Zur Rolle des hypoxischen Tumor-Mikromilieus in anti-angiogener Resistenz

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Steffen Gretser

aus Hildesheim

Gießen 2020

Aus dem Institut für Neuropathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Till Acker

Fachbereich Medizin

der Justus Liebig Universität Giessen

Gutachter: Herr Professor Dr. Till Acker

Gutachter: Frau PD Dr. Sommer

Tag der Disputation: 24.09.2019

1	Inhaltsverzeichnis	
1	Inhaltsverzeichnis	

2 Einleitung	1
2.1 Tumorangiogenese	1
2.1.1 Entdeckung der Tumorangiogenese	1
2.1.2 Arten der Gefäßversorgung von Tumoren	1
2.1.3 Molekulare Reaktionswege der Tumorangiogenese	2
2.2 Anti-angiogene Therapie	4
2.2.1 Entwicklung anti-angiogener Therapie	4
2.2.2 Bedeutung der Rezeptortyrosinkinaseninhibition in anti-angiogener Therapie	5
2.2.3 Resistenz gegen anti-angiogene Therapie	7
2.3 Evasive Resistenz	9
2.3.1 Grundlagen der evasiven Resistenz	9
2.3.2 Entstehung der evasiven Resistenz	10
2.4 Epigenetik	11
2.4.1 Grundlagen der Epigenetik	11
2.4.2 Hypoxie und Epigenetik	12
2.5 Fragestellung	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Materialien	15
3.1.1 Substanzen und Geräte	15
3.1.2 Antikörper	17
3.1.3 Primer	17
3.1.4 Ansätze und Puffer	18
3.2 Methoden	20
3.2.1 Zellisolation	21
3.2.2 Zellkultur	22
3.2.3 Generation der Hypoxielinien	22
3.2.4 Produktion der Lentiviren in HEK293T Zellen	23
3.2.5 Virus Titration	24
3.2.6 Lentivirale Transduktion	24
3.2.7 Zelllyse	24
3.2.8 Western Blot	25

3.2.9 RNA Isolation	25
3.2.10 Reverse Transkription	25
3.2.11 qPCR	26
3.2.12 Kolonieformations-Assay	26
3.2.13 Proliferations-Assay	26
3.2.14 Modified Boyden Chamber Invasion Assay	27
3.2.15 gDNA Isolation & DNA-dot-blot	28
3.2.16 Statistische Auswertung	28
4. Ergebnisse	29
4.1 Auswirkungen anti-angiogener Therapie in vivo	29
4.2 Charakterisierung der reisolierten Tumorzellen	32
4.2.1 Veränderte Reaktion auf Hypoxie	32
4.2.2 Identifikation eines invasiven Phänotyps nach anti-angiogener Therapie	36
4.3 Charakterisierung der Hypoxielinien	39
4.3.1 Parallelen in der Reaktion auf Hypoxie	39
4.3.2 Reproduktion des invasiven Phänotyps durch Hypoxie	43
4.4 Reversion des invasiven Phänotyps durch ein HIF-2α knock-down	47
4.5 Exploration der DNA-Methylierung	49
4.6 Reproduktion des invasiven Phänotyps durch TET1 Überexpression	54
Relative mRNA-Expression	54
5. Diskussion	57
5.1 Mechanismen der evasiven Resistenz	57
5.2 Die Rolle der Hypoxie im Tumorprogress	59
5.3 Die Rolle von TET1 in Tumorhypoxie	60
5.4 Schlussfolgerungen	62
5.5 Klinischer Ausblick	63
6 Anhänge	66
6.1 Zusammenfassung	66
6.2 Summary	68
6.3 Abkürzungsverzeichnis	69
6.4 Literaturverzeichnis	70

6.5 Erklärung	79
6.6 Danksagung	80
6.7 Tabellarischer Lebenslauf	81

2 Einleitung

Im Gegensatz zur Vaskulogenese, die die Neubildung von Gefäßen aus mesodermalen Zellen darstellt, ist die Angiogenese ein Prozess der Gefäßneubildung aus bereits Gefäßen.^{96,97} vorhandenen Stimuliert wird diese Gefäßneubildung durch Wachstumsfaktoren wie den "vascular endothelial growth factor" (VEGF) und den "platelet derived growth factor" (PDGF), die von vielen Zellen sezerniert werden und auch in der Extrazellularmatrix (ECM) gebunden werden können. Ein weiterer wichtiger Stimulationsfaktor ist Hypoxie, also der Mangel an Sauerstoff im Gewebe, der durch Stimulierung von Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF) Angiogenese aulösen kann.⁶⁰ Angiogenese spielt jedoch nicht nur bei physiologischen, sondern auch bei pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel der proliferativen Retinopathie oder der Entstehung von Tumoren, eine entscheidene Rolle.¹²

2.1 Tumorangiogenese

2.1.1 Entdeckung der Tumorangiogenese

Ide et al. waren die Ersten, die 1939 die Hypothese veröffentlichten, dass Tumore Faktoren sezernieren könnten, um Angiogenese zu ihrer Versorgung auszulösen.⁵⁰ 1970 entdeckten Folkman et al. den "tumor-angiogenesis factor", der von Tumoren sekretiert, Gefäßneubildung stimuliert.³⁹ Zu dieser Zeit wurde auch zum ersten Mal die Idee einer anti-angiogenen Therapie von Folkman vorgebracht.⁴⁰ In vielen weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Tumore, ohne Angiogenese auszulösen, nicht größer als 1-2mm wachsen können.^{8,43,41} 1983 wurde der "vascular permeability factor" entdeckt, der 1989 als identisch mit dem neu entdeckten "vascular endothelial growth factor" identifiziert werden sollte.¹⁰³ Dieser Faktor vermittelt über Bindung an Rezeptor-Tyrosinkinasen nicht nur Vaskulogenese, sondern auch Angiogenese.^{10,76,107} Dieser Signalweg ist bis heute einer der Schwerpunkte in der Erforschung neuer anti-angiogener Tumortherapien.

2.1.2 Arten der Gefäßversorgung von Tumoren

Neben der klassischen Art der Tumorangiogenese, in Form von zytokinvermittelter Aussprossung neuer Kapillaren aus bestehenden Gefäßen, existieren für den Tumor auch andere Möglichkeiten, sich mit dem Gefäßsystem des Körpers zu verbinden. Obwohl bereits 1978 Hinweise darauf entdeckt wurden , konnte die "Gefäß co-option"

werden.47,118 Tumorzellen 1999 verifiziert von kleinzelligen erst nicht Lungenkarzinomen können im Sinne der "co-option" entlang vorhandener Gefäße wachsen, ohne dabei neue zu bilden.^{22,92} Dabei können die Gefäße von einigen Tumoren wie zum Beispiel dem Glioblastoma Multiforme (GBM) zu glomeruloiden Knäulen ummodelliert werden, um die Blutversorgung für eine breitere Gewebefläche zu gewährleisten.⁷ Auch ein Teilen von vorhandenen Gefäßen durch einsprießendes Bindegewebe kann durch vom Tumor sekretierte Zytokine ausgelöst werden, um seine Versorgung mit Blut zu maximieren.90,94 Tumore wie das GBM nutzen auch die Möglichkeit, epitheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmarks zu rekrutieren, um Gefäße de novo zu bilden.^{2,20} Einige Tumorzellen wie zum Beispiel Melanomzellen sind sogar in der Lage, blutführende Kanäle unabhängig von Endothelzellen zu bilden. Dieses Phänomen wird Gefäßmimikry bezeichnet.^{38,71} Bei vielen dieser Prozesse sind die genauen molekularen Abläufe nicht völlig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass Zytokine wie PDGF und VEGF eine wichtige Rolle spielen.^{47,7,90,94}

2.1.3 Molekulare Reaktionswege der Tumorangiogenese

Stark wachsende Tumore sind unweigerlich auf Angiogenese angewiesen, da sie nur so während ihres Wachstums konstant mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden können. Studien zeigen, dass Tumorangiogenese das Ergebnis zytokinvermittelter Interaktion zwischen Endothelzellen, Tumorzellen sowie den Tumor infiltrierenden Zellen ist.⁴⁸ Von den vielen pro-angiogenen Wachstumsfaktoren stellten sich die VEGFs als entscheidend für die Tumorangiogenese heraus.¹²¹ Die Familie der VEGFs beinhaltet unter anderen VEGF-A,B,C,D und E.73 Sie sind in der Lage, an 3 verschiedene Rezeptoren, VEGF-Rezeptor 1,2 oder 3 zu binden. Dabei unterscheiden sich die VEGFs in ihrer Affinität zu diesen Rezeptoren.⁷³ Die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 sind für die Vermittlung der Angiogenesekaskade zuständig. Hierbei scheint vor allem der VEGF-Rezeptor 2 die entscheidene Rolle in der Vermittlung der Angiogenese zu spielen.¹²¹ VEGF-Rezeptor 3 ist vor allem in Lymphknoten, sowie Lymphgefäßen lokalisiert. In vielen Tumoren konnte eine verstärkte VEGF-Rezeptor 3 Expression auch unabhängig von lymphatischen Gefäßen gezeigt werden.⁸⁹ Der wichtigste Ligand für den VEGF-Rezeptor 2 ist VEGF-A.³⁶ Über den PI3K-Signalweg wird nach Bindung von VEGF-A an den VEGF-Rezeptor 2 die Gefäßpermeabilität erhöht. Über die p38-MAPKinase sowie über PLC- γ wird die Endothelzellprolifertation sowie Migration vermittelt wird (Abb.1).¹⁹ Der Hauptligand für VEGF-Rezeptor 3 ist das VEGF-C. ⁷³ Ein weiteres entscheidenes Zytokin ist PDGF.¹ PDGF sorgt nach Bindung an seinen Rezeptor für die Rekrutierung glatter Muskelzellen und Perizyten und somit für eine Stabilisierung des neugebildeten Gefäßes.⁵¹



Abbildung 1: VEGFR Signalkaskade, adaptiert nach Takahashi¹¹⁵

In Tumoren wird die Bildung und Freisetzung von VEGF vor allem von den Hypoxieinduzierten Faktoren 1 α und 2 α vermittelt.⁶⁰ HIF-1 α und HIF-2 α sind heterodimärere Transkriptionsfaktoren, die aus zwei Untereinheiten bestehen. Die β -Untereinheit wird konstitutiv produziert. Die α -Untereinheiten hingegen weisen eine sauerstoffabhängige Proteinstabilität auf. In Anwesenheit von Sauerstoff werden sie hydroxyliert, ubiquitiniert und dann protosomal abgebaut.^{49,57} Die Hydoxylierung wird von Enzymen der Familie der Prolyl-Hydroxylase-Domäne (PHD) katalysiert.⁵⁷ Die Ubiquitinierung am entstandenen Hydroxylrest wird von dem Tumorsupressorprotein von-Hippel-LindauEnzym (VHL) durchgeführt.⁵⁷ Eine weitere Hydroxylierung wird durch den "Factor Inhibiting HIF" (FIH) katalysiert und reguliert die Transaktivierungsaktivität der α -Untereinheit.⁵⁷ Unter hypoxischen Bedingungen bleibt die α -Untereinheit stabil und dimerisiert mit der β -Untereinheit.⁶⁴ HIF1 und HIF2 werden dann in den Zellkern transportiert und bewirken als Transkriptionsfaktoren eine Inhibition der Apoptose, induzieren Migration und Invasion, verstärkten anaeroben Metabolismus oder die Sekretion von angiogenen Zytokinen wie VEGF und FGF.^{11,88,120}

Für die Tumorangiogenese ist insbesondere die durch hypoxische Aktivierung verstärkte Produktion von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF verantwortlich. Da Tumore in ihrem Wachstum zwingend auf Angiogenese angewiesen sind, eröffnete die Entschlüsselung der Angiogenesemechanismen neue Möglichkeiten einer zielgerichteten Therapie.

2.2 Anti-angiogene Therapie

2.2.1 Entwicklung anti-angiogener Therapie

Das Prinzip der anti-angiogenen Therapie wurde 1971 von Judah Folkman vorgeschlagen.⁴⁰ 1980 gab es die ersten Versuche mit Interferonen die Angiogenese in Tumoren zu inhibieren, was für einige wenige Tumore auch vielversprechend wirkte.^{56,110} Andere anti-angiogene Substanzen wie TNP-470, ein Pilzgiftanalog oder Protamin, ein aus Spermien isoliertes Protein, zeigten neben ihrer gewünschten Wirkung eine zu starke kumulative Toxizität, sodass sie nicht in der Klinik zum Einsatz kommen konnten.^{62,117} Angiogenesehemmer wie Weitere endogene Angiostatin, Endostatin oder Thrombospondin-1 wurden entdeckt, wodurch auch der Prozess der Tumorangiogenese besser verstanden wurde.⁸⁴ Ferrara et al. isolierten und klonierten 1989 als Erste VEGF.⁶⁶ Da dieses Zytokin eine immense Bedeutung für die Angiogenese besitzt und zudem parakrin von vielen Tumoren sezerniert wird, wurden neutralisierende Antikörper dagegen entwickelt.⁹⁸ Diese Antikörper konnten in Mausmodellen Tumorwachstum signifikant inhibieren.⁵⁸ Der erste für den klinischen Gebrauch zugelassene Antikörper war Bevacizumab, ein humanisierter VEGF-A-Antikörper.93 Die Wirksamkeit dieses Antikörpers wurde in vielen Studien dargestellt, sodass er heute für metastasierte Nierenzellkarzinome, metastasierten Brustkrebs, metastasierte kolorektale Karzinome und metastasierte nicht-kleinzellige Nicht-Plattenepithelkarzinome als Kotherapie zur Standardtherapie zugelassen wurde.^{37,108,116} So konnte mit Bevacizumab eine Gesamtüberlebensverlängerung von 2 Monaten beim nicht-kleinzelligen Nicht-Plattenepithelkarzinom erzielt werden.¹⁷ Auch beim kolorektalen Karzinom konnte mit einer Bevacizumab-Kotheraphie eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von circa 2 Monaten erreicht werden.¹⁸ Beim metastasierten Nierenzellkarzinom konnte eine Verlängerung der progressionsfreien Lebenszeit um circa 5 Monate gezeigt werden, jedoch kein Vorteil in der Überlebensrate.¹¹¹ In den USA ist Bevacizumab auch für das Glioblastoma Multiforme zugelassen, wobei auch hier lediglich die progressionsfreie Überlebenszeit und nicht das Gesamtüberleben verlängert werden konnte.^{33,112} Probleme in der Theraphie mit Bevacizumab sind neben der Resistenzbildung gegenüber dem Medikament auch die Nebenwirkungen. Häufige Nebenwirkungen sind gastrointestinale Perforationen, Wundheilungsstörungen, hypertensive Krisen sowie arterielle Thromben. ^{17,18,111}

Parallel zu der Inhibition von Angiogenese vermittelnden Zytokinen wurde die Blockade ihrer Rezeptoren erforscht. Diese Rezeptoren sind Rezeptor-Tyrosinkinasen und können über sogenannte Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren (RTKI) blockiert werden. Sie bilden die vielversprechendste Substanzklasse neuer anti-angiogener Medikamente.

