motility factor
APS	sodium persulfate
ARD1	arrest defective 1
ARE	AU rich element
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
bFGF	basic Fibroblast growth factor
BH3	Bcl-2 homolgy domain
bHLH-PAS	basic helix-loop-helix PER-ARNT-SIM
BSA	bovin serum albumine
C1P	ceramide-1-phosphate
cAMP	cyclic AMP
CBP	CREB binding protein
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat hydrat
CKII	casein kinase type 2
СМ	konditioniertes Medium
C-NLS	c-terminal nuclear locolization sequence
COX-1	cyclooxygenase-1
COX-2	cyclooxygenase-2
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP responsive element binding protein 1
C-TAD	c-terminal transactivation domain
Cyt c	cytochrome c
DAPI	4´,6´-diamin-2-phenylindole
DEPC	diethylpyrocarbonate
DFX	desferroxamine

DihydroS1P	dihydrosphingosine-1-phosphate
DiOC ₆ (3)	3,3´-dihexyloxacarbocyaninjodide
DMS	dimethylsphingosine
DMSO	dimethylsulfoxide
DP	prostaglandine D ₂ receptor
DTT	dithiothreitole
EDTA	ethylendiaminetetraacetate
EGF	epidermal growth factor
EGTA	ethylenglycole-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraacetate
EP1-4	prostaglandin E_2 receptor
EPO	erythropoetin
ER	endoplasmatic reticulum
ERFR	EGF-receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Eto	etoposide
Ets	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
FACS	fluorescent activated cell sorter
Fas	TNF receptor superfamily, member 6 (CD95)
FCS	fetal calf serum
FIH-1	factor inhibiting HIF-1
FP	prostaglandin F_2 receptor
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethane-sulfonic acid
Her2 ^{neu}	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
HIF-1	hxpoxia inducible factor 1
HIF-2	hxpoxia inducible factor 2
HIF-3	hxpoxia inducible factor 3
HO-1	heme oxygenase-1
HRP	horse radish peroxydase
HuD, HuR	mRNA binding factors
IAPs	inhibitor of apoptosis proteinfamily
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
IGF-R	insulin-like growth factor receptor
IL-1	interleukine 1

IP	prostaglandin I_2 receptor
IP ₃	inositoletriphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase 1
Lip-CM	lipid extract from CM
LPA	lysophosphatidylacid
LPP	lipidphosphate phosphatase
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDM2	murine double minute 2
MEK1	mitogen-activated protein kinase kinase 1
MMP2	matrixmetalloporotease 2
MRP1	multidrug resistance protein 1
NBD-Sphingosin	nitrobenzoxadiazole labled sphingosine
NES	nuclea export sequence
NF-IL-6	nuclear factor of interleukin 6
NF-кВ	Nuclear factor-kappa B
NGF	nerve growth factor
NLS	nuclear locolization sequence
N-NLS	N-terminal NLS
NO	nitrogen monoxide
NOS2	NO-synthase 2 (iNOS)
Nox	normoxia
N-TAD	N-terminal transactivation domain
ODD	oxygen dependent degradation domain
р53	p53 tumorsuppressorprotein
PAF	platelet activating factor
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphat-buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PGA ₂	prostaglandin A ₂
PGD ₂	prostaglandin D ₂
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGG ₂	prostaglandin G₂
PGH ₂	prostaglandin H ₂

PGI ₂	prostaglandin I ₂
PGJ ₂	prostaglandin J₂
P-gp	P-glycoprotein
PHD	prolinhydroxylase
PhytoS1P	phytosphingosine-1-phosphate
РІЗК	phosphatidylinositole-3-kinase
РКС	proteinkinase C
PKD	proteinkinase D
PLC	phospholipase C
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	phenylmethansulfonic acid fluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
pVHL	von Hippel-Lindau protein
ROS	reactive oxygen species
S.E.M	standar error of the mean
S1P	sphingosin-1-phosphate
S1PR	S1P-receptor
SDS	sodiumdodecylsulfate
siRNA	small interfering RNA
SphK1	sphingosine-kinase 1
SpHK2	sphingosine-kinase 2
SPL	sphingosine-1-phosphate lyase
SPP	sphingosine-1-phosphat phosphatase
SRC-1	Rous sarcoma proto-oncogene tyrosine-protein kinase 1
STS	staurosporine
TAD	transactivation domain
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	tetramethylendiamine
TGF-α	tumor growth factor
TIA-1	T-cell-restricted intracellular antigen-1
TIAR	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1
ТМ	transmembrane domain
TNF-α	tumor necrose factor α

ТР	thromboxane A ₂ receptor
ТРА	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane
TTP	tristetraprolin
TXA ₂	thormboxane A ₂
uPAR	u-plasminogen activator receptor
UTR	untranslated region
VEGF	vascular endothelial growth factor
v-Src	viral oncogene Src
ΔΨΜ	mitochondrial membrane potential

1 EINLEITUNG

Krebs ist neben der Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2006 waren 25,7% (211523 Menschen) aller Todesfälle Folgen einer Krebserkrankung, wobei bösartige Erkrankungen des Darms, der Lunge und bei Frauen der Brustdrüsen am weitesten verbreitet waren¹. Solide Tumoren stellen etwa 90 % aller bekannten Krebsarten des Menschen dar [1]. Sie entstehen aus einer einzelnen transformierten Zelle und führen im weiteren Verlauf zu einer erhöhten Sterblichkeit des Erkrankten durch den direkten Befall oder die Bildung von Metastasen in lebenswichtigen Organen wie Leber, Lunge oder Gehirn. Das Verständnis der molekularen Grundlagen von Tumorentstehung (Initiation) und dem Fortschreiten der Erkrankung (Promotion und Progression) ist noch immer nicht vollständig. Hinzu kommt, dass viele Tumorarten sich gegen die heute verfügbaren Therapieansätze resistent zeigen. Nicht zuletzt aufgrund der Vielfalt der auftretenden Erkrankungen und der sehr spezifischen Ursachen der Entstehung einer jeweiligen Krebsart stellt die genaue Charakterisierung der molekularen Vorgänge in Tumorzellen - von der malignen Transformation bis hin zur Apoptoseresistenz (Apoptose - programmierter Zelltod) etablierter Tumoren und Metastasen - die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapien dar.

Tumoren entstehen durch genetische Veränderungen einer Zelle, ausgelöst durch Karzinogene wie ionisierende Strahlung, chemische Substanzen oder auch Viren. Die aufgetretenen Veränderungen können in der Folge ein beschleunigtes Wachstum der Zelle oder eine Unterdrückung der Apoptose bewirken. Durch diese Störungen des sensiblen Gleichgewichts von Zellteilung und Zelltod (Zellhomöostase) kann es zu einer Ansammlung von "entarteten Zellen", d.h. zur Ausbildung eines Tumors kommen. Dieser bleibt zunächst durch die Basallamina umschlossen, wächst jedoch unkontrolliert weiter. Aufgrund des abnorm schnellen Wachstums vergrößert sich der Abstand des Tumorkerns zum nächsten Blutgefäß stetig. Er beträgt bei den meisten soliden Tumoren mehr als 100 µm [2]. Es herrscht im Inneren des Tumors ein Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff, welcher zur Bildung eines ,hypoxischen Kerns' (*hypoxic core*) führt. Diese Region spielt für die weitere Entwicklung des Tumors sowie in Bezug auf dessen Therapierbarkeit eine wichtige Rolle. Es wird daher detaillierter auf die Bedeutung der Hypoxie für die Entwicklung des Tumors eingegangen.

¹ Quelle: Webseite des Statistischen Bundesamtes www.destatis.de

1.1 Die Rolle der Hypoxie/HIF-1 in der Tumorbiologie

In Gewebsschnitten von Tumoren zeigte sich, dass im Inneren des Tumors eine Region abgestorbenen, nekrotischen Gewebes entstanden war. Ursächlich hierfür war, dass die Zellen von der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff abgeschnitten waren. In der Randzone dieses Bereichs genügt der verfügbare Sauerstoff für das Überleben der Zellen. Färbungen solcher Schnittpräparate zeigten, dass in diesen Bereichen eine starke Expression von HIF-1 vorlag. Das Auftreten dieses "hypoxischen Kern' ist ein charakteristisches Merkmal solider Tumoren. Hypoxie kann einerseits das Fortschreiten des Tumors hemmen, indem Mechanismen induziert werden, die das Wachstum und die Differenzierung der Zellen hemmen, oder Zelltod in Form von Apoptose und Nekrose auslösen [3-6]. Allerdings ist für die Entwicklung neuer Therapien die Tatsache von größerem Interesse, dass Hypoxie die Anpassung an den verringerten Sauerstoff- und Nährstoffgehalt ermöglicht. Diese Veränderungen, teilweise durch HIF-1 vermittelt, umfassen die Angiogenese, Glykolyse, Hemmung der Apoptose sowie die verstärkte Freisetzung von Wachstumsfaktoren, was autarkes Wachstum der Tumorzellen ermöglicht [7, 8].

Das Fortschreiten und weitere Wachstum eines Tumors (Progression) bedingt die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff. Die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) ist daher eine essenzielle Voraussetzung für die Tumorprogression. Angiogenese bezeichnet die Bildung neuer Blutgefäße. Ausgelöst wird die dies durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren, die endotheliale Vorläuferzellen zur Bildung neuer Gefäße anregen. Es handelt sich um eine lokal begrenzte Reaktion auf eine Unterversorgung von Geweben. Signale, die eine solche Gefäßum- und -neubildung und auch die Regulation des Gefäßtonus vermitteln, sind unter anderem der α_{1B} -adrenerger Rezeptor, ADM, Endothelin-1, NOS2, HO-1, PAI-1, VEGF oder FLT-1 [8, 9]. Zusätzlich erfolgen jedoch auch systemische Anpassungen, z B. durch Stimulation der Erythropoese und des Eisenstoffwechsels (Ceruloplasmin, EPO, Transferrin, Transferrin-Rezeptor) vermittelt [8, 9]. Die verstärkte Bildung und Freisetzung dieser Faktoren in Tumoren wird einerseits durch Hypoxie induziert, andererseits aber auch sauerstoffunabhängig durch Mutationen von Tumorsuppressorgenen (z. B. p53, pVHL) oder Onkogenen (ERFR, Her2^{neu}, v-Src, IGF-R) vermittelt. Diese nehmen unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit über eine Expressionssteigerung von HIF-1 Einfluss auf die Synthese der genannten Faktoren [7]. In einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Tumorentwicklung kommt es bei vielen Tumorarten zur Streuung der Tumorzellen in entfernte Gewebe (Metastasierung). Die Bildung von Metastasen findet meist in für die jeweilige Tumorart charakteristischen Geweben statt. Zu Beginn der Metastasierung lösen sich einzelne Zellen vom Tumor ab, durchbrechen die Basallamina, wandern in das umliegende Gewebe ein und gelangen

schließlich über den Blutkreislauf oder das Lymphsystem zum Ort der Metastasenbildung. Die Vorgänge, die zur Bildung von Metastasen führen, werden Migration und Invasion genannt und es wurde gezeigt, dass die hierfür notwendigen Gene durch Hypoxie induziert werden können [10, 11]. So werden durch HIF-1 unter anderem Enzyme verstärkt exprimiert, die zur Lyse der Basallamina führen und Veränderungen der extrazellulären Matrix herbeiführen (z. B. MMP2, uPAR, Cathepsin D, AMF, c-Met) [8]. Des Weiteren kommt es durch Hypoxie zu einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Tumorzellen, was eine Ablösung der Zellen vom Tumor fördert [12, 13]. Wie bereits dargestellt, ist die intratumorale Hypoxie sowie die Deregulation von HIF-1 durch Mutationen in Onke- und Tumorsunpressorrangen nicht nur an der Initiation und Progression

Mutationen in Onko- und Tumorsuppressorgenen nicht nur an der Initiation und Progression von Tumoren beteiligt, sondern auch ein wichtiges Kriterium für die Therapierbarkeit. So besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Grad an Hypoxie und dem Therapieerfolg durch Bestrahlung, Immuntherapie, photodynamischer Therapie und auch mit Chemotherapeutika [14, 15]. Die Ursachen liegen einerseits in der limitierten Verfügbarkeit molekularen Sauerstoffs (Strahlentherapie) bzw. in den veränderten chemischen Bedingungen (Azidose), andererseits in der Expression von Faktoren, die die Wirkung der Therapie negativ beeinflussen [15, 16]. Als bedeutendster Transkriptionsfaktor der Zellantwort auf Sauerstoffmangel ist HIF-1 auch in der Tumorbiologie von großer Bedeutung. In verschiedenen Tumorarten konnte darüber hinaus eine Überexpression von HIF-1 im Vergleich zu untransformiertem Gewebe festgestellt und eine Korrelation mit dem Therapiererfolg hergestellt werden [8, 17, 18]. Im Folgenden wird daher näher auf die Struktur und Regulation von HIF-1 eingegangen.

1.2 Der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1)

Für das Überleben von Zellen unter Hypoxie sind Veränderungen auf subzellulärer Ebene, aber auch im umgebenden Gewebe notwendig. Die Adaption des zellulären Stoffwechsels an Sauerstoffmangel betrifft vor allem die Umstellung der Energiegewinnung von der oxidativen Phosphorylierung hin zur Glykolyse und zur verbesserten Glukoseaufnahme, dem Substrat der Glykolyse. Weiterhin kommt es zu zellübergreifenden Veränderungen. Dies sind unter anderem die vermehrte Bildung roter Blutkörperchen (Erythropoese), Gefäßerweiterung (Vasodilatation) und Gefäßneubildung (Angiogenese) - Faktoren die langfristig eine verbesserte Versorgung des Gewebes ermöglichen sollen. Das Protein, welches unter Hypoxie diese zellulären Veränderungen maßgeblich reguliert, ist der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF). Es handelt sich um einen hertodimeren Transkriptionsfaktor, von dem im Menschen drei Isoformen HIF-1; HIF-2 und HIF-3 bekannt sind. Diese unterscheiden sich einerseits strukturell durch die beteiligte α -Untereinheit (HIF-1 α , HIF-2 α

und HIF-3α), andererseits durch Unterschiede in ihrer Funktion und Gewebsdistribution [19-21].

1.2.1 Domänenstruktur von HIF-1

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor bestehend aus der konstitutiv exprimierten und stabilen β -Untereinheit (ARNT - *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) und einer ebenfalls konstitutiv exprimierten, aber sauerstoffabhängig regulierten α -Untereinheit. Er gehört zu der Familie der bHLH-PAS (*basic helix-loop-helix PER-ARNT-SIM*) Transkriptionsfaktoren. Die Domänenstruktur beider Untereinheiten zeigt, dass sowohl die α als auch die β -Untereinheit einen N-terminal gelegenen Bereich besitzen, welcher für die Dimerisierung und DNA-Bindung notwendig ist. Diesen Bereich nennt man die bHLH-PAS Domäne. Die bHLH-Domäne ist für die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA verantwortlich. Die daran anschließende PAS-Domäne vermittelt die Dimerisierung der α und β -Untereinheit [22, 23] (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Proteinstruktur von humanem HIF-1 α und HIF-1 β

HIF-1α und HIF-1β besitzen am N-Terminus eine bHLH-Domäne die in Verbindung mit der PAS-Domäne die Dimerisierung und DNA-Bindung von HIF-1 vermittelt. Eine Transaktivierungsdomäne in HIF-1β und zwei TADs (N-TAD und C-TAD) in HIF-1α dienen der Rekrutierung von Kofaktoren. Des Weiteren besitzt die α-Untereinheit einen Bereich der die Regulation des Proteins durch Sauerstoff vermittelt (*oxygen dependent degradation domain* - ODD), sowie zwei Kernlokalisationssequenzen (N-NLS und C-NLS). Die α-Untereinheit unterliegt verschiedenen posttranslationalen Modifikationen. P402 und P564 werden sauerstoffabhängig durch Prolinhydroxylasen (PHD) hydroxyliert und dienen als Bindungsstellen für das von Hippel-Lindau Protein (pVHL). Die Acetylierung von K532 durch ARD1 erleichtert diese Interaktion. Eine weitere Hydroxylierung an N803 durch die FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) diente der Regulation der Aktivität. Phosphorylierungsstellen an T796, SUMOylierungsstellen an K391, K477 und K532 sowie die Nitrosylierungen an C800 und C533 wurden ebenfalls beschrieben.

17

In der α-Untereinheit sind weitere Strukturen identifiziert worden, welche der Regulation der Proteinstabilität und der transkriptionellen Aktivität dienen. Die Aminosäuresequenz von HIF-1α besitzt zwei Bereiche, welche die nukleäre Lokalisation des Proteins determinieren (NLS nuclear localization sequence). Die erste NLS befindet sich im N-Terminus des Proteins, inmitten der bHLH-Domäne zwischen den Aminosäuren 17-33 (N-NLS), der zweite ist Cterminal zwischen den Aminosäuren 718-721 (C-NLS) gelegen. Nach Akkumulation der α-Untereinheit wird so die Translokation des Proteins vom Zytosol in den Zellkern festgelegt. Eine weitere Struktur zwischen den Aminosäuren 429-608, welche ausschließlich in der a-Untereinheit zu finden ist, ist die so genannte ODD (oxygen dependent degradation domain). Dieser Bereich ist für die sauerstoffabhängige Regulation der Proteinstabilität verantwortlich [22, 24]. Innerhalb dieser Domäne befinden sich zwei Prolinreste (P402 und P564), die die Regulation der Proteinstabilität nach der herrschenden Sauerstoffkonzentration ermöglichen. Prolinreste durch spezifische Hydroxylasen, Unter Normoxie werden die den Prolinhydroxylasen (PHDs), hydroxyliert, wodurch die Bindung des von Hippel-Lindau Proteins (pVHL) ermöglicht, und HIF-1a ubiguitiniert wird. Die Stabilität von HIF-1a wird durch einen weiteren Aminosäurerest (K532) innerhalb der ODD beeinflusst. Dieser Lysinrest wird durch die Acetyltransferase ARD1 (arrest-defective-1) acetyliert, und so die Bindung von pVHL an HIF-1α erleichtert [25] (siehe Abschnitt 1.2.2).

Die Struktur von HIF-1 umfasst drei weitere Strukturen, die für die Transaktivierung nötig sind. Die α -Untereinheit verfügt über zwei so genannte Transaktivierungsdomänen (N-TAD; aa531-575 und C-TAD; aa786-826) [26]. Innerhalb der C-TAD befindet sich ein Aminosäurerest (N803) welcher ebenfalls sauerstoffabhängig durch FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) hydroxyliert wird und für die Regulation der Aktivität wichtig ist (siehe 1.2.3). Die β -Untereinheit hingegen weist lediglich eine TAD am C-terminalen Ende auf. Diese Strukturen sind an der Rekrutierung von Kofaktoren beteiligt, welche für die transkriptionelle Aktivität notwendig sind (siehe Abschnitt 1.2.3) [27].

1.2.2 Regulation des Proteingehaltes von HIF-1α

Wie bereits erwähnt stellt die α -Untereinheit den limitierenden Faktor für die Bildung von HIF-1 dar. Die Regulation des Proteingehaltes von HIF-1 α erfolgt hauptsächlich durch die Veränderung der Proteinstabilität. Der Abbau von HIF-1 α unter Normoxie erfolgt durch ein Zusammenspiel mehrerer Proteine. Zunächst kommt es – katalysiert durch eine Prolinhydroxylase (PHD) - zur Hydroxylierung von HIF-1 α an den zuvor genannten Prolinresten P402 und P564 [28-31]. Die PHDs gehören zu der Familie der 2-oxoglutarat (2-OG)-abhängigen Dioxygenasen und benötigen neben 2-OG noch Eisen (Fe²⁺), O₂ und Ascorbat als Kofaktoren [32]. Im Menschen sind drei Isoformen der Prolinhydroxylasen beschrieben (PHD1, PHD2 und PHD3) [30, 31, 33] wobei gezeigt werden konnte, dass der Abbau von HIF-1α durch die PHD2 vermittelt wird [34]. Unter Hypoxie kommt es zu einer verstärkten mRNA- und Proteinexpression der PHD2, wodurch HIF-1α selbst Einfluss auf seine Stabilität nimmt. So kann nach Reoxygenierung der Zellen ein beschleunigter Abbau der α-Untereinheit erfolgen [30, 35].

Die Hydroxylierung der Prolinreste innerhalb der ODD von HIF-1 α dient als Bindungsstelle für pVHL [36, 37]. pVHL wird im Menschen ubiquitär exprimiert und kommt, wie die PHD, sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vor. Ein Abbau von HIF-1 α ist somit auch im aktivierten Zustand möglich. Die Bindung von pVHL an das hydroxylierte HIF-1 α Protein ist der Initialschritt der Degradation von HIF-1 α . Um pVHL bildet sich nun ein Multiproteinkomplex, der neben pVHL noch Elongin C, Elongin B, Cullin-2 und Rbx1 umfasst, und zusammen den VCB-Cul2 E3 Ligase Komplex formt [38]. Die Bildung dieses Komplexes führt zur Polyubiquitinierung von HIF-1 α und führt es so dem Abbau durch das 26S-Proteasom zu [39]. Neben dem eben genannten Abbau von HIF-1 α durch die Bindung von pVHL konnte ein alternativer Abbaumechanismus beschrieben werden. Unabhängig vom Hydroxylierungsstatus von HIF-1 α wurde gezeigt, dass p53 an der Destabilisierung von HIF-1 α beteiligt ist [40]. Die Ubiquitinierung von HIF-1 α wird durch die Bildung eines Komplexes aus HIF-1 α , p53 und MDM2 (*murine double minute 2*), einer weiteren E3 Ubiquitin Ligase, vermittelt und HIF-1 α somit dem proteasomalen Abbau zugeführt [41].

Für die Untersuchung spezifischer HIF-1-vermittelter Effekte, unabhängig von einer möglichen Beeinflussung durch andere Hypoxie-induzierte Faktoren, macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass Prolinhydroxylasen, welche maßgeblich an der Degradation beteiligt sind, auf Fe²⁺ als Kofaktor angewiesen sind. Der Einsatz so genannter Hypoxie-Mimetika, wie Metallionen (Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺) oder Eisenchelatoren wie Desferroxamin (DFX), ermöglicht es, durch die verringerte Verfügbarkeit von Fe²⁺ eine Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 unter Normoxie zu induzieren [42, 43].

Eine weitere posttranslationelle Modifikation, die die Stabilität von HIF-1α negativ beeinflusst, wird durch ARD1 katalysiert. ARD1 ist eine Acetyltransferase, welche eine Acetylierung an einem spezifischen Lysinrest innerhalb der ODD von HIF-1α (K532) vermittelt [25]. Diese Acetylierung von HIF-1α erleichtert die Bindung von pVHL an HIF-1α und fördert somit dessen Abbau. Unter Hypoxie kommt es zu einer Verringerung des mRNA- und Proteingehaltes von ARD1 und folglich zu einer verminderten Acetylierungsrate von HIF-1α [25]. In Verbindung mit der gehemmten PHD-Aktivität kann somit eine maximale Stabilität von HIF-1α unter Sauerstoffmangel erreicht werden.

Innerhalb der ODD von HIF-1α befindet sich eine weitere Aminosäure deren Modifikation die Stabilität von HIF-1α beeinflussen kann. Im Mausmodell wurde die Nitrosylierung von Cystein533 (C533, humanes Homolog C520) innerhalb der ODD nach der Interaktion von Tumorzellen mit Tumor-assoziierten Makrophagen berichtet. Hierdurch wird der Abbau der

α-Untereinheit blockiert und die Aktivierung von HIF-1 ermöglicht [44]. Obwohl die Nitrosylierung bisher nur im Mausmodell festgestellt wurde, könnte dieser Mechanismus auch in humanen Zellen stattfinden, da diese Aminosäure in den HIF-1α-Seqeunzen vieler Vertebraten konserviert vorkommt.

Neben der ,klassischen' Regulation von HIF-1 über die Proteinstabilität sind alternative Mechanismen beschrieben, die Einfluss auf den Proteingehalt von HIF-1 nehmen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es durch Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF, IGF, IL-1 β , TGF- α) oder Onkogene (Src, PTEN) sauerstoffunabhängig zu einer Akkumulation von HIF-1 α kommt [45-47]. In diesem Zusammenhang werden die Aktivierung des PI3K- und des MAPK-Signalwegs genannt, durch die es zu einer verstärkten Translation der HIF-1 α -mRNA kommt und so die Akkumulation des Proteins unter Normoxie ermöglicht wird [48-50]. Weiterhin wurde die Regulation von HIF-1 α auf Ebene der Transkription beschrieben [51, 52]. Unter Hypoxie wurde eine Induktion der HIF-1 α -mRNA ,in vitro' und ,in vivo' festgestellt [51, 53]. Im Gegensatz dazu konnten Uchida *et al.* zeigen, dass durch eine verringerte mRNA-Stabilität, sowie durch die Expression eines endogenen antisense-HIF-1 α Konstuktes, der mRNA-Gehalt von HIF-1 α stark reduziert wird [52].

1.2.3 Transaktivierung von HIF-1

Die Stabilisierung der α-Untereinheit und die resultierende Bildung des Heterodimers aus HIF-1a und HIF-1ß ist Voraussetzung für die transkriptionelle Aktivität von HIF-1. Nach Bildung von HIF-1 bindet dieses an eine entsprechende Konsensusseguenz in der Promoterregion von Zielgenen. Alle Bindungsstellen von HIF-1 beinhalten die Kernseqeunz 5'-RCGTG-3'. Für die Transkription von Zielgenen benötigt HIF-1 jedoch zusätzlich die Bindung von Kofaktoren wie p300/CBP, SRC-1 oder TIF-2 [54-58]. Diese Rekrutierung wird durch weiteres Protein reguliert dessen Aktivität abhängig ein von der Sauerstoffverfügbarkeit ist. Die Asparaginhydroxylase FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) katalysiert die Hydroxylierung eines Asparaginrestes innerhalb der C-TAD von HIF-1α (N803) [27, 59, 60]. FIH-1 gehört, wie die PHDs auch, zu der Familie der 2-oxogluterat abhängigen Dioxygenasen und benötigt neben molekularem Sauerstoff ebenfalls Fe²⁺ und Ascorbat als Kofaktoren. Die Verwendung von Hypoxie-Mimetika induziert deshalb nicht allein die Stabilisierung, sondern auch die Aktivierung von HIF-1 [61].

Die Phosphorylierung von HIF-1α nimmt ebenfalls Einfluss auf die Aktivität von HIF-1, wobei der Proteingehalt oder die DNA-Bindung nicht verändert werden [62-65]. Eine direkte Phosphorylierung von HIF-1α wurde für ERK1/2 und p38 gezeigt, jedoch konnten die genauen Phosphorylierungsstellen dieser Proteinkinasen bisher nicht identifiziert werden [62, 64, 66]. Es ist wahrscheinlich, dass HIF-1α neben ERK1/2 und p38 noch durch weitere Proteinkinasen phosphoryliert wird. Neuere Untersuchungen von Gradin *et al.* beschreiben

die Phosphorylirung von HIF-1α an Threonin796 (T796) unabhängig von ERK und CKII [67]. Einen möglichen Mechanismus dafür, wie die Phosphorylierung die Aktivität reguliert, lieferten Suzuki *et al.* [68]. Sie konnten zeigen, dass HIF-1β bevorzugt die phosphorylierte Form von HIF-1α bindet und so die Bildung des Heterodimers erleichtert wird.

Weitere, bisher nur wenig charakterisierte, Proteinmodifikationen der α -Untereinheit sind die Nitrosylierung und die SUMOylierung. Es ist bekannt, dass HIF-1 α drei konservierte potentielle SUMOylierungsstellen (K391, K477, K532) aufweist. Erste Ergebnisse deuten jedoch auf eine SUMOylierung sowohl von HIF-1 α als auch von HIF-1 β hin, wodurch eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität von HIF-1 eintritt [69, 70]. Die Nitrosylierung eines Cysteinrestes innerhalb der C-TAD (C800) wird ebenfalls mit der Regulation der Transaktivierung in Verbindung gebracht. Eine Nitrosylierung dieses Restes induziert eine gesteigerte Bindung des Kofaktors p300 und steigert so die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 [71].

1.3 Sphingosine-1-Phosphat – Metabolismus und Funktion

Sphingolipide gehören zu den Membranlipiden und vermitteln wichtige Funktionen für die Fluidität und die Struktur von Zellmembranen [72]. Mitte der 90-er Jahre wurden Sphingolipide und deren Metabolite erstmals als Signalmoleküle in unterschiedlichen zellulären Prozessen beschrieben. Heute weiß man, dass sie eine wichtige Funktion in der Regulation der Apoptose, der Zellhomöostase, Migration und Seneszenz der Zellen spielen, aber auch bei inflammatorischen Prozessen von Bedeutung sind [73, 74]. Eine wichtige Rolle wird ihnen in der Tumorbiologie zugesprochen, wo eine zunehmende therapeutische Bedeutung der Sphingolipide in den vergangenen Jahren beschrieben wurde [74-79]. Das Verhältnis von pro-apoptotischem Ceramid zu anti-apoptotischem Sphingosin-1-Phposphat (S1P), das so genannte "Sphingolipid Rheostat", wird als wichtiges Regulationselement für die zelluläre Vitalität beschrieben [80]. Das Grundgerüst aller Sphingolipide ist Ceramid, welches entweder durch Neusynthese oder durch die Spaltung von Sphingomyelin gebildet wird [74] (siehe Abb.2).



Abb.2: Das Gleichgewicht zwischen Ceramid und S1P (,Sphingolipid Rheostat')

Die Synthese von Ceramid kann entweder über de novo Synthese ausgehend von Serin und Palmotyl-CoA, oder der Spaltung von Sphingomyelin erfolgen. Bei der Neusynthese wird die Initialreaktion durch die Serin-Palmotyl-CoA-Transferase (SPT) katalysiert. Die Spaltung von Sphingomyelin erfolgt durch die Sphingomyelinasen (SMasen). Ceramid ist ein wichtiger pro-apoptotischer Faktor, der über die Phopshoprylierung durch die Ceramid-Kinase (CK) in Ceramid-1-Phosphat (C1P) umgewandelt werden kann. Diese Reaktion kann durch die C1P-Phosphatase (C1PP) rückgängig gemacht werden. Die Umwandlung von Ceramid durch die Ceramidase (CDase) zu Sphingosin und durch die Sphingosin-Kinasen 1/2 (SphK1/2) weiter zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) verschiebt das ,Sphingolid Rheostat' hin zu einem anti-apoptotischen Mediator (S1P). Umgekehrt kann durch die Dephosphorylierung von S1P durch die S1P-Phosphatasen 1/2 (SPP 1/2) und weiter durch die Ceramid-Synthase (CS) Ceramid gebildet werden. Die irreversible Spaltung von S1P in Hexadecenal und Phosphoethanolamin wird durch die S1P-Lyase (SPL) katalysiert.

Ceramid selbst ist ein wichtiges Signalmolekül, kann aber auch in weitere Botenmoleküle wie Ceramid-1-Phosphat, Galaktosylceramid, Sphingosylphosphocholin, Sphingosin-1-Phosphat, Psychosin, und Sphingosin umgewandelt werden [74]. Unter den Sphingolipiden ist insbesondere Sphingosin-1-Phosphat (S1P) von großem Interesse und wird daher im Folgenden näher beschrieben.

1.3.1 Die Synthese von Sphingosin-1-Phosphat durch Sphingosin-Kinasen

Die beiden Isoformen der Sphingosin-Kinasen (SphK1 und SphK2) katalysieren die reversible Umwandlung von Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) [81]. Obwohl beide Enzyme das gleiche Produkt hervorbringen (S1P) unterscheiden sie sich in vielerlei Hinsicht wesentlich, so z. B. in ihrer Expression während der Embryonalentwicklung und dem Auftreten in unterschiedlichen Geweben [73, 81, 82]. Neben den unterschiedlichen Expressionsmustern zeigen beide Enzyme auch deutliche funktionelle Unterschiede [83, 84]. Die Aktivität der SphK1 wird in einer Vielzahl von Zellsystem und Kulturbedingungen mit gesteigertem Wachstum, Proliferation und erhöhter Vitalität der Zellen beschrieben [85-87]. Die SphK2 wird im Gegenteil mit pro-apoptotischen Vorgängen in Verbindung gebracht. Es gibt Berichte, dass die SphK2 durch die Hemmung der DNA-Synthese oder durch die Freisetzung von Cytochrom c Apoptose induzieren kann [88, 89]. Der pro-apoptotische Effekt der SphK2 wird durch eine N-terminal gelegene BH3-Domäne vermittelt, wodurch die SphK2 mit Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie interagieren und Apoptose auslösen kann [89].

Die Proteinstruktur beider Sphingosin-Kinase Isoformen weist fünf konservierte Domänen (C1-C5) auf (siehe Abb.3). Die Domänen C1-C3 im N-terminalen Bereich des Enzyms beinhalten die katalytische Domäne und die ATP-Bindungsstelle (C2). Die Bindungsstelle für das Substrat Sphingosin befindet sind in der C4-Domäne [90]. Im Gegensatz zur SphK1 verfügt die SphK2 über einen verlängerten N-Terminus und besitzt weiterhin vier putative Transmembrandomänen (TM) [73], was auf die Lokalisation des Enzyms in Zellmembranen schließen lässt. In der Tat wurde gezeigt, dass die SphK1, welche keine Membrandomänen aufweist, im Zytosol, in Assoziation mit dem Zytoskelett bzw. in perinukleären Regionen, oder im Nukleus lokalisiert ist [91]. Interessanterweise identifizierten Igarashi *et al.* eine putative Kernexportsequenz in der SphK1, wodurch es zu einem permanenten Austausch der SphK1 zwischen dem Zytosol und dem Nukleus kommt [92]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die SphK1 auch in das extrazelluläre Milieu abgegeben werden kann, obwohl bisher keine Exportsequenz für SphK1 beschrieben wurde [93, 94].

Die Regulation der Isoenzyme kann sowohl auf Transkriptionsebene, als auch durch posttranslationelle Modifikationen erfolgen. So konnte nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (PDGF) [95] oder Zytokinen (TGF- β , TNF- α , IL-1 β) [96, 97], aber auch unter Hypoxie [98, 99] ein erhöhter mRNA-Gehalt der SphK1 detektiert werden. Als Faktoren, die zu einer Induktion der SphK-Aktivität führen, sind unter anderem TNF- α [100], IL-1 β [97, 101], PDGF [102], VEGF [103], EGF [104, 105], NGF [106], bFGF [106], LPA [107], TPA [108] und sogar S1P selbst [109] beschrieben.



Abb.3: Proteinstruktur der humanen Sphingosin-Kinasen 1 und 2

Die SphK-Isoenzyme besitzen fünf konservierte Domänen (C1-C5). Diese bilden das katalytische Zentrum (C1-C3) mit der ATP-Bindungsstelle (C2) sowie die Bindungsstelle für das Substrat Sphingosin (C4). Beide Enzyme besitzen eine putative Kernexportsequenz (NES). Im Gegensatz zur SphK1 verfügt die SphK2 über vier Transmembrandomänen (TM) die das Enzym in Zellmembranen verankern. Darüber hinaus befindet sich im verlängerten N-Terminus der SphK2 eine Kernlokalisationssequenz (NLS). Die Phosphorylierungsstellen an SphK1 (S225) sowie an SphK2 (S351, S419, S421, T578) dienen der Regulation der Enzyme.

Der Mechanismus, der zur Aktivierung des Enzyms führt, ist nicht vollständig aufgeklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von SphK1 an Serin225 durch die ERK2 zu einer gesteigerten Enzymaktivität führt [110]. Eine ERK-abhängige Phosphorylierung konnte auch für die SphK2 gezeigt werden (S351, T578) [104]. Zwei weitere Aminosäurereste (S419, S421), innerhalb einer putativen Kernexportsequenz (NES) der SphK2, werden nach Stimulation mit PMA durch die Proteinkinase D (PKD) phosphoryliert [111]. Interessanterweise führt die Agonist-vermittelte Regulation der Enzyme, anders als bei den meisten Kinasen, nur zu einer sehr schwachen Induktion der Enzymaktivität (1,5 - 3-fach) [102, 110]. Die Regulation der Enzymfunktion scheint daher nicht hauptsächlich durch die Änderung der Enzymaktivität zu erfolgen. In ,in vitro'-Experimenten wurde gezeigt, dass die Zugabe von Phosphatidylserin, Phosphatiylinosit und Phosphatidylsäure zu einer Steigerung der SphK-Aktivität führt [112-114]. Da diese Lipide konzentriert an der Innenseite der Plasmamembran vorkommen scheint es nach Aktivierung zu einer Translokation der SphK an die Plasmamembran zu kommen. Diese Vermutung konnte nach Stimulation mit TNF- α , PDGF, LPA oder IGFBP3 sowie nach Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und Ca²⁺-Freisetzung bestätigt werden [91].

1.3.2 Der Abbau von Sphingosin-1-Phosphat

Der Abbau von S1P kann auf zwei unterschiedliche Wege erfolgen, entweder durch die reversible Dephosphorylierung oder durch eine irreversible Spaltung von S1P. Die Dephosphorylierung von S1P wird durch Mitglieder der Lipid Phosphat Phosphohydrolase Famile katalysiert [115-117]. Zwei Mitglieder dieser Familie, SPP1 und SPP2, zeigen zwar starke Homologien zu den übrigen LPPs, besitzen jedoch eine hohe Substratspezifität für

Sphingoidphosphatester wie S1P, DihydroS1P und PhytoS1P [118, 119]. Beide SPPs besitzen neben den konservierten Domänen der LPP Superfamilie [120] jeweils 8-10 Transmembrandomänen, welche die Enzyme in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankern [121, 122]. Die Lokalisation der Enzyme am ER ermöglicht lediglich den Abbau intrazellulären S1Ps, und bewirken eine Zunahme des Ceramidgehaltes, da das Produkt Sphingosin durch die Ceramid-Synthase in Ceramid überführt werden kann [118, 122]. Der extrazelluläre Abbau von S1P wird ebenfalls durch Mitglieder der LPP Superfamilie katalysiert. Die LPPs besitzen sechs Transmembrandomänen und sind sie in der Plasmamembran lokalisiert, wobei das aktive Zentrum zur Außenseite hin gerichtet ist [120]. Diese Ektoaktivität der Enzyme ermöglicht die Spaltung der Substrate im extrazellulären Raum und könnte dazu dienen, S1P-vermittelte Signale zu beenden [123]. Die irreversible Spaltung von S1P sowie von DihydroS1P und PhytoS1P wird durch die S1P-Lyase (SPL) katalysiert [124, 125]. Durch Spaltung der C2-C3 Brücke in S1P entsteht Hexadecenal und Phosphoethanolamin. SPL besitzt 6 Transmembrandomänen und ist in der Membran des ER verankert, wobei das katalytische Zentrum in das Zytosol zeigt [126]. Die Aktivität der SPL wurde mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika

korreliert und die Hemmung der SPL Expression während der Metastasierung verdeutlicht ihre Bedeutung während der Tumorgenese [126].

1.3.3 Sphingosin-1-Phosphat (S1P) als Botenstoff

Das Produkt der durch Sphingosin-Kinasen katalysierten Reaktion ist Sphingosin-1-Phosphat (S1P), welches als Signalmolekül an der Übermittlung von Signalen im Inneren der Zelle aber auch zellübergreifend beteiligt ist. Die intrazelluläre Konzentration von S1P wird durch den stetigen Abbau durch S1P-Phosphatasen (SPPs) und die S1P-Lyase (SPL) minimal gehalten. Extrazellulär liegt es niemals frei sondern assoziiert mit Lipoproteinen in Konzentrationen zwischen $0,1 - 1 \mu M$ vor. Ursprünglich wurde S1P als intrazellulär wirkender Faktor beschrieben, jedoch konnten bis heute keine direkten intrazellulären Rezeptoren oder Effektoren von S1P identifiziert werden. Eine mögliche intrazelluläre Signalwirkung könnte durch das Verschieben des Gleichgewichts zwischen Ceramid und S1P vermittelt werden. Dieses so genannte "Sphingolipid Rheostat' ist ein wichtiges Regulationselement unterschiedlicher zellulärer Prozesse, z. B. der Apoptoseregulation. Ein alternativer Mechanismus wurde von Kariya *et al.* beschrieben. Sie zeigten, dass die Produkte der Spaltung von S1P durch die S1P-Lyase das Wachstum der Zellen förderten [127].

Die Grundlage für Untersuchungen zu der auto- oder parakrinen Wirkung von S1P wurde durch die Identifikation spezifischer S1P-Rezeptoren Oberflächenrezeptoren (S1PR) geschaffen. Obwohl die Freisetzung von S1P und die daraus resultierende parakrine Weiterleitung von Signalen mehrfach beschrieben wurden, ist der zugrunde liegende Mechanismus der Freisetzung von S1P nicht vollständig geklärt. Wie in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, kommt es nach Aktivierung der Sphingosin-Kinasen zu einer Translokation der Enzyme zur Plasmamembran, wodurch S1P in unmittelbarer Nähe zu Membrantransportern synthetisiert wird. In Mastzellen und Blutplättchen, die als Speicher für S1P gelten, wurde gezeigt, dass S1P durch Mitglieder der Familie der ABC-(*ATP binding cassette*)-Transportern in das extrazelluläre Milieu transportiert wird [128, 129]. Möglich ist allerdings auch, dass die Synthese von S1P durch eine sekretierte Form der SphK1 bereits extrazellulär stattfindet [93, 94].

Die meisten der S1P-vermittelten Signale werden über die Freisetzung und anschließende Aktivierung der Rezeptoren vermittelt. Die S1P-Rezeptoren (S1PR) gehören zu der Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Im Menschen sind heute fünf Isoformen der S1PR beschrieben (S1PR1-5), die sich durch die Assoziation mit unterschiedlichen G-Proteinen (G_i, G_{12/13}, G_a) unterscheiden [130]. Nahezu alle Zellen exprimieren eine oder mehrere Isoformen der S1PR, jedoch zeigen sich in der Verteilung auch Gewebsunterschiede. So wird z. B. der S1PR4 vorwiegend im lymphatischen Gewebe und Thrombozyten exprimiert. Der S1PR5 ist weitestgehend auf das Nervensystem beschränkt, wohingegen S1PR1-3 nahezu ubiquitär exprimiert vorkommen [131]. Des Weiteren besitzen S1PR unterschiedlich starke Bindungsaffinitäten für S1P (K_d 2 - 63 nM), worüber eine spezifische Antwort eine Rezeptor-Isoform ermöglicht wird [130]. Über die Induktion spezifischer G-Protein-Kaskaden können durch die Aktivierung der S1PR unterschiedliche Signale wie die Bildung neuer Blutgefäße, Migration, inflammatorische Signale, aber auch Signale zur Differenzierung und Vitalität der Zellen vermittelt werden [132]. Die intrazelluläre Weiterleitung der Signale nach Aktivierung der S1PR erfolgt unter anderem durch PLC, PI3K, AC, ERK1/2, p38-MAPK oder JNK [130, 132, 133] (siehe Abb.4).

Zu den durch S1P-vermittelten Effekten zählen neben der anti-apoptotischen Wirkung auch eine verstärkte Proliferation, Migration und Transformation sowie eine Erhöhung der Vitalität und Hemmung der Apoptose von Zellen [80, 130, 132, 133]. S1P wird neuerdings aufgrund der Aktivierung von NF-κB auch eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen zugesprochen [134, 135]. Neben der Aktivierung von NF-κB führt S1P auch zu einer verstärkten Expression von COX-2 und damit zur Freisetzung von PGE₂ [136] - ein Effekt, der neben dem Entzündungsgeschehen auch an der Progression von Darmkrebs wesentlich beteiligt ist [137]. Eine weitere Funktion von S1P, welche durch die Aktivierung von S1PR in Endothel-und Glattmuskelzellen ausgelöst wird, ist die Induktion der Vaskularisierung und Angiogenese [138].





Die Stimulation mit Wachstumsfaktoren induziert üder die Aktivierung von Proteinkinasen (z. B. ERK, PKA) Phosphorylierung und Translokation der Sphingosin-Kinasen 1/2 (SphK1/2) zur Plasmamembran. Dort erfolgt die Umwandlung von Sphingosin (Sph) zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) welches über Transporter der ABC-(*ATP binding cassette*)-Familie exportiert wird. Die SphK1 kann auch aus der Zelle exportiert werden und extrazellulär S1P synthetisieren. S1P wird intrazellulär durch die S1P-Phosphatasen (SPP1/2) oder durch die S1P-Lyase (SPL) abgebaut. Extrazellulär vermitteln Mitglieder der Lipidphosphat-Phosphatase Superfamile (LPP) die Dephosphorylierung von S1P. In Zielzellen bindet S1P an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren (S1P₁₋₅) welche entweder mit G_q, G_i oder G_{12/13} assoziieren können. Die Signalweiterleitung von S1P-Signalen erfolgt über unterschiedliche Signalkaskaden (PLC, Rac, ERK, p38-MAPK, PI3K, Rho, JNK und AC). Eine besondere Bedeutung kommt S1P in der Tumorbiologie zu, da viele S1P-induzierte Prozesse während der Tumorgenese eine Rolle spielen (z. B. Proliferation, Wachstum, Vitalität, Apoptoseregulation und Migration). Hierauf wird im kommenden Abschnitt näher eingegangen.

1.3.4 S1P in der Tumorbiologie

Wie bereits beschrieben sind Tumoren während der Tumorgenese auf umfassende Veränderungen innerhalb der Zelle und des umgebenden Gewebes angewiesen. Viele dieser Effekte werden unter anderem durch S1P vermittelt, so z. B. die Hemmung der Apoptose oder die Induktion der Angiogenese und der Proliferation. In MCF-7 Brustkrebszellen wurde durch S1P eine verstärkte Proliferation und erhöhte Vitalität festgestellt [85], wobei dieser Effekt durch die Hemmung der SphK1-Expression aufgehoben werden konnte, was zur Induktion der Apoptose führte [139]. Im gleichen Zellsystem vermittelt S1P die Östrogen-induzierte Tumorgenese der Zellen [140]. Die Bedeutung von S1P schon bei der Initiation von Tumoren wird durch Berichte deutlich, die zeigen, dass eine Überexpression der SphK1 und eine daraus resultierende verstärkte Synthese von S1P in 3T3 Fibroblasten eine maligne Transformation induziert und die Bildung von Tumoren initiiert [141-143]. Für eine Vielzahl solider Tumoren konnte eine Überexpression der SphK1 bestätigt werden [144, 145]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass S1P auch an der Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika beteiligt ist [146]. So korrelierte z. B. eine Überexpression der SphK1 in A-375 Melanomzellen mit der Resistenz der Zellen gegenüber Fas- und Ceramid-induzierter Apoptose [87]. Des Weiteren wurde die Beteiligung der SphK1 von S1PR, sowie der S1P-Lyase an der Resistenz von Dictyostelium discoideum, A549- und HEK293-Zellen gegenüber Cisplatin-induzierte Apoptose festgestellt [147, 148]. Eine verstärkte Expression der SphK1 sowie von S1PR1 und S1PR3 in PC3 Prostatakrebszellen führt zu einer verminderten Wirksamkeit von Camptothecin in diesen Zellen [149].

Neben dem Schutz der Zellen kann auch die Migration während der Metastasierung durch S1P induziert werden. In MCF-7 Brustkrebszellen erfolgt die Migration der Zellen durch die Aktivierung von EGF-Rezeptoren. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass dies teilweise auch die Bindung von S1P an S1PR erfordert [150, 151]. Dies wurde durch Untersuchungen an MBA-MD-453 Brustkrebszellen bestätigt, die eine EGF-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung der SphK2 mit der verstärkten Migration der Zellen in Verbindung brachten. Der Einfluss von S1P auf die Invasion von Zellen wurde auch in Glioblastomen festgestellt [152].

Die Interaktion von Tumoren mit den Zellen des Immunsystems ist für die Entwicklung des Tumors ebenfalls von großer Bedeutung. Die Freisetzung von TNF-α durch Makrophagen ist

einer der ersten Schritte nach Interaktion von Immunzellen mit dem Tumor. Xia *et al.* konnten zeigen, dass TNF-α die Aktivierung der SphK und die Freisetzung von S1P induziert und so Zellen vor Apoptose schützt [153]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass S1P einen potenten Inhibitor TRAIL-induzierter Apoptose darstellt [154]. Die Freisetzung von S1P aus apoptotischen Tumorzellen führt außerdem zu einer Polarisierung der assozierten Makrophagen hin zu einem pro-Tumor Phänotyp und schützt diese darüber hinaus vor Apoptose [155, 156].

1.4 Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Prostaglandine

Prostaglandine zählen zu der Gruppe der Eicosanoide und vermitteln autokrine und parakrine Signale. Seit ihrer Entdeckung vor mehr als 70 Jahren nahm das Wissen um die vielfältigen Funktion der Prostaglandine stetig zu, weshalb sie heute zu den bedeutendsten Lipidmediatoren zählen [157]. Das Substrat der Prostaglandin-Synthese ist die Arachidonsäure, welche durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Phospholipiden der Plasmamembran freigesetzt wird. Die Initialreaktion, die Umwandlung von Arachidonsäure zu PGH₂ wird durch die Cyclooxygenasen katalysiert [158, 159]. In einer zweistufigen Reaktion kommt es zunächst durch die Cyclooxygenase-Aktivität von COX-2 zur Bildung des Zwischenproduktes PGG₂, das durch die Peroxidase-Aktivität des Enzyms sofort zu PGH₂ umgewandelt wird. Drei Isoformen der Cyclooxygenase wurden bisher identifiziert (COX-1, COX-2 und COX-3) [157, 160]. Die COX-1 wird in Zellen konstitutiv exprimiert und ist an der Regulation der Nierenfunktionen, der Blutplättchenaggregation sowie an der vaskulären Homöostase beteiligt. Die COX-2 hingegen ist ein induzierbares Protein, welches durch eine Vielzahl unterschiedlicher Reize, z.B. Wachstumsfaktoren, Stressbedingungen, Hormone und Zytokinen neu synthetisiert wird und im Wesentlichen bei Entzündungsprozessen und der Regulation der Immunantwort eine Rolle spielt [161]. Die Regulation und physiologische Funktion von COX-3, einer Splice-Variante von COX-1, ist bisher unklar [160].

Die Expression von COX-2 wird auf zwei Ebenen reguliert. Einerseits können Reize Einfluss auf die Transkriptionsrate des COX-2-Gens nehmen, andererseits wird zunehmend die Bedeutung der mRNA-Stabilität als Regulationselement diskutiert [162, 163]. Die Transkription von COX-2 wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren reguliert. Hierzu zählen unter anderem AP-1 (*activator protein 1*), NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*), NF- κ B-Bindungsstellen (*nuclear factor \kappa B*), ATF (*activating transcription factor*), NF-IL-6 (*nuclear factor of interleukin 6*) und HIF-1 [164-167]. Die 3'UTR (*3' untranslated region*) der COX-2 mRNA enthält mehrere Kopien so genannter AU-reicher Elemente (ARE – *AU rich elements*, Kernsequenz AUUUA), welche die Stabilität der mRNA beeinflussen [168]. Faktoren, die an diese AU-reichen Elemente binden können und so Einfluss auf die Stabilität der mRNA nehmen, sind z.B. HuR, HuD, AUF-1, TTP, TIA-1, TIAR oder AU-A [169]. Bezüglich der Regulation von COX-2 wurde die Beteiligung von TTP [170] und HuR [171, 172] gezeigt [173].



Abb.5: Regulation und Funktion der Cyclooxygenase-2

Die Expression von COX-2 erfolgt nach Stimulation der Zelle mit unterschiedlichen Reizen wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, UV-Strahlung oder auch Hypoxie. Die Stimulation der Transkription von COX-2 erfolgt unter anderem über ERK1/2-, p38- oder JNK-vermittelte Signalwege. Als Transkriptionsfaktoren welche Einfluss auf die COX-2-Expression nehmen können wurden unter anderem AP-1, NFkB, NFAT, ATF, NF-IL-6 oder HIF-1 beschrieben. Darüber hinaus kann die Regulation der COX-2-Expression durch Modulation der mRNA-Stabilität erfolgen. Diese wird unter anderem durch HuR reguliert. Das Substrat von COX-2, die Arachidonsäure, wird durch die PLA₂ aus Membranlipiden bereitgestellt. COX-2 vermittelt die Umwandlung von Arachidonsäure zu PGH₂ welches als Vorstufe für die Synthese von PGI₂, PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂ oder TXA₂ dient.

Nach der Bildung von PGH₂ durch COX-2 wird dieses durch zelltypspezifische Prostaglandin-Synthasen in das entsprechende Prostaglandin (PGI₂, PGF_{2α}, PGD₂ und PGE₂) sowie Thromboxan A₂ (TXA₂) umgewandelt. Prostaglandine können ihre Signale über zwei unterschiedliche Signalwege vermitteln: Einerseits über die Bindung und Aktivierung spezifischer Membranrezeptoren, andererseits über direkte Interaktion mit intrazellulären Rezeptoren. Prostanoid-Rezeptoren gehören zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und vermitteln über die Aktivierung von Botenstoffen (Ca²⁺, cAMP, IP₃) die Weiterleitung der Signale [174]. Es sind acht Prostanoid-Rezeptoren beschrieben: DP (PGD₂-Rezeptor), EP₁₋₄ (PGE₂-Rezeptoren), FP (PGF₂-Rezeptor), IP (PGI₂-Rezeptor) und TP (TXA₂-Rezeptor) [175]. Darüber hinaus vermitteln Prostaglandine wie PGJ₂, 15 δ -PGJ₂ oder PGA₂ ihre Signale unabhängig von Membranrezeptoren. Es wurde gezeigt, dass diese an nukleäre Rezeptoren wie PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) binden und diese aktivieren können [176].

Prostaglandine sind an unterschiedlichen systemischen oder lokal begrenzten Reaktionen des Organismus beteiligt. Hierzu zählen unter anderem die Regulation der Nierenfunktion, der Thrombozytenaggregation, der Freisetzung von Neurotransmittern sowie im Entzündungsgeschehen und der Immunregulation [157, 177]. Das wohl bedeutendste und am besten charakterisierte Prostaglandin ist PGE2 dessen Synthese durch die PGE-Synthase erfolgt [177]. PGE₂ ist an der Regulation unterschiedlicher Funktionen von Immunzellen und der Immunantwort beteiligt. So werden die Proliferation, Differenzierung und die Apoptose und Zytokinproduktion von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Denritischen Zellen durch PGE₂ reguliert [177]. Neben der Regulation der Immunantwort spielt PGE₂ auch bei einer Vielzahl von Krankheiten, unter anderem Krebs, eine Rolle. Eine Überexpression von COX-2 wurde beispielsweise in Brustkrebs, Darmkrebs und Prostatakrebs festgestellt, was zu einer Erhöhung der PGE₂-Konzentrationen in Tumorgewebe führt [177, 178]. Der Einsatz spezifischer Inhibitoren von COX-2 und deren tumorsupprimierende Wirkung unterstreicht die Bedeutung von COX-2 und PGE₂ in der Tumorbiologie. Die Antwort des Immunsystems nach der Erkennung entarteter Zellen wird unter anderem durch PGE₂ beeinflusst. So wird diskutiert, dass PGE₂ die Freisetzung von Zytokinen von Tumorzellen induziert, die eine immunsuppressive Wirkung haben [179, 180]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PGE₂ die Proliferation und Apoptose von Tumorzellen beeinflusst und über die verstärkten Expression von VEGF pro-angiogenetische Effekte vermitteln kann [181-183]. In einem weiter fortgeschrittenen Tumorstadium, der Metastasierung, kann PGE₂ die Migration und Invasion von Tumorzellen unter anderem die Synthese von Matrixmetalloproteasen (MMPs) fördern [184].

1.5 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, zu klären, in wie fern die Inkubation von Zellen unter Hypoxie einen chemoresistenten Phänotyp induziert. Darüber hinaus sollten die zugrunde liegenden Signalwege identifiziert werden. Hierbei sollte auf folgende Fragestellungen genauer eingegangen werden:

- (1) Sind A549 Zellen unter Hypoxie vor der Behandlung mit Chemotherapeutika geschützt? In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, wie es unter Hypoxie zur Entstehung der Chemoresistenz kommt, und welche antiapoptotischen Signalwege involviert sind.
- (2) Ist die Aktivierung von HIF-1 unter Hypoxie f
 ür die Induktion der antiapoptotischen Signale verantwortlich? Kann die Stabilisierung von HIF-1 unter Normoxie ebenfalls eine Chemoresistenz induzieren? Sind neben HIF-1 weitere Faktoren f
 ür den Zellschutz unter Hypoxie notwendig?
- (3) Welche HIF-1-unabhängigen Mechanismen werden unter Hypoxie aktiviert? Tragen diese ebenfalls zur Übermittlung anti-apoptotische Signale bei?
- (4) Ist der Mechanismus der Chemoresistenz auf intrazelluläre Signalewege beschränkt oder sind hierbei lösliche Faktoren beteiligt, die über auto- oder parakrine Signale wirken? Welche Botenstoffe können identifiziert werden, die ein solches Signal vermitteln?
- (5) Kommt es unter Hypoxie zur die Aktivierung von COX-2? Trägt diese über die Freisetzung von Prostaglandinen zum Schutz der Zelle vor Etoposid bei?
- (6) Welche Rolle spielen Sphingolipide unter Hypoxie? Kommt es zur Aktivierung von Sphingosin-Kinasen und welche Funktionen erfüllt S1P in A549 Zellen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper, deren Konzentrationen und Inkubationsbedingungen

Antikörper	Konzentration	Inkubation	Hersteller
HIF-1α	1:1000	ü.N. 4°C 5 % Milch/TTBS	BD Bioscience
COX-2	1:500	ü.N. 4℃ 5 % BSA/TTBS	Upstate Technologies
Aktin	1:2000	ü.N. 4℃ 5 % Milch/TTBS	Sigmaaldrich
SphK1	1:500	ü.N. 4℃ 5 % BSA/TTBS	Abgent
SphK2	1:500	ü.N. 4℃ 5 % BSA/TTBS	Abgent
ERK	1:2000	ü.N. 4℃ 5 % Milch/TTBS	Cellsignal Technology
P~ERK(T202/T204)	1:500	ü.N. 4℃ 5 % BSA/TTBS	Cellsignal Technology
Anti-mouse HRP	1:2000	2h, RT 5% Milch/TTBS	Amersham Bioscience
Anti-rabbit HRP	1:2000	2h RT 5% Milch/TTBS	Amersham Bioscience
Anti-goat HRP	1:2000	2h RT 5% Milch/TTBS	Amersham Bioscience

2.1.2 Primer

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primer

Zielgen	vorwärts Primer (5'→3')	rückwärts Primer (5'→3')	T _A	
SphK1	Hs_SPHK1_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (<i>Qiagen</i>)			
SphK2	Hs_SPHK2_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (Qiagen)			
Actin	TGACGGGGTCACCCA	CTAGAAGCATTTGCG	559	
	CACTGTGCCCATCTA	GTCGACGATGGAGGG	000	

Bei den eingesetzten Primern gegen SphK1 und SphK2 handelt es sich um validierte Primerpaare der Firma Qiagen, deren Sequenzen uns nicht bekannt sind.
2.1.3 siRNA-Sequenzen

Tabelle 3: Auflistung der eingesetzten siRNA

Zielgen	Zielsequenz
HIF-1α-siRNA	5'-AAC UAA CUG GAC ACA GUG UGU-3'
SphK2-siRNA	validierte Hs_SPHK2_2 HP siRNA (Qiagen)
Kontroll-siRNA	validierte Kontroll-siRNA der Firma Dharmacon
	(siCONTROL Non-Targeting siRNAs Duplex 1)

Bei der verwendeten siRNA gegen SphK2, sowie der eingesetzten Kontroll-siRNA handelt es sich um validierte Sequenzen der Firmen Qiagen und Dharmacon, deren Sequenzen uns nicht bekannt sind.

2.1.4 Liste der verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Ziel
LY294002	Phosphatidylinositol-3-Kinase
NS398	Cyclooxygenase-2
PD98059	Extrazellulär-regulierte Kinasen 1/2
SB203580	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38)
U0126	Extrazellulär-regulierte Kinasen 1/2
DMS	Sphingosin-Kinasen

Tabelle 4: Auflistung der eingesetzten Inhibitoren

2.1.5 Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen

Sphingosin-Kinase Lysepuffer

Tris/HCI	20 mM
Glycerol	20% (v/v)
β-Mercaptoethanol	1 mM
EDTA	1 mM
Natriumfluorid	15 mM
β-Glycerophosphat	40 mM
Proteaseinhibitor Mix	1fach
Natriumorthovanadat	1 mM
рН	7,4

Kaliumphosphat-Puffer

KH ₂ PO ₄	1 M
рН	8,5

Sphingosin-Kinase 1 Reaktionspuffer	
HEPES	50 mM
Magnesiumclorid	15 mM
Triton X-100	0,50% (v/v)
Natriumfluorid	10 mM
Semicarbazid	1,5 mM
рН	7,4

Sphingosin-Kinase 2 Reaktionspuffer

HEPES	50 mM
Magnesiumclorid	15 mM
Triton X-100	0,50% (v/v)
Natriumfluorid	10 mM
Semicarbazid	1,5 mM
Kaliumchlorid	1 M
рН	7,4

10fach SDS-Laufpuffer

Tris/HCI	250 mM
Glyzin	1,9 M
SDS	7 mM
pН	7,1

10fach Blotting-Puffer

5	
Tris-HCI	250 mM
Glyzin	1,9 M
рН	8,3

Trypsin-Lösung

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

10fach TBS

Tris-HCI	500 mM
NaCl	1,5 M
рН	7,4

TTBS

.