2.2.2 Bedeutung der Rezeptortyrosinkinaseninhibition in anti-angiogener Therapie Rezeptortyrosinkinasen sind Rezeptoren, die bei Bindung ihres Liganden weitere Rezeptoren oder erste Proteine einer Signalkaskade phosphorylieren und damit aktivieren.¹⁰¹ Viele Wachstumsfaktoren, wie der VEGF-Rezeptor, gehören zu dieser Familie.¹⁰¹ Da in vielen Tumoren die Signalwege der Rezeptor-Tyrosinkinasen überaktiv sind, wurde nach spezifischen Inhibitoren dieser Rezeptoren gesucht. Der erste RTKI war Imatinib, ein spezifischer Inhibitor der Tyrosinkinase Bcr-Abl. Imatinib konnte sehr effektiv gegen chronisch myeloische Leukämie eingesetzt werden, sodass auch die Suche nach RTKI für die Rezeptoren der Angiogenese begann.^{23,24}

Das Hauptziel hierbei war der VEGF-Rezeptor 2, der der wichtigste Rezeptor in der Vermittlung der Angiogenese ist. Es wurden drei verschiedene Arten von Inhibitoren des VEGF-Rezeptores entwickelt.⁴⁴ Typ I bindet an die aktive Kinasedomäne des Rezeptors, während Typ II an die inaktive Kinasedomäne des Rezeptors bindet. Der Typ III bindet kovalent über einen Cysteinrest an die Kinasedomäne und verhindert so dessen

Aktivität.⁴⁴ Unabhängig davon, zu welchem dieser Typen die RTKI gehören, inhibieren sie meist nicht nur den VEGF-Rezeptor, sondern auch andere Rezeptortyrosinkinasen (Abb. 2).



Abbildung 2: Ziele der neuen anti-angiogenen Therapie, adaptiert nach Zhao¹²⁸

Diese RTKIs nennt man deshalb Multityrosinkinaseinhibitoren. Ein RTKI des Typ III Vandetanib inhibiert zum Beispiel nicht nur den VEGF-Rezeptor, sondern auch den epidermal growth factor Rezeptor (EGFR).⁷⁷ Ein Typ II RTKI, Sorafenib, inhibiert ebenso wie Sunitinib, ein RTKI des Typ I, die VEGF-Rezeptoren 1,2,3 und den PDGF-Rezeptor. Die neuen RTKI sind also in der Lage die wichtigsten Rezeptoren der Angiogenese zu inhibieren.⁷⁴ *In vitro* sowie *in vivo* Studien konnten die Wirksamkeit von Sunitinib darstellten.⁸³ Vor allem bei metastasierten Nierenzellkarzinomen sowie weit fortgeschrittenen gastrointerstinalen Stromatumoren zeigte Sunitnib eine signifikante Wirkung, sodass es 2007 zur Therapie zugelassen wurde.^{63,87} Bei metastasiertem Nierenzellkarzinom konnte das progressionsfreie Überleben im Vergleich zu einer Interferon- α Therapie um 6 Monate verlängert werden.⁷⁸ Auch das Gesamtüberleben konnte mit diesem Therapiewechsel um circa 5 Monate verlängert werden.⁷⁹ Die häufigsten Nebenwirkungen, die dabei auftraten, waren Bluthochdruck, Müdigkeit und Druchfall.⁷⁹

Das Problem aller anti-angiogenen Substanzen ist jedoch, dass meist nur eine vorübergehende Stase des Tumorwachstums erzielt wird. In den meisten Fällen beginnt der Tumor nach einiger Zeit des Wachstumsarrests erneut zu wachsen.⁶ Der Grund dafür ist, dass, wie bei allen Tumortherapien, Resistenzen gegen die Substanzen entstehen, was mitunter gravierende Folgen haben kann.

2.2.3 Resistenz gegen anti-angiogene Therapie

Die Entwicklung von Tumorresistenzen auf medikamentöse Behandlung ist ein weitverbreitetes Phänomenen und wird in der Regel auf die genetische Instabilität der Tumorzellen mit Entwicklung resistenter Tumorzellklone zurückgeführt. Da sich die antiangiogene Therapie gegen genetisch stabile Endothelzellen richtet, war man initial davon ausgegangen, dass anti-angiogene Therapien nicht von Resistenzbildung beeinträchtigt werden würden. Es zeigte sich allerdings, dass Tumorzellen verschiedene Mechanismen nutzen, um Resistenzen gegen anti-angiogene Therapien auszubilden. Zum einen besteht die Möglichkeit einer intrinsischen Resistenz, bei der die Tumorzellen bereits vor der Behandlung eine Resistenz gegen anti-angiogene Therapie besitzen. In diesem Fall spricht der Tumor erst gar nicht auf die Therapie an. Zum anderen können Tumorzellen eine adaptive Resistenzstrategie ausbilden.⁶ Bei dieser Form der Resistenzbildung wird nicht wie bei den meisten Arzneimittelresistenzen die Aufnahme vermindert oder der Efflux gesteigert.⁶⁷ Vielmehr bleibt das eigentliche Ziel der Therapie inhibiert und die Tumorzellen finden andere Möglichkeiten ihr Wachstum fortzusetzen.

Für die intrinsische Resistenz von Tumoren gegenüber anti-angiogener Behandlung gibt es verschiedene Erklärungsansätze. VEGF löst nicht nur Angiogenese aus, sondern erhöht auch die Gefäßpermeabilität. Zudem sorgen die stark erhöhten Mengen an proangiogenen Faktoren im Tumormikromilieu für ein sehr chaotisches Gefäßwachstum. Eine Anti-VEGF Behandlung würde demzufolge die Permeabilität der Gefäße wieder herabsetzen und den Gefäßaufbau im Tumor im Ganzen normalisieren, was dem Wachstum des Tumors zu Gute kommt.⁵² In einem Mausmodell wurden in Tumoren, die nicht auf eine anti-angiogene Therapie reagierten, verstärkt myeolide Zellen nachgewiesen, die pro-angiogene Faktoren sezernieren.¹⁰⁹ Ein Vorhandensein solcher Zellen in Tumoren kann also auch eine Resistenz gegen eine anti-angiogene Therapie bewirken. In reich vaskularisierten Organen kann auch unter anti-angiogener Therapie über "co-option" oder über "vascular mimicry" der Tumor weiterhin suffizient mit Blut versorgt werden, was auch ein Therapieversagen erklärt.^{65,25}

Für die adaptive Resistenz gegenüber anti-angiogener Behandlung konnten verschiedene Mechanismen aufgedeckt werden (Abb. 3).



Abbildung 3: Bildung der adaptiven Resistenz, Abbildung adaptiert nach Berger⁶

Ein Mechanismus basiert auf der Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark, um Gefäße *de novo* zu bilden. Du et al. zeigten, dass die Rekrutierung von diesen Progenitorzellen hypoxieabhängig ist, was eine verstärkte Rekrutierung unter antiangiogener Therapie erklären könnte.²⁶ Es konnte auch bereits gezeigt werden, dass gerade unter anti-angioger Behandlung vermehrt endotheliale Progenitorzellen rekrutiert

werden, die neue Blutgefäße bilden und den Tumor trotz anti-angiogener Therapie mit Blut versorgen.¹⁰⁶ Ein weiterer Mechanismus ist die Umstellung auf andere proangiogene Faktoren. Da anti-angiogene Therapie meist gezielt einen pro-angiogenen Signalweg blockiert - wie zum Beispiel Bevacizumab oder Sunitinib den VEGF-A-Signalweg – können Tumorzellen über die verstärkte Sekretion anderer pro-angiogener Faktoren, wie dem "fibroblasts growth factor" (FGF) oder Angiopoetine, nach einer Phase der Wachstumsstase trotz anti-angiogener Therapie erneut Gefäße bilden.¹³ Die verstärkte Sekretion von pro-angiogenen Faktoren konnte bei anti-angiogen behandelten Patienten im Plasma nachgewiesen werden, weshalb dieser Parameter zunächst als ein Biomarker für eine Resistenzbildung gegen die Therapie in Betracht gezogen wurde. Allerdings konnte gezeigt werden, dass in Mäusen, die keinen Tumor besaßen und antiangiogen behandelt wurden, ebenfalls erhöhte Konzentrationen pro-angiogener Faktoren im Plasma festgestellt werden konnten, was zeigt, dass diese Erhöhung eine systemische Antwort auf die Therapie ist und nicht spezifisch als Parameter für die Resistenzbildung des Tumors gesehen werden kann.⁵⁵ Einen weiteren Weg der Resistenzbildung stellt die verstärkte Ummantelung der Gefäße mit Perizyten dar.⁶ Werden zusätzlich zu den Signalwegen der Endothelzellen die Signalwege der Perizyten inhibiert, so ist der Behandlungserfolg größer als bei einfacher Inhibition der endothelialen Signalwege.⁵

Die wohl gravierendste Form der adaptiven Resistenzbildung stellt die evasive Resistenz dar. Dabei findet ein Übergang in einen aggressiveren Phänotypen statt, der stärker infiltrierend wächst und mehr Metastasen bildet.⁶

2.3 Evasive Resistenz

2.3.1 Grundlagen der evasiven Resistenz

Ein Großteil von Tumorpatienten verstirbt nicht an Ihrem Primärtumor, sondern an Metastasen dieses Tumors.²⁸ Metastasen sind Absiedlungen von einzelnen Tumorzellen, die mit dem Blutstrom im Körper verteilt werden und sich zunächst als Mikrometastasen in anderen Organen ansiedeln, bevor sie in einigen Fällen zu Makrometastasen heranwachsen.⁸² Um Metastasen ausbilden zu können, müssen Tumorzellen die Fähigkeit erwerben, invasiv zu wachsen. Eine Reihe von Befunden lässt den Schluss zu, dass Tumore Mechanismen für invasiveres Wachstum unter anti-angiogener Behandlung aktivieren. Glioblastoma Multiforme Zellen wuchsen durch die Behandlung mit Anti-

VEGF-Antikörpern zwar langsamer, führten jedoch verstärkt Gefäß-,,cooption" durch. Sie waren durch die Behandlung invasiver geworden.^{81,99} Die Tumorzellen führten einen Wechsel zu einem aggressiverem Phänotyp durch. Dieser Wechsel findet vermutlich im Rahmen der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) statt. Dabei wechseln Zellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp. Die EMT ist als Programm in den Zellen bekannt, da dieser Wechsel bereits in der Embryonalperiode genutzt wird, um Zellen im Embryo migrieren zu lassen.¹²⁵ Neuere Studien zeigen, dass Zellen nach anti-angiogener Therapie nicht nur invasiver wachsen, sondern dass sich – zumindest im Tiermodell – auch signifikant mehr Metastasen bilden.^{27,86} Pàez-Ribes et al. konnten zeigen, dass Tumorzellen nach spezifischer Inhibition vom VEGF-Rezeptor 2 *in vivo* verstärkt invasiv wachsen. Sie konnten im Mausmodell signifikant mehr Metastasen nach anti-angiogener Therapie beobachten. Der gleiche Effekt konnte durch Behandlung der Mäuse mit Sunitinib reproduziert werden.⁸⁶

Die Blockade des VEGF-Signalweges stellt also eine effektive Methode dar, das Wachstum von Tumoren zu inhibieren. Jedoch führt eben diese Inhibition experimentell zu einem invasiveren Wachstum einiger Tumorzellen, was vermehrte Metastasenbildung zur Folge hat. Hiermit vereinbar wäre, dass die Gesamtüberlebenszeit der Patienten unter anti-angiogener Therapie – mit einigen Ausnahmen – kaum verlängert wird und die Größe des Karzinoms oder die Anzahl der Metastasen bei den Patienten nach einiger Zeit trotz Therapie weiter zunehmen.^{70,95} Wie genau Tumorzellen diesen aggressiveren Phänotyp annehmen, ist jedoch noch nicht bekannt.

2.3.2 Entstehung der evasiven Resistenz

Die verstärkte Metastasierung von Tumoren nach anti-angiogener Therapie stellt einen Risikofaktor beim Einsatz von VEGF-Inhibitoren wie Sunitinib dar. Deshalb gilt es den Mechanismus, der diese Entwicklung auslöst, aufzudecken. Tumorzellen können auf antiangiogene Therapie durch VEGF-Inihbitoren mit verstärkter Sekretion von anderen proangiogenen Faktoren reagieren. Casanovas et al. zeigten, dass diese verstärkte Expression von pro-angiogenen Faktoren eine Ursache der verstärkten Invasivität sein kann, indem sie nach VEGF-Rezeptor-2-Blockade auch den FGF Signalweg blockierten und die Invasion der Zellen eindämmten.¹³ Sie konnten außerdem zeigen, dass durch die Behandlung mit einem VEGF-Rezeptor-2-Inhibitor permanente Veränderungen stattfinden, die nach Absetzten des Inhibitors weiterhin bestehen. Die Zellen produzierten auch nach der Therapie weiterhin vermehrt andere pro-angiogene Faktoren. Sie vermuteten die durch die Behandlung entstandene Hypoxie als Ursache hinter diesen Veränderungen.¹³ Auch Ebos et al. vermuteten Veränderungen im Tumormikromilieu als Triebkraft der verstärkten Metastasierung nach VEGF-Inhibtion.²⁷ Wie allerdings Hypoxie diese Veränderungen verursacht, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden.