Tris-HCI	50 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0,05% (v/v)
рH	7,4

4fach SDS-Probenpuffer

Tris-HCI	125 mM
10% SDS	2 % (v/v)
Glyzerin	20% (v/v)
Bromphenolblau	0,002% (w/v)
DTT	5 mM
рН	6,9

Blockierungslösung

Milchpulver	5% (w/v)
Tris-HCI	50 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0,5 % (v/v)
рН	7,4

Lösung A

Tris-HCI	0,1 M
Luminol	0,25 mg/ml
рН	8,6

Lösung B

para-Hydroxycumarinsäure

Caspase-Puffer

Saccharose	10% (w/v)
HEPES	100 mM
CHAPS	0,1 % (w/v)
EDTA	1 mM
рН	7,5

Protein-Lysepuffer

Tris-HCI	50 mM
EDTA	5 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P-40	150 mM
PMSF	0,5 mM
DTT	1 mM
Protease-Inhibitor Mix	1x
рН	8,0

Triton X-100-Lösung

Triton X-100	0,2 % (v/v)
Sammelgel-Puffer	
Tris-HCI	0,5 M
рН	6,8
Trenngel-Puffer	
Tris-HCI	1,5 M
рН	8,8

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 erfolgte bei $37 \,^{\circ}$ C und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei $5\% \,^{\circ}$ CO₂. Das verwendete DMEM/Ham's F12 (1:1) Medium wurde mit 10% FCS (hitzeinaktiviert für 30 min bei $56 \,^{\circ}$ C), 5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin ergänzt. Die Zellen wurden bei einer maximalen Konfluenz von 80% kultiviert, weshalb die Zellen alle drei bis vier Tage in neue Flaschen umgesetzt wurden. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin für 5 min bei $37 \,^{\circ}$ C behandelt, anschließend mit warmem PBS abgespült und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (500 × g für 5 min bei RT) wurde der Überstand verworfen, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und mit einer Verdünnung von 1:5 bis 1:12 in neue Kulturflaschen überführt.

Für die entsprechenden Versuchsansätze wurde die Zellzahl mit Hilfe des CASY® Model TT der Firma *Schärfe System* bestimmt und in den für die jeweiligen Methoden notwendigen Konzentrationen ausgesät. Arbeiten mit den Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen an HERAsafe Arbeitsbänken der Firma *Thermo Fischer Scientific*. Alle Medien und Lösungen wurden bei 37 ℃ im Wasserbad vortemperiert.

2.2.1.1 Inkubationen unter Hypoxie

Die Inkubationen unter Sauerstoffmangelbedingungen erfolgten in der Invivo400 Werkbank der Firma *Ruskinn Technology Ltd.* Die Werkbank ermöglicht das Arbeiten mit Zellen unter konstanten hypoxischen Bedingungen. Für die durchgeführten Experimente wurden die Zellen bei 1 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂ bei feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre inkubiert. Alle verwendeten Medien wurden vor Versuchsbeginn in der Werkbank vorinkubiert, um den Gehalt an gelöstem Sauerstoff zu minimieren.

2.2.1.2 Herstellung von konditioniertem Medium (CM)

Für die Herstellung des konditionierten Mediums (CM) wurden A549 Zellen mit einer Konfluenz von 70-80% in Zellkulturflaschen (175 cm²) mit 30 ml Medium ausgesät und für 24 *Extraktion von Lipiden aus Medium*

Die Extraktion von Lipiden aus Zellüberständen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Bligh und Dyer [185]. Hierzu wurde 1 ml Medium mit 1,25 ml eines Gemisches aus Chloroform/Methanol/HCI (v/v/v 2/4/0,1) versetzt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurden weitere 1,55 ml Chloroform hinzu gegeben und wiederum kräftig geschüttelt. Letztendlich wurden 1 ml ddH₂O zugegeben und 30 sec gevortext. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch für 5 min bei 1000 × g und RT zentrifugiert. Die untere Chloroformphase wurde vorsichtig abgenommen, zur Beseitigung von Wasserrückständen mit NaSO₄ ausgeschüttelt und anschließend filtriert. Das Extrakt wurde nun mittels des SpeedVac Concentrator SVC100H der Firma Savant eingeengt und zur Verwendung in Ethanol (100 % p.A.) gelöst.

2.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Für die Messung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde das Standard DC Protein Assay Kit der Firma *Bio-Rad*, basierend auf der Methode nach Lowry [186], verwendet. Zunächst wurde aus BSA-Standard (*Pierce*) eine Standardreihe mit den Konzentrationen 0 μ g/ μ l, 0,25 μ g/ μ l, 0,50 μ g/ μ l, 1 μ g/ μ l und 2 μ g/ μ l erstellt. Entsprechend der jeweiligen Methode wurden Zelllysate gewonnen, von denen jeweils 5 μ l mit 20 μ l ddH₂O verdünnt wurden. Von der Standardreihe sowie den verdünnten Lysaten wurden 5 μ l in Duplikaten für die Proteinbestimmung in einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Die Färbung der Proteine erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm am Apollo-8 LB 912 Photometer der Firma *Berthold Technologies*.

2.2.3 Analyse der Proteinexpression mittels Western-Blot

2.2.3.1 Extraktion von Zellproteinen

Die Lyse der Zellen erfolgte mittels Ultraschall. Hierzu wurden die Zellen am Ultraschall-Generator Branson Sonifier 250 für 10 sec bei 20 % Ausgangsleistung auf Eis aufgebrochen. Bei der folgenden Zentrifugation von 15 min bei 13000×g und 4℃ wurden alle Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand (Proteinfraktion) wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und der Proteingehalt, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, bestimmt.

2.2.3.2 Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Methode der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ermöglicht es, Proteine der Größe nach aufzutrennen. Die Gele bestehen aus einem 4 %igen Sammelgel, und einem 10 %igen Trenngel (Zusammensetzung siehe unten). Tabelle 5: Zusammensetzung der SDS-Gele

Δ	%ines	Samme	امما
4	/olyes	Samme	yei

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

10% iges Trenngel

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

Für die Vorbereitung der Proben wurden 140 µg der Zelllysate (siehe Abschnitt 2.2.2) mit 4× Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95 ℃ denaturiert und zentrifugiert (2 min, 12 000×g, RT). Für die Auftrennung der Proteine wurden die Taschen des Sammelgels mit den Proben beladen. Zur späteren Größenbestimmung der Banden wurde zusätzlich ein Größenmarker (PageRuler[™] Prestained Protein Ladder) der Firma *MBI Fermentas* eingesetzt.

Nach dem Aufbau der Apparatur wurde die Laufkammer mit 1×SDS-Laufpuffer gefüllt und die Auftrennung gestartet. Hierzu wurde eine Stromstärke von 40 mA angelegt, und die Auftrennung beendet, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat.

2.2.3.3 Blotten der Proteine

Das Blotten dient dazu, die Proteine aus dem Gel auf eine entsprechende Membran zu transferieren, auf der sie kovalent gebunden werden. Hierzu wurde das Gel nach Ende der Auftrennung für 5 min in 1×Blotting-Puffer gewaschen. Gleichzeitig wurden die Blotting-Membran (Hybond C extra Nitrozellulose Membran, *Amersham Biosciences*) und das Whatman-Papier in 1×Blotting-Puffer eingeweicht. Zum Blotten wurde das Sammelgel entfernt und in der Blotting-Kammer (Trans-Blot SD, *Bio-Rad*) auf die Membran zwischen das Whatman-Papier positioniert. Das Blotten erfolgte bei 75 mA pro Gel für 90 min. Nach Beendigung des Blottens wurde die Membran mit PBS gewaschen.

2.2.3.4 Detektion der Proteine auf der Membran

Vor der Detektion der Proteine über ein immunochemisches Verfahren musste die Membran, zur Minimierung unspezifischer Signale, für 30 min mit einer Blockierungslösung inkubiert werden. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers. Eine Übersicht der Konzentrationen und Inkubationsbedingungen der verwendeten Antikörper befindet sich in Tabelle 1. Nach erfolgter Inkubation des Primärantikörpers wurde die Membran dreimal jeweils für 5 min mit PBS gewaschen. Die Wahl des zu verwendeten Sekundärantikörpers richtete sich nach der Quelle des Primärantikörpers (siehe Tabelle 1). In allen Fällen wurde jedoch ein Antikörper verwendet, der zur späteren Detektion des Signals mit der Meerrettichperoxidase verknüpft war. Die Inkubation der Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde bei RT bei einer Verdünnung von 1:2000 in Blockierungslösung. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Membran für 5 min in TTBS-Puffer, und zweimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Zur Detektion des Signals wurden 3 ml Lösung A mit 30 µl Lösung B und 1 µl 30 % H₂O₂ vermischt und 1 min bei RT inkubiert. Die Meerrettichperoxidase katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion, wodurch die Bereiche der Membran Licht emittieren, an denen der Antikörper gebunden ist. Das emittierte Licht kann mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurden.

2.2.4 Bestimmung des mRNA-Gehalts von Zellen

2.2.4.1 Isolation der mRNA

Für die Bestimmung des mRNA-Gehalts, wurden ein Tag vor Versuchsbeginn 1×10⁶ Zellen/ml in 10 cm Schalen ausplattiert. Unmittelbar vor Versuchsstart wurde das verbrauchte Medium entfernt, 4 ml frisches Medium zugegeben und die entsprechenden Versuchsbedingungen gewählt. Nach Beendigung der Inkubationen wurden die Zellen von den Platten abgeschabt und zusammen mit dem Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Anschließend wurde die Platte mit 4 ml eiskaltem PBS gespült und das PBS ebenfalls in das Reaktionsgefäß transferiert. Die Zellen wurden nun bei 500×g für 5 min bei 4℃ pelletiert, der Überstand verworfen und das Pel let mit 4 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (500×g, 5 min, 4℃) wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei -80℃ eingefroren.

Zur Extraktion der mRNA wurde das Pellet in 1 ml peqGold RNAPure[™] resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Gemisch 15 sec kräftig geschüttelt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch für 5 min bei 12 000×g und 4℃ zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der gelösten mRNA wurden 500 µl Isopropanol zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Die präzipitierte RNA wurde durch Zentrifugation

(12 000×g, 10 min, 4 °C) gefällt, der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit jeweils 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Die pelletierte mRNA wurde getrocknet und bei 55 °C in DEPC-ddH₂O gelöst.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer der Firma *NanoDrop Technologies* bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Eine OD₂₆₀ (optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm) von 1,0 entspricht einer RNA-Menge von 40 µg/ml. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

2.2.4.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der isolierten mRNA in cDNA wurde mittels des iScript[™]cDNA Synthesis Kit der Firma *Bio-Rad* durchgeführt. Hierzu wurde 1 µg der mRNA mit DEPCddH₂O auf ein Volumen von 15 µl verdünnt. Zu jedem Ansatz wurden 4 µl 5× Reaktionspuffer und 1 µl iScript Enzym Mix zugegeben und entsprechend dem Standardprotokoll des Herstellers im Thermocycler (*Eppendorff*) inkubiert. Die cDNA-Proben wurden mit DEPCddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und bis zur Verwendung bei -20 ℃ gelagert

2.2.4.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Quantifizierung der mRNA eines Gens erfolgte durch die Methode der qPCR. Hierfür wurden der i-Cycler[™] von *Bio-Rad* und als Reaktionslösung das ABsolute[™] QPCR SYBR[®] Green der Firma *Abgene* verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt. Der Reaktionsansatz für die qPCR setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 6: Reaktionsansatz der qPCR-Reaktion

Reaktionsansatz

cDNA-Probe	4 µl
vorwärts Primer [10 pmol/ml]	0,4 µl
rückwärts Primer [10 pmol/ml]	0,4 µl
ABsolute™ QPCR SYBR [®] Green	10 µl
ddH ₂ O	5,2 µl

Reaktionsansatz - QuantiTect Primer Assay

cDNA-Probe	4 µl
Primer	2 µl
ABsolute [™] QPCR SYBR [®] Green	10 µl
ddH ₂ O	4 µl

Für die Amplifikationsreaktion wurde nach den Angaben des Herstellers folgendes Protokoll erstellt:

1	Aktivierung der Polymerase	2 min	50 ℃
2	Denaturierung	15 min	95 <i>°</i> C
3	Denaturierung	15 sec	95 <i>°</i> C
(45x)	Primer-Anlagerung an die DNA	30 sec	55 ℃
()	Elongation	30 sec	72℃
4	finale Denaturierung	2 min	95 <i>°</i> C
5	Anlagerung homolger DNA-Stränge	30 sec	55 ℃
6	Schmelzkurve	20 sec	+0.5℃
(80x)			

Tabelle 7: Amplifikationsprotokoll der qPCR-Reaktion

Am Ende jedes Amplifikationsschritts (Schritt 3) wurde die Fluoreszenz detektiert. Da SYBR-Green in doppelsträngige DNA-Moleküle interkaliert, ist die Fluoreszenz ein Maß für die Anzahl der gebildeten PCR-Produkte. Nach der finalen Denaturierung (Schritt 4) wurde die Temperatur der Proben auf 55 °C abgekühlt und schließlich schrittweise 0,5 °C alle 20 sec angehoben, wobei wiederum nach jeder Erhöhung die Fluoreszenz gemessen wurde. So konnten die Schmelzpunkte der entstandenen Produkte ermittelt werden. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der von Bio-Rad bereitgestellten Software MyiQ durchgeführt.

2.2.5 Messungen der Vitalität von Zellen

2.2.5.1 Bestimmung der Caspase3-Aktivität

Die Aktivierung der Caspase3 ist ein charakteristisches Merkmal des apoptotischen Prozesses. Eine einfache Methode, um Apoptose in Zellen nachzuweisen, ist daher die Bestimmung der Enzymaktivität der Caspase3. Hierzu wurden ein Tag vor Versuchsstart 3×10⁵ Zellen/ml in 3 cm Schalen ausplattiert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden 2 ml frisches Medium zugegeben und die entsprechenden Versuchsbedingungen gewählt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen abgeschabt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Anschließend wurde die Platte mit 2 ml eiskaltem PBS gespült und dieses ebenfalls in dem Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellen wurden für 5 min bei 500×g und 4 ℃ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das P ellet in Caspase-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Lyse der Zellen erfolgte mittels Ultraschall. Hierzu wurden die Zellen am Ultraschall-Generator Branson Sonifier 250 für 10 sec bei 20% Ausgangsleistung auf Eis aufgebrochen. Bei der folgenden Zentrifugation von 15 min bei 13000×g und 4 °C wurden alle Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand (Proteinfraktion) wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, und der Proteingehalt wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben bestimmt.

Für die Messung der Caspase3-Aktivität würden 50 µg Protein mit Caspase-Puffer auf ein Endvolumen von 140 µl aufgefüllt, und unmittelbar vor Messbeginn 10 µl einer 2 mM Substratlösung (Ac-DEVD-Amc in DMSO) zugegeben. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte über ein Zeitintervall von 60 min bei 30 °C, wobei alle 2 min die Fluoreszenz (Extinktion 360 nm; Emission 460 nm) detektiert wurde.

2.2.5.2 Detektion des mitochondriellen Membranpotentials ($\Delta \Psi M$)

Zur Bestimmung des mitochondriellen Membranpotenzials ($\Delta\Psi$ M) wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiOC₆(3) verwendet. In geringen Konzentrationen eingesetzt ist DiOC₆(3) aufgrund seiner positiven Ladung in der Lage, selektiv intakte Mitochondrien anzufärben.

Für die Experimente wurden einen Tag vor Versuchsbeginn 1×10^5 Zellen/ml in 3 cm ausgesät. Unmittelbar vor Start des Versuches erfolgte ein Mediumwechsel und es erfolgte die Zugabe der Reagenzien. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen durch die Behandlung mit Trypsin von der Platte abgelöst, zentrifugiert (5 min, 500×g, RT) und in 1 ml warmem PBS resuspendiert. Zu jeder Probe wurde anschließend 40 nM DiOC₆(3) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Messung der Fluoreszenz von mindestens 10 000 Zellen (Extinktion 488 nm/Emission 530 nm) erfolgte am FACSCanto[™] Durchflusszytometer der Firma *BD Bioscience* (Software: BD FACSDiva).

2.2.5.3 Färbung der Zellkerne mit DAPI

Neben der Aktivierung von Caspasen ist der strukturelle Abbau der genomischen DNA, wodurch es zur Kondensation des Chromatins kommt, ein weiteres charakteristisches Merkmal der Apoptose. Da DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Extinktion 358 nm/Emission 461 nm) spezifisch die DNA anfärbt, können Kerne apoptotischer Zellen mit kondensiertem Chromatin einfach von den Kernen vitaler Zellen unterschieden werden.

Für die Färbung mit DAPI wurden 1×10⁴ Zellen/well in *Chamber Slide™* Objektträgern der Firma *Nunc* ausgesät. Nach Beendigung der jeweiligen Inkubationen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 4%-iger para-Formaldehyd-Lösung für 25 min fixiert. Nach dem Waschen der Zellen für 5 min in PBS, wurden die Zellen durch eine Triton-X 100-Lösung permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen für 5 min in PBS wurden die Zellen mit einer DAPI-Lösung (6×10⁻⁷ M) für 10 min bei RT gefärbt. Die Visualisierung der Zellkerne

erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma *Zeiss* und der AxioVision Software (*Carl Zeiss MicroImaging GmbH*).

2.2.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA

Die transiente Transfektion von Zellen mit siRNA dient dazu, spezifisch die Expression einzelner Proteine zu hemmen. Hierzu wird ein kurzes, zur mRNA des Zielproteins homologes RNA-Fragment in die Zelle eingebracht, wo es an das komplementäre mRNA-Molekül bindet. Dieses teilweise doppelsträngige mRNA-Molekül wird von zelleigenen Proteinen erkannt und abgebaut. Die mRNA steht der Zelle somit nicht mehr zur Verfügung. Die Expression des codierten Proteins ist nicht mehr möglich. Für die transiente Transfektion von A549 Zellen wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt, die in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

2.2.6.1 Transfektion mit siRNA durch DharmaFECT1

Die Transfektion mit Dharma*FECT1*[®] wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Drei Tage vor Versuchsbeginn wurden 5×10⁵ Zellen/ml in 10 cm Schalen ausgesät. Für die Transfektion wurden 780 µl einer 2 µM siRNA-Lösung in dem mitgelieferten Transfektionspuffer angesetzt und mit dem äquivalenten Volumen an additivfreiem Medium verdünnt. In einem zweiten Ansatz wurde 31,2 µl Dharma*FECT1*[®] mit 1,52 ml additiv-freiem Medium verdünnt. Beide Ansätze wurden für 5 min bei RT inkubiert, anschließend vereinigt und für weitere 25 min bei RT gelagert. Zwei Stunden nach der Aussaat wurde der vorbereitete Transfektionsansatz zu den Zellen pipettiert und mit Vollmedium auf ein Gesamtvolumen von 15 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden nun für 48 h mit dem Transfektionsansatz inkubiert, anschließend das Medium gewechselt und der Versuch gestartet.

2.2.6.2 Nukleofektion mit siRNA

Eine alternative Transfektionsmethode um siRNA in Zellen einzubringen ist die Nukleofektion. Hierzu wurde das Gerät und das benötigte Kit (*Nucleofector Kit T*) der Firma *Amaxa Biosystems* verwendet. Die Nukleofektion erfolgte gemäß dem empfohlenen Protokoll. Zunächst wurden 1×10⁶ Zellen in 100 µl der Lösung T aufgenommen und mit 5 µg siRNA vermischt. Für die Nukleofektion wurde das Programm X-001 verwendet. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Nukleofektion mit frischem Medium in eine 10 cm Schale überführt. 24 h nach der Nukleofektion wurde das Medium gewechselt und der Versuch gestartet.

2.2.7 Messungen der Sphingosin-Kinase Aktivität

Die Messungen der Enzymaktivät der Sphingosin-Kinasen 1 und 2 erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Billich und Ettermeyer [187]. Hierzu wurden Zellen für den Versuch, wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, ausplattiert und geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl eiskaltem Lyse-Puffer resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall (Branson Sonifier 250) (5 sec, 20 % Ausgangsleistung) aufgebrochen. Um das Zytoplasma von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen, wurde die Suspension für 30 min bei 1600×g und 4 ℃ zentrifugiert.

Für die separate Detektion der Enzymaktivität beider Isoformen, wurde dem SphK2-Reaktionspuffer 1 M KCI hinzugefügt, was zur Hemmung der SphK1 führte [113]. So war es möglich, die Aktivitäten beider Isoformen in nur einer Probe zu bestimmen. Zunächst wurde, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, der Proteingehalt bestimmt. Für die Messung der Enzymaktivität wurden 10 µl des gewonnenen Zytoplasmas in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl des entsprechenden Reaktionspuffers versetzt. Hierzu wurden 10 µM des fluoreszenzmarkierten Substrats (NBD-Sphingosine), sowie 1 mM ATP pipettiert und für zwei Stunden bei 37 ℃ inkubiert.

Zur Extraktion des gebildeten NBD-Sphingosin-1-Phosphats wurden dem Reaktionsansatz 100 µl K₂HPO₄ und 500 µl Chloroform/Methanol (v/v 2/1) hinzugefügt und umgehend kräftig geschüttelt. Die folgende Trennung der Phasen durch Zentrifugation (10 min, 12000×g, RT) separierte das Substrat NBD-Spshingosin (Lipidphase) von dem Produkt NBD-Sphingosin-1-Phosphat (wässrige Phase). Die Quantifizierung des gebildeten NBD-Sphingosin-1-Phosphats (Extinktion 485 nm, Emission 538 nm) wurde am Mithras LB940 der Firma *Berthold Technologies* durchgeführt.

Für die Auswertung der Messergebnisse wurden die gemessenen Fluoreszenzen auf den Proteingehalt normiert und so die relative Enzymaktivität pro µg Protein ermittelt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde durch Berechnungen mit Hilfe des 1-Weg-ANOVA Test ermittelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der ,ehrlichen signifikanten Differenz' nach Tukey. Die Werte gelten als signifikant unterschiedlich mit p≤0,05. Bei Western-Blot Analysen sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3 ERGEBNISSE

Das Auftreten von Chemoresistenz in Tumoren ist ein oft beobachtetes Phänomen und stellt häufig ein Problem bei deren Behandlung dar. Es ist bekannt, dass im Inneren von Tumoren die Sauerstoffversorgung oftmals nicht ausreicht und so eine hypoxische Region, der so genannte ,hypoxische Kern' (*hypoxic core*), entsteht. In ,in vitro' Experimenten mit Tumorzellen konnte eine Korrelation zwischen dem Grad an Hypoxie und der erhöhten Vitalität von Zellen hergestellt werden, jedoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen bisher nicht vollständig geklärt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Ausbildung eines chemoresistenten Phänotyps in Zellen nach der Inkubation unter Hypoxie untersucht werden. Hierbei sollten insbesondere die zugrunde liegenden Mechanismen aufgeklärt werden, um mögliche Ziele für therapeutische Ansätze zu identifizieren.

3.1 Die Expression von HIF-1 in A549 Zellen

Die zellulären Reaktionen auf Sauerstoffmangel hängen vom Zelltyp und dem entstammenden Gewebe ab und fallen daher unterschiedlich stark aus. Daher musste zu Beginn der Arbeit zunächst geeignete Inkubationsbedingungen zur Untersuchung Hypoxieinduzierter Effekte etabliert werden. Ein charakteristisches Merkmal für die Aktivierung Hypoxie-induzierter Effekte ist die Expression und Akkumulation von HIF-1α. Aus diesem Grund wurden A549 Zellen für unterschiedliche Inkubationszeiten bei 1% Sauerstoff inkubiert, und die Expression von HIF-1α mittels Western-Blot untersucht.



Abb.6: Zeitlicher Verlauf der HIF-1α-Expression in A549 Zellen unter Hypoxie

A549 Zellen wurden unter Normoxie (21% O₂) für 48h, bzw. für 4-48h unter Hypoxie (1% O₂) inkubiert. Die Expression von HIF-1α und Aktin wurde mittels Western-Blot nach der in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Methode detektiert. Die Expression von Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Aufgrund des stetigen Abbaus durch die PHDs war unter Normoxie ($21 \% O_2$) in den A549 Zellen kein HIF-1 α Protein detektierbar. Die Inkubation von der Zellen unter Hypoxie ($1 \% O_2$) führte zu einer Akkumulation von HIF-1 α nach nur 4h Inkubationsdauer, wobei das Signal bis 8 h Hypoxie konstant blieb (Abb.6). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass unter lang anhaltendem Sauerstoffmangel (<16 h) der Proteingehalt von HIF-1α wieder reduziert wurde. Der Grund hierfür liegt in Rückkoplungsmechanismen die gewährleisten, dass die Hypoxievermittelte Zellantwort nicht beliebig lange andauert.

Die Stabilisierung von HIF-1 α ist Vorraussetzung für die Bildung des aktiven HIF-1 Heterodimers. Eine HIF-1 vermittelte Zellantwort kann somit breits nach 4 h Hypoxie induziert werden.

3.2 Der Hypoxie-vermittelte Schutz vor Apoptose

In einem nächsten Experiment musste überprüft werden, ob A549 Zellen unter Hypoxie über einen Mechanismus zum Schutz vor Chemotherapeutika-induzierter Apoptose verfügen. Für die Messung der Apoptoserate wurde die Bestimmung der Caspase3-Aktivität durchgeführt. Die Aktivierung der Caspase3, einer Effektorcaspase, ist esseniell für die Ausführung der Apoptose und ein charakteristisches Merkmal für den apoptotischen Zelltod. Als Induktoren der Apoptose wurden Etoposid und Staurosporin verwendet. Durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Apoptose-Induktoren sollten substanzspezifische Effekte ausgeschlossen werden.





Messungen der Caspase3-Aktivität in A549 Zellen nach der Inkubation für jeweils 24 h unter Normoxie (21 % O₂) oder Hypoxie (1 % O₂). Die Stimulation mit (A) 150 μ M Etoposid oder (B) 0,5 μ g/ml Staurosporin (Sts) erfolgte nach 24 h Vorinkubation für weitere vier Stunden unter serumfreien Bedingungen. Die Bestimmung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die gemessenen Aktivitäten sind als Vielfaches der unbehandelte Kontrolle dargestellt (x der Kontrolle). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (*) markierten Messwerte sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

A549 Zellen wurden zunächst unter Normoxie (21 % O₂) oder Hypoxie (1 % O₂) für 24 h vorinkubiert, bevor durch die Zugabe von 150 µM Etoposid oder 0,5 µg/ml Staurosporin und der Inkubation für weitere vier Stunden in serumfreien Medium, Apoptose ausgelöst wurde. Anhand der Messung der Caspase3-Aktivität wurde anschließend die Sensitivität der Zellen gegenüber Etoposid detektiert.

In A549 Zellen wurde unter unstimulierten Bedingungen keine basale Caspase3-Aktivität festgestellt. Die Stimulation der Zellen mit 150 μ M Etoposid unter Normoxie (21 % O₂) induzierte einen starken Anstieg der Caspase3-Aktivität (~32fach), der durch die Vorinkubation der Zellen für 24 h unter Hypoxie (1% O₂) auf das 7fache reduziert werden konnte (siehe Abb.7 A). Ein äquivalentes Ergebnis wurde durch die Induktion der Apoptose durch 0,5 μ g/ml Staurosporin, einem Inhibitor der Familie der ATP-abhängigen Proteinkinasen, erzielt. Hier kam es unter Normoxie (21% O₂) zu einer Induktion der Caspase3-Aktivität um das 47fache, welche durch die 24stündige Vorinkubation unter Hypoxie (1% O₂) auf das 13fache reduziert wurde (Abb.7 B). Die Beobachtung, dass Hypoxie vor Apoptose, induziert durch Etoposid und Staurosporin,gleichermaßen schützt, zeigt, dass es sich um einen generellen Effekt unter Hypoxie und nicht um substanzspezifische Mechansimen handelt. Aus Kostengründen wurde daher für die kommenden Versuche auf den Einsatz von Staurosporin verzichtet.

Anhand der dargestellten Ergebnisse konnte eine Hypoxie-vermittelte Chemoresistenz in A549 Zellen festgestellt werden. Zur Validierung der Ergebnisse wurde das Experiment wiederholt und die Bestimmung der Apoptose mit Hilfe einer weiteren Methode, der Färbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass während des programmierten Zelltods charakteristische Veränderungen in der Zellmorphologie und auch der DNA auftreten. Hierzu zählt die Kondensation des Chromatins, die durch Färbung der Zellenkerne mit DAPI sichtbar gemacht werden kann.



Abb.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von A549 Zellen nach DAPI-Färbung

A549 Zellen wurden für 24 h unter Normoxie (21 % O₂) oder Hypoxie (1 % O₂) inkubiert und anschließend, soweit angegeben, mit 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei) stimuliert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die DAPI-Färbung, wie in Abschnitt 2.2.5.3 beschrieben, durchgeführt und das Ergebnis der Färbung mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. Die mit Pfeilen markierten Bereiche zeigen Zellkerne mit kondensiertem Chromatin. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Färbung der Zellkerne mit DAPI hat das Ergebnis der Messungen der Caspase3-Aktivität (Abb.7) bestätigt. Nach Inkubation der Zellen unter Normoxie ($21 \% O_2$) und anschließender Behandlung mit 150 µM Etoposid (4h, serumfrei) waren deutlich Zellkerne mit kondensiertem Chromatin erkennbar (siehe Pfeile in Abb.8). In der unstimulierten Kontrolle unter Normoxie und Hypoxie ($1 \% O_2$) waren keinerlei apoptotische Kerne zu sehen. Eine Vorinkubation für 24h unter Hypoxie ($1 \% O_2$) und anschließender Stimulation mit 150 µM Etoposid (4h, serumfrei) hatte ebenfalls die Bildung so genannter apoptotischer Kerne zur Folge. Diese waren im Vergleich zur Etoposid-Behandlung unter Normoxie jedoch in stark reduzierter Anzahl vorhanden.