2.4 Epigenetik

2.4.1 Grundlagen der Epigenetik

Unter anderem kommt die epigenetische Regulation in Frage, da EMT nicht nur posttranslational, sondern auch epigenetisch reguliert wird, was eine Erklärung für das invasivere Verhalten sein könnte.¹⁰⁴

Unter Epigenetik versteht man den Teil an Erbinformationen, der neben der Basensequenz vererbt werden kann. Die drei Haupttypen der epigenetischen Codierung sind DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und "genomic imprinting".³⁵ 1983 zeigten Gama-Sosa et al., dass die DNA vieler Tumoren hypomethyliert ist.⁴² Vor allem die Cytosin-phophatidyl-Guanin (CpG) Inseln waren in einigen Tumoren im Vergleich zum normalen Gewebe hypomethyliert.³⁴ CpG-Inseln befinden sich meist in Promoter-Regionen. Demethylierung dieser Regionen bewirkt eine Aktivierung des Gens, während Hypermethylierung eine Deaktivierung auslöst.²¹ Auch Hypermethylierungen von CpG-Inseln konnte in vielen Tumoren festgestellt werden.³¹ Es finden also sowohl Hypo- als auch Hypermethylierungen der DNA in Tumoren statt, was zu ihrer Entstehung beitragen kann.²⁹ Die Histone der DNA können ebenfalls vielfältig posttranslational verändert werden. Durch Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung der Histone kann die Chromatinanordnung und damit die Transkription von Genen verändert werden.³ Beim "Genomic imprinting" wird in den Keimzellen entweder die väterliche oder die mütterliche Variante eines Gens durch epigenetische Modifikation wie DNA-Methylierungen inaktiviert.⁴ Fehler im "genomic imprinting" können außerdem Erbkrankheiten, wie das Prader-Willi-Syndrom oder Tumore wie den Wilms Tumor, auslösen.35

Die DNA-Methylierung sowie Demethylierung wird von verschieden Enzymen katalysiert. Für die Methylierung sind die DNA-Methyltransferasen (DNMT) zuständig.⁹

Es gibt drei verschiedene DNMTs: DNMT1, 3a und 3b. DMNT1 ist für den Erhalt der Methylierungen während der Zellteilung verantwortlich, während DNMT3a und 3b für die *de novo* Methylierung zuständig sind.⁹ Eine direkt aktive Form der DNA-Demethylierung konnte noch nicht entdeckt werden. Indirekt kann DNA jedoch durch andere Enzyme demethyliert werden. Die Enzyme, die dazu in der Lage sind, gehören zu der Familie der ten-eleven-translocation 5-methylcytosine dioxygenase (TET). Diese besteht aus drei Enzymen: TET1, TET2 und TET3. Diese Enzyme hydroxylieren Methylcytosin in der DNA, was anschließend zu einer Demethylierung der DNA und somit zu einer Aktivierung der Genexpression führt.^{45,53}

2.4.2 Hypoxie und Epigenetik

Mariani et al. zeigten, dass durch den Hypoxiesignalweg von HIF-1 α der epigenetische Regulator TET1 verstärkt exprimiert wird und die Hypoxieantwort unterstützt (Abb.4).⁷² Die verstärkte Expression von TET1 durch Hypoxie könnte auch die Ursache des durch anti-angiogene Therapie veränderten Phänotypen der Tumorzellen darstellen. Ob diese Signalkaskade wirklich im Zusammenhang mit der evasiven Resistenz auf anti-angiogene Therapie steht, soll unter anderem in dieser Arbeit untersucht werden.



Abbildung 4: Wechselwirkung von Hypoxie und TET1, adaptiert nach Mariani 72

2.5 Fragestellung

Anti-angiogene Therapie stellt eine Form der Therapie dar, die im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie systemisch auf Endothelzellen und somit die Angiogenese abzielt. Durch viele Studien konnte ein Benefit für gewisse Patientenkollektive mittels anti-angiogener Therapie erzielt werden. Aufgrund der genetischen Stabilität von Endothelzellen war man davon ausgegangen, dass es nicht zu einer Resistenzentwicklung gegen anti-angiogene Therpaie kommen würde, wie man sie bei vielen medikamentösen Tumortherapien beobachten kann. Allerdings zeigen verschiedene experimentelle und klinische Befunde, dass auch gegen anti-angiogene Therapie Resistenzen entstehen, die ein Sistieren des Therapieerfolges und damit ein Fortschreiten der Krankheit verursachen.^{70,95} So häufen sich auch Studienergebnisse die nahelegen, dass antiangiogene Therapie aggressiverem Tumorzell-Teilpopulationen zu führen kann.^{16,27,79,86,91} Der Mechanismus hinter der Entstehung dieser aggressiveren Tumor-Teilpopulation ist jedoch weitestgehend unbekannt.

In dieser Arbeit sollte mechanistisch der Zusammenhang zwischen anti-angiogener Therapie und der verstärkten Metastasenbildung nach Ende der Therapie näher aufgeklärt werden. Vor allem sollte dabei auf Veränderungen im Tumor-Mikromilieu und dessen Auswirkungen auf die Tumorzellen eingegangen werden.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde ein *in vivo* Modell etabliert, um die klinische Situation der Therapie im Labor nachzustellen. Dafür wurden zunächst athymischen Mäusen humane Brustkrebszellen transplantiert, wobei eine der Mausgruppen eine antiangiogene Therapie in Form von Sunitinib erhielt und die andere nicht. Nach Ende der Therapie wurden aus den Tumoren der unbehandelten sowie der behandelten Mäuse Zelllinien isoliert. Diese wurden auf Unterschiede in ihrer Reaktion auf Hypoxie und die Entstehung eines invasiveren Phänotypes untersucht.

Parallel wurde ein in vitro Modell etabliert, um die hypoxischen Verhältnisse, die im Tumor unter anti-angiogener Therapie entstehen, nachzustellen. Dazu wurden humane Brustkrebszellen intermittierend beziehungsweise chronisch hypoxisch kultiviert. Etwaige Unterschiede im Protein- und Genexpressionsmuster, die in den Zelllinien aus den *in vivo* Experimenten festgestellt wurden, wurden auch in diesem Modell überprüft, um den Ursprung der Veränderungen mit prolongierter Hypoxie in Verbindung zu bringen. Abschließend wurden die so identifizierten Expressionsmuster in knock-out und Überexpressionslinien eingeführt, um diese Muster als Ursache der verstärkten Invasivität zu belegen.

Es sollte ein mechanistischer Zusammenhang zwischen der Hypoxie im Tumor-Mikromilieu, die in den Tumoren während anti-angiogener Therapie entsteht, und der Entstehung eines invasiveren Phänotyps nach Ende der Therapie gefunden werden. Perspektivisch sollten dadurch neue potentielle Ziele für eine Blockade der evasiven Resistenzbildung gegenüber anti-angiogener Therapie gefunden werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Substanzen und Geräte

Zellisolation	
Substanz	Hersteller
EBSS (1X)	Invitrogen, Carlsbad, USA
HBSS (10X)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Papain	Worthington, Ohio, USA
DNaseI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	Sigma, St. Louis, USA
Collagenase I	Worthington, Ohio, USA
Hyaluronidase	Sigma, St. Louis, USA
Red Blood Cell Lysis Buffer	Roche, Basel, Schweiz

Zellkultur	
Substanz	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	
(1X)	Gibco, Carlsbad, USA
Phosphate Buffed Saline (PBS)	Gibco, Carlsbad, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Carlsbad, USA
0,05% Trypsin-EDTA	Gibco, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Puromycin	Invitrogen, Carlsbad, USA

Western blots	
Substanz	Hersteller
DC Protein Assay Reagent A	Biorad, Hercules, USA
DC Protein Assay Reagent B	Biorad, Hercules, USA
DC Protein Assay Reagent S	Biorad, Hercules, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AppliChem, Darmstadt, GER
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt, GER
PVDF Membran Thermo Scientific	AppliChem, Darmstadt, GER
Western lightening ECL	Thermo Scientific, Waltham, USA
Western lightening ECL-Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, GER
Glycin	Roth, Karlsruhe, GER
SDS Ultra Pure	Roth, Karlsruhe, GER
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, GER
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, GER
Glycerol	Roth, Karlsruhe, GER

Substanz	Herstelller
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt, GER
Methanol Sigma-Aldrich	Sigma, St. Louis, USA
Ethanol Sigma-Aldrich	Sigma, St. Louis, USA
Tween20 AppliChem	AppliChem, Darmstadt, GER
PageRuler prestained protein ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
High range protein ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA

qPCR	
Substanz	Hersteller
Random Hexamers (25nM)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Protector RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Waltham, USA
5x RT-PCR reaction buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
dNTPs (10nM)	Thermo Scientific, Waltham, USA
RNase H	Thermo Scientific, Waltham, USA
Revert Aid H Reverse Transcriptase	Thermo Scientific, Waltham, USA
Absolute SYBR Green ROX mix	Thermo Scientific, Waltham, USA

Kits	
Kit	Hersteller
QIAshredder	Qiagen, Hilden, GER
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden, GER
Blood & Cell Culture Mini Kit	Qiagen, Hilden, GER

Geräte	
Gerät	Hersteller
Steri-Cult CO2-Incubator	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilbank	Thermo Scientific, Waltham, USA
Hypoxie Kammer	Koi Laboratory Products, Tokio, JP
Rotina 420 Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, GER
CASY cell counter	Roche, Basel, Schweiz
Sonoplus	Bandelin, Berlin, GER
TriStar LB941	Berthold Technologies, Bad Wildbad, GER
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Semi-dry blotter	Invitrogen, Carlsbad, USA
CRURIX 60	AGFA Healthcare, Bonn, GER
Nanodrop 2000 Thermo Scientific	Thermo Scientific, Waltham, USA
StepOnePlus	Applied Biosystems, Foster City, USA

Material	
Material	Hersteller
Pipetboy	Integra Biosciences, Zizern, CH
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Kulturplatten	Greiner Bio-one, Kremsmünster,
T	Osterreich
Plastikröhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

3.1.2 Antikörper

Antigen	Hersteller	Produkt-Nr.	Hostspezies	Größe
HIF1a	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA	10006421	rabbit	120 kD
HIF2a	Novus Biologicals, Littleton, USA	NB 100-122	rabbit	120 kD
PHD1	Novus Biologicals, Littleton, USA	NB-100-310	rabbit	45-50 kD
PHD2	Novus Biologicals, Littleton, USA	NB-100- 2219	rabbit	43 kD
PHD3	Novus Biologicals, Littleton, USA	NB-100-303	rabbit	26 kD
Tubulin	Dianova, Hamburg, Deutschland	DLN09992	mouse	57 kD
CA9	Novus Biologicals, Littleton, USA	NB 100-417	rabbit	45-50 kD
TET1	Genetex, Irvine, USA	GTX124207	rabbit	235 kD
5-methyl cytosine	Merck Millipore, Bellerica, USA	MABE146	rabbit	für DNA-dot- blot

3.1.3 Primer

Gen	5'-3' Sequenz
HIF-1α - vorwärts	CGTTCCTTCGATCAGTTGTC
HIF-1α - rückwärts	TCAGTGGTGGCAGTGGTAGT
HIF-2α - vorwärts	GCGGCCGCGGTTTAAAGGGTTTTTTTTGT
HIF-2α - rückwärts	CCGGGGCCAACCAAATAAAAATAATTTCTC
MMP2 - vorwärts	CCCACTGCGGTTTTCTCGAAT
MMP2 - rückwärts	CAAAGGGGTATCCATCGCCAT
MMP9 - vorwärts	CAGTCCACCCTTGTGCTCTT
MMP9 - rückwärts	ATCTCTGCCACCCGAGTGTA
Angiopoetin - vorwärts	CTGGGCGTTTTGTTGTTGGTC
Angiopoetin - rückwärts	TGGTTTGGCATCATAGTGCTG
CA IX - vorwärts	AAGAAGAGGGCTCCCTGAAG
CA IX - rückwärts	TAGCGCCAATGACTCTGGTC
Nanog - vorwärts	GCAGAAGGCCTCAGCACCTA
Nanog - rückwärts	AGGTTCCCAGTCGGGTTCA
Sox2 - vorwärts	GCCGGCGGCAACCAGAAAAACAG
Sox2 - rückwärts	CCGCCGGGGCCGGTATTTAT

Gen	5'-3' Sequenz
Maml3 - vorwärts	CAGCAGGTCAATCAGTTTCAAG
Maml3 - rückwärts	GGTTCTGGGAGGGTCCTATTC
TET1 - vorwärts	CAGAACCTAAACCACCCGTG
TET1 - rückwärts	TGCTTCGTAGCGCCATTGTAA
TET2 - vorwärts	GATAGAACCAACCATGTTGAGGG
TET2 - rückwärts	TGGAGCTTTGTAGCCAGAGGT
DNMT1 - vorwärts	AGAACGGTGCTCATGCTTACA
DNMT1 - rückwärts	CTCTACGGGCTTCACTTCTTG
DNTM3b - vowärts	CCCAGCTCTTACCTTACCATCG
DNMT3b - rückwärts	GGTCCCCTATTCCAAACTCCT
HPRT1 - vorwärts	TATGGCGACCCGCAGCCC
HPRT1 - rückwärts	GCAAGACGTTCAGTCCTGTCCAT

3.1.4 Ansätze und Puffer

10x Running Buffer:	n
Tris	0,500 M
Glycine	3,840 M
SDS	0,390 M
in 2L destilliertem Wasser	

10x Transfer Buffer:	n
Tris Base	0,400 M
Glycine	3,000 M
SDS	0,690 M
in 2L destilliertem Wasser	

Seperating Gel	
H2O	4,650 mL
Lower Buffer	2,600 mL
30% Acrylamid	2,700 mL
10% APS	0,100 mL
TEMED	5,000 µL

Stacking Gel	
H2O	3,050 mL
Upper Buffer	1,030 mL
30% Acrylamid	0,650 mL
10% APS	0,500 mL
TEMED	5,000 µL

Solution I	
HBSS 1	50,000 mL
D-Glucose	2,700 g
HEPES	7,500 mL
in 500mLdestilliertem H2O	
pH = 7.5	

Dissociation Medium I	
Solution I	4,750 mL
Papain-Stock (20u/ml)	0,200 mL
DNaseI (100U/ml)	0,050 mL

Upper Buffer 4x	n
Tris	0,050 M
SDS	0,035 M
in 150mL destilliertem	
Wasser	
pH= 6,8	

Lower Buffer 4x	n
Tris Base 18,17 g	0,150 M
SDS	0,035 M
in 160mL destilliertem	
Wasser	
pH= 8,8	

Dissociation Medium II	
Solution I	100 mL
Collagenase I	70 mg
Hyaluronidase	70 mg
Trypsin	100 mg

3.2 Methoden

Im Vorfeld meiner Versuche wurden von Omelyan Trompak MDA-MB-231 Zellen mit einem Plasmid transduziert, das zum einen das Enzym Renilla-Luciferase und zum anderen ein Fusionsprotein aus der Oxygen-dependent-degradation-domain (ODD) von HIF-2α und dem Enzym Firefly-Luciferase codiert (Abb. 5).



Abbildung 5: Schema des Plasmids

Renilla- und Firefly-Luciferase sind Enzyme, die ihr jeweiliges Substrat (Coelenterazin-H und Firefly-D-Luciferin) unter der Emission von Licht spalten. Diese Zellen wurden orthotopisch in das Mammafettbett von athymischen Nacktmäusen transplantiert. (Versuch-Aktenzeichen: F42/16)



Abbildung 6: Versuchsaufbau des Tierversuchs (Aktenzeichen: F42/16)

Nachdem sich ein sichtbarer Tumor gebildet hatte, wurde die Hälfte der Tiere täglich oral mit Sunitinib 65mg/kG behandelt, während die andere Hälfte Kontrollinjektionen erhielt. In fünf Tagesabständen wurden von den Tieren nach Injektion von Coelenterazin-H oder Firefly-D-Luciferin mit dem In-Vivo-Imaging-System (IVIS) Lumineszentaufnahmen gemacht, um den Tumor und die Sauerstoffverteilung innerhalb des Tumors zu begutachten. Mit dem IVIS lassen sich in vivo Aufnahmen von enzymmarkierten Zellen im Tiermodell machen. Dazu wird dem Tier das Substrat für das entsprechende Enyzm, mit dem die transplatierten Zellen markiert wurden, injiziert. Nach Injektion von Coelenterazin-H geben in unserem Modell sämtliche Tumorzellen ein Lichtsignal ab, wodurch die Tumorzellzahl beurteilt werden kann. Nach Injektion von Firefly-D-Luciferin geben nur die Zellen unter hypoxischen Verhältnissen ein Signal ab, da das Enzym durch die Fusion mit der ODD in Anwesenheit von Sauerstoff abgebaut wird, was eine Beurteilung der Sauerstoffverhältnisse im Tumor zulässt. Dafür wurde abschließend der Quotient aus dem Signal nach Injektion von Coelenterazin-H und Firefly-D-Luciferin gebildet. Nach 15 Tagen Behandlung wurden die Tumore resiziert und Tumorzelllinien aus ihnen isoliert (Abb. 6). 40 Tage nach der Tumorresektion wurden die Tiere euthanasiert und ihre Lungen auf oberflächliche Lungenmetastasen untersucht. Die Zählung der Metastasen erfolgte durch zwei Personen. Die Injektionen, sowie die Tumortransplantationen und Resektionen, wurden von Omelyan Trompak durchgeführt.

3.2.1 Zellisolation

Um zu untersuchen, ob die Tumorzellen nach anti-angiogener Therapie einen stabilen invasiven Phänotyp entwickelten, mussten aus den Tumoren Tumorzelllinien isoliert werden. Für die Isolation wurde ein enzymatisch basierter Ansatz gewählt. Dabei wird die Extrazellularmatrix mittels Enzymen abgebaut und in mehreren Waschschritten entfernt. Die verbleibenden Tumorzellen können anschließend kultiviert werden. Für diesen Ansatz mussten die resezierten Tumore zunächst zwei Mal mit "Phosphate Buffed Saline" (PBS) gewaschen und mit Rasierklingen zerkleinert werden. Zusammen mit 5 ml Dissociation Medium I wurden sie 30 Minuten bei 37°C unter häufigem Mischen inkubiert. Nach 3 Minuten Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen und 5 ml Dissociation Medium II hinzugegeben. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 37°C und 5 Minuten Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen. Um verbleibende Erythrozyten aufzulösen wurde das Pellet in 1 ml Red Blood Cell Lysis Buffer resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM) und 5 Minuten Zentrifugation bei 1000rpm wurde der Überstand verworfen und 5 ml DMEM resuspendiert. Die Suspension wurde durch ein Sieb mit 100 μ m Poren gegeben und noch zwei Mal mit DMEM gewaschen. Danach wurden die Zellen in eine 10 cm Schale ohne den Zusatz von Sunitinib gesät. Bei der weiteren Kultivierung wurde ebenfalls kein Sunitinib mehr verwendet.

3.2.2 Zellkultur

Die Zellen wurden in 10 ml DMEM mit 10% "Fetal Bovine Serum" (FBS) bei 37°C, 21% O₂, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für hypoxische Versuchsbedingungen wurden die Zellen in einer Hypoxiekammer bei 37°C, 1% O₂, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig passagiert und nach spätestens 30 Tagen verworfen. Für das Ansetzen von Versuchen wurden die Zellen mittels Casey gezählt, um identische Zellzahlen zu gewährleisten. Bei der Kultivierung wurde auf Antibiotika verzichtet. Lediglich bei der Kultivierung der knock-down und Überexpression wurden Puromycin und Blasticidin als Selektionsfaktoren eingesetzt.

3.2.3 Generation der Hypoxielinien

Um die hypoxischen Verhältnisse in Tumoren *in vitro* nachzustellen wurden Hypoxielinien generiert.

Dazu wurde die ursprüngliche Zelllinie in drei Populationen gesplittet. Eine Population der Zellen wurde für 30 Tage durchgehend in der Hypoxiekammer kultiviert, um eine chronische Hypoxielinie zu erzeugen, die die Verhältnisse im Tumorzentrum nachstellen sollte. Um eine weitere Zelllinie zu erzeugen, die die Verhältnisse in der Tumorperipherie unter anti-angiogener Therapie nachstellt, wurde eine Schale zwei Tage in Hypoxie und zwei Tage in Normoxie kultiviert. Dadurch sollten die durch Umbauprozesse entstehenden Wechsel zwischen Hypoxie und Normoxie nachgestellt werden. Dieser Zyklus wurde 15 Mal wiederholt. Die Kontrolllinie wurde über die Dauer des Versuches in Normoxie kultiviert (Abb 7). Am Ende der Generierung wurden die Zellen aus der Hypoxiekammer entnommen, zwei Wochen unter Normoxie kultiviert und eingefroren. Mit diesen Zelllinien wurden im Anschluss die Versuche durchgeführt.



Abbildung 7: Ablauf der Generation der Hypoxielinien

3.2.4 Produktion der Lentiviren in HEK293T Zellen

Die Produktion der rekombinanten Lentiviren, die Virustitration und die Transduktion wurden von Omelyan Trompak durchgeführt.

Für die Produktion der Lentiviren wurden humane embryonische Nierenzellen (HEK293T) verwendet. Einen Tag vor der Tranfektion wurden 5 Millionen Zellen in einer 75T Flasche gesäht. Für die Virusproduktion wurden second generation packaging Plasmide (pCIVSVG-Env und psPAX2) genutzt. 25 μ g des Transferplasmids und 12,5 μ g der beiden packaging Plasmide wurden mittels der Kalziumphosphatmethode in die HEK Zellen co-transfiziert. Dafür wurde DNA-Ca-Phosphat durch das Hinzufügen von Hank's buffered saline prezipitiert. Die finale Tansfektionslösung wurde dann zu den Zellen gegeben, die dann für 5 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Um die Transfektionseffektivität zu erhöhen wurde den Zellen zuvor Chloroquin (10 μ M) zugesetzt. Anschließend wurde das Medium erneuert und der virushaltige Überstand 24 und 48 Stunden nach Transfektion gesammelt. Anschließend wurde der Überstand bei 4°C for 4 h bei 20000 rpm zentrifugiert.

Abschließend wurde der jetzt entstandene Überstand verworfen, die Viren in 100-200 µl DMEM resupendiert und bei -80°C gelagert.

3.2.5 Virus Titration

Die humane Glioblastoma multiforme Zellliine G55TL wurde für die Virustitrierung genutzt. Serienverdünnungen der Viruskonzentrate (von 10^{-9} bis 10^{-2}) wurden erzeugt und G55TL Zellen in polybrenehaltigen Medium (6 µg/ml) transduziert. Am Folgetag wurde das Zellkulturmedium erneuert und die Zellen für 5 Tage (bei GFP kodierenden Viren) oder 2-3 Wochen (bei Viren ohne Fluoreszenzmarkierung, unter antiobiotischer Selektion) kultiviert.

Der Titer wurde abschließend durch Zählen von Kolonien geschtätzt.

3.2.6 Lentivirale Transduktion

Für die Transduktion wurden 1000 bis 30.000 Karzinomzellen pro well in einer 96- oder 48- well plate gesäht. Am nächsten Tag wurde das Medium durch die Transduktionlösung, bestehend aus Zellkulturmedium mit Polybrene (6 μ g/ml) und der für die gewünschte multiplicity of infection (MOI) notwendigen Viruskonzentration ausgetauscht. Nach je 24 und 48 Stunden wurde das Medium erneut gegen Zellkulturmedium ausgetauscht und die entsprechenden Selektionsantibiotika zugefügt (Puromycin oder Blasticidin).

3.2.7 Zelllyse

Nach dem für den Versuch gewünschten Behandlungzeitraum wurden die Proben für Western Blots mit 200 μ l Laemmli-Puffer lysiert, 5 Minuten auf 95°C erhitzt, mittels Ultraschall aufgeschlossen und erneut 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Für RNA-Isolation wurden die Zellen mit 400 μ l RLT-Puffer aus dem RNeasy Kit zusammen mit 4 μ l β -Mercaptoethanol lysiert.

3.2.8 Western Blot

Um Proteine zu analysieren, wurden zunächst Gele nach der Zusammensetzung aus 3.1.4 gegossen. Nachdem der Proteingehalt der Proben photometrisch bestimmt wurde, wurden jeweils 50 µg der Probe mit Probenpuffer vorbereitet und mit 90-130 V im Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit einer Spannung von 100 W pro Membran auf PVDF-Membranen geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran mit Waschpuffer mit 5% Milchpulver geblockt und anschließend mit dem jeweiligen Primärantiköper über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran gewaschen und für 1,5 Stunden mit dem passenden Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Membranen mit ECL oder ECL plus inkubiert, um die Proteine sichtbar zu machen. Nach 2 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden in einer Dunkelkammer Fotofilme auf die Membranstücke gelegt und nach definierten Zeiträumen entwickelt.

3.2.9 RNA Isolation

Für eine qPCR musste eine RNA-Isolation aus der Probe vorgenommen werden. Dazu wurde die Probe zunächst mit dem QIAshredder Kit homogenisiert und mittels gDNA-Eliminator Spin Columns aus dem RNeasy Kit die DNA entfernt. Danach wurde die RNA durch Zugabe von Ethanol präzipitiert und in einem weiteren Schritt in RNeasy Spin coulumns gebunden. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA eluiert und photometisch die Konzentration in der Probe bestimmt.

3.2.10 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden zunächst 1 µg RNA auf 11 µl RNAse freies Wasser angepasst und mit einem 1 µl random hexamers versetzt. Die Probe wurde kurz zentrifugiert, 5 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurden 4 µl 5X RT-Reaction Buffer, 2 µl dNTPs und 1 µl RNase Inhibitor zugefügt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Revert Aid H Reverse Transcriptase wurde kurz zentrifugiert, dann 10 Minuten bei Raumtemperatur, eine Stunde bei 42°C und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl RNase H hizugegeben, um das ursprüngliche RNA Template abzubauen. Der Ansatz wurde mit 180µl RNase freiem Wasser verdünnt.

3.2.11 qPCR

Für eine qPCR wurden in jeden Well einer 96-well Platte folgender Ansatz pipettiert:

12,5 μl SYBR (2X) 3,5 μl H2O

- 2,5 µl Forward Primer (1 µM)
- 2,5 µl Reverse Primer (1 µM)
- 4 µl der cDNA Probe aus 3.2.6

Die Proben wurden jeweils als technische Triplets pipettiert. Als "housekeeping gene" wurde hHPRT1 benutzt. Die Auswertung wurde nach der $\delta\delta$ CT-Methode durchgeführt.

3.2.12 Kolonieformations-Assay

Mittels der Fähigkeit der Zelllinien, aus einer Zelle sichtbare Kolonien zu bilden, sollte auf die Stammzelleigenschaften der Zellen geschlossen werden. Die Versuche wurden mit 6 Well Platten durchgeführt, wobei 250 Zellen pro Well ausgesäht wurden. Die Platten wurden anschließend bei 37°C inkubiert, bis sich sichtbare Kolonien formten. Diese wurden mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt.

3.2.13 Proliferations-Assay

Um die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen zu bestimmen, wurden jeweils 10000 Zellen pro Zelllinie in 2 Wells von 6 Well Platten ausgesät. Die Platten wurden weiter bei 37°C inkubiert und nach 2 und 4 Tagen mittels CASEY cell counter ausgezählt. 3.2.14 Modified Boyden Chamber Invasion Assay

Das Modified Boyden Chamber Invasion Assay (MBI) wurde benutzt, um die Invasionfähigkeit von Zelllinien zu testen. Dazu wurde die gewünschte Zellzahl in einer



Abbildung 8: Schema eines Wells für das Invasions assay

Mischung aus DMEM und Matrigel resuspendiert und auf den Filter einer Transwellkammer gegeben (Abb. 8). Dabei wurden pro Zellinie Zellen in zwei Wells ausgesäht.

Matrigel ist ein Sekretionsprodukt einer murinen Sarkom-Zelllinie und ähnelt in seiner Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix von Tumoren. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde in die obere Kammer DMEM mit 1% FBS und in die untere Kammer DMEM mit 10% FBS gegeben, um einen Nährstoffgradienten zu erzeugen. Nach einem Tag Inkubationszeit wurde das Medium in der unteren Kammer durch eine 70% ige Ethanollösung ersetzt. Nach 10 Minuten wurden die Zellen mit PBS rehydriert und nach weiteren 10 Minuten wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Nach einem Waschgang mit PBS für 10 Minuten wurden nun Bilder von den Kammern mit einem Mikroskop gemacht, um die gesamte Zellzahl im Well bestimmen zu können. Anschließend wurde das Medium in der oberen Kammer und das PBS in der unteren Kammer entfernt. Die obere Seite der Membran wurde gereinigt, sodass sich Zellen nur noch auf der Unterseite der Membran befanden. Dies sind die zu Invasion fähigen Zellen.

Die Membran wurde nun abgelöst und auf einen Objektträger aufgebracht. Von den Filtern wurden ebenfalls Bilder mit einem Mikroskop gemacht, um die Zahl der invasiv gewachsenen Zellen zu bestimmen. Für die Auswertung wurde die Zahl der invasiven Zellen durch die Gesamtzellzahl geteilt.