Die Bestimmung der Apoptoserate mittels der Messung der Caspase3-Aktivität und der Färbung der Zellkerne mit DAPI, zeigte eine deutliche Reduktion des apoptotischen Potenzials von Etoposid nach Vorinkubation unter Hypoxie. Der Hypoxie-vermittelte Schutz basiert somit nicht allein auf der Hemmung der Caspase3. Die Messungen der Caspase3-Aktivität sind aufgrund der besseren Quantifizierbarkeit und der einfacheren Durchführung gegenüber der Färbung mit DAPI von Vorteil. Aus diesem Grund wurde für die kommenden Versuche die Bestimmung der Apoptoserate von Zellen durch die Messung der Caspase3-Aktivität als Testsytem herangezogen.

3.2.1 Zeitabhängige Entwicklung der Chemoresistenz unter Hypoxie

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die zugrunde liegenden Mechanismen der Hypoxieinduzierten Chemoresistenz aufzuklären. Zur Charakterisierung beteiligter Faktoren war es zunächst notwendig zu überprüfen, wie sich die Dauer der Vorinkubation unter Hypoxie auf die Resistenz gegenüber Etoposid auswirkt. Hierzu wurden die Zellen für 4 - 48 h unter Hypoxie vorinkubiert, bevor 150 µM Etoposid für weitere 4 h in serumfreien Medium inkubiert wurde.



Abb.9: Resistenz gegenüber Apoptose nach Vorinkubation unter Hypoxie

A549 Zellen wurden für Inkubationszeiten von 4 – 48 hunter Hypoxie (1% O2) vorinkubiert und anschließend 150 μ M Etoposid (4 h, serumfrei) zugegeben. Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte nach der in Abschnitt 2.2.5.1 beschriebenen Methode. Die dargestellten Werte entsprechend der Caspase3-Aktivität in % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid) zum jeweiligen Zeitpunkt. Alle Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (#) markierten Messwerte sind signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Positivkontrolle (p≥0,05).

Wie in Abb.9 dargestellt, reicht eine Vorinkubation von <8 h unter Hypoxie (1 % O_2) nicht aus um eine signifikante Reduktion der Caspase3-Aktivität nach Etoposid-Behandlung zu erreichen. Interessant ist, dass kurzzeitige Hypoxie (1 % O_2) (<4 h) sogar zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber Etoposid führt. Erst nach einer Vorinkubation der Zellen für mindestens 16 h unter Hypoxie (1 % O_2) konnte eine signifikante Hemmung der Apoptoserate festgestellt werden, welche durch längere Vorinkubation unter Hypoxie weiter verstärkt wurde.

Wie gezeigt werden konnte, kommt es nach nur eine Inkubation für 4h unter Hypoxie zu einer Akkumulation von HIF-1 α , jedoch ist eine Inkubationszeit von mindestens 16h unter Hypoxie (1% O₂) notwendig, um einen Schutz vor Etoposid-induzierter Apoptose

auszulösen. Für die kommenden Versuche wurde eine 24stündige Vorinkubation angesetzt, da die Chemoresistenz der Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits stark ausgeprägt war.

3.3 Die Rolle von HIF-1 bei der Chemoresistenz unter Hypoxie

Da HIF-1 ein wichtiger Transkriptionsfaktor für zelluläre Reaktionen auf Hypoxie ist, und die Induktion zellulärer Schutzmechanismen durch HIF-1 bereits festgestellt wurde, wurde zunächst die Bedeutung von HIF-1 für das Auftreten der Chemoresistenz unter Hypoxie untersucht. Die Funktion von HIF-1 besteht unter anderem darin, durch die Expression von Genen den Zellen das Überleben unter Sauerstoffmangel zu ermöglichen. Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, führt HIF-1 unter anderem zu einer verstärkten Expression von Enzymen des Glukosemetabolismus, der Angiogenese und der Erythropoese. Neben diesen Faktoren, die eine verbesserte Versorgung der Gewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff und die sauerstoffunabhängige Energiegewinnung ermöglichen, werden auch Gene von HIF-1 induziert, die Zellen vor Apoptose schützen. Hierzu zählen unter anderem Faktoren, die eine Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Agenzien vermitteln (z. B. P-gp, MRP1), sowie Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie. Sofern HIF-1 an der Entstehung der Chemoresistenz beteiligt ist, würde ein Fehlen von HIF-1a zur Sensibilisierung der Zellen gegen Etoposid unter Hypoxie führen. Durch den Einsatz HIF-1α-spezifischer siRNA (small interfering RNA) konnte die Expression des Proteins unterdrückt werden. Der Einsatz von siRNA ermöglicht es, den mRNA-Gehalt eines Gens spezifisch zu verringern, was mit einer Hemmung der Expression des Proteins und damit verbundener Effekte korreliert.

Zunächst musste die Wirksamkeit und Spezifität der verwendeten siRNA gestestet werden. Hierzu wurden Zellen mit Kontroll-siRNA oder spezifischer HIF-1α-siRNA transient transfiziert und die Expression von HIF-1α unter Hypoxie detektiert. Der Einsatz der KontrollsiRNA dient dazu eventuelle, durch die Transfektion oder der eingebrachten siRNA hervorgerufenen, unspezifischen Effekte auszuschließen.



Abb.10: Hemmung der HIF-1a Expression durch spezifische siRNA

Inkubation von A549 Zellen für 4 h unter Hypoxie $(1 \% O_2)$ als Kontrolle nach der Transfektion mit 100 nM HIF-1 α -spezifischer siRNA bzw. der Transfektion mit 100 nM Kontroll-siRNA. Zur Transfektion wurde die in Abschnitt

52

2.2.6.1 beschriebene transiente Transfektion mit DharmaFECT1 durchgeführt. Die Detektion der Proteinexpression erfolgte nach der in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Methode. Die Expression von Aktin diente als Beladekontrolle. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Transfektion der A549 Zellen mit spezifischer HIF-1 α -siRNA führte zu einer vollständigen Hemmung der HIF-1 α Proteinexpression unter Hypoxie (1 % O₂) (Abb.10). Die Inkubation von untransfizierten Zellen führte nach 4h Hypoxie (1 % O₂) zu einer Akkumulation von HIF-1 α . Dies war auch in Zellen der Fall, die zuvor mit 100 nM der Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Ein unspezifischer Effekt der Transfektion konnte somit ausgeschlossen werden. Die Proteinexpression von Aktin wurde nicht beeinflusst, was ebenfalls auf einen spezifischen Effekt der HIF-1 α -siRNA spricht. Toxische Effekte durch die Transfektion oder der transfizierten siRNA waren keine zu beobachten.

Um anschließend die Bedeutung von HIF-1 α auf die Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapeutika unter Hypoxie zu untersuchen, wurden A549 Zellen wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben mit Kontroll-siRNA bzw. spezifischer HIF-1 α -siRNA transfiziert, für 24 h unter Hypoxie (1% O₂) inkubiert und die Caspase3-Aktivität nach der Behandlung mit 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei) gemessen.



Abb.11: Die Rolle von HIF-1 α während des Hypoxie-vermittelten Schutzes vor Apoptose

A549 Zellen wurden 48h vor Inkubationsstart nach der in Abschnitt 2.2.6.1 beschriebenen Methode mit 100 nM Kontroll-siRNA oder 100 nM spezifischer HIF-1α-siRNA transfiziert. Anschließend wurde die Caspase3-Aktivität von untransfizierten oder transfizierten A549 Zellen nach der Inkubation unter Normoxie (21 % O₂) oder Hypoxie (1 % O₂) und anschließender Behandlung mit 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei) gemessen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Änderung der Caspase3-Aktivität als % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (#) markierten

Messwerte sind signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle. Alle mit (#) oder (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

Die Vorinkubation der A549 Zellen für 24 h unter Hypoxie $(1 \% O_2)$ führte zu einer Reduktion der Etoposid-induzierten Caspase3-Aktivität um ~80 %. Die Transfektion mit Kontroll-siRNA führte zu keiner Änderung des Apoptoseschutzes, wohingegen der Verlust von HIF-1 α durch die Transfektion der Zellen mit spezifischer HIF-1 α -siRNA zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber der Behandlung mit 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei) führte (siehe Abb.11).

Um die Beteiligung von HIF-1 zu verifizieren, wurden die Zellen zunächst mit Desferroxamin (DFX) behandelt, welche unter Normoxie zu einer Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 führt. DFX, ein so genanntes Hypoxie-Mimetikum, bewirkt unabhängig von den herrschenden Sauerstoffkonzentrationen eine Stabilisierung von HIF-1 α . DFX bindet Fe²⁺, ein essenzieller Kofaktor der Asparagin- und Prolinhydroxylasen (siehe Abschnitt 1.2), und induziert so HIF-1-vermittelte Effekte unter Normoxie. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse von DFX und Hypoxie, wurde wiederum eine Inkubationszeit von 24 h gewählt.



Abb.12: Der Einfluss von DFX auf Etoposid-induzierte Caspase3-Aktivität

A549 Zellen wurden für 24 h entweder unter Normoxie (21 % O₂) oder unter Normoxie mit 50 μ M Desferroxamin (DFX) inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen vor der Inkubation mit 50 μ M DFX unter Normoxie, wie in Abschnitt 2.2.6.1, mit 100 nM HIF-1 α -spezifischer siRNA transfiziert. Bei allen Proben erfolgte die Induktion der Apoptose mit 150 μ M Etoposid für 4 h unter serumfreien Bedingungen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Reduktion der Caspase3-Aktivität in % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (#) markierten Messwerte sind signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle. Alle mit (#) oder (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

Die Stimulation mit 50 µM DFX für 24 h unter Normoxie führte zu einer Reduktion des Etoposid-induzierten Zelltodes um etwa 50% (Abb.12). Da DFX als Chelator für Fe²⁺-Ionen alle Enzyme beeinflusst, die Fe²⁺ als Kofaktor nutzen, wurde zusätzlich die Spezifität des Effektes für HIF-1 untersucht. Hierzu wurden Zellen 48 h vor Versuchsbeginn mit 100 nM HIF-1α-spezifischer siRNA transfiziert, und anschließend für 24h unter Normoxie (21%O₂) mit 50 µM DFX behandelt. Nach Stimulation mit 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei) zeigte sich, dass nach Hemmung der HIF-1α-Expression kein Apoptoseschutz durch DFX mehr vorlag. Anhand der bisher gewonnenen Erkenntnisse konnte eine Beteiligung von HIF-1 an der Hypoxie-induzierten Resistenz gegenüber Etoposid festgestellt werden. Die Hemmung der HIF-1a Expression durch spezifische siRNA führte unter Hypoxie zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber der Behandlung mit Etoposid. Auch die Induktion von HIF-1 durch DFX unter Normoxie vermittelte einen Schutz der Zellen vor Apoptose. Dieser Effekt konnte ebenfalls durch den Einsatz von HIF-1α-siRNA rückgängig gemacht werden. Interessanterweise konnte die Chemoresistenz unter Hypoxie durch die Hemmung von HIF-1 nicht vollständig aufgehoben werden. Ebenso war der Schutz vor Etoposid durch die Behandlung mit DFX unter Normoxie weniger stark ausgeprägt wie dies durch Hypoxie der Fall war. Aus den dargestellten Ergebnissen lässt sich schließen, dass Hypoxie neben der Aktivierung von HIF-1 weitere Mechanismen induziert, welche zu einem Schutz der Zellen vor induziertem Zelltod vermittelt.

3.3.1 Auto- oder parakrine Resistenzmechanismen unter Hypoxie

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kann es unter Hypoxie zur Freisetzung löslicher Faktoren kommen, die über auto- oder parakrine Effekte vor Apoptose schützen können (z. B. EPO, VEGF, IL-6, IL-8, TGF-α). Die Sekretion solcher Signalmoleküle ist ein Mechanismus, der Reaktionen auf einen Reiz nicht nur auf einzelne Zellen beschränkt, sondern auch an das umliegende Gewebe weitergibt.

Für die Identifizierung dieser Faktoren wurde daher überprüft, ob Zellen unter Hypoxie Faktoren in das Medium abgeben, welche die Chemoresistenz vermitteln. Hierzu wurden A549 Zellen für 24 h entweder unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert und deren Zellüberstand, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, gesammelt und aufbereitet. Anschließend wurden frisch ausgesäte Zellen mit diesen konditionierten Medien (Nox-CM oder CM) für 24 h unter Normoxie inkubiert, und durch Zugabe von 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei) Apoptose induziert (siehe Abb.11).



Abb.13: Schutz vor Apoptose induziert durch konditioniertes Medium (CM)

Messungen der Caspase3-Aktivität nach Vorinkubation unter Normoxie (21% O₂), Hypoxie 1% O₂) oder mit unterschiedlich konditionierten Medien unter Normoxie (Nox-CM, CM). Nach Vorinkubation der Zellen für 24 h unter den jeweiligen Bedingungen, erfolgte die Zugabe von 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei). Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Reduktion der Caspase3-Aktivität als % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

Das in Abb.13 dargestellte Ergebnis zeigt, dass eine Vorinkubation für 24 h unter Hypoxie (1% O₂) zu einer starken Hemmung der Apoptoserate nach Etoposid-Behandlung führt. Die Inkubation der Zellen in konditioniertem Medium, welches von Zellen gewonnen wurde, die für 24 h unter Normoxie kultiviert wurden (Nox-CM), zeigte keinerlei protektive Wirkung gegenüber der Behandlung mit 150 µM Etoposid (4h, serumfrei). Im Gegensatz hierzu führte die Vorinkubation mit Medium, welches von Zellen unter Hypoxie konditioniert wurde (CM), zu einer Hemmung der Etoposid-induzierten Caspase3-Aktivität um ~60% im Vergleich zur Kontrolle (Nox-CM + Etoposid) (siehe Abb.13). Dies spricht für die Aktivierung von Schutzmechanismen, die über extrazelluläre Signale ihre Funktion erfüllen. In Verbindung mit der Beobachtung, dass frühestens nach 16 h Inkubationszeit unter Hypoxie eine Reduzierung der Etoposid-induzierten Apoptose auftritt, ist die Neusynthese und Sekretion eines Schutzfaktors nahe liegend.

3.3.2 Identifizierung des sekretierten Schutzfaktors

Wie bereits gezeigt werden konnte, führt die Inkubation unter Hypoxie zur Freisetzung eines Schutzfaktors. Die Synthese und Sekretion von Botenstoffen unter Hypoxie ist bereits beschrieben und die Beteiligung von HIF-1 ebenfalls gezeigt. Im Zusammenhang mit der Induktion einer Chemoresistenz ist dies jedoch noch nicht vollständig geklärt. Zunächst wurde daher untersucht, inwieweit die Aktivierung von HIF-1 unter Hypoxie für die konditionierung des Mediums notwendig ist.

3.3.2.1 Die Beteiligung von HIF-1 bei der Konditionierung des Mediums

Wie bereits in Abschnitt 3.3 gezeigt, ist HIF-1 an der Resistenz von A549 Zellen gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose beteiligt. Die Expression von Genen durch HIF-1 könnte somit zur Synthese und Sekretion von Faktoren führen, welche auto- oder parakrin den Schutz vor Apoptose vermitteln. Zum Testen dieser Vermutung wurde konditioniertes Medium von Zellen unter Hypoxie hergestellt die zuvor entweder mit unspezifischer Kontroll-siRNA (CM(siKontrolle)), oder mit spezifischer HIF-1α-siRNA transfiziert wurden (CM(HIF-1α-siRNA)).



Abb.14: Die Wirkung von CM nach Konditionierung in Zellen mit unterdrückter HIF-1α Expression Messungen der Caspase3-Aktivität nach Inkubation von A549 Zellen für 24 h unter Normoxie (21 % O₂) mit frischem Medium, CM oder CM das aus Zellen mit unterdrückter HIF-1α Expression gewonnen wurde (CM(HIF-1α-siRNA)). Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Änderung der Caspase3-Aktivität als % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (#) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid).

Wie in Abb.14 dargestellt, ist HIF-1 nicht an der Synthese des sekretierten Schutzfaktors beteiligt. Unter Normoxie (21 % O₂) zeigte konditioniertes Medium, welches unter Hypoxie von HIF-1α-defizienten Zellen konditioniert wurde (CM(HIF-1α-siRNA)), ein unverändertes Schutzpotenzial im Vergleich zu konditioniertem Medium von untransfizierten Zellen (CM). Eine HIF-1-abhängige Synthese und Sekretion des Schutzfaktors kann somit ausgeschlossen werden.

3.4 Charakterisierung der Stoffklasse des Schutzfaktors

Für die nähere Eingrenzung möglicher Schutzfaktoren sollte zunächst die Stoffklasse des freigesetzten Faktors bestimmt werden. Hierzu wurde CM unterschiedlichen Behandlungen unterzogen und anschließend untersucht, inwieweit sich das Potenzial von CM, vor Apoptose zu schützen, reduziert wurde. Zunächst wurden Proteine durch die Zugabe von Proteasen und anschließender Denaturierung entfernt. In einem weiteren Ansatz wurden, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, Lipide aus dem konditionierten Medium (CM) extrahiert. Zur Kontrolle wurde neben der Extraktion aus CM auch ein Extrakt aus Medium hergestellt, das unter Normoxie konditioniert wurde (Nox-CM). Mit den so hergestellten Lipid-Extrakten wurden Zellen für 24 h unter Normoxie inkubiert, und deren Resistenz gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose bestimmt.



Abb.15: Charakterisierung der Stoffklasse des Schutzfaktors im CM

A549 Zellen wurden für 24 h unter Normoxie (21 % O₂) inkubiert. Die Inkubation erfolgte entweder unbehandelt mit CM, behandeltem CM oder Lipid-Extrakten für 24 h unter Noxmoxie (21 % O₂). Es wurde unbehandeltes CM oder CM nach Verdau mit 50 μ M Proteinase K und anschließender Denaturierung (1 h, 100 °C) (CM(ProtK; 100 °C)) eingesetzt. Weiterhin wurde ein Lipid-Extrakt n ach der in Abschnitt 2.2.1.3 beschriebenen Methode hergestellt. Die Zellen wurden hierzu zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH), oder den Extrakten aus Normoxie-konditioniertem Medium (Lip-Nox-CM) oder Extrakten aus CM (Lip-CM) behandelt. Das eingesetzte Volumen des Lipid-Extraktes wurde so gewählt, dass es die Lipide aus 2 ml Medium enthielt. Diese Volumen an Medium wurde auch bei den Inkubationen unter Normoxie oder Hypoxie eingesetzt. Die Induktion der Apoptose erfolgte für 4 h in serumfreien Medium durch die Zugabe von 150 μ M Etoposid. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Reduktion der Caspase3-Aktivität als % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich. Es zeigte sich, dass der Schutz vor Apoptose auch nach Denaturierung aller Proteine aus dem konditionierten Medium unverändert blieb (siehe Abb.15, CM(ProtK, 100°C)). Die hergestellten Lipid-Extrakte wurden in Ethanol (EtOH) resuspendiert, weshalb zunächst ein Effekt des Lösungsmittels EtOH ausgeschlossen werden musste. Die Zugabe von 1 % (v/v) Ethanol bei einer Inkubation von 24 h unter Normoxie führte weder zur Sensibilisierung der Zellen, noch wurde ein Schutz der Zellen vor Apoptose induziert. Die Inkubation der Zellen mit Lipid-Extrakt aus Nox-CM (Lip-Nox-CM) führte zu keiner signifikanten Änderung der Caspase3-Aktivität nach Stimulation mit 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei). Im Gegensatz hierzu zeigte sich nach der Zugabe von Extrakten aus CM (Lip-CM) eine deutliche Hemmung der Apoptoserate nach Etoposid-Behandlung (~60 % reduziert) (siehe Abb.15).

Anhand des hier dargestellten Ergebnisses steht fest, dass der durch CM-induzierte Schutz vor Apoptose durch ein Lipid vermittelt wird. Daher wurde ein Screening bekannter Lipidmediatoren durchgeführt.

3.4.1 Screening möglicher Lipidmediatoren

Die Auswahl der zu testenden Substanzen erfolgte danach, ob für diese eine antiapoptotische Wirkung beschrieben ist, oder ob diese unter Hypoxie verstärkt exprimiert werden. Hierzu zählen unter anderem PAF (*platelet activating factor*), LPA (Lysophosphatidylsäure), C1P (Ceramid-1-Phosphat), S1P (Sphingosin-1-Phosphat) und PGE₂ (Prostaglandin E₂). Diese wurden auf ihrer Fähigkeit getestet A549 Zellen vor Etoposid-induzierter Apoptose zu schützen.



Abb.16: Wirkung unterschiedlicher Lipide auf Etoposid-induzierte Apoptose

A549 Zellen wurden für 24 h unter Normoxie (21 % O_2) inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit oder ohne Zugabe von entweder 10 μ M LPA, 1 μ M PAF, 1 μ M C1P, 10 μ M S1P oder 500 nM PGE₂. Nach 24 h Vorinkubation

erfolgte die Zugabe von 150 µM Etoposid (4h, serumfrei). Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Caspase3-Aktivität in % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (#) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich gegenüber der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid).

Die Inkubation der Lipide erfolgte für 24 h unter Normoxie (21 % O₂) mit anschließender Induktion der Apoptose durch 150 μ M Etoposid für 4 h in serumfreien Medium. Es stellte sich heraus, dass Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) A549 Zellen vor Apoptose schützen. Die Zugabe von 10 μ M S1P reduzierte die Caspase3-Aktivität nach Etoposid-Behandlung um 40% im Vergleich zur Positivkontrolle. PGE₂ induzierte einen Schutz vor Etoposid von ~65 % bezogen auf die Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Die Inkubation mit 10 μ M LPA, 1 μ M PAF bzw. 1 μ M C1P führte zu keiner Reduktion der Caspase3-Aktivität (siehe Abb.16).

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzantrationen von PGE₂ oder S1P stimuliert, bevor die Caspase3-Aktivität nach Etoposid-Behandlung bestimmt wurde.



Abb.17: Die protektive Wirkung von Prostaglandin E2 (PGE2) in A549 Zellen

A549 Zellen wurden für 24 h unter Normoxie unstimuliert bzw. mit steigenden Konzentration an PGE₂ (10-500 nM) inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Apoptose durch die Stimulation mit 150 μ M Etoposid (4 h, serumfrei). Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Caspase3-Aktivität in % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant.

Die Inkubation von A549 Zellen für Konzentrationen von PGE₂ (10 - 500 nM) führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Caspase3-Aktivität nach der Behandlung mit

150 μM Etoposid (4 h, serumfrei) (siehe Abb.17). Neben PGE₂ wurde auch durch S1P ein Schutz vor Apoptose induziert. Anhand einer Konzentrationsreihe sollte auch dessen Spezifität bestätigt werden.

Ähnlich wie dies für die Stimulation mit PGE_2 gezeigt werden konnte, kommt es nach Vorinkubation der Zellen mit 1, 10 und 30 μ M S1P zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Apoptoserate, ausgelöst durch die Behandlung mit 150 μ M Etoposid (4 h, serumfrei) (siehe Abb.18).



Abb.18: S1P reduziert konzentrationsabhängig die Caspase3-Aktivität nach Etoposid-Behandlung Inkubation von A549 Zellen für 24 h unter Normoxie (21 % O₂) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Sphingosin-1-phosphat (S1P). S1P wurde in Konzentrationen von 1, 10 oder 30 μ M für 24 h unter Normoxie inkubiert, bevor die Inkubation mit 150 μ M Etoposid (4 h, serumfrei) erfolgte. Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Caspase3-Aktivität als % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass PGE₂ und S1P in A549 Zellen spezifisch antiapoptotische Signale vermitteln. In weiteren Experimenten sollten anschließend die Synthesewege beider Faktoren unter Hypoxie untersucht werden.

3.5 Die Bedeutung von PGE₂ für die Chemoresistenz unter Hypoxie

3.5.1 Expression von COX-2 unter Hypoxie

COX-2 katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂, welches in einer Folgereaktion durch die PGE-Synthase in PGE₂ umgewandelt wird. Es ist bereits bekannt, dass es durch die Inkubation von Zellen unter Hypoxie zu einer Induktion von COX- 2 kommen kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass COX-2 über die Aktivierung von HIF-1 reguliert werden kann, und dass COX-2 über die Bildung und Sekretion von Prostaglandin E_2 (PGE₂) zum Zellschutz beitragen kann. Ich untersuchte daher, ob es unter Hypoxie in A549 Zellen ebenfalls zu einer Akkumulation von COX-2 kommt.



Abb.19: Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) unter Hypoxie

Western-Blot (siehe Abschnitt 2.2.3) von A549 Zellen nach der Inkubation für 48 h unter Normoxie (21 % O₂) bzw. für 4-48 h unter Hypoxie (1 % O₂). Die Expression von COX-2 und Aktin wurde nach der in Abschnitt 2.2.3.4 beschriebenen Methode detektiert. Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Die Inkubation der Zellen für 4-48 h unter Hypoxie (1 % O₂) führte zu einer Akkumulation der COX-2 beginnend nach einer Inkubationszeit von 8 h, wobei eine weitere Zunahme des Proteingehalts bis 32 h erfolgte (siehe Abb.19). Die verstärkte Expression von COX-2 unter Hypoxie ist möglicherweise ein erster Hinweis auf die Beteiligung von COX-2 an der Weiterleitung des auto-/parakrinen Schutzsignals.

3.5.2 Die Rolle von COX-2 bei der Weiterleitung des Schutzsignals

Es stellte sich die Frage, inwieweit die Akkumulation von COX-2 zur Etablierung der Chemoresistenz unter Hypoxie beiträgt. Um diese Frage zu beantworten, wurde der spezifische COX-2-Inhibitor NS398 während der Inkubation unter Hypoxie koinkubiert. Sofern die Aktivierung von COX-2 für die erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber Etoposid unter Hypoxie notwendig ist, würde man durch den Einsatz von NS398 eine verminderte Chemoresistenz beobachten können.

Wie in Abb.20 dargestellt, reduziert die Hemmung von COX-2 durch 100 μ M NS398 unter Hypoxie (24 h, 1 % O₂) den Schutz vor Etoposid um etwa 35 %. Wie dies bereits für HIF-1 festgestellt werden konnte, konnte auch die Hemmung von COX-2 den Hypoxie-induzierten Schutz nicht vollständig aufheben. Dies spricht für ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren.



Abb.20: Die Rolle von COX-2 bei der Hypoxie-induzierten Chemoresistenz und der Sekretion des Schutzfaktors Messungen der Caspase3-Aktivität in A549 Zellen nach Inkubation unter Normoxie ($21 \% O_2$) oder Hypoxie ($1\% O_2$). Die Zellen wurden jeweils 24 h wie angegeben mit oder ohne 100 µM NS398 inkubiert. Die Inkubation mit konditioniertem Medium (CM) oder Medium welches von Zellen mit gehemmter COX-2 Aktivität konditioniert wurde (CM(NS398)) erfolgte ebenfalls für 24 h unter Normoxie. Anschließend erfolgte die Induktion der Apoptose durch die Stimulation mit 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei). Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Caspase3-Aktivität in % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (#) markierten Werte sind signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle mit (#) und (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

PGE₂, welches nach Aktivierung der COX-2 gebildet wird, konnte bereits als Mediator antiapoptotischer Mechanismen in A549 Zellen bestätigt werden. Es sollte daher untersucht werden, ob COX-2 an der Freisetzung des Schutzfaktors beteiligt ist. Hierzu stellte ich konditioniertes Medium von Zellen her, die unter Hypoxie, bei gleichzeitiger Hemmung von COX-2 durch NS398, inkubiert wurden (CM(NS398)). Wie in Abb.20 dargestellt, konnte durch die Inkubation mit CM(NS398) für 24 h unter Normoxie (21 % O₂) kein Schutz von Etoposid-induzierter Apoptose induziert werden (Abb.20). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Freisetzung von PGE₂ nach Aktivierung von COX-2 an der übertragbaren Chemoresistenz in A549 Zellen beteiligt ist.

Es stellte sich heraus, dass sowohl HIF-1, als auch COX-2 Schutz der Zellen vor Etoposid unter Hypoxie beteiligt waren. Da bekannt ist, dass HIF-1 die Expression von COX-2 induzieren kann, stellte sich die Frage, der COX-2 vermittelte Schutz vor Apoptose ebenfalls durch HIF-1 vermittelt wird.



Abb. 21: HIF-1 und COX-2 vermitteln unabhängig voneinander der Schutz vor Apoptose unter Hypoxie Messungen der Caspase3-Aktivität in A549 Zellen nach Inkubation unter Normoxie (21% O₂) oder Hypoxie (1% O₂). Die Transfektion der Zellen mit 100 nM HIF-1 α -spezifischer siRNA erfolgte 48 h vor Versuchsbeginn. Die Zellen wurden jeweils 24 h wie angegeben mit oder ohne 100 μ M NS398 inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Apoptose durch die Stimulation mit 150 μ M Etoposid (4 h, serumfrei). Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Caspase3-Aktivität in % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Alle mit (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

Wie bereits dargestellt wurde, führte die Transfektion mit spezifischer HIF-1 α siRNA zur Reduktion des Apoptoseschutzes um etwa 25% nach Inkubation unter Hypoxie (1 % O₂). Ein ähnlicher Effekt konnte nach Hemmung von COX-2 durch 100 µM NS398 beobachtet werden. Die Kombination beider Stimulationen zeigte einen additiven Effekt und führte zu einer Reduktion des Apoptoseschutzes um etwa 50% (siehe Abb. 21). Dies deutet darauf hin, dass beide Faktoren unabhänbgig voneinander zum Schutz der Zellen beitrugen. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis, dass weitere Faktoren am Schutz der Zellen vor Etoposid-induzierter Apoptse unter Hypoxie beteiligt sind.

Es konnte festgestellt werden, dass es unter Hypoxie zu einer Akkumulation von COX-2 kommt, und dass COX-2 zum Schutz der Zellen unter Hypoxie, unabhängig von HIF-1, beiträgt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass COX-2 die Freisetzung eines Schutzfaktor vermittelt, der auto- oder parakrin die Zellen vor Etoposid-induzierter Apoptose schützt. Darüber hinaus führte die Stimulation mit PGE₂ konzentrationsabhängig zur Reduktion des pro-apoptotischen Potenzials von Etoposid. Das Lipid-Screening (siehe Abb.16) ergab, dass neben PGE₂ auch S1P ein anti-apoptotisches Signal für Zellen darstellt. Im Folgenden sollte daher die Synthese von S1P unter Hypoxie, sowie dessen Bedeutung auf die Vitalität von A549 Zellen, untersucht werden.

3.6 Die Funktion von S1P während der Enstehung der Chemoresistenz

3.6.1 Expression und Aktivität der Sphingosin-Kinasen

Sphingosin-Kinasen katalysieren die Reaktion von Sphingosin zu Sphingosin-1-phosphat (siehe Abschnitt 1.3.1). Ihre Expression und Aktivierung unter Hypoxie ist somit Grundvoraussetzung für die Synthese und Freisetzung von S1P. Aus diesem Grund untersuchte ich den mRNA- und Proteingehalt, sowie die Aktivität beider Enzyme unter Hypoxie.