3.2.15 gDNA Isolation & DNA-dot-blot

Um genomische DNA zu isolieren, wurden zunächst die Zellmembranen der Zellen lysiert. Die nun isolierten Zellkerne wurden gemäß des Protokolls aus dem Blood & Cell Culture Kit lysiert. Die freigesetzte DNA wurde nach Bindung in Säulen gewaschen und diese anschließend eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von Ethanol präzipitiert und in TE Puffer gelöst. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch gemessen. 10µg DNA wurde in 10µl TE Buffer gelöst, sodass 1µl dieses Ansatzes als Tropfen auf eine Nitrozellulosemembran gegeben werden konnte. Nach 10 Minuten Trocknung wurde die Membran mit 5% Milch geblockt und es wurde wie in 3.2.4 mit der Zugabe spezieller Primärantikörper, die an methylierte DNA binden, fortgefahren. Der anschließende Ablauf gleicht ebenfalls dem Western Blot aus 3.2.4.

3.2.16 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittwelwert \pm einer Standardtabweichung präsentiert. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm STATISTICA unter der Nutzung des Mann-Whitney-U Tests durchgeführt. Dieser nicht parametrische Test wurde nach Ausschluss einer Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov Tests angewendet. Statistische Signifikanz wurde als p < 0.05 definiert (*P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001).

4. Ergebnisse

4.1 Auswirkungen anti-angiogener Therapie in vivo

Um die Folgen einer anti-angiogenen Therapie *in vivo* zu untersuchen, wurden, wie in 3.2 beschrieben, MDA-MB-231 Zellen orthotopisch athymischen Nacktmäusen transplantiert und nach einer Wachstumsphase von 25 Tagen über 15 Tage täglich mit Sunitinib behandelt (n=18; 9 je Gruppe). Die Behandlung mit Sunitinib führte zu einem signifikant geringeren Tumorvolumen in der Behandlungsgruppe (Abb. 9A). Nach Resektion der Tumore wurden diese gewogen. Hier zeigten die behandelten Tumore ein signifikant niedrigeres Gewicht als die Kontrollgruppe (Abb. 9B). In Querschnitten der resiszierten Tumore zeigten sich nach Sunitinib-Behandlung makroskopisch blassere Tumoren als Hinweis auf eine geringere Vaskularisierung (Abb. 9B)



Abbildung 9: Sunitinib hemmt signifikant das Tumorwachstum und reduziert das Tumorgewicht im *in vivo* Experiment. Tumorvolumen im Verlauf und Tumorgewicht nach Resektion (A & B). (Die Experimente wurden von Omelyan Trompak durchgeführt.) * = p < 0,05; MDA-CO (n = 9); MDA-SU (n = 9).

Im Verlauf des Tierversuchs wurde das Tumorwachstum regelmäßig kontrolliert. Die Quantifizierung der IVIS-Bilder sowie repräsentative IVIS-Bilder sind hier dargestellt

(Abb. 10). Die obere Bildreihe zeigt die Fluoreszenzsignale nach Injektion von Coelenterazin am 10. Behandlungstag.



Abbildung 10: Sunitinib verstärkt die Tumorhypoxie. In vivo Bilder der Fluoreszenzsignale nach Injektion von Renilla- oder Firefly-D-Luciferin an Tag 10 der Sunitinib Behandlung und Quantifikation aller 4 Messzeitpunkte. Gemessen wurde der Quotient aus dem Signal nach Renilla-Luciferin Injektion (Zellzahl) und nach Firefly-D-Luciferin Injektion. (PHD abhängige Hydroxylierungsaktvität, entsprechend einem hypoxischen Milieu). Das Firefly-Signal kann als indirekter Marker für Hypoxie angesehen werden. Aufgetragen sind die Quotienten der beiden Signale, normalisiert auf die MDA-CO Zelllinie. (Die Experimente wurden von Omelyan Trompak durchgeführt.) *** = p < 0,001 ; * = p < 0,05; MDA-CO; n = 9); MDA-SU (n = 9).

Da alle Tumorzellen ein Signal abgeben, ließ sich bereits anhand der Bilder erkennen, dass die Tumore der Kontrollmäuse größer waren. Die Bilder der unteren Reihe zeigen die Mäuse nach Injektion von Firefly-D-Luciferin am Folgetag (Abb. 10). Durch die Fusion der Fireflyluciferase mit der ODD von HIF-2 α gaben nach Firefly-D-Luciferin Injektion nur Zellen mit einer verminderten PHD abhängigen Hydroxylierungsaktvität, wie sie in einem hypoxischen Milieu vorkommt, ein Signal ab. Dies konnte damit als indirekter Marker zum Nachweis hypoxischer Regionen genutzt werden. Auf den Bildern ließ sich erkennen, dass im Gegensatz zu der Coelenterazin Injektion die mit Sunitinib behandelten Mäuse ein deutlich stärkeres Firefly-Signal abgaben. Zur Auswertung wurde der Quotient aus Coelenterazin-Signal und Firefly-Signal gebildet, um das Signal des HIF-Reporterkonstrukts auf die Tumorzellmenge zu normalisieren. Dies ließ Rückschlüsse auf den Anteil von hypoxischen Zellen an der Gesamtzellzahl im Tumor zu. Im Versuch zeigten sich ab dem 10. Behandlungstag signifikant erhöhte Werte in der Gruppe, die mit Sunitinib behandelt wurde, was auf wesentlich sauerstoffärmere Verhältnisse in den Tumoren der Behandlungsgruppe schließen ließ.

Am Endpunkt der Studie (30 Tage nach Tumorresektion) wurden die Lungen der Versuchstiere entnommen und die Anzahl der oberflächlichen Lungenmetastasen bestimmt.



Abbildung 11: Verstärkte Lungenmetastasierung nach der Behandlung mit Sunitinib. Quantifizierung der oberflächlichen Lungenmetastasen mit repräsentativen Bildern der Lungen. (Die Experimente wurden von Omelyan Trompak durchgeführt.) *** = p < 0,001; MDA-CO (n = 9); MDA-SU (n = 9).

In der Gruppe der Mäuse, deren Tumore mit Sunitinib behandelt wurden, zeigte sich eine signifikant höhere Zahl an oberflächlichen Metastasen der Lunge (Abb. 11), was auf Veränderungen hin zu invasiverem, pro-metastatischen Verhalten im Primärtumor schließen ließ. Die Ergebnisse dieses *in vivo* Experimentes zeigten, dass eine antiangiogene Therapie Tumorhypoxie induziert und die Metastasierung erhöht. Um die Mechanismen näher aufzuklären, wurden aus jeweils drei Tumoren der Kontroll- und der Behandlungsgruppe Zelllinien isoliert, um diese anschließend molekularbiologisch zu untersuchen.
4.2 Charakterisierung der reisolierten Tumorzellen

4.2.1 Veränderte Reaktion auf Hypoxie

Da die Ergebnisse der in vivo Experimente zum einen deutlich sauerstoffärmere Verhältnisse in den Tumoren der mit Sunitinib behandelten Mäuse zeigten, sowie zum der einem anderen auf Veränderungen Tumorzellen hin zu stärkeren Metastasierungspotential deuteten, wurden als erstes die Proteinlevel von HIF-1 α und HIF-2α bestimmt (Abb. 12). Die Zelllinien MDA-CO 1,2,3 wurden aus drei verschieden Tumoren aus der Kontrollgruppe isoliert. Die Zelllinien MDA-SU 1,2,3 wurden aus drei Tumoren isoliert, deren Trägertiere mit Sunitinib behandelt wurden. Hierbei zeigten sich erhöhte HIF-1 α Proteinlevel sowohl unter kurzer (18h), als auch langer (72h) Hypoxie. Vor allem ließ sich jedoch eine erhöhte HIF-2a Expression in den MDA-SU Zellen nachweisen (Abb. 12).



Abbildung 12: Erhöhte HIF-1 α und HIF-2 α Protein Level in den reisolierten Zelllinien nach Sunitinibbehandlung (MDA-SU) nach unterschiedlicher Hypoxiezeit. HIF-Western Blot Ergebnisse der MDA-SU Zelllinien nach 18- und 72-stündiger Hypoxie; MDA-CO (n = 3); MDA-SU (n = 3).

Diese erhöhten HIF-2 α Level waren der erste Befund, der auf eine dauerhafte Veränderung der Tumorzellen unter anti-angiogener Therapie hindeutete. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurden Zielproteine von HIF-1 α und HIF-2 α untersucht. Das HIF Zielgen Carboanhydrase 9 (CA IX) war auf Proteinebene in den MDA-SU Linien stark erhöht (Abb. 13A). Eine signifikante Erhöhung von CA IX ließ sich auch auf mRNA Ebene feststellen (Abb. 13B). Auch auf mRNA Ebene fanden sich signifikante Erhöhungen der mRNA von Angiopoetin 1 und der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) (Abb. 13B), die ebenfalls Zielproteine der HIF-Transkriptionsfaktoren darstellen. MMP2

ist zudem ein Enzym, das Extrazellularmatrix spalten kann, den Zellen also invasiveres Wachtstum ermöglichen kann. Diese Befunde ließen den Schluss zu, dass die erhöhten HIF-2α Level auch funktionell zu einer erhöhten Aktivierung HIF-abhängiger Zielgene führte.



Abbildung 13: Verstärkte Expression von HIF-2a Zielgenen in den mit Sunitinib behandelten Tumorzellen (MDA-SU). Western Blot sowie qPCR Ergebnisse für HIF-2a Zielgene, normalisiert auf MDA-CO. Der CA IX Protein Gehalt der reisolierten Zelllinien nach 96 Stunden Hypoxie stellte sich im Western Blot in den MDA-SU Zellen deutlich erhöht dar (A). Die Angiopoetin1, CA IX und MMP2 mRNA Level der reisolierten Zelllinien nach 18h Hypoxie wurden auf die MDA-CO normalisiert. Diese stellten sich ebenfalls als erhöht dar (B). * = p < 0.05; ** = p < 0.01; MDA-CO (n = 3); MDA-SU (n = 3).

Im nächsten Schritt sollte nach Ursachen für die Erhöhung im HIF-2 α Gehalt gesucht werden. HIF-2 α wird vor allem auf Proteinebene, d.h. posttranslational reguliert. Dazu wurden posttranslationale Regulatoren des Abbaus der HIF-2 α -Untereinheit unter hypoxischen Bedingungen untersucht. HIF-1 α und HIF-2 α werden posttranslational von PHDs oder vom FIH hydroxyliert, um dann von dem VHL ubiquitiniert zu werden. Nach der Ubiquitinierung folgt dann der proteasomale Abbau.



Abbildung 14: Reaktiver PHD3 Anstieg im Rahmen der verstärkten HIF-2 α Expression. Western Blot sowie qPCR Ergebnisse für Regulatoren des HIF-2 α Abbaus, normalisiert auf MDA-CO. In den PHD1/2/3 Protein Level der reisolierten Zelllinien (MDA-SU) zeigte sich nach 18h Hypoxie bei PHD3 eine Erhöhung der Expression (A). In den FIH/VHL Protein Leveln der reisolierten Zelllinien zeigten sich nach 18h Hypoxie keine Unterschiede (B). MDA-CO (n = 3); MDA-SU (n = 3).

Es fanden sich keine Unterschiede von PHD1 oder PHD2 in der MDA-CO und MDA-SU Gruppe (Abb. 14A). In der MDA-SU Gruppe zeigte sich jedoch ein starker Anstieg im Proteingehalt von PHD3. Dieser lässt sich durch eine negative Feedback-Schleife im Rahmen des erhöhten HIF-2 α erklären, da dieses direkt über HIFs reguliert wird. Im Gehalt von FIH ließ sich ebenso wie bei VHL kein Unterschied erkennen, der den unterschiedlichen HIF-2 α Gehalt erklären würde (Abb. 14B). Auch der mRNA Gehalt an hypoxia-associated factor HAF, der einen Wechsel von HIF-1 α zu HIF-2 α innerhalb der Zelle auslöst, zeigte keinen signifikanten Unterschied, sodass posttranslationale Faktoren für die verstärkte HIF-2 α Expression in den MDA-SU Zellen ausschieden. Um zu untersuchen, ob die Unterschiede im HIF-2 α Gehalt auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen sind, wurde der mRNA Gehalt der Zellen für HIF-1 α und HIF-2 α bestimmt.



Abbildung 15: Erhöhte HIF-2a mRNA Expression in Sunitinib behandelten Tumorzellen (MDA-SU). qPCR Analyse der HIF-1/2 α mRNA der reisolierten Zelllinien nach 18h Hypoxie normalisiert auf MDA-CO. *** = p < 0,001; MDA-CO (n = 3); MDA-SU (n = 3).

Im HIF-1 α Gehalt zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Beim HIF-2 α Gehalt zeigten sich jedoch signifikant erhöhte mRNA Level in der MDA-SU Gruppe (Abb. 15). Dies legte den Rückschluss nahe, dass die erhöhten HIF-2 α Level auf eine erhöhte HIF-2 α mRNA Experession zurückzuführen waren und die transkriptionelle Hochregulation von HIF-2 α wichtig für den invasiven Phänotyp der MDA-SU Zellen sein könnte.

4.2.2 Identifikation eines invasiven Phänotyps nach anti-angiogener Therapie

Im nächsten Schritt galt es zu untersuchen, ob die Unterschiede im HIF-2α Gehalt Auswirkungen auf das Verhalten der Zellen hatten. Als erstes wurden die Zellen auf Stammzelleigenschaften überprüft und verglichen. Dazu wurden Stammzellmarker in einer qPCR bestimmt und ein Kolonieformationsversuch durchgeführt. Im Kolonieformationsversuch bildeten sich signifikant mehr Kolonien in der MDA-SU Linie (Abb. 16A), was auf verstärkte Stammzelleigenschaften hinweist. Um diese Erkenntnis weiter zu verifizieren, wurden Stammzellmarker mittels qPCR untersucht. Hierbei zeigte sich vor allem im mRNA Gehalt des Markers SOX2 ein signifikanter Unterschied (Abb. 16B). Die Stammzelleigenschaften der MDA-SU Zelllinie könnten einen Faktor bei der



Abbildung 16: Verstärkte Stammzelleigenschaften der mit Sunitinib behandelten Zellen (MDA-SU). Quantifizierung der Kolonien im Kolonieformationsversuch sowie repräsentative Bilder (A). qPCR Ergebnisse zu Nanog und SOX2 als Stammzellmarker, normalisiert auf MDA-CO (B). Die Erhöhung des SOX2 mRNA Gehaltes war ebenfalls als Indikator für verstärkte Stammzelleigenschaften zu werten. * = p < 0.05; ** = p < 0.01; MDA-CO (n = 3); MDA-SU (n = 3).

verstärkten Entstehung von Metastasen darstellen.