Zunächst wurde der mRNA-Gehalt beider Sphingosin-Kinase Isoformen unter Normoxie und Hypoxie detektiert. A549 Zellen wurden hierzu für 24 h unter Normoxie, oder für 4-24 h unter Hypoxie inkubiert und anschließend mittels quantitativer PCR (qPCR) der mRNA-Gehalt bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.4).



Abb.22: Bestimmung des mRNA-Gehaltes von SphK1 und SphK2 unter Hypoxie

A549 Zellen wurden unter Normoxie (21 % O₂), oder für 4 - 24 h unter Hypoxie (1 % O₂) inkubiert und der mRNA-Gehalt von SphK1 (weiß) SphK2 (schwarz) ermittelt. Die Bestimmung des mRNA-Gehalts erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Die dargestellten Werte entsprechen der mRNA-Expression relativ zur Expression von Aktin in % der Kontrolle (24 h Normoxie). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥3 Experimenten \pm S.E.M.

Es konnte bei den Untersuchungen eine basale Transkription beider Gene unter Normoxie festgestellt werden. Wie in Abb.22 dargestellt, blieb der mRNA-Gehalt sowohl von SphK1, als auch von SphK2 bis zu einer Inkubationszeit von 24 h Hypoxie unverändert. Ein regulatorischer Effekt von Transkriptionsfaktoren, und somit auch von HIF-1, sowie von Faktoren, die die Stabilität der mRNA beeinflussen, konnte somit ausgeschlossen werden. Nach Ausschluss einer Regulation auf der Ebene der Transkription, wurde die Proteinexpression von SphK1 und SphK2 unter Hypoxie überprüft. Hierzu wurden kurze Inkubationszeiten unter Hypoxie gewählt, da Mechanismen, welche die Stabilität oder die Translationsrate eines Proteins von bereits vorhandener mRNA regulieren, sehr schnell wirken können. Die Zellen wurden hierzu für 4h unter Normoxie, oder für 2h und 4h unter Hypoxie inkubiert.



Abb.23: Protein-Expression von HIF-1 α , SphK1, SphK2 und Aktin unter Hypoxie

Western-Blot von A549 Zellen nach der Inkubation unter Normoxie ($21 \% O_2$) bzw. 2–4h Hypoxie ($1 \% O_2$). Die Expression von HIF-1 α , SphK1, SphK2 und Aktin wurde nach der in Abschnitt 2.2.3.4 beschriebenen Methode detektiert. Aktin diente als Kontrolle der Beladung. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Zur Kontrolle der hypoxischen Bedingungen wurde zunächst die Expression von HIF-1α untersucht. Die Inkubation von A549 Zellen führte bereits nach 2h Hypoxie zu einer Akkumulation von HIF-1α, dessen Proteingehalt auch nach 4h unverändert blieb. Weiterhin kam es nach bereits nach 2h Hypoxie zu einem schwachen Anstieg der SphK2 Expression. Der Gehalt an SphK1 blieb hingegen unverändert (siehe Abb.23).

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Hypoxie einen chemoresistenten Phänotyp induziert. Bisher konnte gezeigt werden, dass der Schutz teilweise über einen intrazellulären HIF-1-abhängigen Weg, und über die COX-2-abhängige Freisetzung eines löslichen Faktors, vermittelt wird. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass S1P ebenfalls anti-apoptotische Signale vermittelt. Die Synthese von S1P erfolgt durch die Sphingosin-Kinasen welche in A549 Zellen beide basal exprimiert werden. Nach 2-4h Inkubation unter Hypoxie konnte darüber hinaus eine schwache Induktion des SphK2-Proteingehalts festgestellt werden. Da beide Isoformen auch eine basale Expression zeigen und S1P für die Vitalität der Zellen von Bedeutung ist, stellte sich zunächst die Frage, inwieweit die Sphingosin-Kinasen die Vitalität von Zellen auch unter unstimulierten Bedingungen beeinflussen.

3.6.2 Der Einfluss der SphK-Aktivität auf die Vitalität der Zellen

Es ist bekannt, dass S1P an Vorgängen beteiligt ist, die das Überleben der Zellen beeinflussen. Daher sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob A549 Zellen auf die basale Aktivität der Sphingosin-Kinasen und somit auf das Vorhandensein von S1P unter unstimulierten Bedingungen angewiesen sind. Um dies zu überprüfen, wurde Dimethylsphingosin (DMS), ein Inhibitor beider SphK-Isoformen, eingesetzt. Dimethylsphingosin ist ein Strukturanalogon des Sphingosin, dem endogenen Substrat der Kinasen. DMS bindet kompetitiv zu Sphingosin im aktiven Zentrum des Enzyms, wird allerdings nicht metabolisiert und verhindert so die Synthese von S1P. Als Nachweis für die Spezifität von DMS und für die Bedeutung von S1P für die Zellvitalität wurde in einem weiteren Ansatz eine Koinkubation von DMS und S1P durchgeführt.



Abb.24: Hemmung der SphK-Aktivität durch DMS und die Auswirkungen auf die Zellvitalität A549 Zellen wurden für 24 h unter Normoxie (21 % O₂) unstimuliert, oder mit 10 µM Dimethylsphingosin (DMS) inkubiert. Als weitere Ansätze wurden, sofern angegeben, während der DMS Behandlung 10 µM S1P oder Lipid-Extrakt (Lip-CM) co-inkubiert bzw. die DMS-Behandlung in CM durchgeführt. Das eingesetzte Volumen des Lipid-Extraktes wurde so gewählt, dass es die Lipide aus 2 ml Medium enthielt. Dieses Volumen an Medium wurde auch bei den Inkubationen unter Normoxie oder Hypoxie eingesetzt. Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Induktion der Caspase3-Aktivität als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle (Normoxie). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten \pm S.E.M. Alle mit (#) gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zur DMS-Behandlung (Normoxie + 10 µM DMS). Die mit (*) oder (#) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

Die Inkubation der Zellen für 24 h unter Normoxie mit 10 µM DMS führte zu einem etwa zehnfachen Anstieg der Caspase3-Aktivität (siehe Abb.23). Dieser pro-apoptotische Effekt

konnte durch die Koinkubation von 10 µM DMS und 10 µM S1P nahezu vollständig aufgehoben werden. In weiteren Ansätzen konnte gezeigt werden, dass neben S1P sowohl die Zugabe von Lipid-Extrakte aus CM (Lip-CM), als auch die Inkubation mit CM unter Normoxie ebenfalls zu einer Reduktion des pro-apoptotischen Potenzials von DMS führten. Mit diesem Ergebnis konnte die Bedeutung von S1P für das Überleben der Zellen unter Normoxie verdeutlicht werden. Nun sollte die Frage geklärt werden, ob die erhöhte Expression der SphK2 unter Hypoxie möglicherweise zum Schutz der Zellen vor physiologischems Stress dient. Hierzu wurde zunächst die Enzymaktivität der Sphingosin-Kinasen gemessen.

3.6.3 Enzymaktivität der SphK unter Hypoxie

Für die Messungen der Sphingosin-Kinase Aktivität wurden Inkubationszeiten von 2 oder 4 h unter Hypoxie gewählt. Unter diesen Bedingungen lag bereits eine Induktion des SphK2-Proteingehaltes vor (siehe Abb.23). Neben der Messung der Enzymaktivität unter Hypoxie wählte ich einen weiteren Ansatz mit der Inkubation der Zellen mit 100 µM des Hypoxie-Mimetikums CoCl₂ unter Normoxie. Dies sollte die Frage klären, ob die Akkumulation von HIF-1alpha einen direkten Einfluss auf die Aktivität der SphK hat. Die Messung erfolgte nach der in Abschnitt 2.2.7 beschrieben Methode, bei der in einem ,in vitro' Ansatz die Aktivität der Enzyme anhand der Umwandlung eines fluoreszenzmarkierten Substrates (NBD-Sphingosin) bestimmt wird.



Abb.25: Messungen der Sphingosin-Kinase Aktivität unter Hypoxie

A549 Zellen wurden für 4h unter Normoxie (21 % O₂) unstimuliert oder mit 100 µM CoCl₂, bzw. für 2 oder 4 h unter Hypoxie (1 % O₂) inkubiert. Die Bestimmung der SphK-Aktivität erfolgte nach der in Abschnitt 2.2.7 beschriebenen Methode. Zur besseren Vergleichbarkeit der gemessenen Enzymaktivitäten wurden diese auf den Gehalt an Gesamtprotein der jeweiligen Probe normiert. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Änderungen der

68

SphK1- (weiß) und SphK2-Aktivität (schwarz) als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle (Normoxie). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Alle mit (#) gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich zur unstimulierten Kontrolle (Normoxie), mit p≥0,05.

Wie in Abb.25 dargestellt ist, führte die Inkubation der Zellen unter Hypoxie (1 % O_2) zu einer sehr schnellen Steigerung der SphK2-Aktivität. Nach 2 - 4 h Hypoxie war in den A549 Zellen eine etwa 1,5fache Induktion der SphK2-Enzymaktivität messbar. Im Gegensatz dazu konnte für die SphK1 keine Aktivitätsänderung festgestellt werden. Auch die Stimulation mit 100 μ M CoCl₂ unter Normoxie führte zu keiner Änderung der Enzymaktivität beider Isoformen, was eine Beteiligung von HIF-1 ausschließt.

Die Akkumulation der SphK2 unter Hypoxie korrelierte mit einer Erhöhung der Enzymaktivität. Es ist naheliegend, dass dies zu einer verstärkten Synthese von S1P führt und somit die Anpassung der Zellen an Hypoxie fördert. Bisher konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der erhöhten SphK2-Aktivität und dem Auftreten eines chemoresistenten Phänotyps unter Hypoxie hergestellt werden. In den kommenden Experimenten sollte diese Vermutung näher untersucht werden.

3.6.4 Die Rolle der SphK2 in dem Auftreten der Chemoresistenz und der Sekretion des Schutzfaktors unter Hypoxie

3.6.4.1 SphK2-vermittelter Schutz vor Apoptose unter Hypoxie

Mit Hilfe der spezifischen Hemmung der SphK2-Expression sollte deren Bedeutung auf den Hypoxie-vermittelten Schutz vor Etoposid untersucht werden. Wie zuvor erwähnt, konnte DMS nicht verwendet werden, da dieser Hemmstoff beide Isoformen inhibiert. Daher wurden die Zellen mit spezifischer siRNA gegen SphK2 transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.6) und die Auswirkung auf die Chemoresistenz unter Hypoxie untersucht. Zunächst musste jedoch die Spezifität der verwendeten siRNA überprüft werden. Hierzu wurden die Zellen entweder mit 100 nM Kontroll-siRNA oder 100 nM validierter, spezifischer SphK2-siRNA transfiziert und anschließend, wie angegeben, entweder für 4h unter Normoxie ($21 \% O_2$) oder für 4h unter Hypoxie ($1 \% O_2$) inkubiert.

Wie es für die Inkubation der Zellen unter Hypoxie bereits gezeigt werden konnte (Abb.23), führte die Inkubation unter Hypoxie auch nach einer Transfektion mit Kontroll-siRNA zu einer Akkumulation der SphK2. Diese Induktion konnte durch die Transfektion der Zellen mit 100 nM spezifischer siRNA vollständig rückgängig gemacht werden (siehe Abb.23).
SphK2	(Bai		à.
Aktin	-	-	-
Normoxie [h]	4	-	-
Hypoxie [h]	-	4	4
Kontroll-siRNA	-	+	-
SphK2-siRNA	-	-	+

Abb.26: Wirksamkeit der spezifischen SphK2-siRNA

Inkubation von A549 Zellen für 4 h unter Hypoxie (1% O₂) als Kontrolle, nach der Nukleofektion mit 100 nM SphK2-spezifischer siRNA bzw. der Transfektion mit 100 nM Kontroll-siRNA. Zur Nukleofektion wurde die in Abschnitt 2.2.6.2 beschriebene Nukleofektion mit Hilfe des Nukleofektors der Firma Amaxa Biosystems verwendet. Die Detektion der Proteinexpression erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Die Expression von Aktin diente als Beladekontrolle. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In den nun folgenden Experimenten wurde eine für die mRNA der SphK2 spezifische siRNA verwendet, um die Rolle der SphK2 bei der Chemoresistenz unter Hypoxie und der Synthese und Freisetzung des Schutzfaktors näher zu charakterisieren. A549 Zellen wurden entweder mit Kontroll-siRNA (100 nM) oder spezifischer SphK2-siRNA (100 nM) transfiziert und anschließend für 24 h unter Hypoxie (1 % O₂) inkubiert.



Abb.27: Die Rolle der SphK2 bezüglich der Chemoresistenz unter Hypoxie

Messungen der Caspase3-Aktivität von A549 Zellen nach Inkubation für 24 h unter Normoxie (21 % O₂) oder Hypoxie (1 % O₂). Wenn angegeben wurden die Zellen 48 h vor Versuchsstart entweder mit 100 nM KontrollsiRNA oder 100 nM SphK2-spezifischer siRNA transfiziert. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch die Stimulation mit 150 µM Etoposid (4 h, serumfrei). Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Caspase3-Aktivität in % zu der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

Die Hemmung der SphK2-Expression durch Transfektion mit siRNA führte zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose (siehe Abb.27). Während untransfizierte Zellen nach der Behandlung mit 150 μ M Etoposid (4h, serumfrei) eine um ~70% reduzierte Caspase3-Aktivität nach 24stündiger Vorinkubation unter Hypoxie (1 % O₂) zeigten, lag die Reduktion der Apoptoserate in Zellen mit gehemmter SphK2 Expression nur noch bei ~35%. Die Transfektion mit Kontroll-siRNA hatte hingegen keinerlei Einfluss auf den Hypoxie-vermittelten Schutz vor Apoptose (siehe Abb.27). Wie dies schon nach Hemmung von HIF-1 und COX-2 beobachten werden konnte, führte die Hemmung der SphK unter Hypoxie nicht zu einer vollständigen Reduktion des Hypoxie-induzierten Schutzes.

Die erhöhte Expression der SphK2 und die gesteigerte Aktivität des Enzyms unter Hypoxie tragen zu einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber Etoposid bei. Das Produkt der durch die SphK2 vermittelten Reaktion (S1P) wirkt, wie gezeigt werden konnte, antiapoptotisch. Wie in Abschnitt 1.3.3 beschrieben, kann S1P sowohl intrazellulär als auch nach Sekretion extrazellulär Signale übermitteln. Daher wurde das Schutzpotenzial von konditioniertem Medium untersucht, welches von Zellen mit unterdrückter SphK2-Expression stammt (siSphK2-CM).

3.6.4.2 Die Beteiligung der SphK2 an der Freisetzung des Schutzfaktors

Für die nächsten Experimente wurde konditioniertes Medium von Zellen verwendet, die entweder mit 100 nM Kontroll-siRNA (siKontrolle-CM) oder mit 100 nM spezifischer SphK2-siRNA (siSphK2-CM) transfiziert wurden. 24 h nach der Transfektion wurde die Konditionierung wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben für 24 h unter Hypoxie (1% O₂) durchgeführt. Frisch ausplattierte Zellen wurden anschließend mit den so hergestellten unterschiedlich konditionierten Medien für 24 h unter Normoxie inkubiert. Die Induktion der Apoptose erfolgte mit 150 μM Etoposid (4 h, serumfrei).

Wie in Abb.28 dargestellt, reduzierte die Inkubation mit konditioniertem Medium, das von Kontroll-siRNA transfizierten Zellen stammt (siKontrolle-CM), die Etoposid-induzierte Apoptose um ~80%. Die Hemmung der SphK2-Expression bei der Konditionierung des Mediums (siSphK2-CM) führte hingegen zu einer deutlichen Verringerung des Schutzpotenzials des konditionierten Mediums um ~30% (siehe Abb.28).



Abb.28: Sekretion des Schutzfaktors durch SphK2

A549 Zellen wurden mit frischem oder unterschiedlich konditioniertem Medium für 24 h unter Normoxie inkubiert. Das CM wurde entweder von Zellen gewonnen die 24 h unter Hypoxie (1 % O₂) inkubiert wurden, und zuvor mit 100 nM Kontroll-siRNA (siKontrolle-CM) oder 100 nM SphK2-siRNA (siSphK2-CM) transfiziert wurden. Anschließend erfolgte die Induktion der Apoptose durch die Stimulation mit 150 μ M Etoposid (4 h, serumfrei). Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Caspase3-Aktivität in % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten \pm S.E.M. Die mit (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

3.7 Signalweiterleitung der Schutzfaktoren in Zielzellen

Als Schutzfaktoren, welche über auto- und parakrine Wege zur Chemoresistenz der Zellen beitragen, konnten PGE₂ und S1P identifiziert werden. Dies wurde durch Reduktion des Schutzpotenzials nach Hemmung der Synthesewege belegt. Da die Wirkungsweise beider Faktoren bei der Chemoresistenz unter Hypoxie noch nicht beschrieben ist, wurde zunächst untersucht, welche Signalwege an der Weiterleitung des Schutzes in Zielzellen beteiligt sind. Sowohl S1P als auch PGE₂ vermitteln ihre Funktionen durch die Aktivierung von Kinase-Kaskaden, unter anderem PI3K-, MAPK- und ERK1/2. Es wurden daher spezifische Inhibitoren dieser Signalwege eingesetzt, um die Funktion der jeweiligen Signalkaskaden an der Weiterleitung der anti-apoptotischen Signale zu untersuchen. Hierzu wurden die Zellen mit CM oder Lip-CM für 24 h unter Normoxie und den spezifischen Inhibitoren koinkubiert, und deren Auswirkungen auf den Apoptoseschutz ermittelt.



Abb.29: Beteiligung des ERK1/2-Signalweges an der Induktion der Chemoresistenz in Zielzellen

Caspase3-Aktivitäts-Messungen von A549 Zellen unter Normoxie. Die Zellen wurden für 24 h unter Normoxie (21 % O₂) mit frischem Medium, CM oder Lipid-Extrakt (Lip-CM) inkubiert. Zusätzlich erfolgte, wie angegeben, eine Co-Inkubation mit 5 μ M U0126 (ERK1/2-Inhibitor), 30 μ M LY294002 (PI3K-Inhibitor), 10 μ M SB203580 (p38-MAPK-Inhibitor) oder 100 μ M NS398 (COX-2-Inhibitor). Anschließend erfolgte die Induktion der Apoptose durch die Stimulation mit 150 μ M Etoposid (4 h, serumfrei). Das eingesetzte Volumen des Lipid-Extraktes wurde so gewählt, dass es die Lipide aus 2 ml Medium enthielt. Dieses Volumen an Medium wurde auch bei den Inkubationen unter Normoxie oder Hypoxie eingesetzt. Die Messung der Caspase3-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Caspase3-Aktivität in % der Positivkontrolle (Normoxie + Etoposid). Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus n≥5 Experimenten ± S.E.M. Die mit (*) markierten Unterschiede sind mit p≥0,05 signifikant unterschiedlich.

Die Weiterleitung des CM-vermittelten Schutzes vor Apoptose erfolgt über den ERK1/2-Signalweg. Die Ko-Inkubation von CM mit 5 μ M des ERK1/2-spezifischen Inhibitor U0126 für 24 h unter Normoxie führte zu einer Reduktion des Apoptoseschutzes um ~35 %. Die Beteiligung von PI3K- oder MAPK-Signalwegen kann hingegen ausgeschlossen werden, da sowohl der PI3K-Inhibitor LY294002 (30 μ M) als auch der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 (10 μ M) keinen Einfluss auf das Schutzpotenzial des CM hatten.

Berichten aus der Literatur zu Folge, kann S1P zu einer Induktion von COX-2 führen. Wäre die Induktion der COX-2 unter Hypoxie ein sekundärer Effekt durch die Freisetzung von S1P, würde die Hemmung von COX-2 die während der Inkubation mit CM, das antiapoptotische Potenzial des CM aufheben. Die Koinkubation von CM mit 100 µM NS398 führte zu keiner

Reduktion des CM-vermittelten Apoptoseschutzes, wodurch eine Aktivierung von COX-2 durch CM ausgeschlossen werden konnte.

Da die Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulation von Zellen mit S1P oder PGE₂ mehrfach beschrieben ist und ERK1/2 an der Weiterleitung des Apoptoseschutz beteiligt war, musste die Aktivierung von ERK1/2 nach Inkubation mit CM oder Lip-CM untersucht werden. Die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges lässt sich durch die Detektion des Phosphorylierungsstatus des Proteins mittels Western-Blot feststellen. Die Phosphorylierung erfolgt nach Aktivierung eines entsprechenden Rezeptors durch die MEK1 (mitogenactivated protein kinase kinase 1) an zwei Aminosäureresten (Thr202 und Tyr204), wobei eine verstärkte Phosphorylierung des Proteins mit einer gesteigerten Aktivität der Kinase einhergeht.



Abb.30: Aktivierung des ERK1/2-Signalweges durch CM und Lip-CM

Western-Blot von A549 Zellen nach der Inkubation unter Normoxie (21 % O₂) mit CM oder Lipid-Extrakt für 2–8 h. Das eingesetzte Volumen des Lipid-Extraktes wurde so gewählt, dass es die Lipide aus 2 ml Medium enthielt. Dieses Volumen an Medium wurde auch bei den Inkubationen unter Normoxie oder Hypoxie eingesetzt. Die Expression von phospho~p42/44 (Thr202; Tyr204) und p42/44 wurde nach der in Abschnitt 2.2.3.4 beschriebenen Methode detektiert. p42/44 diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Sowohl die Inkubation mit CM für 2 - 8 h unter Normoxie (21 % O_2), als auch die Stimulation mit Lip-CM für 2 - 8 h unter Normoxie (21 % O_2) führten zu einer starken Aktivierung von ERK1/2. Dies konnte durch die Zunahme der phosphorylierten Form von ERK1/2 bezogen auf den Gehalt an Gesamtprotein gezeigt werden.

4 **DISKUSSION**

Der Erfolg einer Behandlung solider Tumoren hängt entscheidend davon ab, wie sensitiv diese gegenüber dem jeweiligen Therapieansatz sind. Oftmals treten bei der Transformation in maligne Zellen Veränderungen auf, die die Tumorzellen gegenüber Bestrahlung oder der Behandlung mit Chemotherapeutika unempfindlich machen. Derartige Resistenzmechanismen können einerseits genetisch bedingt sein, beispielsweise ausgelöst durch Mutationen (intrinsische Resistenz), oder erst durch die Behandlung selbst hervorgerufen werden (erworbene Resistenz) [188]. Bei der chemotherapeutischen Behandlung von Tumoren stellt die erworbene Resistenz ein besonders großes Problem dar, da hierbei oft Kreuzresistenzen gegenüber vielen unterschiedlichen Chemotherapeutika auftreten [189]. können Änderungen des Milieus Des Weiteren innerhalb solider Tumoren (Sauerstoffmangel, Nährstoffmangel, Azidifizierung) die Sensitivität von Tumoren gegenüber Krebstherapien beeinflussen. In den hier verwendeten A549 Zellen wurde unter unstimulierten Bedingungen keine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika festgestellt (intrinsische Chemoresistenz). Die Vorinkubation unter Hypoxie induzierte jedoch eine starke Desensitivierung der Zellen gegenüber der Behandlung mit Etoposid oder Staurosporin (Abb.7). Aufgrund der kurzen Inkubationszeit des Chemotherapeutikums und der Tatsache, dass die Dauer der hypoxischen Vorinkubation für die Entwicklung der Chemoresistenz entscheidend war, konnte auch eine erworbene Resistenz ausgeschlossen werden.

Ein weiteres großes Problem bei der Behandlung von Tumoren ist, dass die Ursachen einer Chemoresistenz sehr unterschiedlich sein können. So können Tumorzellen über den Export oder die Inaktivierung des Medikaments, verbesserte DNA-Reparatur Mechanismen, DNA-Methylierung oder die Induktion anti-apoptotischer Signalwege Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika aufbauen [190]. Mutationen des Zielproteins oder fehlerhafte Apoptosemechanismen können in malignen Zellen aufgrund von genetischen Veränderungen auftreten, was ebenfalls zur Desensitivierung der Zellen beitragen kann. Da sowohl die intrinsische, als auch die erworbene Resistenz ausgeschlossen werden konnte, galt es, die anti-apoptotischen Signalwege zu identifizieren, die einen Schutz der Zellen vor Chemotherapeutika vermitteln. Auch substanzspezifische Ursachen der Resistenz wie z. B. Mutationen im Zielprotein des Chemotherapeutikums können ausgeschlossen werden, da sich die Wirkungsweise von Staurosporin und Etoposid stark unterscheiden und Hypoxie vor der Behandlung mit beiden Substanzen gleichermaßen schützt. Eine Möglichkeit wie sich Zellen unter Hypoxie vor Chemotherapeutika schützen können, ist eine Abschwächung der Wirksamkeit, wie sie beispielsweise durch strukturelle Veränderungen, z.B. der Konjugation

mit Glutathion, entstehen können [189]. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da hierbei keine Zeitabhängigkeit zu erwarten wäre.

4.1 HIF-1 vermittelt intrazellulär anti-apoptotische Signale unter Hypoxie

Wie bereits erwähnt, können Veränderungen des pH-Wertes, der Nährstoffverfügbarkeit, der Zelldichte und vor allem der Sauerstoffkonzentration die Vitalität der Zellen beeinflussen. Im Organismus kann eine solche Unterversorgung der Zellen z.B. durch Entzündungen, Gefäßverschlüsse, Verletzungen oder in Tumoren auftreten. Als Folge dieser Unterversorgung entstehen ischämische Bedingungen (Sauerstoff- und Nährstoffmangel). Zusätzlich kommt es, ausgelöst durch den Mangel an Sauerstoff und der damit verbundenen Hemmung der mitochondrialen Atmungskette, zur Akkumulation von Laktat und somit zur Azidifizierung des Gewebes. In ,in vitro' Studien wurde gezeigt, dass diese Veränderungen Zellen vor Apoptose schützen können [191-194]. Vorversuche in A549 Zellen ergaben jedoch, dass der Mangel an Glukose oder Wachstumsfaktoren sowie Schwankungen des pH-Wertes keine Chemoresistenz induzierten. Die Induktion protektiver Signalwege erfolgte somit höchstwahrscheinlich durch Sauerstoffmangel, weshalb die Inkubation unter Hypoxie als Stimulus für die Induktion der zu charakterisierenden Resistenzmechanismen diente.

Wie bereits erwähnt kann Hypoxie auch ,in vivo' die Behandlung von Tumoren negativ beeinflussen. In soliden Tumoren tritt diese als Folge des abnorm schnellen Wachstums der Zellen und der fehlerhaften Vaskularisierung des Gewebes auf, wodurch es zur Akkumulation von HIF-1 kommt. Diese intratumorale Hypoxie wurde mehrfach als Auslöser von Chemoresistenzen solider Tumoren beschrieben [8, 17, 18]. Die Beobachtung, dass HIF-1 in vielen humanen Tumoren überexprimiert vorliegt, bestätigt diese Annahme [8]. Auch in A549 Zellen kam es unter Hypoxie zu einer Akkumulation von HIF-1α und somit zur Aktivierung von HIF-1. Die Aktivierung von HIF-1 und somit die Expression HIF-1-regulierter Zielgene ermöglicht die Adaption der Zellen an die veränderten Bedingungen. In A549 Zellen konnte durch die Unterdrückung der HIF-1-vermittelten Zellantwort mit HIF-1α-spezifischer siRNA eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Etoposid erreicht werden (Abb.11).

Unter den mehr als 70 bekannten Zielgenen von HIF-1 befinden sich unter anderem Proteine, die anti-apoptotische Signale vermitteln. Des Weiteren werden Proteine reguliert, die die Wirkung von Chemotherapeutika verringern können. Hierzu zählen beispielsweise detoxifizierende Transporter der ABC-(*ATP binding cassette*)-Transporter Familie. Mitglieder dieser Proteinfamilie, die einer Regulation durch HIF-1 unterliegen, sind P-gp (P-Glykoprotein; alias MDR1 oder ABCB1) und MRP1 (*multi drug resistance protein 1,* alias ABCC1) [189, 195-200]. Über den aktiven Transport toxischer Substanzen aus der Zelle heraus, wodurch der Wirkstoff sein intrazelluläres Zielprotein nicht erreichen kann, vermitteln

ABC-Transporter ein Schutz der Zellen vor schädlichen Substanzen. Aus ,in vivo' Studien ist heute bekannt, dass eine Vielzahl von Leukämieerkrankungen und unterschiedliche Formen solider Tumoren eine Überexpression von ABC-Transportern aufweisen, wodurch sie gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika desensitiviert sind [195, 201].



Abb. 31: HIF-1-vermittelte Chemoresistenz unter Hypoxie

Unter Hypoxie kommt es durch die Hemmung der PHD zur Stabilisierung von HIF-1 α und folglich zur Aktivierung von HIF-1. Über die verstärkte Expression anti-apoptotischer Zielgene, vermittelt HIF-1 intrazellulär zu einer Reduktion der Apoptoserate durch die Behandlung mit Chemotherapeutika. PHD – Prolinhydroxylasen; HIF-1 α – Hypoxie-induzierter Faktor 1 α

Berichten aus der Literatur zur Folge sind A549 Zellen durch die Inkubation unter Hypoxie, neben dem hier festgestellten Schutz vor Chemotherapeutika, auch vor physiologischen Apoptose-Signalen, wie z. B. TRAIL-induzierter Apoptose, geschützt [202]. Es ist daher anzunehmen, dass es in A549 Zellen unter Hypoxie zur Aktivierung generell-wirkender anti-apoptotischer Signalwege kommt. Da diese auch vor physiologischen Apoptosesignalen schützen, kann die Expression von ABC-Transportern durch HIF-1 als Ursache der Chemoresistenz ausgeschlossen werden. Stattdessen liegt die Beteiligung von HIF-1-Zielgenen nahe, die für anti-apoptotische Proteine, wie z. B. IAP-2, Survivin, Bcl-2, Bcl-X_L oder Mcl-1 codieren [8, 202-207]. Die Proteine der IAP-Familie (*inhibitors of apoptosis*), wie IAP-2 oder Survivin, unterdrücken die Spaltung der pro-Caspasen in ihre aktive Form (z. B. der Caspase3) und blockieren so die Ausführung des apoptotischen Programms sowohl über Rezeptor-vermittelte Wege, als auch über den mitochondrialen Weg [208].