Als nächstes wurde die Proliferationsgeschwindigkeit der Zelllinien untersucht. Auch Unterschiede in der Proliferationgeschwindigkeit hätten bei der Entstehung eines aggressiveren Phänotyps eine Rolle spielen können. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der beiden Zelllinien (Abb. 17), sodass dieser Faktor nicht als ursächlich für den invasiveren Phänotyp angenommen werden konnte.



Abbildung 17: Mit Sunitinib behandelte Tumorzellen (MDA-SU) proliferieren nicht schneller als die unbehandelten Kontrollzellen (MDA-CO). Quantifizierung eines Proliferationsassays unter Normoxie, normalisiert auf MDA-CO. MDA-CO (n = 3); MDA-SU (n = 3).

Der letzte und entscheidende Versuch zum Vergleich dieser Zelllinien, war ein Experiment zur Invasionsfähigkeit. Um diese zu evaluieren, wurde ein MBI-Assay durchgeführt. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Invasionsfähigkeit der Zelllinien unter Normoxie (Abb. 18A). Führte man denselben Versuch unter hypoxischen Bedingungen durch, zeigte sich eine signifikant erhöhte Invasivität der MDA-SU Linien. Die MDA-SU Linien war nahezu drei Mal so invasiv wie die MDA-CO Linien. Diese Ergebnisse passten gut zu dem erhöhten HIF-2α Gehalt der MDA-SU Linien unter Hypoxie sowie der verstärkten Metastasenbildung in den *in vivo* Versuchen.



Abbildung 18: Mit Sunitinib behandelte Tumorzellen (MDA-SU) wachsen unter hypoxischen Verhältnissen invasiver als die unbehandelten Kontrollzellen (MDA-CO). Ergebnisse von MBI Assays unter 24 Stunden Normoxie, sowie 24 Stunden Hypoxie, normalisiert auf MDA-CO. Unter normoxischen Bedingungen zeigte sich kein Unterschied zwischen den MDA-SU Zellinien und den Kontrollen (A) Unter Hypoxie stellen sich die MDA-SU Zellinien signifikant invasiver dar (B). * = p < 0,05; MDA-CO (n = 3); MDA-SU (n = 3).

Die bisher dargestellten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass durch die sauerstoffärmeren Verhältnisse in den Tumoren der Mäuse, die mit Sunitinib behandelt wurden, dauerhafte Veränderungen stattgefunden hatten, die auf transkriptioneller Ebene zu vermehrten Expression von HIF-2 α führten. Des Weiteren zeigten diese Zellen einen Phänotyp mit vermehrten Stammzelleigenschaften sowie invasiverem Verhalten. Interessanterweise zeigte sich das invasivere Verhalten der Zellen lediglich unter hypoxischen Verhältnissen. Die Zellen haben sich also in ihrem Verhalten zu Veränderungen im Mikromilieu – in diesem Falle Hypoxie – verändert. Der nächste Schritt war es, diesen Phänotyp *in vitro* zu erzeugen, um seine Entstehung durch Sauerstoffarmut zu belegen. Dazu wurden Hypoxielinien als Modellzelllinien generiert.

4.3 Charakterisierung der Hypoxielinien

4.3.1 Parallelen in der Reaktion auf Hypoxie

Nachdem die Generation der Zelllinien wie in Abbildung 7 gezeigt abgeschlossen war, konnten bereits morphologische Änderungen festgestellt werden. Diese waren selbst nach 2 Wochen dauerhafter Kultivierung unter Normoxie noch vorhanden, sodass direkte Folgen der Hypoxiebehandlung nicht die Ursache sein konnten. Vor allem in Kolonien der Hypoxielinien sind diese morphologischen Veränderungen deutlich zu erkennen (Abb. 19). In der Kontrolllinie (MDA-CO) stellten sich die Zellen mit einer eher



Abbildung 19: Schemadarstellung der Generierung der Hypoxielinien mit repräsentativen Bildern. Dargestellt sind Zellkolonien nach 5 Tagen Wachstum. Während die MDA-CH Linie kaum Unterschiede aufwies, zeigte sich in der MDA-IM Linie ein mesenchymales Zellbild mit weniger Zell-Zell-Kontakten. (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.) epithelialen Morphologie sowie engen Zell-Zell-Kontakten dar. In der Linie, die im Verlauf 15 Zyklen von 48h Hypoxie sowie 48h Reoxygenierung durchlaufen hatte (MDA-IM), zeigte sich ein gegenteiliges Bild. Die Zellen zeigten eine eher mesenchymale Morphologie sowie wesentlich weniger Zell-Zell-Kontakte. Die Zelllinie, die 30 Tage dauerhafter Hypoxie ausgesetzt war, zeigte keine Unterschiede zu der MDA-CO Linie. Die Phänotypänderung war konstant bei der MDA-IM zu beobachten und veränderte sich auch nicht durch das Einfrieren und Auftauen der Zellen.

Der nächste logische Schritt war es, die Hypoxielinien auf ihren HIF-1 α und HIF-2 α Gehalt zu untersuchen. Wie bei den reisolierten Zelllinien aus den *in vivo* Experimenten wurde zunächst der Proteingehalt von HIF-1 α und 2 α unter Normoxie, 18h sowie 96h Hypoxie bestimmt (Abb. 20).



Abbildung 20: Erhöhte HIF-2 α Expression der Zelllinen, die in intermittierender Hypoxie kultiviert wurden (MDA-IM). HIF Western Blot der Hypoxielinien und ihrer Kontrolle nach Normoxie, 18 und 96 Stunden Hypoxie. Die HIF-2 α Protein Level der Zelllinie, die intermittierender Hypoxie ausgesetzt waren, waren gegenüber den Kontrollzellen (MDA-CO) und den Zellen nach chronischer Hypoxiebehandlung (MDA-CH) sowohl nach kurzer, als auch noch verlängerter Hypoxiezeit erhöht. Nach verlängerter Hypoxiezeit bildete diese Linie auch mehr HIF-1 α als die beiden anderen Linien. (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.)

Wie bei den reisolierten Zellinien zeigte sich im HIF-1 α Gehalt ein gemischtes Bild. Unter Normoxie ließ sich kein Unterschied erkennen, wohingegen nach kurzer Hypoxiebehandlung die MDA-CO Linie am meisten HIF-1 α exprimierte. Nach 96h Hypoxie bildete die MDA-IM Linie am meisten HIF-1 α . In der HIF-2 α Expression zeigte sich ein gleichbleibendes Muster. Zu allen drei Zeitpunkten exprimierte die MDA-IM Linie mehr HIF-2 α , als die Kontrolle. Die MDA-CH Linie exprimierte nach 18h Hypoxie mehr HIF-2 α als die Kontrollinie, nach 96h exprimierte sie jedoch am wenigsten HIF-2 α . Dieses HIF-2 α Expressionmuster ließ sich konstant reproduzieren. In Bezug auf die HIF-1 α und 2 α Expression, konnte mit den Hypoxielinien das Verhaltensmuster der reisolierten Zellinien komplett *in vitro* durch intermittierende Hypoxie erzeugt werden.

Auch in der Untersuchung der HIF-1 α und HIF-2 α mRNA zeigte sich das gleiche Bild wie in den reisolierten Zellinien (Abb. 21). Der mRNA Gehalt von HIF-1 α unter Normoxie war in der MDA-IM und der MDA-CH Linie höher als in der Kontrolle. Unter



Abbildung 21: Kultivierung unter intermittierender Hypoxie führt zu erhöhter HIF-2 α mRNA Expression. qPCR Ergebnisse der Hypoxielinien unter Normoxie sowie 96 stündiger Hypoxie, normalisiert auf MDA-CO. Im HIF-2 α mRNA-Gehalt zeigte sich die MDA-IM Linie sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie als am stärksten HIF-2 α mRNA exprimierende Zellinie.

Hypoxie exprimierte die MDA-CO Linie am meisten HIF-1 α mRNA. Die Ergebnisse zu HIF-1 α konnten jedoch nicht sicher reproduziert werden.

Die verstärkte HIF- 2α Produktion der reisolierten MDA-SU Linien konnte sowohl auf Proteinebene, als auch auf auf mRNA Ebene durch intermittierende Hypoxie reproduziert werden. Da die verstärkte HIF- 2α Produktion der Faktor war, der *in vitro* reproduziert werden sollte, wurde für die folgenden Experiment die MDA-IM Linie weiter untersucht.



Abbildung 22: Verstärkte Expression von HIF-2α Zielgenen in den unter intermittierender Hypoxie kultivierten Tumorzellen (MDA-IM). Western Blot sowie qPCR Ergebnisse für HIF-2α Zielgene unter Normoxie und Hypoxie, normalisiert auf MDA-CO. Das CA IX Protein Level der MDA-IM Linie nach 96h Hypoxie war deutlich erhöht (A) (Der CAIX Western Blot wurde von Omelyan Trompak angefertigt). Auf mRNA Ebene waren CAIX und MMP2 sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie erhöht (B). Sie kommt dem durch anti-angiogene Therapie *in vivo* erzeugten Phänotypen am nächsten. Als nächstes mussten wieder HIF-Zielgene untersucht werden (Abb. 22A&B).

In der MDA-IM Linie zeigte sich nach 96h Hypoxie eine vielfach verstärkte Expression von CA IX. Nach 18h Hypoxie sowie Normoxie zeigte sich kein Unterschied. Auf mRNA Ebene ließ sich sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie ein Unterschied in der CA IX mRNA Expression erkennen. Auch MMP2 mRNA wird sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie verstärkt von der MDA-IM Linie exprimiert. Beide Proteine sind HIF-2α Zielproteine.

Durch intermittierende Hypoxie konnte also eine Zelllinie generiert werden, die nicht nur im HIF-2 α Expressionsmuster, sondern auch im Expressionmuster von HIF-2 α Zielgenen der *in vivo* erzeugten Zelllinie ähnelte. Als nächstes galt es zu untersuchen, ob sich ein vergleichbarer Phänotyp, wie in den *in vivo* Experimenten, gebildet hatte.

4.3.2 Reproduktion des invasiven Phänotyps durch Hypoxie

Dazu wurden die Hypoxielinien funktionell auf die selben Aspekte, wie die reisolierten Zellinien, untersucht. Zunächst wurde auch für diese Linien die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt. In der MDA-IM Linie zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Bezug zur Kontrolle (Abb. 23).



Abbildung 23: Intermittierende Hypoxie führt zu keiner Veränderung der Proliferationsgeschwindigkeit. Quantifizierung eines Proliferationsassays unter Normoxie, normalisiert auf MDA-CO.

Wie bei den reisolierten Zelllinien wurden anschließend ein Kolonieformationversuch sowie eine Bestimmung der Stammzellmarker auf mRNA Ebene durchgeführt (Abb. 24A&B). In der direkten Testung der Stammzelleigenschaften im Kolonieformationversuch bildeten sich in der MDA-IM Linie signifikant mehr Kolonien als in der Kontrolle. Bei allen untersuchten Markern für Stammzelleigenschaften zeigte sich ein Anstieg in der MDA-IM Linie.



Abbildung 24: Verstärkte Stammzelleigenschaften der intermittierend Hypoxie exponierten Zellen (MDA-IM). Quantifizierung der Kolonien im Kolonieformationsversuch sowie repräsentative Bilder (A). qPCR Ergebnisse zu SOX2, Nanog und Maml3 als Stammzellmarker, normalisiert auf MDA-CO (B). (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.) * = p < 0,05.

In Bezug auf die Stammzelleigenschaften zeigte die MDA-IM Linie also sowohl in den Markern, als auch in der Kolonienanzahl ähnliche Veränderungen wie die Zelllinie, die *in vivo* mit Sunitinib behandelt wurde. In der MDA-IM Linie konnten in Bezug auf ihre Kontrolle erneut Veränderungen beobachtet werden, die den Veränderungen der Zelllinien aus den *in vivo* Versuchen glichen.

Der wichtigste funktionelle Versuch mit den Hypoxielinien war jedoch die Evaluation ihres invasiven Verhaltens. Dazu wurde, wie bei den reisolierten Zelllinien, ein MBI-Assay durchgeführt (Abb. 25A&B) Unter Normoxie zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der MDA-IM und der Kontrolllinie. Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien. Die *in vitro* erzeugte MDA-IM Zelllinie zeigte, ebenso wie die *in vivo* erzeugte MDA-SU Zelllinie, ein signifikant invasiveres Verhalten.



Abbildung 25: Die repetitive Exposition der Tumorzellen zu intermittierender Hypoxie führt unter hypoxischen Bedingungen zu verstärkter Invasion. Ergebnisse von MBI Assays unter 24 Stunden Normoxie, sowie 24 Stunden Hypoxie, normalisiert auf MDA-CO. Unter Normoxie zeigten sich keine Unterschiede im Invasionsverhalten der beiden Zelllinien (A). Unter Hypoxie zeigte sich die MDA-IM Zelllinie jedoch wesentlich invasiver als die Kontrolllinie (B). (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.) * = p < 0.05;

Durch die im *in vivo* Versuch generierten Zelllinien wurde gezeigt, dass durch antiangiogene Behandlung von Tumoren verstärkt sauerstoffarme Verhältnisse im Tumor entstanden. Diese Sauerstoffarmut sorgte für dauerhafte Veränderungen in den Zellen, die sich durch verstärkte HIF-2 α Expression und einen invasiveren Phänotyp kennzeichnete. Durch die Generierung der Hypoxielinien, die sich durch Kultivierung in Hypoxie auszeichneten, wurden die sauerstoffarmen Verhältnisse aus den *in vivo* Versuchen *in vitro* nachgestellt. Mit diesen Zelllinien konnte ein sehr ähnlicher Phänotyp zu dem nach anti-angiogener Therapie entstandenen Phänotypen generiert werden. Vor allem die Zellen aus intermittierenden Hypoxieverhältnissen zeigten ebenso eine verstärkte HIF-2 α Expression sowie einen invasiveren Phänotypen. Diese Ergebnisse legten wiederholten hypoxischen Stress als Ursache für die Phänotypveränderung hin zu invasiveren und stärker metastasierenden Tumorzellen nahe. Die Frage, die als nächstes geklärt werden musste, war, ob auch wirklich die HIF-2 α Expression die treibende Kraft hinter dieser Veränderung war.

4.4 Reversion des invasiven Phänotyps durch ein HIF-2α knock-down

Um die HIF-2 α Expression als treibende Kraft zu identifizieren, wurde in der Kontrollund in der intermittierenden Hypoxielinie, die als Modell für die Theorie generiert wurden, ein lentivirus-HIF-2 α knock-down eingeführt. Die Generierung der knock-down Linie sowie der Kontrollen wurde von Omelyan Trompak durchgeführt.