Die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie (Bcl-2, Bcl-X_L oder Mcl-1) sind ein wichtiger Bestandteil des mitochondrialen Apoptoseweges. Sie verhindern die Bildung einer mitochondrialen Pore und so die Freisetzung von Cytochrom c, was die Aktivierung der Effektorcaspasen verhindert. Neben der verstärkten Expression anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine kann HIF-1 jedoch auch die Bildung pro-apoptotischer Faktoren hemmen. So kann HIF-1 verringerte Synthese von Bid, Bax und Bak, pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, bewirken [209, 210].

Die Induktion anti-apoptotischer Proteine durch HIF-1 ist eine viel beschriebene Beobachtung, weshalb im Rahmen dieser Arbeit die spezifischen Effektoren des HIF-1vermittelten Apoptoseschutzes nicht näher untersucht wurden. Es standen vielmehr HIF-1unabhängige Schutzmechanismen im Vordergrund, da sich herausstellte, dass neben HIF-1 weitere Hypoxie-induzierte Signalwege zur Entstehung des chemoresistenten Phänotyps der A549 Zellen beitrugen.

4.2 HIF-1-unabhängiger Schutz vor Apoptose

Es ist bekannt, dass unabhängig von HIF-1 Signalkaskaden aktiviert werden, die eine antiapoptotische Wirkung vermitteln können. Hierzu zählen neben Transkriptionsfaktoren auch Kinasekaskaden wie z. B. PI3K oder MAPK. Die Untersuchungen an A549 Zellen ergaben, dass eine Vorinkubation von >16 h nötig war, bis ein signifikanter Schutz vor Etoposidinduzierter Apoptose vorlag. Ein Apoptoseschutz durch die direkte Regulation von Proteinen durch Hypoxie-induzierte Kinase-Kaskaden, wie z. B. der Phosphorylierung von Bad oder der Caspase9, scheiden somit aus. Die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren, die unter Hypoxie unabhängig von HIF-1 aktiviert werden, liegt daher nahe. Hierzu zählen unter anderem AP-1, NF-KB, ATF4, C/EBPβ und PEA3 [211-215]. Piret et al. untersuchten die Hypoxie-induzierte Chemoresistenz in HepG2 Zellen und stellten fest, dass diese durch AP-1 vermittelt wurde [214]. Es wurde weiterhin gezeigt, dass AP-1 während der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielt, denn eine erhöhte Aktivierung von AP-1 wurde als mögliche Ursache der malignen Transformation von Zellen identifiziert. Auch an der weiteren Progression von Tumoren ist AP-1 beteiligt. Hierbei spielt vor allem die verstärkte Expression von MMP1 und MMP3 sowie die Induktion der EMT (Epithelial-mesenchymal transition) eine Rolle [216]. NF-kB ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der unter Hypoxie die Vitalität der Zellen reguliert. Neben der Aktivierung durch die Veränderung des Redoxstatus der Zellen und die Bildung reaktiver Sauerstoffsradikale (ROS) unterliegt NF-KB auch einer Regulation durch die PHDs [215, 217]. Cummins et al. beschrieben einen Mechanismus, nachdem die Hemmung der PHD-1-Aktivität unter Hypoxie zu einer verstärkten Aktivierung der IKKß (IkB-Kinase β) und somit von NF-κB führt. NF-κB könnte neben den HIF-Proteinen die Anpassungen an Hypoxie gewährleisten. Eine erhöhte Aktivität von NF-KB ist in einer Vielzahl von Tumoren zu beobachten [218]. Hierdurch können in malignen Zellen Apoptose-Resistenzen auftreten, die die Progression des Tumors unterstützen [218]. Neben den Auswirkungen auf die Zellvitalität kann NF-KB auch die Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen beeinflussen [218]. Genau wie NF-kB und AP-1 ist ein weiterer

Hypoxie-regulierter Transkriptionsfaktor an der Weiterleitung anti-apoptotischer Signale beteiligt. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von ATF4 an der Entstehung einer Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin beteiligt ist [219, 220]. Interessant ist auch, dass neben HIF-1 vermehrt die Bedeutung von HIF-2 bei zellulären Reaktionen auf Sauerstoffmangel beschrieben wird. Es ist bekannt, dass beide Transkriptionsfaktoren unter Hypoxie unabhängig voneinander spezifische Zielgene regulieren können [19]. Bei Untersuchungen von HIF-vermittelten Effekten muss daher in Zukunft auf die Rolle von HIF-1 und HIF-2 besonders eingegangen werden.

4.3 Sekretierte Lipide vermitteln einen auto-/parakrinen Schutz unter Hypoxie

Unter Hypoxie wird neben intrazellulären Adaptionsmechanismen auch die Freisetzung von Botenstoffen induziert. Hierzu zählen vor allem Faktoren, die eine verbesserte Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen ermöglichen, aber auch Signale die zum Schutz des unterversorgten Gewebes vor Apoptose beitragen [8]. Zusätzlich zu der Übertragung des Signals selbst besteht eine weitere Funktion sekretierter Botenstoffe darin, über Rückkopplungsmechanismen Einfluss auf zelluläre Reaktionen zu nehmen. Hierdurch wird entweder eine Signalverstärkung oder die Beendigung des Signals erreicht. Die Freisetzung von Faktoren, die zum Schutz der Zellen vor Apoptose beitrugen, konnte in A549 Zellen unter Hypoxie ebenfalls festgestellt werden. Diese vermitteln, zusätzlich zu den intrazellulären HIF-1-abhängigen Mechanismen, die Übertragung anti-apoptotischer Signale über auto- und parakrine Wege. Die Synthese dieser Faktoren wurde durch Hypoxie ausgelöst, jedoch konnten diese ihre Wirkung unabhängig von den herrschenden Sauerstoffkonzentrationen erfüllen. In Tumoren trägt dies dazu bei, dass auch in den Randzonen, in denen stets eine ausreichende Versorgung des Gewebes gewährleistet ist, die Tumorzellen vor der Bekämpfung durch das Immunsystem oder durch Medikamente geschützt sind.

Hypoxie-induzierte Botenstoffe wie EPO oder VEGF werden im Wesentlichen durch HIF-1 über eine verstärkte Transkriptionsrate induziert. Es ist jedoch bekannt, dass neben HIF-1 weitere Faktoren an der Freisetzung von Botenstoffen beteiligt sind. Dies konnte z. B. für VEGF gezeigt werden [212]. In Experimenten mit HIF-1α defizienten Zellen wurde festgestellt, dass die Bildung von VEGF lediglich reduziert vorlag, was für eine HIF-1unabhängige Regulation von VEGF spricht [212]. Ebenfalls HIF-1-unabhängig kommt es unter Hypoxie zur Synthese von Interleukinen wie IL-6 oder IL-8 [221, 222]. Diese werden unter anderem durch NF-κB reguliert und können über den ERK1/2- oder Jak/STAT-Signalweg vor Apoptose schützen [218, 223]. Obwohl anhand der dargestellten Ergebnisse

79

eine Freisetzung solcher Schutzfaktoren nicht ausgeschlossen werden kann, steht fest, dass diese nicht an der Übertragung des anti-apoptotischen Signals beteiligt sind. Dies konnte durch ein Experiment belegt werden, in dem alle Proteine im konditionierten Medium durch Proteasen und Hitzeeinwirkung denaturiert wurden (Abb.15). Unabhängig von der Sekretion von Proteinen beschreibt ein interessanter Diskussionsansatz die Rolle von Adenosin bei der Übertragung anti-apoptotischer Signale in Tumoren. Es wurde festgestellt, dass ,in vitro' unter Hypoxie bzw. in soliden Tumoren Adenosin im extrazellulären Raum in erhöhten Konzentrationen vorliegt. Darüber hinaus wurde bei diesen Untersuchungen eine übermäßig starke Expression des Adenosin-Rezeptors A₃ (ADORA3) detektiert [224, 225]. In diesem Zusammenhang stellten Merighi et al. kürzlich fest, dass die Bindung von Adenosin an ADORA3 zu einer Aktivierung des PI3K-Signalwegs führt. Dies vermittelt über die Phosphorylierung und damit der Hemmung von Bad, einem pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2 Proteinfamilie, den Schutz vor Paclitaxel-induzierter Apoptose [226]. Die Weiterleitung des Adenosin-vermittelten Signals erfolgt über PI3K-abhängige Signalwege [226]. Die Beteiligung eines solchen Mechanismus in dem hier verwendeten Testsystem konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da im Verlauf der Arbeit festgestellt wurde, dass die Hemmung des PI3K-Signalswegs durch LY294002 keinen Einfluss auf die Weiterleitung des anti-apoptotischen Signals in Zielzellen hatte (Abb.29).

Die weitere Charakterisierung des löslichen Schutzfaktors ergab, dass es sich um ein Lipid handelt, da ein Lipid-Extrakt aus konditioniertem Medium (CM) ein starkes anti-apoptotisches Signal vermittelte (Abb.15). Die Suche nach potenziellen Lipidmediatoren des Apoptoseschutzes, welche unter Hypoxie synthetisiert werden oder bekanntermaßen anti-apoptotische Signale übertragen, ergab, dass PGE₂ und S1P A549 Zellen vor Etoposid-induzierter Apoptose schützen (Abb.17 und Abb.18).

4.4 COX-2 vermittelt über PGE₂ anti-apoptotische Signale

Wie in Abschnitt 1.4 bereits dargestellt, ist COX-2 an unterschiedlichen physiologischen, aber auch patho-physiologischen Prozessen beteiligt. COX-2 ist ein induzierbares Protein, welches unter anderem unter Stressbedingungen aktiviert wird. Es ist bekannt, dass es unter Hypoxie zu einer verstärkten Expression von COX-2 kommen kann [184]. Über die Bereitstellung von PGH₂ aus Arachidonsäure ermöglicht COX-2 die Bildung von Prostaglandinen und ist so an vielfältigen Prozessen des Organismus, wie z. B. Schmerz, Fieber, Angiogenese, Thrombozyten-aggregation und vor allem bei der Regulation der Immunantwort beteiligt [161]. Für die Bildung von Prostaglandinen ist jedoch nicht nur die Aktivierung von COX-2, sondern auch die Bereitstellung des Substrats Arachidonsäure nötig.

Hierzu bedarf es der Aktivierung der PLA₂, welche ebenfalls durch Hypoxie aktiviert wird [227].

4.4.1 Die Akkumulation der Cyclooxygenase-2 unter Hypoxie

Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine Akkumulation von COX-2, beginnend nach einer Inkubation von 8 h unter Hypoxie, auch in A549 beobachtet werden. Der Proteingehalt von COX-2 kann sowohl über die Induktion der Transkriptionsrate als auch über eine Stabilisierung der mRNA reguliert werden. Leider reichen die durchgeführten Experimente nicht aus, um eine präzise Aussage über den Mechanismus der COX-2 Expression treffen zu können. Aufgrund einer Inkubationszeit von >8h, bis es zu einer Akkumulation von COX-2 kam, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass die Regulation von COX-2 durch die Stabilisierung der mRNA erfolgt. Dieser Mechanismus führt sehr schnell zu einer Akkumulation von COX-2 und liefert bereits nach nur 30 min ein detektierbares Signal auf Proteinebene [228]. Es ist daher nahe liegend, dass es unter Hypoxie über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Steigerung der COX-2 mRNA kommt. Dies könnte unter anderem durch HIF-1, aber auch über NF-kB, AP-1 oder CREB erfolgen [212, 229, 230]. Obwohl HIF-1 als möglicher Regulator von COX-2 unter den gewählten Bedingungen nicht ausgeschlossen werden konnte wurde festgestellt, dass beide Proteine unabhängig voneinander zum Schutz der Zellen vor Apoptose beitragen (Abb. 21). Weiterführende Experimente sind nötig, um die Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, welche die Expression von COX-2 unter Hypoxie vermitteln. Die Beteiligung von NF-κB ist hierbei am wahrscheinlichsten, da dieser eine COX-2 Expression nach inflammatorischen Signalen vermittelt [157].

4.4.2 Synthese und Funktion von PGE₂ unter Hypoxie

Die Expression von COX-2 erfüllte in A549 Zellen unter Hypoxie eine doppelte Funktion: COX-2 war sowohl an der Etablierung der Chemoresistenz unter Hypoxie als auch an der Konditionierung des Mediums beteiligt. Die dargestellten Ergebnisse sprechen für die Synthese und Freisetzung von PGE₂. Zum einen wurde festgestellt, dass COX-2 für die Synthese und Freisetzung des Schutzfaktors essenziell war (Abb.20), zum anderen führte die Stimulation mit PGE₂ unter Normoxie konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der Etoposid-induzierten Apoptose. Auch die Behandlung mit Lipid-Extrakt, der potenziell PGE₂ enthielt, induzierte einen chemoresistenten Phänotyp.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Bedeutung von COX-2 bei der Induktion eines chemoresistenten Phänotyps von Tumoren. Die Rolle von COX-2 während der Tumorgenese wird durch Publikationen verdeutlicht, wonach COX-2 in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt [177, 178]. Eine mögliche Ursache dieser Überexpression liegt in der Entstehung von Onkogenen. Die Untersuchung eines chemoresistenten Phänotyps des multiplen Myeloms

zeigte, dass dieser durch eine Überexpression von COX-2, ausgelöst durch Mutationen des Ras-Onkogens, induziert wurde [231]. Aufgrund der häufig austretenden Überexpression von COX-2 in Tumoren stellt COX-2 auch bei der Entwicklung neuer Therapieansätze zur Bekämpfung von Tumoren ein interessantes Ziel dar. In ,in vivo' Studien an Mäusen konnte das Tumorwachstum durch die Hemmung von COX-2 bzw. durch den Einsatz eines PGE₂ neutralisierenden Antikörpers verlangsamt werden [232]. In einem vergleichbaren Ansatz wurde die Latenzzeit der Tumorbildung durch die Verabreichung von Celecoxib, einem Inhibitor von COX-2, verlängert. Im weiteren Verlauf der Tumorgenese wurden durch Celecoxib das Wachstum und somit die Größe der Tumoren deutlich reduziert [233]. Dies konnte in klinischen Studien bestätigt werden [234].



Abb. 32: Die Rolle von COX-2 bei der Entstehung der Chemoresistenz

Die Inkubation unter Hypoxie führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die eine Akkumulation von COX-2 induzieren. In der Folge kommt es zur Bildung und Freisetzung von PGE₂. Über autokrine oder parakrine Bindung an EP-Rezeptoren wird der ERK1/2-Signalweg aktiviert, wodurch in Zielzellen der Schutz vor Chemotherapeutika induziert wird. TF – Transkriptionsfaktoren; COX-2 – Cyclooxygenase 2; AA – Arachidonsäure; PGE₂ – Prostaglandin E₂; EP – PGE₂-Rezeptoren

Neben dem Einfluss auf die Progression von Tumoren wird COX-2 auch mit der Entstehung von Chemoresistenzen in Verbindung gebracht. So führte die Überexpression von COX-2 zu einer verstärkten Freisetzung von PGE₂, wodurch ein Schutz vor Melphalan-induzierter Apoptose vermittelt wird [231]. Einen möglichen Mechanismus, wie COX-2 an dem Auftreten von Chemoresistenzen beteiligt sein könnte, beschrieben Puhlmann *et al.* [235]. Sie stellten fest, dass die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin zu einer Erhöhung des PGE₂-Gehaltes führte, in deren Folge die Expression des ABC-Transporters MDR-1b die Chemoresistenz gegenüber Doxorubicin vermittelte [235]. Eine erhöhte Expression eines weiteren Mitglieds der ABC-Transporter (MDR-1) wurde in Tumoren mit überexprimierter

COX-2 beschrieben [236]. Wie zuvor bereits dargestellt, führt die Inkubation der A549 Zellen unter Hypoxie auch zu einem Schutz von physiologischen Apoptosesignalen [202]. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Detoxifizierung der Zellen die Ursache der beobachteten Chemoresistenz ist. Eine Überexpression von COX-2 kann weiterhin zu einer verstärkten Expression von Bcl-X_L führen [236]. Die Analyse der Expression von Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie wäre ein erster Ansatz zur Identifikation von Effektoren des COX-2 abhängigen Schutzes. PGE₂ ist jedoch nicht nur für den Erfolg einer Krebstherapie von Bedeutung, sondern beeinflusst auch die Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem. In Lungentumoren mit einer Überexpression von COX-2 wurde eine verstärkte Freisetzung von PGE₂ festgestellt. Hierdurch kam es durch die Hemmung der IL-12 Produktion und der verstärkten Synthese von IL-10 in Makrophagen zu einer Verschiebung des IL-10/IL-12 Verhältnisses, wodurch der Tumor sich der Immunreaktion entzog [237].

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen Beobachtungen, dass COX-2 über die Induktion anti-apoptotischer Signalwege an der Entstehung von Resistenzen gegenüber unterschiedlichen Therapieansätzen beitragen kann. Die Bildung des hypoxischen Kerns könnte somit über die Induktion von COX-2 und der Freisetzung von PGE₂ die Ursache der Chemoresistenz eines Tumors sein. Es gibt Berichte, wonach der Einsatz spezifischer COX-2-Inhibitoren das Behandlungsergebnis der photodynamischen Therapie solider Tumoren verbessern konnte [238, 239]. In einem Mausmodell zeigten Dandekar *et al.*, dass der Einsatz von Celecoxib, einem spezifischen Inhibitor von COX-2, zu einer Reduktion des PGE₂ Gehaltes führte, wodurch die Effizienz der Chemotherapie mit Docetaxel gesteigert werden konnte [233]. Ähnliche Ergebnisse bei einer chemotherapeutischen Behandlung solider Tumoren lieferten klinische Studien an Patienten [234].

4.5 Die Funktion der Sphingosin-Kinasen in A549 Zellen

Seitdem Lipide als wichtige Botenstoffe zur Übertragung anti-apoptotischer Signale charakterisiert wurden, stieg das Wissen um deren Rolle während der Tumorgenese stetig. Hierbei ist insbesondere die Funktion der Lipide bei der Entstehung von Resistenzmechanismen gegenüber verschiedenen Therapiemethoden interessant [80, 141, 240]. Die Beschreibung von SphK1 als Onkogen und die Beobachtung, dass SphK1 in verschiedenen Tumorarten überexprimiert vorliegt, war ein weiterer Hinweis auf die Funktion von S1P in Tumoren [141, 144, 145, 241]. Auch unter Hypoxie zeigte sich die Bedeutung des ,Sphingolipid Rheostats', insbesondere die Aktivität der Sphingosin-Kinase 1 und die Synthese von S1P. Diese sind für das Überleben der Zellen unter ischämischen Bedingungen notwendig [242-244].

4.5.1 Die Bedeutung der Sphingosin-Kinasen auf die Zellvitalität

In A549 Zellen konnte durch die Zugabe von S1P die Resistenz der Zellen gegenüber Etoposid induziert werden. Beide Isoformen der Sphingosin-Kinasen werden in A549 Zellen konstitutiv exprimiert und zeigen auch unter unstimulierten Bedingungen eine basale Aktivität. Die Hemmung beider Sphingosin-Kinase Isoformen durch Dimethylsphingosin (DMS) führte zum programmierten Zelltod. Dieser pro-apoptotische Effekt von DMS konnte durch die Ko-Inkubation mit S1P aufgehoben werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Zellsystemen gemacht [101, 245]. Die basale Aktivität der Sphingosin-Kinasen und die dadurch katalysierte Synthese von S1P scheinen für das Überleben der Zelle essenziell zu sein. Bedenkt man die subzelluläre Verteilung beider Enzyme in ruhenden Zellen – die SphK1 im Zytosol, die SphK2 im Nukleus – liegt es nahe, dass die Synthese des basal gebildeten S1P durch die SphK1 erfolgt, da das Substrat Sphingosin für die SphK2 im Kern nicht verfügbar ist. Darüber hinaus kann die SphK1 kontinuierlich aus der Zelle exportiert werden, wodurch auch extrazellulär S1P gebildet werden kann [93, 94]. Die Tatsache, dass DMS-induzierte Apoptose durch die Koinkubation mit S1P, aber auch durch Inkubation mit CM oder die Zugabe von Lipid-Extrakt aus CM (Lip-CM) verhindert werden konnte, ist ein Indiz für die Sekretion von S1P.

4.5.2 Die Transkription der Sphingosin-Kinase unter Hypoxie

Über die Regulation der Expression der Sphingosin-Kinasen ist bisher wenig bekannt. Literaturberichten zur Folge kann eine Induktion der Sphingosin-Kinasen durch Steigerung der Transkriptionsrate erfolgen [84]. Auch die Inkubation unter Hypoxie führte zu einer Zunahme des mRNA-Gehaltes beider Sphingosin-Kinase Isoformen [99]. In der Arbeit wurde jedoch zur Untersuchung von Glattmuskelzellen der Lunge eine Langzeitinkubation zwischen 2-14 Tagen durchgeführt, bei der eine Sauerstoffkonzentration von 10% als Hypoxie definiert wurde. Jedoch handelt es sich bei der von Ahmand *et al.* festgestellten Induktion unter Hypoxie um eine Langzeitadaption der Zellen, weshalb dieser Effekt nicht mit dem hier angesetzten Testsystem vergleichbar ist.

In A549 Zellen ergab die Analyse der Promotorregionen von humanem SphK1 und SphK2 im Bereich von -2000 bis +100 bp mit einer Software zur Identifikation putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Genomatix MatInspector), dass beide Promotoren putative Bindungsstellen für HIF-1 enthalten. Die Messungen des mRNA-Gehaltes von SphK1 und SphK2 ergab, dass nach Inkubation der A549 Zellen für 8·24 h unter Hypoxie der mRNA-Gehalt unverändert blieb (Abb.22). Interessanterweise beschreiben Anelli *et al.* eine Zunahme der SphK1-mRNA, des Proteins und der Aktivität bereits nach 1 h Hypoxie, wobei dieser Effekt bis maximal 8 h anhielt [98]. Als Ursache identifizierten sie die Bindung von HIF-2α an den SphK1-Promotor. Die Autoren stellten weiterhin fest, dass dieser Mechanismus spezifisch für die Regulation der SphK1 war und dass HIF-1α diese Induktion negativ beeinflusste [98]. Eine derartige schnelle Regulation von Zielgenen durch Transkriptionsfaktoren der HIF-Familie war bislang unbekannt. Die Analyse der mRNA erfolgte frühestens nach einer Inkubationszeit von 8 h, da nach dieser Zeit eine Induktion bekannter HIF-Zielgene bereits bekannt war. In weiteren Experimenten muss daher der von Anelli *et al.* vorgeschlagene Mechanismus zur Regulation der Sphingosin-Kinase in A549 Zellen untersucht werden. Die Herstellung von stabil transfizierten A549 Zellen mit spezifischer Unterdrückung der HIF-1α oder HIF-2α Expression ermöglicht hierbei eine bessere Unterscheidung von HIF-1 oder HIF-2 vermittelten Effekten.



Abb. 33: Die Funktion der Sphningosin-Kinasen in A549 Zellen

Die Sphingosin-Kinasen erfüllen in A549 Zellen eine zweifache Funktion. Einerseits tragen sie unter Normoxie über die basale Synthese von S1P zur Vitalität der Zellen bei. Dies wird höchstwahrscheinlich durch die SphK1 vermittelt, welche zytosolisch oder extrazellulär vorliegen kann. Unter Hypoxie kommt es zusätzlich zur Aktivierung der SphK2. Dies wird möglicherweise durch Kinasen vermittelt, welche unter Hypoxie die Phosphorylierung von SphK2 katalysieren. Die Translokation der SphK2 an die Plasmamembran führt zu einer verstärkten Synthese und Freisetzung von S1P durch ABC-Transporter. S1P trägt über die Aktivierung von ERK1/2 zur Entstehung der Chemoresistenz bei. S1P – Sphingosin-1-Phosphat; Sph – Sphingosin; S1PR – S1P-Rezeptoren; ERK1/2 – Extrazellulär regulierte Kinase 1/2, SphK1 - Sphingosin-Kinase 1; SphK2 - Sphingosin-Kinase 2

4.5.3 Induktion der Enzymaktivität der SphK2

Obwohl es in A549 Zellen unter Hypoxie zu keiner Regulation der mRNA von SphK1 und SphK2 kam, sprechen Berichte aus der Literatur dafür, dass es zu einer Aktivierung von Sphingosin-Kinasen unter Hypoxie kommt. Die Regulation der Funktion der Sphingosin-Kinasen nach Stimulation der Zellen erfolgt im Wesentlichen über posttranslationelle Modifikationen und der Änderung der Lokalisation der Proteine (siehe 1.3.1). Dieser Mechanismus basiert auf der Aktivierung von Kinasen und findet daher sehr schnell statt. Aus diesem Grund wurden für Messungen der Enzymaktivität kurze Inkubationszeiten von 2 und 4h gewählt. Wie in Abb.25 dargestellt, kam es in A549 Zellen bereits nach 2h zu einer Induktion der SphK2-Aktivität. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der von Anelli et al. dargestellten Arbeit, da in A549 Zellen keine Regulation der SphK1 beobachtet werden konnte. Aufgrund der funktionellen Unterschiede der beiden Isoformen der Sphingosin-Kinasen wäre es denkbar, dass in Lungengewebe (A549) die SphK2 die Vitalität der Zellen unter physiologischem Stress vermittelt, wohingegen im Nervensystem (U87) die Funktion der SphK1 essenziell ist. Der Mechanismus der Aktivierung der SphK2-Enzymaktivität konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, ist jedoch als Ziel weiterführender Arbeiten geplant.

Es stellte sich heraus, dass die Induktion der SphK-Aktivität mit einer Steigerung um das ~1,5fache nur schwach ausfiel. Dies deckt sich jedoch mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die eine Zunahme der Enzymaktivität der Sphingosin-Kinasen unter physiologischen Bedingungen meist zwischen 1,5-3fach feststellen konnten [102, 110]. Bedenkt man, dass in A549 Zellen eine basale Aktivität der SphK2 vorliegt, welche durch Stimulation nur auf das 1,5-fache gesteigert werden kann, ist eine Regulation durch die Translokation des Enzyms nahe liegend. Hinzu kommt, dass die SphK2 zur Synthese von S1P aus dem Zellkern exportiert werden muss. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es innerhalb einer putativen Kernexportsequenz zu Phosphorylierungen an Serin 419 und Serin 421 durch die Proteinkinase D kommen kann [111]. Dies könnte den Export der SphK2 aus dem Kern induzieren. Unter Hypoxie konnte diese Hypothese bisher noch nicht bestätigt werden. ,In vitro' konnte jedoch gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder PMA unter Normoxie zur Translokation der Sphingosin-Kinasen zur Plasmamemenbran kommt (siehe 1.3.1). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass nach Stimulation mit Membranlipiden eine Steigerung der SphK-Aktivität festgestellt werden konnte [112]. Dies deutet darauf hin, dass nach Assoziation mit der Plasmamembran die Synthese von S1P zusätzlich gesteigert wird.

Die Bindung an Membranbestandteile hat neben der Steigerung der katalytischen Leistung einen weiteren Effekt. So erfolgt die Synthese von S1P in unmittelbarer Nähe zu Mitgliedern der ABC-Transporter-Familie, wodurch der Export von S1P aus der Zelle erleichtert wird [128, 129]. Darüber hinaus vermittelt die Bindung von Membranlipiden den Export der SphK2 aus der Zelle. So wurde gezeigt, dass die Bindung der SphK2 an Phosphatidylserin zu einem Export des Enzyms während der Apoptose führt (Weigert *et al.* zur Veröffentlichung eingereicht). Während der Apoptose kommt es zum so genannten "Phosphatidylserin Flip-Flop', wodurch das Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran präsentiert wird. Durch diesen Vorgang wird die daran gebundene SphK2 ebenfalls aus der Zelle transportiert und es kommt zur extrazellulären Synthese von S1P (Weigert *et al.* zur Veröffentlichung eingereicht).

Die Ånderung der subzellulären Lokalisation scheint ein wesentliches Regulationselement S1P-vermittelter Effekte darzustellen. Der Auslöser dieser Translokation ist die Phosphorylierung der Proteine. Unter Hypoxie kann es zur Aktivierung von Proteinkinasen kommen, die potenziell die Phosphorylierung der SphK2 vermitteln könnten. Um Kinasen zu identifizieren, welche hierbei in Frage kommen könnten, wurde eine Analyse der Proteinstruktur mit Hilfe der Analysesoftware ,NetPhos 2.0' sowie ,KinasePhos' durchgeführt. Es zeigte sich, dass putative Phosphorylierungsstellen unterschiedlicher Kinasen (z. B. AKT, IKKβ, PKA, PKC) vorhanden waren. Da es unter Hypoxie zur Aktivierung einiger der genannten Kinasen kommen kann (z. B. AKT oder IKKβ), könnte eine Phosphorylierung der SphK2 und die damit verbundene Translokation zur Plasmamembran zur Steigerung der Syntheserate von S1P beitragen. Um diese Frage zu klären, sind weiterführende Experimente notwendig. Der Einsatz spezifischer Inhibitoren ermöglicht die Eingrenzung beteiligter Proteinkinasen, wobei im weiteren Verlauf durch Mutationen einzelner Aminosäuren die genauen Phosphorylierungsstellen identifiziert werden könnten.

In soliden Tumoren könnte die Erhöhung der Sphingosin-Kinase Aktivität durch die dort auftretende Hypoxie die Progression des Tumors fördern. In der Tat wurde eine Deregulation von Enzymen des Sphingolipid-Metabolismus (SphK1 oder S1P-Lyase) als Ursache für die Progression von Tumoren beschrieben [144, 246]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Freisetzung von S1P aus apoptotischen Tumorzellen zu einer Phänotyp-Änderung der Tumor-assoziierten Makrophagen führt, wodurch diese die Tumorgenese unterstützen [155]. Die Hemmung S1P-vermittelter Signale stellt daher ein Iohnendes Ziel für die Entwicklung neuer Therapien dar. Hierbei werden bereits verschiedene Ansätze verfolgt, die eine Verringerung des verfügbaren S1P oder die Blockade S1P-vermittelter Signalwege zum Ziel haben [247-252].

4.6 Weiterleitung des freigesetzten Schutzsignals in Zielzellen

In Zielzellen erfolgt die Übertragung extrazellulärer Reize durch Signalkaskaden, die den Stimulus in eine zelluläre Reaktion übertragen. Nach Bindung des Botenstoffs an

entsprechende Rezeptoren kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Rezeptoren können entweder auf der Zelloberfläche oder bei membrangängigen Botenmolekülen auch intrazellulär lokalisiert sein. Es konnte festgestellt werden, dass Hypoxie die Freisetzung löslicher Faktoren induziert, die anti-apoptotische Signale auto- oder parakrin weiterleiteten. Als mögliche Mediatoren dieses übertragbaren Schutzsignals wurden PGE₂ und S1P identifiziert. Für die Übertragung anti-apoptotischer Signale durch S1P oder PGE₂ ist die Beteiligung mehrerer Signalwege beschrieben. Hierzu zählen vor allem der PI3K- sowie die MAPK-Signalwege (p38, ERK1/2, JNK) [130, 253]. Durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren gegen PI3K, p38 und ERK1/2 wurde festgestellt, dass die Weiterleitung des übertragbaren Schutzsignals in A549 Zellen über ERK1/2-vermittelte Wege erfolgt. Der spezifische ERK1/2-Inhibitor U0126 führte durch Koinkubation mit CM oder Lip-CM zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Etoposid. Als Beleg, dass ERK1/2 an der Weiterleitung beteiligt war, konnte die Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulation mit CM oder Lip-CM dargestellt werden (Abb.30).

Eine Aktivierung von Kinase-Kaskaden durch Rezeptoren erfolgt meist binnen weniger Minuten. Nach Inkubation mit CM konnte jedoch eine ERK1/2-Aktivierung erst nach 4 h festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Stimulation mit CM über einen sekundären Effekt, beispielsweise über die Freisetzung von Ca²⁺ und der Aktivierung der PKC, die Aktivierung von ERK1/2 vermittelt. Des Weiteren kommt es unter Hypoxie zur Freisetzung unterschiedlicher Faktoren (z. B.VEGF, EPO, TGF- α , IL-8, IL-6), wodurch eine Interaktion verschiedener Signalwege die Aktivierung von ERK1/2 verzögern könnte. Nach Stimulation mit Lip-CM konnte diese Verzögerung nicht beobachtet werden, da hierin nur Lipide enthalten waren und so die Zahl der aktivierten Signalkaskaden geringer war. Die Aktivierung von ERK1/2 durch CM und Lip-CM konnte auch nach 8 h Stimulation noch festgestellt werden. Im zeitlichen Verlauf des Hypoxie-induzierten Schutzes kommt es zunächst zur Aktivierung von COX-2 und SphK2. Als Folge kommt es zur Bildung und Freisetzung von PGE₂ und S1P, welche autokrin oder parakrin die Aktivierung von ERK1/2 induzieren. Die langanhaltende Aktivierung von ERK1/2 könnte so auch nach andauernder Hypoxie einen konstanten Schutz der Zellen ermöglichen.

Es bleibt zu klären, über welche Rezeptoren S1P und PGE₂ ihre Signale vermitteln. Insbesondere die Expression der S1PR ist hierbei interessant, da in den Promotorregionen von S1PR1-3 putative Bindungsstellen für HIF-1 identifiziert wurden. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass es unter Hypoxie zu einer Induktion der S1PR2-mRNA kommt (nicht gezeigte Daten). Möglicherweise dient die gesteigerte Synthese von S1PR2 einer Verstärkung S1P-vermittelter Signale unter Hypoxie und trägt so zu einer erhöhten Vitalität der Zellen bei. In diesem Zusammenhang ist es ebenfalls interessant, die Expression der Enzyme des S1P-Abbaus (SPP1/2, SPL) zu untersuchen, denn auch in deren Promotoren sind putative HIF-1 Bindungsstellen vorhanden. Eine Hemmung der S1P-Phosphatasen (SPP1/2) oder der S1P-Lyase (SPL) würde ebenfalls zu einer Verstärkung des S1P-Signals führen. Bei der Entwicklung neuer Therapien werden bereits verschiedene Ansätze verfolgt, die eine Verringerung des verfügbaren S1P, oder die Blockade S1P-vermittelter Signalwege zum Ziel haben [247-252].

Sowohl für die die Stimulation von Zellen mit S1P als auch für PGE₂ ist eine Aktivierung des ERK1/2 Signalwegs beschrieben [130, 253]. Eine der vielfältigen Funktionen von ERK1/2 ist unter anderem die Übermittlung anti-apoptotischer Signale [254, 255]. Eine erhöhte Aktivierung von ERK1/2 konnte darüber hinaus in Tumoren der Pankreas detektiert werden, was die Entstehung eines chemoresistenten Phänotyps induzierte [256]. Auch unter Hypoxie konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK1/2 Zellen vor Apoptose, ausgelöst durch UV-Bestrahlung oder Etoposid, schützen kann [257]. Die Beteiligung von ERK1/2 bei der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wurde auch bei der Behandlung mit Gemcitabin gezeigt. Auch nach Stimulation von Zellen mit S1P oder PGE₂ wurde in Folge einer ERK1/2 Aktivierung die Desensitivierung der Zellen gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika oder auch Bestrahlung berichtet [140, 258, 259]. Die Effektoren eines ERK1/2-vermittelten Schutzes können einerseits Transkriptionsfaktoren sein, welche durch ERK1/2 aktiviert werden, wodurch die Expression von anti-apoptotischen Proteinen reguliert wird. So kommt es z.B. nach ERK1/2 Aktivierung zur CREB-vermittelten Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 [260]. Andererseits kann ERK1/2 über die direkte Phosphorylierung von Proteinen vor Apoptose schützen [254]. Hierzu zählen unter anderem pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie wie Bim oder Bad, aber auch Caspasen wie die Caspase9 [261].

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Resistenz solider Tumoren gegenüber der Behandlung mit Medikamenten oder Bestrahlung ist ein häufig auftretendes Phänomen. Insbesondere das Auftreten von Chemoresistenzen stellt ein großes Problem bei der Behandlung von Krebs dar. Aufgrund einer Unterversorgung des Gewebes kommt es in soliden Tumoren zur Bildung des so genannten ,hypoxischen Kern' (*hypoxic core*), welcher bei der Progression und Metastasierung des Tumors eine wichtige Rolle spielt. Es wird diskutiert, inwieweit Hypoxie an der Entstehung von Resistenzen gegenüber unterschiedlichen Therapieansätzen beteiligt ist. Das Ziel der Arbeit war es, die Fragestellung zu klären, ob Hypoxie vor Apoptose, ausgelöst durch Chemotherapeutika, schützt. Wenn sich diese Vermutung bestätigen sollte, sollten die zu Grunde liegenden Mechanismen dieser Chemoresistenz aufgeklärt werden.

Es konnte festgestellt werden, dass es in A549 Zellen unter Hypoxie durch ein Zusammenspiel mehrerer unabhängiger Signalwege zum Schutz vor Etoposid-induzierter Apoptose kommt. Zum einen induziert Hypoxie die Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1. Über einen intrazellulären Mechanismus, wahrscheinlich der Expression anti-apoptotischer Zielgene, kommt es zur Desensitivierung der Zellen gegenüber der Behandlung mit Etoposid. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es unter Hypoxie unabhängig von HIF-1 zur Freisetzung von Schutzfaktoren kommt. Diese vermitteln über auto- oder parakrine Wege anti-apoptotische Signale. Hypoxie führte zu einer Akkumulation der Cyclooxygenase-2 (COX-2), welche maßgeblich an der Freisetzung des Schutzfaktors beteiligt ist. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die Stimulation mit PGE₂ zu einer erhöhten Resistenz von A549 Zellen gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose führte. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die basale Aktivität der Sphingosin-Kinasen für die Vitalität von A549 Zellen essenziell ist. Unter Hypoxie wurde darüber hinaus eine Aktivierung der Sphingosin-Kinase 2 (SphK2) festgestellt, wodurch eine vermehrte Synthese und Freisetzung von Sphingosin-1-phosphat (S1P) induziert wurde. Es kommt unter Hypoxie über zwei unabhängige Signalwege zur Freisetzung von PGE₂ und S1P, welche in Zielzellen einen chemoresistenten Phänotyp induzieren. Die Übertragung des anti-apoptotischen Signals erfolgte über die Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Hypoxie über die Aktivierung von HIF-1, COX-2 und SphK2 in A549 Zellen die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika induziert. Hierbei sind neben intrazellulären Signalen auch auto- und parakrin wirkende Mechanismen beteiligt. Als Übermittler des übertragbaren anti-apoptotischen Signals konnten S1P und PGE₂ identifiziert werden, die über die Aktivierung von ERK1/2 vor Apoptose schützen.

6 LITERATUR

- (1) Brown JM (2000) *Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies.* Mol Med Today, 6(4): p. 157-162.
- (2) Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, and Jain RK (1997) Interstitial pH and pO2 gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. Nat Med, 3(2): p. 177-182.
- Moulder JE and Rockwell S (1987) *Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy.* Cancer Metastasis Rev, 5(4): p. 313-341.
- (4) Durand RE (1991) *Keynote address: the influence of microenvironmental factors on the activity of radiation and drugs.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 20(2): p. 253-258.
- (5) Giaccia AJ (1996) *Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest.* Semin Radiat Oncol, 6(1): p. 46-58.
- (6) Riva C, Chauvin C, Pison C, and Leverve X (1998) *Cellular physiology and molecular events in hypoxia-induced apoptosis.* Anticancer Res, 18(6B): p. 4729-4736.
- (7) Semenza GL (2000) *Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 35(2): p. 71-103.
- (8) Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer, 3(10): p. 721-732.
- (9) Semenza GL (2000) *HIF-1 and human disease: one highly involved factor.* Genes Dev, 14(16): p. 1983-1991.
- (10) Sullivan R and Graham CH (2007) *Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype.* Cancer Metastasis Rev, 26(2): p. 319-331.
- (11) Chan DA and Giaccia AJ (2007) Hypoxia, gene expression, and metastasis. Cancer Metastasis Rev, 26(2): p. 333-339.
- (12) Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, and Loskutoff DJ (2003) Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. J Cell Biol, 160(5): p. 781-791.
- (13) Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, and Giaccia AJ (2000) *Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype.* Cancer Res, 60(4): p. 883-887.
- (14) Vaupel P and Mayer A (2007) Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. Cancer Metastasis Rev, 26(2): p. 225-239.
- (15) Hockel M and Vaupel P (2001) *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects.* J Natl Cancer Inst, 93(4): p. 266-276.

- (16) Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, and Brune B (2006) *Tumor hypoxia and cancer progression.* Cancer Lett, 237(1): p. 10-21.
- (17) Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, and Simons JW (1999) Overexpression of hypoxiainducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. Cancer Res, 59(22): p. 5830-5835.
- (18) Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, and Semenza GL (2000) Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. Cancer, 88(11): p. 2606-2618.
- (19) Ratcliffe PJ (2007) *HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia?* J Clin Invest, 117(4): p. 862-865.
- Maynard MA and Ohh M (2007) The role of hypoxia-inducible factors in cancer. Cell Mol Life Sci, 64(16): p. 2170-2180.
- (21) Bracken CP, Whitelaw ML, and Peet DJ (2003) The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. Cell Mol Life Sci, 60(7): p. 1376-1393.
- (22) Semenza GL (2001) *Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology.* Trends Mol Med, 7(8): p. 345-350.
- (23) Semenza GL (1999) *Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1.* Annu Rev Cell Dev Biol, 15: p. 551-578.
- Huang LE and Bunn HF (2003) *Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance*. J Biol Chem, 278(22): p. 19575-19578.
- (25) Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, and Kim KW (2002) *Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation.* Cell, 111(5): p. 709-720.
- (26) Ruas JL, Poellinger L, and Pereira T (2002) Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. J Biol Chem, 277(41): p. 38723-38730.
- (27) Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, and Whitelaw ML (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. Science, 295(5556):
 p. 858-861.
- (28) Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, and Kaelin WG, Jr. (2001) *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing.* Science, 292(5516): p. 464-468.
- (29) Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, and Ratcliffe PJ

(2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2regulated prolyl hydroxylation. Science, 292(5516): p. 468-472.

- (30) Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, and Ratcliffe PJ (2001) *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.* Cell, 107(1): p. 43-54.
- (31) Bruick RK and McKnight SL (2001) *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF.* Science, 294(5545): p. 1337-1340.
- (32) Schofield CJ and Zhang Z (1999) Structural and mechanistic studies on 2oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. Curr Opin Struct Biol, 9(6): p. 722-731.
- (33) Huang J, Zhao Q, Mooney SM, and Lee FS (2002) Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. J Biol Chem, 277(42): p. 39792-39800.
- (34) Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, and Pouyssegur J (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. Embo J, 22(16): p. 4082-4090.
- (35) Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, Acker H, and Fandrey J (2003) Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. J Cell Sci, 116(Pt 7): p. 1319-1326.
- (36) Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Jr., and Pavletich NP (2002) Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. Science, 296(5574): p. 1886-1889.
- (37) Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, and Kaelin WG (2000) *Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein.* Nat Cell Biol, 2(7): p. 423-427.
- (38) Ivan M and Kaelin WG, Jr. (2001) *The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.*Curr Opin Genet Dev, 11(1): p. 27-34.
- (39) Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, and Conaway JW
 (2000) Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau
 (VHL) tumor suppressor complex. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(19): p. 10430-10435.
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, and Bedi A (2000) *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha.* Genes Dev, 14(1): p. 34-44.

- (41) Chen D, Li M, Luo J, and Gu W (2003) *Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function.* J Biol Chem, 278(16): p. 13595-13598.
- (42) Masson N and Ratcliffe PJ (2003) *HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels.* J Cell Sci, 116(Pt 15): p. 3041-3049.
- (43) Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, and Millhorn DE (2003) Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. J Biol Chem, 278(18): p. 15911-15916.
- Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, Huang Q, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, and Li CY (2007) *Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation.* Mol Cell, 26(1): p. 63-74.
- (45) Ke Q and Costa M (2006) *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Mol Pharmacol, 70(5):
 p. 1469-1480.
- (46) Karni R, Dor Y, Keshet E, Meyuhas O, and Levitzki A (2002) Activated pp60c-Src leads to elevated hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha expression under normoxia. J Biol Chem, 277(45): p. 42919-42925.
- (47) Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, and Giaccia AJ (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. Genes Dev, 14(4): p. 391-396.
- (48) Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, and Semenza GL (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. Mol Cell Biol, 21(12): p. 3995-4004.
- (49) Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, and Abraham RT (2002) *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin.* Mol Cell Biol, 22(20): p. 7004-7014.
- (50) Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, and Semenza GL (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. J Biol Chem, 277(41): p. 38205-38211.
- (51) Wiener CM, Booth G, and Semenza GL (1996) In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. Biochem Biophys Res Commun, 225(2): p. 485-488.
- (52) Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, and Clerici C (2004) Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. J Biol Chem, 279(15): p. 14871-14878.

- (53) Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(12): p. 5510-5514.
- (54) Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, and Poellinger L
 (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha.
 Embo J, 17(22): p. 6573-6586.
- (55) Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, and Poellinger L (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. Mol Cell Biol, 20(1): p. 402-415.
- (56) Ebert BL and Bunn HF (1998) Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. Mol Cell Biol, 18(7): p. 4089-4096.
- (57) Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, and Livingston DM (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(23): p. 12969-12973.
- (58) Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, and Fujii-Kuriyama Y (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. Embo J, 18(7): p. 1905-1914.
- (59) Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, and Caro J (2002) Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. Mol Cell Biol, 22(9): p. 2984-2992.
- (60) Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, and Schofield CJ (2002) *Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family.* J Biol Chem, 277(29): p. 26351-26355.
- (61) Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, and Bruick RK (2002) FIH1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. Genes Dev, 16(12): p. 1466-1471.
- (62) Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, and Pouyssegur J (1999) p42/p44 mitogenactivated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem, 274(46): p. 32631-32637.

- (63) Hur E, Chang KY, Lee E, Lee SK, and Park H (2001) Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha. Mol Pharmacol, 59(5): p. 1216-1224.
- (64) Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, and Michiels C (2001) Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. Free Radic Biol Med, 31(7): p. 847-855.
- (65) Conrad PW, Freeman TL, Beitner-Johnson D, and Millhorn DE (1999) EPAS1 transactivation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. J Biol Chem, 274(47): p. 33709-33713.
- (66) Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, and Gutkind JS (2000) The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor upregulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. Cancer Res, 60(17): p. 4873-4880.
- (67) Gradin K, Takasaki C, Fujii-Kuriyama Y, and Sogawa K (2002) *The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine.* J Biol Chem, 277(26): p. 23508-23514.
- (68) Suzuki H, Tomida A, and Tsuruo T (2001) Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. Oncogene, 20(41): p. 5779-5788.
- (69) Tojo M, Matsuzaki K, Minami T, Honda Y, Yasuda H, Chiba T, Saya H, Fujii-Kuriyama Y, and Nakao M (2002) *The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system.* J Biol Chem, 277(48): p. 46576-46585.
- Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, and Brahimi-Horn MC (2007)
 SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. Biochem Biophys Res Commun, 360(3): p. 646-652.
- (71) Yasinska IM and Sumbayev VV (2003) S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. FEBS Lett, 549(1-3): p. 105-109.
- (72) Futerman AH and Hannun YA (2004) *The complex life of simple sphingolipids*. EMBO Rep, 5(8): p. 777-782.
- (73) Spiegel S and Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. Nat Rev Mol Cell Biol, 4(5): p. 397-407.
- (74) Ogretmen B and Hannun YA (2004) *Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment.* Nat Rev Cancer, 4(8): p. 604-616.

- (75) Ogretmen B (2006) Sphingolipids in cancer: regulation of pathogenesis and therapy.
 FEBS Lett, 580(23): p. 5467-5476.
- (76) Modrak DE, Gold DV, and Goldenberg DM (2006) *Sphingolipid targets in cancer therapy.* Mol Cancer Ther, 5(2): p. 200-208.
- (77) Kok JW and Sietsma H (2004) Sphingolipid metabolism enzymes as targets for anticancer therapy. Curr Drug Targets, 5(4): p. 375-382.
- (78) Reynolds CP, Maurer BJ, and Kolesnick RN (2004) *Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy.* Cancer Lett, 206(2): p. 169-180.
- (79) Fox TE, Finnegan CM, Blumenthal R, and Kester M (2006) The clinical potential of sphingolipid-based therapeutics. Cell Mol Life Sci, 63(9): p. 1017-1023.
- (80) Maceyka M, Payne SG, Milstien S, and Spiegel S (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. Biochim Biophys Acta, 1585(2-3): p. 193-201.
- (81) Liu H, Chakravarty D, Maceyka M, Milstien S, and Spiegel S (2002) Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 71: p. 493-511.
- (82) Ben-Yosef Y, Miller A, Shapiro S, and Lahat N (2005) *Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death.* Am J Physiol Cell Physiol, 289(5): p. C1321-1331.
- (83) Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH, Jr., Milstien S, and Spiegel S (2005) SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. J Biol Chem, 280(44): p. 37118-37129.
- (84) Alemany R, van Koppen CJ, Danneberg K, Ter Braak M, and Meyer Zu Heringdorf D (2007) Regulation and functional roles of sphingosine kinases. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 374(5-6): p. 413-428.
- (85) Sarkar S, Maceyka M, Hait NC, Paugh SW, Sankala H, Milstien S, and Spiegel S (2005) Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. FEBS Lett, 579(24): p. 5313-5317.
- (86) Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, and Spiegel S (1999) Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. J Cell Biol, 147(3): p. 545-558.
- (87) Bektas M, Jolly PS, Muller C, Eberle J, Spiegel S, and Geilen CC (2005) Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. Oncogene, 24(1): p. 178-187.

- (88) Igarashi N, Okada T, Hayashi S, Fujita T, Jahangeer S, and Nakamura S (2003) Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. J Biol Chem, 278(47): p. 46832-46839.
- (89) Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, Nava VE, Sankala H, Payne SG, Bektas M, Ishii I, Chun J, Milstien S, and Spiegel S (2003) *Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis.* J Biol Chem, 278(41): p. 40330-40336.
- (90) Yokota S, Taniguchi Y, Kihara A, Mitsutake S, and Igarashi Y (2004) Asp177 in C4 domain of mouse sphingosine kinase 1a is important for the sphingosine recognition.
 FEBS Lett, 578(1-2): p. 106-110.
- (91) Wattenberg BW, Pitson SM, and Raben DM (2006) The sphingosine and diacylglycerol kinase superfamily of signaling kinases: localization as a key to signaling function. J Lipid Res, 47(6): p. 1128-1139.
- (92) Inagaki Y, Li PY, Wada A, Mitsutake S, and Igarashi Y (2003) Identification of functional nuclear export sequences in human sphingosine kinase 1. Biochem Biophys Res Commun, 311(1): p. 168-173.
- (93) Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae SS, Stefansson S, Liau G, and Hla T (2002) Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. J Biol Chem, 277(8): p. 6667-6675.
- (94) Waters C, Sambi B, Kong KC, Thompson D, Pitson SM, Pyne S, and Pyne NJ (2003) Sphingosine 1-phosphate and platelet-derived growth factor (PDGF) act via PDGF beta receptor-sphingosine 1-phosphate receptor complexes in airway smooth muscle cells. J Biol Chem, 278(8): p. 6282-6290.
- (95) Francy JM, Nag A, Conroy EJ, Hengst JA, and Yun JK (2007) *Sphingosine kinase 1 expression is regulated by signaling through PI3K, AKT2, and mTOR in human coronary artery smooth muscle cells.* Biochim Biophys Acta, 1769(4): p. 253-265.
- (96) Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, Pettus B, Hannun YA, Obeid L, and Trojanowska M (2004) Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. J Biol Chem, 279(52): p. 53994-54001.
- (97) Mastrandrea LD, Sessanna SM, and Laychock SG (2005) Sphingosine kinase activity and sphingosine-1 phosphate production in rat pancreatic islets and INS-1 cells: response to cytokines. Diabetes, 54(5): p. 1429-1436.
- (98) Anelli VV, Gault CR, Cheng AB, and Obeid LM (2007) Sphingosine kinase 1 is upregulated during hypoxia in U87MG glioma cells: Role of hypoxia-inducible factors 1 and 2. J Biol Chem.

- (99) Ahmad M, Long JS, Pyne NJ, and Pyne S (2006) The effect of hypoxia on lipid phosphate receptor and sphingosine kinase expression and mitogen-activated protein kinase signaling in human pulmonary smooth muscle cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 79(3-4): p. 278-286.
- (100) Xia P, Gamble JR, Rye KA, Wang L, Hii CS, Cockerill P, Khew-Goodall Y, Bert AG, Barter PJ, and Vadas MA (1998) *Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 95(24): p. 14196-14201.
- (101) Billich A, Bornancin F, Mechtcheriakova D, Natt F, Huesken D, and Baumruker T (2005) Basal and induced sphingosine kinase 1 activity in A549 carcinoma cells: function in cell survival and IL-1beta and TNF-alpha induced production of inflammatory mediators. Cell Signal, 17(10): p. 1203-1217.
- (102) Olivera A and Spiegel S (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. Nature, 365(6446): p. 557-560.
- (103) Shu X, Wu W, Mosteller RD, and Broek D (2002) Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. Mol Cell Biol, 22(22): p. 7758-7768.
- (104) Hait NC, Bellamy A, Milstien S, Kordula T, and Spiegel S (2007) Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. J Biol Chem, 282(16): p. 12058-12065.
- (105) Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Alemany R, Guo Y, Schmidt M, and Jakobs KH (1999) Role of sphingosine kinase in Ca(2+) signalling by epidermal growth factor receptor. FEBS Lett, 461(3): p. 217-222.
- (106) Rius RA, Edsall LC, and Spiegel S (1997) Activation of sphingosine kinase in pheochromocytoma PC12 neuronal cells in response to trophic factors. FEBS Lett, 417(2): p. 173-176.
- (107) Young KW, Challiss RA, Nahorski SR, and MacKrill JJ (1999) Lysophosphatidic acidmediated Ca2+ mobilization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells is independent of phosphoinositide signalling, but dependent on sphingosine kinase activation. Biochem J, 343 Pt 1: p. 45-52.
- (108) Johnson KR, Becker KP, Facchinetti MM, Hannun YA, and Obeid LM (2002) PKCdependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12myristate 13-acetate (PMA). J Biol Chem, 277(38): p. 35257-35262.
- (109) Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Lipinski M, Alemany R, Rumenapp U, and Jakobs KH (2001) *Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by*

G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. Eur J Pharmacol, 414(2-3): p. 145-154.

- (110) Pitson SM, Moretti PA, Zebol JR, Lynn HE, Xia P, Vadas MA, and Wattenberg BW
 (2003) Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation.
 Embo J, 22(20): p. 5491-5500.
- (111) Ding G, Sonoda H, Yu H, Kajimoto T, Goparaju SK, Jahangeer S, Okada T, and Nakamura S (2007) Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. J Biol Chem, 282(37): p. 27493-27502.
- (112) Olivera A, Rosenthal J, and Spiegel S (1996) *Effect of acidic phospholipids on sphingosine kinase.* J Cell Biochem, 60(4): p. 529-537.
- (113) Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, Milstien S, Kohama T, and Spiegel S (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. J Biol Chem, 275(26): p. 19513-19520.
- (114) Pitson SM, D'Andrea R J, Vandeleur L, Moretti PA, Xia P, Gamble JR, Vadas MA, and Wattenberg BW (2000) *Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes.* Biochem J, 350 Pt 2: p. 429-441.
- (115) Brindley DN (2004) Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. J Cell Biochem, 92(5): p. 900-912.
- (116) Le Stunff H, Peterson C, Liu H, Milstien S, and Spiegel S (2002) *Sphingosine-1*phosphate and lipid phosphohydrolases. Biochim Biophys Acta, 1582(1-3): p. 8-17.
- (117) Mandala SM (2001) *Sphingosine-1-phosphate phosphatases.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 64(1-4): p. 143-156.
- (118) Mandala SM, Thornton R, Galve-Roperh I, Poulton S, Peterson C, Olivera A, Bergstrom J, Kurtz MB, and Spiegel S (2000) Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1- phosphate and induces cell death. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(14): p. 7859-7864.
- (119) Le Stunff H, Peterson C, Thornton R, Milstien S, Mandala SM, and Spiegel S (2002) Characterization of murine sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase. J Biol Chem, 277(11): p. 8920-8927.
- (120) Brindley DN, English D, Pilquil C, Buri K, and Ling ZC (2002) Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. Biochim Biophys Acta, 1582(1-3): p. 33-44.

- (121) Ogawa C, Kihara A, Gokoh M, and Igarashi Y (2003) *Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2.* J Biol Chem, 278(2): p. 1268-1272.
- (122) Le Stunff H, Galve-Roperh I, Peterson C, Milstien S, and Spiegel S (2002) Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. J Cell Biol, 158(6): p. 1039-1049.
- (123) Jasinska R, Zhang QX, Pilquil C, Singh I, Xu J, Dewald J, Dillon DA, Berthiaume LG, Carman GM, Waggoner DW, and Brindley DN (1999) *Lipid phosphate phosphohydrolase-1 degrades exogenous glycerolipid and sphingolipid phosphate esters.* Biochem J, 340 (Pt 3): p. 677-686.
- (124) Zhou J and Saba JD (1998) Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. Biochem Biophys Res Commun, 242(3): p. 502-507.
- (125) Van Veldhoven PP, Gijsbers S, Mannaerts GP, Vermeesch JR, and Brys V (2000) Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). Biochim Biophys Acta, 1487(2-3): p. 128-134.
- (126) Bandhuvula P and Saba JD (2007) *Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren.* Trends Mol Med, 13(5): p. 210-217.
- (127) Kariya Y, Kihara A, Ikeda M, Kikuchi F, Nakamura S, Hashimoto S, Choi CH, Lee YM, and Igarashi Y (2005) *Products by the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase pathway but not S1P stimulate mitogenesis.* Genes Cells, 10(6): p. 605-615.
- (128) Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, and Spiegel S (2006) Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(44): p. 16394-16399.
- (129) Kobayashi N, Nishi T, Hirata T, Kihara A, Sano T, Igarashi Y, and Yamaguchi A (2006) Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. J Lipid Res, 47(3): p. 614-621.
- (130) Taha TA, Argraves KM, and Obeid LM (2004) Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. Biochim Biophys Acta, 1682(1-3): p. 48-55.
- (131) Yopp AC, Randolph GJ, and Bromberg JS (2003) *Leukotrienes, sphingolipids, and leukocyte trafficking.* J Immunol, 171(1): p. 5-10.
- (132) Kluk MJ and Hla T (2002) Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDGfamily of G-protein-coupled receptors. Biochim Biophys Acta, 1582(1-3): p. 72-80.

- (133) Sanchez T and Hla T (2004) *Structural and functional characteristics of S1P receptors.* J Cell Biochem, 92(5): p. 913-922.
- (134) Xia P, Wang L, Moretti PA, Albanese N, Chai F, Pitson SM, D'Andrea RJ, Gamble JR, and Vadas MA (2002) Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. J Biol Chem, 277(10): p. 7996-8003.
- (135) El Alwani M, Wu BX, Obeid LM, and Hannun YA (2006) *Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response.* Pharmacol Ther, 112(1): p. 171-183.
- (136) Pettus BJ, Bielawski J, Porcelli AM, Reames DL, Johnson KR, Morrow J, Chalfant CE, Obeid LM, and Hannun YA (2003) The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. Faseb J, 17(11): p. 1411-1421.
- (137) Backlund MG, Mann JR, and Dubois RN (2005) *Mechanisms for the prevention of gastrointestinal cancer: the role of prostaglandin E2.* Oncology, 69 Suppl 1: p. 28-32.
- (138) Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, and Proia RL (2005) Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. Mol Cell Biol, 25(24): p. 11113-11121.
- (139) Taha TA, Kitatani K, El-Alwani M, Bielawski J, Hannun YA, and Obeid LM (2006) Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis. Faseb J, 20(3): p. 482-484.
- (140) Nava VE, Hobson JP, Murthy S, Milstien S, and Spiegel S (2002) Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells.
 Exp Cell Res, 281(1): p. 115-127.
- (141) Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW, D'Andrea RJ, and Vadas MA (2000) An oncogenic role of sphingosine kinase. Curr Biol, 10(23): p. 1527-1530.
- (142) Argraves KM, Wilkerson BA, Argraves WS, Fleming PA, Obeid LM, and Drake CJ (2004) Sphingosine-1-phosphate signaling promotes critical migratory events in vasculogenesis. J Biol Chem, 279(48): p. 50580-50590.
- (143) Chae SS, Paik JH, Furneaux H, and Hla T (2004) Requirement for sphingosine 1phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. J Clin Invest, 114(8): p. 1082-1089.
- (144) French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, Yun JK, and Smith CD (2003) *Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase.* Cancer Res, 63(18): p. 5962-5969.