Abbildung 26: Erfolgreiche Einführung eines RNAi basierten knock-downs von HIF-2a in der MDA-CO und in der MDA-IM Linie. Western Blot und qPCR Ergebnisse zur HIF-2a Expression in den knock-down Zelllinien, normalisiert auf MDA-CO nsc. Darstellung des knock downs auf mRNA Ebene sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie. (A). In der MDA-IM Linie zeigte sich die erfolgreiche Einführung des knock-downs im HIF-2a Protein Level (B). (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.)

Die MDA-IM Linie zeigte auch nach der Transduktion mit der nonsilencing control (nsc) wesentlich mehr HIF-2 α mRNA Expression, sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie, als die MDA-CO Linie (Abb. 26A). Vergleicht man die MDA-CO nsc mit der MDA-CO HIF-2 α knock-down Linie (shHIF2 α) zeigte sich eine starke Reduktion der HIF-2 α mRNA Expression. Ebenfalls in der MDA-IM Linie zeigte sich eine sehr starke Reduktion der HIF-2 α mRNA Expression. Auf transkriptionaler Ebene war also erfolgreich eine knock-down Linie generiert. Auch auf Proteinebene ließ sich der knock-

down bestätigen (Abb. 26B). Die MDA-IM Linie produzierte nach wie vor mehr HIF-2 α als die MDA-CO Linie. Im Western Blot ließ sich erkennen, dass in der knock-down Zelllinie der MDA-IM Line weniger HIF-2 α vorhanden ist, als in ihrer Kontrolle. In der MDA-CO Linie stellte sich kein Unterschied im HIF-2 α Gehalt dar. Es konnte erfolgreich ein HIF-2 α knock-down in der MDA-IM und seiner Kontrolllinie etabliert werden. Nun musste getestet werden, ob auch in den knock-down Linien der invasivere Phänotyp ausgebildet wird. Dazu wurde erneut ein MBI durchgeführt (Abb. 27).



Abbildung 27: Ein knock-down von HIF-2 α führt zu einer deutlichen Reduktion des invasiven Verhaltens der MDA-IM Zelllinie. Ergebnisses eines MBI Assays nach 24 Stunden Hypoxie, normalisiert auf MDA-CO nsc. Die MDA-IM Linie war invasiver als die MDA-CO Zelllinie. Der HIF-2 α knock-down bewirkte in der MDA-CO Linie keine Änderung der Invasivität. In der MDA-IM Linie bewirkte der knock-down von HIF-2 α einen signifikanten Rückgang der Invasivität. (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.) * = p < 0,05.

Der HIF-2 α knock-down hatte keinerlei Auswirkungen auf die Invasivität der Kontrolllinie. In der MDA-IM Linie hingegen sorgte der HIF-2 α knock-down für eine signifikante Reduktion der Invasivität

Der HIF-2 α knock-down wurde in der MDA-IM Linie eingeführt, um die erhöhte HIF-2 α Expression in der MDA-IM Linie als treibende Kraft hinter dem aggressiveren Phänotypen nach prolongierter Hypoxie und somit nach anti-angiogener Therapie zu identifizieren. Es konnte erfolgreich ein HIF-2 α knock-down etabliert werden, wodurch das invasive Potential der Zellen stark abnahm. Es kam jedoch nicht zu einer völligen Reversion des Effektes, da auch kein vollständiger knock-down erzielt werden konnte. Dennoch zeigten diese Ergebnisse klar, dass die verstärkte HIF-2 α Expression in der MDA-IM und in den MDA-SU Linien die treibende Kraft hinter dem invasiveren Phänotyp darstellte. Der nächste Schritt bestand darin, die Ursachen für die verstärkte HIF-2 α Expression zu suchen.

4.5 Exploration der DNA-Methylierung

Die erhöhte Expression von HIF-2 α war, sowohl in den MDA-SU Linien, als auch in der MDA-IM Linie bereits transkriptional anhand erhöhter HIF-2 α mRNA Level zu erkennen. Eine der möglichen Ursachen für diese transkriptionale Expressionerhöhung stellten epigenetische Regulatoren dar. Im nächsten Versuch sollte getestet werden, ob über epigenetische Regulation im Sinne einer Demethylierung der DNA die Expression von HIF-2 α verändert werden kann. Dazu wurde die ursprüngliche Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (MDA-231) 48 Stunden unter Hypoxie jeweils einmal mit 5-aza-deoxycytidin (AZA) und einmal ohne AZA kultiviert. AZA ist ein Inhibitor von DNA-Methyltransferasen und führt somit zu einer Abnahme der DNA-Methylierung. DNA-Demethylierung führt in der Regel zu einer Aktivierung von Genen. Im DNA-dot-blot konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an methyliertem Cytosin (MeC) in der gesamten DNA durch die Behandlung mit AZA stark abnahm (Abb 28A). Die DNA wurde also demethyliert. Anschließend wurden die Protein- sowie die mRNA-Level von HIF-2 α bestimmt.



Abbildung 28: Der HIF-2 α Gehalt der Ausgangszelllinie steigt mit dem Grad der Demethylierung der DNA. DNA-dot-blot Ergebnisse nach AZA Behandlung. Western Blot und qPCR Ergebnisse unter Hypoxie und AZA Behandlung. Die Behandlung mit AZA bewirkte in den MDA-231 Zellen eine Abnahme von MeC in der gesamten DNA (A). Gleichzeitig kam es bei AZA Behandlung unter Hypoxie zu einem Anstieg von HIF- 2α auf mRNA Ebene sowie der HIF- 2α Protein Level (B & C). (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.)

Durch die Kultivierung mit AZA war ein deutlicher Anstieg in der HIF-2 α Expression der MDA-231 Linie, sowohl auf Protein Ebene, als auch in den mRNA Leveln zu beobachten (Abb. 28B&C). Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die HIF-2 α Expression stark vom Grad der DNA-Methylierung abhing. Mit abnehmender Methylierung der DNA stieg die HIF-2 α Expression. Daraus schlussfolgerten wir, dass in den MDA-IM und MDA-SU Linie bereits eine Demethylierung der DNA stattgefunden hatte, was die permanent erhöhten HIF-2 α Level erklären würde. Um diesem Gedanken nachzugehen, überprüften wir in den reisolierten Zelllinien sowie in den Hypoxielinien die Expression von Enzymen, die die DNA-Methylierung regulieren.

Dazu wurden die mRNA Level von TET1-3 sowie DNMT1 und DNMT3b in den reisolierten Zellinien bestimmt (Abb. 29A&B). Die TETs zu untersuchen war entscheidend, da diese Enzyme Methylgruppen an Cytosinen hydroxylieren, was im Endeffekt zu Demethylierung der Cytosine und damit zu Veränderungen im Genexpressionsmuster führen kann.



Abbildung 29: In den mit Sunitinib behandelten Zellen werden weniger DNA-methylierende (DNMT) bei gleichzeitig mehr DNA-demethylierenden (TET) Enzymen exprimiert. qPCR Ergebnisse der reisolierten Zellinie für TET1-3 und DNMT1 & 3b, normalisiert auf MDA-CO. In den MDA-SU Zellen zeigte sich eine signifikant erhöhte TET1 mRNA Expression, während TET2 und TET3 weniger stark exprimiert wurden (A). DNMT1 sowie DNMT3b wurden auf mRNA Ebene weniger in der MDA-SU Linie exprimiert. (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.) * = p<0,05; MDA-CO (n = 3), MDA-SU (n = 3).

Es zeigte sich, dass TET2 und 3 weniger in den Zellinien exprimiert wurden, die *in vivo* mit Sunitinib behandelt wurden. Bei TET1 hingegen war eine signifikante Steigerung um circa 60% zu beobachten. DNMT1 und 3b regulieren ebenfalls die DNA-Methylierung der Zelle. Diese Enzyme methylieren allerdings die DNA. Diese Enzyme wurden auf mRNA Ebene in der MDA-SU Linien weniger exprimiert.

In der Untersuchung der Regulatoren der DNA-Methylierung zeigte sich also, dass die MDA-SU Linien sowohl verstärkt Enzyme exprimierten, die für Demethylierung der DNA sorgen, als auch vermindert Enzyme exprimierten, die für Methylierung der DNA sorgen. Vor allem TET1 rückte so als Regulator der Veränderung der MDA-SU Zellen in den Vordergrund. Als nächstes musste überprüft werden, ob ein ähnliches Expressionsmuster an Regulatoren der DNA-Methylierung auch in den Hypoxielinien zu finden war, da diese ja die Entstehung der MDA-SU Linien *in vitro* nachstellten.

Im mRNA Gehalt von TET1-3 in den Hypoxielinien zeigte sich ein sehr ähnliches Muster, wie in den reisolierten Zelllinien. TET2 und TET3 zeigten keine signifikanten Veränderungen in ihrer Expression. TET1 hingegen war stark hochreguliert (Abb 30A). Auch DNMT1 zeigte das Muster der reisolierten Zellinien. DNMT3b war in der MDA-IM Linie im Vergleich zur Kontrolllinie erhöht (Abb. 30B). Die Zellinie, die intermittierender Hypoxie ausgesetzt war, zeigte die gleiche erhöhte Expression des DNA demethylierenden TET1.



Abbildung 30: In den MDA-IM Zellen werden ebenfalls weniger DNA-methylierende bei gleichzeitig mehr DNA-demethylierenden Enzymen exprimiert. qPCR Ergebnisse der MDA-IM Zellinie für TET1-3 und DNMT1 & 3b, normalisiert auf MDA-CO. In den MDA-IM Zellen zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von TET1 mRNA (A). Im Hinblick auf die DNA methylierenden Enzyme zeigte sich DNMT1 erniedrigt und DNMT3b etwas erhöht (B) Insgesamt konnte auch hier das Expressionsmuster der Zellen aus dem *in vivo* Experiment in dem *in vitro* Modell reproduziert werden. (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.)

Auch auf Proteinebene ließ sich dieses Muster erkennen. Wie auf mRNA Ebene exprimierten die MDA-IM Linie sowie die MDA-SU Linien mehr TET1, als ihre jeweilige Kontrolle (Abb. 31A&B). Der DNA-dot-blot zeigte, dass in der MDA-IM Linie weniger MeC in der gesamten DNA der MDA-IM Zellen als in der Kontrolle vorlag (Abb. 31 C). Die Veränderungen der Expression von DNA-demethylierenden Enzymen korreliert funktionell mit einer Demethylierung der DNA.



Abbildung 31: Erhöhte TET1 Level in der MDA-IM korrelieren mit einer Abnahme der Methylierung der DNA. Protein Level von TET1 der MDA-SU und MDA-IM Zelllinie, sowie DNA-dot-blot Ergebnisse der MDA-IM Zelllinie. TET1 war auf Protein Ebene sowohl in der MDA-SU als auch in der MDA-IM Linie erhöht (A & B). Der Gehalt von MeC in totaler genomischer DNA war in der MDA-IM Linie im Vergleich zu Kontrolle erniedrigt (C). (31A wurde von Omelyan Trompak angefertigt). MDA-CO(n = 3), MDA-IM (n = 3) in B.

Die Ergebnisse zu den epigenetischen Regulatoren zeigten bisher, dass TET1 in den MDA-SU Linien, wie auch in den MDA-IM Linien, stark erhöht war. Die Auswirkungen dieser Expressionveränderungen konnten anhand der verminderten DNA-Methylierung der Hypoxielinien im DNA-dot-blot dargestellt werden. Zusammen mit den Erkenntnissen aus dem Versuch, in dem mit AZA die DNA-Methylierung blockiert wurde, weisen die Daten darauf hin, dass vor allem die DNA-Demethylierung durch TET1 die Phänotypveränderung hin zu verstärkter HIF-2 α Expression, einhergehend mit einem invasiveren Wachstum, in den MDA-SU Linien und der MDA-IM Linie bewirken könnte. Diese Beziehung galt es nun herauszuarbeiten.

4.6 Reproduktion des invasiven Phänotyps durch TET1 Überexpression

Relative mRNA-Expression

Der beste Nachweis für Rolle von TET1 als zentraler Regulator des Phänotyps wäre die Reversion des Phänotyps beziehungsweise die Inhibition seiner Entstehung durch ein TET1 knock-down gewesen. Obwohl sämtliche kommerziell erwerblichen siRNA sowie shRNA Kontstrukte eingesetzt wurden, gelang es nicht ein TET1 knock-down in den Zellen einzuführen. Daher wurde in der MDA-231 Linie TET1 überexprimiert, um auf diese Weise die zentrale Rolle TET1 zu identifizieren. Die Generation dieser Zelllinien erfolgte, wie die HIF-2 α knock- down Linie, durch Omelyan Trompak. Die Überexpression wurde erneut in der Ausgangszelllinie, MDA-231 eingeführt. Die Kontrollgruppe wurde mit green-fluorescent-protein Die (GFP) transduziert. Überexpressionslinie zeigte einen sehr stark erhöhten TET1 mRNA Gehalt (Abb. 32A). Die Generierung einer Überexpressionslinie war also erfolgreich.



Abbildung 32: TET1 Überexpression in der Ausgangszelllinie führt zu verstäkter HIF-2 α mRNA und MMP9 mRNA Expression. qPCR Ergebnisse zu den Überexpressionlinien nach 96 Stunden Hypoxie normalisiert auf die Kontrolllinie. TET1 wurde auf mRNA Ebene von der Überexpressionlinie verstärkt exprimiert (A). Unter denselben Versuchsbedingungen wurde HIF-2 α sowie dessen Zielprotein MMP9 ebenfalls verstärkt exprimiert (B, C). (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt).

Unter Hypoxie stellte sich eine verstärkte HIF-2 α Expression dar (Abb. 32B). Verstärkte HIF-2 α mRNA Expression war ein Charakteristikum, das auch in den MDA-SU Linien und der MDA-IM Linie hervorstechend war und hier durch TET1 Überexpression reproduziert werden konnte. Ein HIF Zielprotein, MMP9, wird von der TET1 Überexpressionlinie verstärkt exprimiert (Abb. 32C), was als Effekt des erhöhten HIF-2 α Levels gesehen werden kann.



Abbildung 33: TET1 Überexpression führt zu verstärkter Invasion unter hypoxischen Verhältnissen. Ergebnisse eines MBI Assays nach 24 stündiger Hypoxie, normalisiert auf die Kontrolllinie. Unter hypoxischen Bedingungen stellte sich die TET1 Überexpressionslinie siginifkant invasiver als die Kontrolllinie dar. (Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Omelyan Trompak durchgeführt.) * = p < 0.05.