- (145) Johnson KR, Johnson KY, Crellin HG, Ogretmen B, Boylan AM, Harley RA, and Obeid LM (2005) *Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue.* J Histochem Cytochem, 53(9): p. 1159-1166.
- (146) Tilly JL and Kolesnick RN (2002) Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility. Biochim Biophys Acta, 1585(2-3):
 p. 135-138.
- (147) Alexander S, Min J, and Alexander H (2006) Dictyostelium discoideum to human cells: pharmacogenetic studies demonstrate a role for sphingolipids in chemoresistance. Biochim Biophys Acta, 1760(3): p. 301-309.
- (148) Min J, Van Veldhoven PP, Zhang L, Hanigan MH, Alexander H, and Alexander S (2005) Sphingosine-1-phosphate lyase regulates sensitivity of human cells to select chemotherapy drugs in a p38-dependent manner. Mol Cancer Res, 3(5): p. 287-296.
- (149) Akao Y, Banno Y, Nakagawa Y, Hasegawa N, Kim TJ, Murate T, Igarashi Y, and Nozawa Y (2006) High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation. Biochem Biophys Res Commun, 342(4): p. 1284-1290.
- (150) Le Stunff H, Mikami A, Giussani P, Hobson JP, Jolly PS, Milstien S, and Spiegel S (2004) Role of sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in epidermal growth factorinduced chemotaxis. J Biol Chem, 279(33): p. 34290-34297.
- (151) Kim JH, Song WK, and Chun JS (2000) Sphingosine 1-phosphate activates Erk-1/-2 by transactivating epidermal growth factor receptor in rat-2 cells. IUBMB Life, 50(2): p. 119-124.
- (152) Van Brocklyn JR, Young N, and Roof R (2003) Sphingosine-1-phosphate stimulates motility and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells. Cancer Lett, 199(1): p. 53-60.
- (153) Xia P, Wang L, Gamble JR, and Vadas MA (1999) Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells. J Biol Chem, 274(48): p. 34499-34505.
- (154) Kang YC, Kim KM, Lee KS, Namkoong S, Lee SJ, Han JA, Jeoung D, Ha KS, Kwon YG, and Kim YM (2004) Serum bioactive lysophospholipids prevent TRAIL-induced apoptosis via PI3K/Akt-dependent cFLIP expression and Bad phosphorylation. Cell Death Differ, 11(12): p. 1287-1298.
- (155) Weigert A, Johann AM, von Knethen A, Schmidt H, Geisslinger G, and Brune B (2006) Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. Blood, 108(5): p. 1635-1642.

- (156) Weigert A, Tzieply N, von Knethen A, Johann AM, Schmidt H, Geisslinger G, and Brune B (2007) *Tumor cell apoptosis polarizes macrophages role of sphingosine-1phosphate.* Mol Biol Cell, 18(10): p. 3810-3819.
- (157) Simmons DL, Botting RM, and Hla T (2004) *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.* Pharmacol Rev, 56(3): p. 387-437.
- (158) Whiteley PJ and Needleman P (1984) *Mechanism of enhanced fibroblast arachidonic acid metabolism by mononuclear cell factor.* J Clin Invest, 74(6): p. 2249-2253.
- (159) Bailey JM, Muza B, Hla T, and Salata K (1985) Restoration of prostacyclin synthase in vascular smooth muscle cells after aspirin treatment: regulation by epidermal growth factor. J Lipid Res, 26(1): p. 54-61.
- (160) Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, and Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(21): p. 13926-13931.
- (161) Hla T, Ristimaki A, Appleby S, and Barriocanal JG (1993) *Cyclooxygenase gene expression in inflammation and angiogenesis.* Ann N Y Acad Sci, 696: p. 197-204.
- (162) Evett GE, Xie W, Chipman JG, Robertson DL, and Simmons DL (1993) Prostaglandin
 G/H synthase isoenzyme 2 expression in fibroblasts: regulation by dexamethasone,
 mitogens, and oncogenes. Arch Biochem Biophys, 306(1): p. 169-177.
- (163) Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, and Hla T (1994) Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation.
 J Biol Chem, 269(16): p. 11769-11775.
- (164) Xie W, Fletcher BS, Andersen RD, and Herschman HR (1994) v-src induction of the TIS10/PGS2 prostaglandin synthase gene is mediated by an ATF/CRE transcription response element. Mol Cell Biol, 14(10): p. 6531-6539.
- (165) Herschman HR, Reddy ST, and Xie W (1997) *Function and regulation of prostaglandin synthase-2.* Adv Exp Med Biol, 407: p. 61-66.
- (166) Sirois J and Richards JS (1993) Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis-acting C/EBP beta promoter element. J Biol Chem, 268(29): p. 21931-21938.
- (167) Crofford LJ, Tan B, McCarthy CJ, and Hla T (1997) Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes. Arthritis Rheum, 40(2): p. 226-236.
- (168) Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, and Hla T (1994) *Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene.* Biochem J, 302 (Pt 3): p. 723-727.

- (169) Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, and Nicolin A (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. J Cell Physiol, 195(3): p. 356-372.
- (170) Boutaud O, Dixon DA, Oates JA, and Sawaoka H (2003) Tristetraprolin binds to the COX-2 mRNA 3' untranslated region in cancer cells. Adv Exp Med Biol, 525: p. 157-160.
- (171) Sengupta S, Jang BC, Wu MT, Paik JH, Furneaux H, and Hla T (2003) The RNAbinding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2. J Biol Chem, 278(27): p. 25227-25233.
- (172) Subbaramaiah K, Marmo TP, Dixon DA, and Dannenberg AJ (2003) Regulation of cyclooxgenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR. J Biol Chem, 278(39): p. 37637-37647.
- (173) Cok SJ, Acton SJ, Sexton AE, and Morrison AR (2004) Identification of RNA-binding proteins in RAW 264.7 cells that recognize a lipopolysaccharide-responsive element in the 3-untranslated region of the murine cyclooxygenase-2 mRNA. J Biol Chem, 279(9): p. 8196-8205.
- (174) Narumiya S (1996) *Prostanoid receptors and signal transduction.* Prog Brain Res, 113: p. 231-241.
- (175) Matsuoka T and Narumiya S (2007) *Prostaglandin receptor signaling in disease*. ScientificWorldJournal, 7: p. 1329-1347.
- (176) Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, and Evans RM (1995) 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. Cell, 83(5): p. 803-812.
- (177) Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, and Phipps RP (2002) *Prostaglandins as modulators of immunity.* Trends Immunol, 23(3): p. 144-150.
- (178) Dempke W, Rie C, Grothey A, and Schmoll HJ (2001) *Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?* J Cancer Res Clin Oncol, 127(7): p. 411-417.
- (179) Bennett A, Tacca MD, Stamford IF, and Zebro T (1977) *Prostaglandins from tumours of human large bowel.* Br J Cancer, 35(6): p. 881-884.
- (180) Plescia OJ, Smith AH, and Grinwich K (1975) *Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 72(5): p. 1848-1851.
- (181) Fosslien E (2001) *Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancerinduced angiogenesis.* Ann Clin Lab Sci, 31(4): p. 325-348.
- (182) Gately S and Li WW (2004) *Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy.* Semin Oncol, 31(2 Suppl 7): p. 2-11.
- (183) Sumitani K, Kamijo R, Toyoshima T, Nakanishi Y, Takizawa K, Hatori M, and Nagumo M (2001) Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of
proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E2 production. J Oral Pathol Med, 30(1): p. 41-47.

- (184) Gately S (2000) *The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis.* Cancer Metastasis Rev, 19(1-2): p. 19-27.
- (185) Bligh EG and Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification.Can J Biochem Physiol, 37(8): p. 911-917.
- (186) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem, 193(1): p. 265-275.
- (187) Billich A and Ettmayer P (2004) *Fluorescence-based assay of sphingosine kinases.*Anal Biochem, 326(1): p. 114-119.
- (188) Kerbel RS, Kobayashi H, and Graham CH (1994) *Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: are they linked phenotypes*? J Cell Biochem, 56(1): p. 37-47.
- (189) Longley DB and Johnston PG (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. J Pathol, 205(2): p. 275-292.
- (190) Wilson TR, Longley DB, and Johnston PG (2006) *Chemoresistance in solid tumours.* Ann Oncol, 17 Suppl 10: p. x315-324.
- (191) Ogiso Y, Tomida A, Lei S, Omura S, and Tsuruo T (2000) Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs. Cancer Res, 60(9): p. 2429-2434.
- (192) Shen J, Hughes C, Chao C, Cai J, Bartels C, Gessner T, and Subjeck J (1987) Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 84(10): p. 3278-3282.
- (193) Vaupel PW, Frinak S, and Bicher HI (1981) Heterogeneous oxygen partial pressure and pH distribution in C3H mouse mammary adenocarcinoma. Cancer Res, 41(5): p. 2008-2013.
- (194) Vaupel PW (1997) The influence of tumor blood flow and microenvironmental factors on the efficacy of radiation, drugs and localized hyperthermia. Klin Padiatr, 209(4): p. 243-249.
- (195) Krishna R and Mayer LD (2000) Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. Eur J Pharm Sci, 11(4): p. 265-283.
- (196) Han HK, Han CY, Cheon EP, Lee J, and Kang KW (2007) Role of hypoxia-inducible factor-alpha in hepatitis-B-virus X protein-mediated MDR1 activation. Biochem Biophys Res Commun, 357(2): p. 567-573.
- (197) Xia S, Yu S, and Yuan X (2005) Effects of hypoxia on expression of P-gp and mutitidrug resistance protein in human lung adenocarcinoma A549 cell line. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 25(3): p. 279-281.

- (198) Comerford KM, Cummins EP, and Taylor CT (2004) *c-Jun NH2-terminal kinase* activation contributes to hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent P-glycoprotein expression in hypoxia. Cancer Res, 64(24): p. 9057-9061.
- (199) Liu L, Ning X, Sun L, Zhang H, Shi Y, Guo C, Han S, Liu J, Sun S, Han Z, Wu K, and Fan D (2007) *Hypoxia-inducible factor-1alpha contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer.* Cancer Sci.
- (200) Wartenberg M, Ling FC, Muschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Putz V, Hescheler J, and Sauer H (2003) *Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species.* Faseb J, 17(3): p. 503-505.
- (201) Thomas H and Coley HM (2003) Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. Cancer Control, 10(2): p. 159-165.
- (202) Park SY, Billiar TR, and Seol DW (2002) Hypoxia inhibition of apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Biochem Biophys Res Commun, 291(1): p. 150-153.
- (203) Zhang Q, Zhang ZF, Rao JY, Sato JD, Brown J, Messadi DV, and Le AD (2004) Treatment with siRNA and antisense oligonucleotides targeted to HIF-1alpha induced apoptosis in human tongue squamous cell carcinomas. Int J Cancer, 111(6): p. 849-857.
- (204) Kilic M, Kasperczyk H, Fulda S, and Debatin KM (2007) Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. Oncogene, 26(14): p. 2027-2038.
- (205) Zhang Y, Park TS, and Gidday JM (2007) Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 292(6): p. H2573-2581.
- (206) Piret JP, Minet E, Cosse JP, Ninane N, Debacq C, Raes M, and Michiels C (2005) Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. J Biol Chem, 280(10): p. 9336-9344.
- (207) Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, and Wenger RH (2003) *The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy.* Oncogene, 22(21): p. 3213-3220.
- (208) Liston P, Fong WG, and Korneluk RG (2003) *The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2.* Oncogene, 22(53): p. 8568-8580.
- (209) Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ, and Dive C (2004) *Hypoxia-Mediated Down-Regulation of*

Bid and Bax in Tumors Occurs via Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent and -Independent Mechanisms and Contributes to Drug Resistance. Mol Cell Biol, 24(7): p. 2875-2889.

- (210) Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T, and Osaki T (2005) Mechanism of HIF-1alpha-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. Cancer Sci, 96(7): p. 394-402.
- (211) Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN, and Runge MS (1997) *Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells.* J Biol Chem, 272(1): p. 601-608.
- (212) Mizukami Y, Kohgo Y, and Chung DC (2007) *Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis.* Clin Cancer Res, 13(19): p. 5670-5674.
- (213) Koditz J, Nesper J, Wottawa M, Stiehl DP, Camenisch G, Franke C, Myllyharju J, Wenger RH, and Katschinski DM (2007) Oxygen-dependent ATF-4 stability is mediated by the PHD3 oxygen sensor. Blood, 110(10): p. 3610-3617.
- (214) Piret JP, Cosse JP, Ninane N, Raes M, and Michiels C (2006) Hypoxia protects HepG2 cells against etoposide-induced apoptosis via a HIF-1-independent pathway. Exp Cell Res, 312(15): p. 2908-2920.
- (215) Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, and Taylor CT (2006) Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxiainduced NFkappaB activity. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(48): p. 18154-18159.
- (216) Eferl R and Wagner EF (2003) *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.* Nat Rev Cancer, 3(11): p. 859-868.
- (217) Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, and Schumacker PT (2000) Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. J Immunol, 165(2): p. 1013-1021.
- (218) Ahn KS, Sethi G, and Aggarwal BB (2007) *Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic.* Curr Mol Med, 7(7): p. 619-637.
- (219) Torigoe T, Izumi H, Ishiguchi H, Yoshida Y, Tanabe M, Yoshida T, Igarashi T, Niina I, Wakasugi T, Imaizumi T, Momii Y, Kuwano M, and Kohno K (2005) *Cisplatin resistance and transcription factors.* Curr Med Chem Anticancer Agents, 5(1): p. 15-27.
- (220) Igarashi T, Izumi H, Uchiumi T, Nishio K, Arao T, Tanabe M, Uramoto H, Sugio K, Yasumoto K, Sasaguri Y, Wang KY, Otsuji Y, and Kohno K (2007) *Clock and ATF4 transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines.* Oncogene, 26(33): p. 4749-4760.

- (221) Maxwell PJ, Gallagher R, Seaton A, Wilson C, Scullin P, Pettigrew J, Stratford IJ, Williams KJ, Johnston PG, and Waugh DJ (2007) *HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells.* Oncogene, 26(52): p. 7333-7345.
- (222) Pfafflin A, Brodbeck K, Heilig CW, Haring HU, Schleicher ED, and Weigert C (2006) Increased glucose uptake and metabolism in mesangial cells overexpressing glucose transporter 1 increases interleukin-6 and vascular endothelial growth factor production: role of AP-1 and HIF-1alpha. Cell Physiol Biochem, 18(4-5): p. 199-210.
- (223) Grivennikov S and Karin M (2008) Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? Cancer Cell, 13(1): p. 7-9.
- (224) Blay J, White TD, and Hoskin DW (1997) The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. Cancer Res, 57(13): p. 2602-2605.
- Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi PG, Tabrizi MA, and Borea PA (2003) *A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy.* Pharmacol Ther, 100(1): p. 31-48.
- (226) Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, Maclennan S, Baraldi PG, and Borea PA (2007) *Hypoxia inhibits paclitaxel-induced apoptosis through adenosine-mediated phosphorylation of bad in glioblastoma cells.* Mol Pharmacol, 72(1): p. 162-172.
- (227) Lambert IH, Pedersen SF, and Poulsen KA (2006) Activation of PLA2 isoforms by cell swelling and ischaemia/hypoxia. Acta Physiol (Oxf), 187(1-2): p. 75-85.
- (228) Johann AM, Barra V, Kuhn AM, Weigert A, von Knethen A, and Brune B (2007) Apoptotic cells induce arginase II in macrophages, thereby attenuating NO production. Faseb J, 21(11): p. 2704-2712.
- (229) Saed GM, Munkarah AR, Abu-Soud HM, and Diamond MP (2005) Hypoxia upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) levels in human peritoneal fibroblasts. Fertil Steril, 83 Suppl 1: p. 1216-1219.
- (230) Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC, and Paraskeva C (2006) Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. Cancer Res, 66(13): p. 6683-6691.
- (231) Hoang B, Zhu L, Shi Y, Frost P, Yan H, Sharma S, Goodglick L, Dubinett S, and Lichtenstein A (2006) Oncogenic RAS mutations in myeloma cells selectively induce cox-2 expression, which participates in enhanced adhesion to fibronectin and chemoresistance. Blood, 107(11): p. 4484-4490.

- (232) Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, and Dubinett SM (2000) Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. J Immunol, 164(1): p. 361-370.
- (233) Dandekar DS, Lopez M, Carey RI, and Lokeshwar BL (2005) Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. Int J Cancer, 115(3): p. 484-492.
- (234) de Groot DJ, de Vries EG, Groen HJ, and de Jong S (2007) Non-steroidal antiinflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. Crit Rev Oncol Hematol, 61(1): p. 52-69.
- (235) Puhlmann U, Ziemann C, Ruedell G, Vorwerk H, Schaefer D, Langebrake C, Schuermann P, Creutzig U, and Reinhardt D (2005) Impact of the cyclooxygenase system on doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells. J Pharmacol Exp Ther, 312(1): p. 346-354.
- (236) Nardone G, Rocco A, Vaira D, Staibano S, Budillon A, Tatangelo F, Sciulli MG, Perna F, Salvatore G, Di Benedetto M, De Rosa G, and Patrignani P (2004) *Expression of COX-2, mPGE-synthase1, MDR-1 (P-gp), and Bcl-xL: a molecular pathway of H pylori-related gastric carcinogenesis.* J Pathol, 202(3): p. 305-312.
- (237) Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, and Dubinett SM (1998) Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. Cancer Res, 58(6): p. 1208-1216.
- (238) Ferrario A, Fisher AM, Rucker N, and Gomer CJ (2005) *Celecoxib and NS-398* enhance photodynamic therapy by increasing in vitro apoptosis and decreasing in vivo inflammatory and angiogenic factors. Cancer Res, 65(20): p. 9473-9478.
- (239) Hendrickx N, Volanti C, Moens U, Seternes OM, de Witte P, Vandenheede JR, Piette J, and Agostinis P (2003) Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. J Biol Chem, 278(52): p. 52231-52239.
- (240) Spiegel S and Kolesnick R (2002) *Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent.* Leukemia, 16(9): p. 1596-1602.
- (241) Van Brocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, and Prior TW (2005) Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with

glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. J Neuropathol Exp Neurol, 64(8): p. 695-705.

- (242) Karliner JS, Honbo N, Summers K, Gray MO, and Goetzl EJ (2001) The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol, 33(9): p. 1713-1717.
- (243) Tao R, Zhang J, Vessey DA, Honbo N, and Karliner JS (2007) *Deletion of the sphingosine kinase-1 gene influences cell fate during hypoxia and glucose deprivation in adult mouse cardiomyocytes.* Cardiovasc Res, 74(1): p. 56-63.
- (244) Zhang J, Honbo N, Goetzl EJ, Chatterjee K, Karliner JS, and Gray MO (2007) Signals from Type 1 Sphingosine 1-Phosphate Receptors Enhance Adult Mouse Cardiac Myocyte Survival During Hypoxia. Am J Physiol Heart Circ Physiol.
- (245) Taha TA, Osta W, Kozhaya L, Bielawski J, Johnson KR, Gillanders WE, Dbaibo GS, Hannun YA, and Obeid LM (2004) *Down-regulation of sphingosine kinase-1 by DNA damage: dependence on proteases and p53.* J Biol Chem, 279(19): p. 20546-20554.
- (246) Oskouian B and Saba J (2007) Sphingosine-1-phosphate metabolism and intestinal tumorigenesis: lipid signaling strikes again. Cell Cycle, 6(5): p. 522-527.
- (247) Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, and Rosen H (2002) Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science, 296(5566): p. 346-349.
- Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, and Lynch KR (2002) *The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors.* J Biol Chem, 277(24): p. 21453-21457.
- (249) Graler MH and Goetzl EJ (2004) *The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors.* Faseb J, 18(3): p. 551-553.
- (250) Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, Garland WA, Lu Y, Yu S, Hall HS, Kundra V, Mills GB, and Sabbadini RA (2006) Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. Cancer Cell, 9(3): p. 225-238.
- (251) Stover TC, Sharma A, Robertson GP, and Kester M (2005) Systemic delivery of liposomal short-chain ceramide limits solid tumor growth in murine models of breast adenocarcinoma. Clin Cancer Res, 11(9): p. 3465-3474.
- (252) Shabbits JA and Mayer LD (2003) *High ceramide content liposomes with in vivo antitumor activity.* Anticancer Res, 23(5A): p. 3663-3669.

- (253) Krysan K, Reckamp KL, Dalwadi H, Sharma S, Rozengurt E, Dohadwala M, and Dubinett SM (2005) Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor-independent manner. Cancer Res, 65(14): p. 6275-6281.
- (254) Yoon S and Seger R (2006) *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.* Growth Factors, 24(1): p. 21-44.
- (255) Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, and Yellon DM (2005) Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 288(2): p. H971-976.
- (256) Zhao Y, Shen S, Guo J, Chen H, Greenblatt DY, Kleeff J, Liao Q, Chen G, Friess H, and Leung PS (2006) *Mitogen-activated protein kinases and chemoresistance in pancreatic cancer cells.* J Surg Res, 136(2): p. 325-335.
- (257) Lee SM, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, and Yoo CG (2006) Hypoxia confers protection against apoptosis via PI3K/Akt and ERK pathways in lung cancer cells. Cancer Lett, 242(2): p. 231-238.
- (258) Repasky GA, Zhou Y, Morita S, and Der CJ (2007) Ras-mediated intestinal epithelial cell transformation requires cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E2 signaling.
 Mol Carcinog, 46(12): p. 958-970.
- (259) Kim DS, Kim SY, Lee JE, Kwon SB, Joo YH, Youn SW, and Park KC (2003) Sphingosine-1-phosphate-induced ERK activation protects human melanocytes from UVB-induced apoptosis. Arch Pharm Res, 26(9): p. 739-746.
- (260) Costes S, Broca C, Bertrand G, Lajoix AD, Bataille D, Bockaert J, and Dalle S (2006) ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive elementbinding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. Diabetes, 55(8): p. 2220-2230.
- (261) Hetman M and Gozdz A (2004) *Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival.* Eur J Biochem, 271(11): p. 2050-2055.

URL:

http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Ges undheit/Todesursachen/Aktuell.psml (02.01.2008)

Software zur Identifikation von Phosphorylierungsstellen in Proteinen

NetPhos 2.0 - www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/

KinasePhos - http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/

<u>Software zur Identifikation von Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren an der DNA</u> *Genomatix MatInsepctor* – http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector_prof/mat_fam.pl? s=56b4edc7888d837af37af36610515717

7 ANHANG

7.1 Chemikalien

Tabelle 8: Liste der eingesetzten Chemikalien und deren Hersteller

$DiOC_6(3)$	Molecular Probes, Leiden (Niederlande)		
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen		
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (40%, 37,5:1)	Roth GmbH, Karlsruhe		
ATP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim		
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen		
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen		
Odyssesy Blockierungslösung	Rockland Immunochemicals Inc, Gilbertsville (US)		
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen		
Bromphenolblau	Fluka GmbH, Buchs		
Ac-DEVD-AMC	Alexis Biochemicals, Grünberg		
Chloroform	Merk Eurolab GmbH, Darmstadt		
DEPC	Roth GmbH, Karlsruhe		
DMSO	Roth GmbH, Karlsruhe		
DTT	Roth GmbH, Karlsruhe		
DMEM/Ham's F12 (1:1)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe		
Ethanol	Roth GmbH, Karlsruhe		
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen		
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen		
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe		
Glucose	Roth GmbH, Karlsruhe		
Glyzerin	Roth GmbH, Karlsruhe		
Glyzin	Serva GmbH, Heidelberg		
HEPES	Roth GmbH, Karlsruhe		
Isopropanol	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt		
Kaliumchlorid (KCI)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt		
Kaliumcyanid (KCN)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen		
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen		
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt		
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck EuroLab GmbH, Darmstadt		

L-Glutamin PAA Laboratories GmbH, Cölbe Magermilchpulver Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Magnesium chloride (MgCl₂) Roth GmbH, Karlsruhe Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Magnesiumcarbonat-Hydroxid Magnesiumsulfat-Heptahydrat Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Methanol (MeOH) Roth GmbH, Karlsruhe Natriumacetat Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Natriumborat Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Natriumchlorid (NaCl) Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Natriumdithionit Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Natríumflourid (NaF) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Nonidet P-40 ICN Biomedicals GmbH, Eschwege NBD-Sphingosine Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA) Paraformaldehyde (PFA) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Para-Hydroxykumarinsäure Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen PBS (9,55 g/ml) Sigmaaldrich Penicillin / Streptomycin Lösung PAA Laboratories GmbH, Cölbe peaGold RNApure[™] PegLab Biotechnologie GmbH, Erlangen Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix Invitrogen Corp., Carlsbad (USA) UDG poly(dI-dC) Pharmacia, Uppsala (Sweden) Proteaseinhibitormix (PIM) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Saccharose Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Semicarbazid Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Sodium chloride (NaCl) Merck EuroLab GmbH, Darmstadt Staurosporin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen Tetraethylendiamin (TEMED) Roth GmbH, Karlsruhe Roth GmbH, Karlsruhe Tris-HCI Triton X-100 Roth GmbH, Karlsruhe Trizin Roth GmbH, Karlsruhe Tween 20 Roth GmbH, Karlsruhe Wasserstoffperoxid (H₂O₂) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

β-glycerophosphate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
β-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

7.2 Geräte

Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller

Autoklav HV 85	BPW GmbH, Süssen
B250 Sonifier	Branson Ultrasonics, Danbury (USA)
CASY®	Schärfe System, Reutlingen
FACSCanto Durchflusszytometer	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Filmentwicklermaschine Optimax Typ TR	MS Laborgeräte Schroeder OHG,
Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Holten LaminAir Sterilbank	Jouan GmbH, Unterhaching
i-CyclerTMMyiQTM	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
IG 150 (Zellkulturinkubator)	Jouan GmbH, Unterhaching
Magnetrührer Combimag RCH	IKA Labortechnik GmbH & Co. KG,
Mastercycler Thermocycler	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mini-PROTEAN 3 System (SDS-PAGE)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiscan RC Luminometer	Thermo Labsystems, Vantaa (Finnland)
NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Plastikmaterial (Zellkultur)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reinstwasseranlage Purelab Plus	ELGA LabWater GmbH, Siershahn
Ruskin InVivo400	Ruskin Technologies, Leeds, UK
Sub-Cell® GT Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SUPERRX X-Ray Film	Fuji Photo Film Europe GmbH,
Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
Trans-Blot SD Blot-Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifuge 3413 R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf GmbH, Hamburg

PUBLIKATIONSLISTE

2008

<u>Steffen E. Schnitzer</u>, Jie Zhou, Bernhard Brüne (2008) *Hypoxia enhances SphK2 activity and provokes S1P-mediated chemoresistance in A549 lung cancer cells.* (zur Veröffentlichung eingereicht)

2006

<u>Steffen E. Schnitzer</u>, Tobias Schmid, Jie Zhou, Bernhard Brüne (2006) *Hypoxia and HIF-1a protect A549 cells from drug-induced apoptosis.* Cell Death Differ 13: 9. 1611-1613 Sep

Jie Zhou, Tobias Schmid, <u>Steffen E. Schnitzer</u>, Bernhard Brüne (2006) *Tumor hypoxia* and cancer progression. Cancer Lett 237: 1. 10-21 Jun

2005

Melvin Callapina, Jie Zhou, <u>Steffen E. Schnitzer</u>, Eric Metzen, Christian Lohr, Joachim W Deitmer, Bernhard Brüne (2005) *Nitric oxide reverses desferrioxamine- and hypoxia-evoked HIF-1α accumulation--implications for prolyl hydroxylase activity and iron.* Exp Cell Res 306: 1. 274-284 May

<u>Steffen E. Schnitzer</u>, Tobias Schmid, Jie Zhou, Gerhard Eisenbrand, Bernhard Brüne (2005) Inhibition of GSK3β by indirubins restores HIF-1α accumulation under prolonged periods of hypoxia/anoxia. FEBS Lett 579: 2. 529-533 Jan

Posterbeiträge

<u>Steffen E. Schnitzer</u>, Jie Zhou, Bernhard Brüne (2006) Hypoxia and HIF-1α protect A549 cells from drug-induced apoptosis. Gordon Research Conference on Cancer Models & Mechanisms. Smithfield, Rhode Island, USA

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE ANGABEN

Vornamen	Steffen Erik			
Name	Schnitzer			
Geburtsdatum	14.12.1978			
Geburtsort	Germersheim			
Nationalität	deutsch			
Adresse	Eckenheimer Schulstraße 20			
	60435 Frankfurt am Main			
Telefon	(+49) 177 6516372			
eMail	SteffenSchnitzer@web.de			

AKADEMISCHER WERDEGANG

09.1988 – 06.1998	Johann Wolfgang von Goethe-Gymnasium, Germersheim				
06.1998	Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife				
10.1999 – 02.2004	Studium an der Universität Kaiserslautern im Studiengang				
	Diplom-Biologie				
09.2001	Vordiplom im Studienfach Diplom-Biologie				
07.2004 – 02.2005	Diplomarbeit in der Abteilung für Molekulare Zellbiologie (Prof. Dr. Bernhard Brüne) an der Universität Kaiserslautern. <i>Die</i> <i>Bedeutung der Glykogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3β) auf</i> <i>das Akkumulationsverhalten des Hypoxie-induzierten Faktor 1</i> <i>alpha (HIF-1α)</i>				
02.2004	Abschluss des Studiums der Diplom Biologie				
03.2004	Beginn der Promotion am Institut für Molekulare Zellbiologie der				
	Technischen Universität Kaiserslautern (Prof. Dr. Bernhard				
	Brüne)				
11.2004 – 12.2004	Wissenschaftlicher Austausch am Centro Nacional de				
	Investigaciones Cardiovasculares (CNIC, Prof. Dr. Lisardo				
	Bosca), Madrid, Spanien				
seit 06.2005	Fortsetzung der Promotion am Institut für Biochemie I (Prof. Dr.				
	Bernhard Brüne), Klinikum der Goethe-Universität, Frankfurt am				
	Main				
03.2008	Abschluss der Promotion				

BERUFLICHE ERFAHRUNGEN

08.1998 – 09.1999	Zivildienst	im T	nerapiezentrun	n Germershein	n, einem		
	soziotherapeutischen Heim für Suchtkranke						
03.2002 – 05.2002	Wissenscha	ftliche Hil	fskraft am Ins	titut für Pflanzen	physiologie		
	(Prof. Dr.	Ekkehard	Neuhaus) d	er Technischen	Universität		
Kaiserslautern							
11.2002 – 02.2003	Wissenscha	ftliche Hil	fskraft am Ins	titut für Pflanzen	physiologie		
	(Prof. Dr.	Ekkehard	Neuhaus) d	er Technischen	Universität		
Kaiserslautern							

BESONDERE KENNTNISSE

- Fachkunde im Strahlenschutz gemäß StrlSchV für die Fachkundegruppen 2.2 & 4.2
- Fachkunde im Strahlenschutz gemäß RöV für die Tätigkeitsgruppe Nr. 3

SPRACHEN

Englisch

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden. Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter und anderer Autoren habe ich entsprechend gekennzeichnet.

Darüber hinaus erkläre ich, dass ich weder bereits früher ein Promotionsverfahren an einer anderen Hochschule beantragt habe, noch die Dissertationsschrift vollständig oder in Teilen einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt wurde.

Frankfurt a.M., den 7. März 2008

Steffen Schnitzer