Der letzte und wichtigste Schritt war nun, die Invasivität der TET1 Überexpressionslinien zu testen. Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich ein signifikant erhöhtes invasives Wachstum in den TET1 Überexpressionslinien (Abb. 33). Durch die Überexpression von TET1 konnte also ein sehr ähnlicher Phänotyp zu dem Phänotypen der MDA-SU und MDA-IM Linie generiert werden. Diese Tatsache ließ vermuten, dass eine verstärkte TET1 Expression in Folge intermittierender Hypoxie mit hoher HIF-2 α Expression zu einer Demethylierung der DNA über TET1 führte. Diese Demethylierung sorgte für noch weiter erhöhte HIF-2 α Expression, was zu einem aggressiveren Phänotypen führte und bei den *in vivo* Versuchen mit anti-angiogener Therapie die vermehrte Metastasenbildung erklären könnte.

5. Diskussion

In dieser Arbeit sollte der mechanistische Zusammenhang zwischen evasiver Resistenz und hypoxischen Veränderungen im Tumormikromilieu als Folge anti-angiogener Therapie untersucht werden.

In *in vivo* Experimenten mit tumortransplantierten Mäusen, die mit Sunitinib behandelt wurden, konnten wir ein verstärkt metastasierendes Verhalten der Tumorzellen, bei verstärkter Hypoxie des Tumormikromilieus, feststellen. Aus diesen Tumoren isolierte Zellen zeigten eine deutliche Induktion der HIF Signalwege. In *in vitro* Experimenten konnte in der Ausgangszelllinie durch Exposition mit intermittierender Hypoxie ein ähnlicher Phänotyp mit der charakteristischen Induktion der HIF Signalwege erzeugt werden. Durch ein knock-down Modell konnten wir HIF-2 α als wichtigsten Mediator für die Invasivität dieses Phänotyps identifizieren. Die alleinige Überexpression von TET1, einem DNA demethylierendem Enzym, welches sowohl in der behandelten Zelllinie des *in vivo* Experimentes, als auch in der intermittierender Hypoxie exponierten Zelllinie des *in vitro* Experimentes erhöht war, sorgte ebenfalls für eine Induktion der HIF-2 α

Unsere Befunde weisen darauf hin, dass eine anti-angiogene Therapie durch Hypoxie im Tumormikromilieu eine TET1 vermittelte DNA-Demethylierung bewirkt. Parallel kommt es zur Induktion der HIF Signalwege und damit einhergehend verstärkter Invasivität der Tumorzellen mit Ausbildung evasiver Resistenz.

5.1 Mechanismen der evasiven Resistenz

Die Tatsache, dass Tumore Resistenzen gegen anti-angiogene Therapie ausbilden können, war so nicht erwartet. Anti-angiogene Therapie richtet sich nicht gegen die Tumorzellen selbst, die in ihrer genetischen Instabilität Resistenzmechanismen gegen das Medikament bilden könnten, sondern gegen genetisch stabile Endothelzellen. Die Therapie bewirkt Änderungen im Tumormikromilieu und greift nicht die Zellen direkt an. Dennoch konnte gezeigt werden, dass Tumore unter anti-angiogener Behandlung erneut zu wachsen begannen, die Tumorzellen also Resistenzen entwickeln konnten.

Neben intrinischer Resistenz, also aufgrund individuenspezifischer Variablen, konnte adaptive Resistenz in Tumoren nachgewiesen werden.⁶ Dabei bleibt das eigentliche Ziel der Therapie inhibiert und die Tumorzellen finden Möglichkeiten den Veränderungen im Mikromilieu auszuweichen. Casanovas et al. zeigten, dass nach Inhibition der Angiogenese mittels VEGFR-Antikörper das Tumorwachstum durch die Expression anderer pro-angiogener Faktoren aufrechterhalten werden konnte. In ihren Versuchen inhibierten sie mit einem monoklonalen Antikörper gezielt den VEGFR2 Signalweg, was zu einer initialen Volumenabnahme der subkutan transplantierten Tumorzellen führte, die nach zehn Tagen jedoch durch die Expression von Faktoren der FGF Familie durchbrochen wurde.¹³ Einen anderen Weg der Resistenzbildung zeigten Paez-Ribez et al.. Sie zeigten, dass es sowohl bei der Therapie mit VEGF-Antikörpern, als auch bei der Behandlung mit RTKI wie Sunitinib, in Tumoren im Tiermodell zu verstärkt invasivem Wachstum mit erhöhter Metastasenbildung kommt. Sie nutzten das gleiche Modell von subkutan transplantierten neuroendokrinen pankreatischen Inseltumorzellen wie Casanovas et al.. In ihren Versuchen konnten sie zeigen, dass bereits nach einer Woche der VEGFR2 Inhibition in über 50% der behandelten Tiere die Tumore invasives Verhalten zeigen. Ohne VEGFR2 Blockade lag die Inzidenz bei 6%.⁸⁵ Diese Form der sogenannten evasiven Resistenzbildung ist als besonders problematisch zu betrachten. Sowohl Casanovas et al. als auch Paez-Ribez et al. vermuteten, dass die therapiebedingte Hypoxie Auslöser der Resistenzbildung war. Paez-Ribes al. zeigten et immunhistochemisch, dass unter anti-angiogener Behandlung verstärkt hypoxische Areale im Tumormikromilieu entstanden. Auch wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die anti-angiogene Therapie zwar das Tumorwachstum reduzierte, aber sekundäre Metastasenbildung induzierte. Wir konnten in dieser Arbeit jedoch inbesondere die Dynamik der hypoxischen Veränderungen im Tumormikromilieu unter anti-angiogener Therapie mittels IVIS verfolgen und den Zusammenhang zwischen der Inhibition der Angiogenese durch Sunitinib und der Induktion der HIF Signalwege darstellen.

Mit dem IVIS wurde in einigen Arbeiten die Wirksamkeit von Sunitinib gezeigt.^{61,75} In dieser Arbeit hingegen wurde mit dem IVIS neben der Wirksamkeit Sunitinibs die im Tumormikromileu entstehende Hypoxie unter der anti-angiogenen Therapie *in vivo* dargestellt. Mit einem dualen Luciferase Reportersystem, in dem die ODD von HIF-2 α genutzt wurde, um die PHD Aktivität und damit Hypoxie zu detektieren, konnten wir zeigen, dass während der gesamten Behandlung hypoxische Verhältnisse im Tumormikromilieu herrschten. Dies stellte im Gegensatz zu dem üblichen Vorgehen, bei dem die Hypoxie in postmortal angefertigten histologischen Schnitten dargestellt wird, den gesamten und dynamischen Verlauf der hypoxische Veränderungen im

Tumormikromilieu unter anti-angiogener Therapie dar. Einen Beweis dafür, dass die Hypoxie auch die Ursache der Resistenz darstellte, bringt diese Untersuchung jedoch noch nicht.

5.2 Die Rolle der Hypoxie im Tumorprogress

Hypoxie entsteht im Tumormikromileu solider Tumoren nahezu unausweichlich, da das Gefäßwachstum nicht mit dem Wachstum der Tumorzellen Schritt halten kann. Ein hypoxisches Mikromilieu bewirkt in Tumoren jedoch Veränderungen in der Angiogenese, dem Zellmetabolismus sowie die Invasivität der Tumorzellen.⁴⁶ Bei vielen dieser Veränderungen konnten die HIFs als essentiell herausgestellt werden.¹⁰⁵ Die verstärkte Invasivität basiert neben vermehrter Epithelialer-Mesenchymaler-Transistion (EMT) auch auf erhöhter Expression von Enyzmen, die die Extrazellularmatirx verändern können, wie zum Beispiel MMPs.⁶⁹ Jing et al. zeigten, dass Ösophaguskarzinomzellen während der Exposition zu Hypoxie vermehrt MMP produzierten und invasiver wuchsen.⁵⁴ Vor allem HIF-1 α schien für die verstärkte Expression von MMPs sowie vermehrter EMT verantwortlich zu sein.^{54,80} Shah et. al zeigten jedoch, dass für die Tumorzellen neben HIF-1 α ebenso HIF-2 α notwendig ist, um den hypoxischen Veränderungen im Mikromilieu zu begegnen.¹⁰⁵

In dieser Arbeit konnten wir in den MDA-SU Zelllinien, die durch anti-angiogene Therapie verstärkter Hypoxie ausgesetzt waren, ähnliche Veränderungen darstellen. Die Reaktion auf Hypoxie im Tumormikromilieu war in den MDA-SU Zelllinien verstärkt und blieb dies auch nach der Isolation der Zellen. Bei jeder erneuten Exposition zu Hypoxie reagierten die behandelten Tumorzellen mit stärkerer HIF-2 α Produktion und Invasion als die unbehandelten Kontrollzellen, was auf eine Sensibilisierung der Tumorzellen auf hypoxische Reize deutete. In den MDA-SU Zelllinien hatte sich nach anti-angiogener Therapie ein in seiner Hypoxieantwort veränderter Phänotyp ausgebildet. Bemerkenswert war vor allen Dingen, dass Phänotyp stabil war, sich also nicht durch normoxische Kultivierung abschwächte. Ursache dieses Phänotypwechsels hätte direkte Folge der Sunitinibbehandlung der Tiere oder indirekte Folge des hypoxischen Tumormikromilieus sein können.

Sakai et al. erzeugten *in vitro* durch Kultivierung mit zunehmenden Konzentrationen von Sunitinib sunitinibresistente Zellen eines Nierenzellkarzinoms. Anschließend wurden diese Zellen Mäusen subkutan transplantiert. Die sunitinibresistenten Tumorzellen zeigten im Vergleich zu ihren Kontrollen keinerlei Unterschiede im Wachstum, was sich auch nach der Administration von Sunitinib nicht änderte.¹⁰⁰ Die Phänotypänderung, die in den reisolierten MDA-SU Zellen beobachtet werden konnte, wurde also wahrscheinlich nicht direkt durch Sunitinib ausgelöst. Vielmehr rückten die therapiebedingten hypoxischen Veränderungen im Tumormikromilieu in den Fokus. Widmer et al. zeigten in Melanomzellen einen Phänotypenwechsel hin zu invasiverem Verhalten. Sie zeigten, dass die Zellen durch hypoxische HIF-1a Signalwegaktivierung zu einem aggressivem Phänotypen wechselten.¹²⁴ In diesen Sinne wollten wir nun den Phänotypwechsel nach Sunitinibtherapie in der MDA-SU Zelllinie auf die Hypoxie im Tumormikromilieu zurückführen. In der vorliegenden Arbeit wurde postuliert, dass antiangiogene Therapie vor allem zu chronischer beziehungsweise intermittierender Hypoxie innerhalb des Tumormikromilieus führte. Um zu untersuchen, ob Hypoxie der maßgebliche Auslöser der Phänotypveränderung nach anti-angiogener Therapie war, setzten wir Tumorzellen über 15 Zyklen intermittierender Hypoxie aus. Dabei bildete diese Zellen, die intermittierender Hypoxie ausgesetzt waren, einen stabilen Phänotyp aus, der nahezu identisch zu dem invasivem Phänotypen der MDA-SU Zelllinien war. Die MDA-IM Linie zeigte sich ebenfalls in ihrer Hypoxieantwort dauerhaft verändert. Hierbei war wie in den MDA-SU Zelllinien – anders als bei Widmer et al. – vor allem die HIF-2a Expression hochreguliert. Die Entstehung des invasiven Phänotypen aus dem in vivo Experiment konnte in vitro allein durch die Kultivierung der Tumorzellen Hypoxie reproduziert werden. Es konnte anders als bei Widmer et al. ein Phänotypwechsel durch Hypoxie beobachtet werden der zu einer dauerhaften Induktion HIF-2a und zu einer stabilen Sensibilisierung der Zellen auf sekundäre hypoxische Reize führt. Um die Ursache der verstärkten Invasivität des in dieser Arbeit präsentierten Phänotypen aufzudecken, wurde in der MDA-IM Zelllinie ein HIF-2a knock down eingeführt. Durch den knock down ließ sich die Invasivität des Phänotyps unterdrücken, sodass wir HIF-2a als zentralen Mediator des invasiven Phänotypen nach intermittierender Hypoxie beziehungsweise anti-angiogener Therapie identifizieren konnten.

5.3 Die Rolle von TET1 in Tumorhypoxie

Neben Mutationen in der DNA von Tumorzellen spielen epigenetische Veränderungen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren sowie bei der Aufrechterhaltung des Tumorprogresses.³⁵ Vor allem Abweichungen in der Methylierung von Promotoren der Onkogene oder Tumorsuppressorgenen sind ein Charakteristikum vieler Tumore. Auch in Brustkrebszellen konnten einige solcher Veränderungen gefunden werden.¹¹⁴ Da in der vorliegenden Arbeit posttranslationale Ursachen für die phänotypspezifischen Veränderungen in der HIF-2 α Expression ausgeschlossen werden konnten, rückte die Regulation über den Grad der DNA-Methylierung in den Fokus. Wir konnten zeigen, dass in unseren Zelllinien die HIF-2 α Expression vom Grad der DNA-Demethylierung abhängig war. Eine Inhibtion der DNA-Methylierung in der ursprünglichen Brusttumorzelllinie bewirkte eine verstärkte Expression von HIF-2 α .

Koslowski et al. konnten in Kolonkarzinomzellen zeigen, dass HIF-1 α nach Demethylierung des HIF-1 α -Promotors an seinen eigenen Promotor binden kann und somit die eigene Expression verstärkt.⁵⁹ Liu et al. zeigten in Leberkarzinomzellen, dass durch hypoxische Expression von HIF-1 α verstärkt Methionin-adenosyltransferase 2A (MAT2A) exprimiert wird, was zu einer Demethylierung der DNA und einer Induktion der HIF-1 α Expression führt.⁶⁸ Diese Ergebnisse legen nahe, dass Hypoxie über epigenetische Demethylierung eine Verstärkung der Hypoxieantwort bewirken kann. Allerdings wurde dies hauptsächlich für HIF-1 α und nicht für HIF-2 α gezeigt. Mariani et al. zeigten zudem in Neuroblastomzellen, dass HIF-1 α Expression zu verstärkter TET1 Produktion führte. Dadurch wurde DNA demethyliert und HIF-1 α verstärkt exprimiert. Die Ergebnisse dieser Studien legten eine mögliche Autoinduktion der Hypoxieantwort durch epigenetische Regulation nahe.

Daher untersuchten wir, ob anti-angiogene Therapie beziehungsweise intermittierende Hypoxie über Veränderung der DNA-Metyhlierung zu der Induktion des stabilen Phänotyps führte. Dazu untersuchten wir Regulatoren der DNA-Methylierung sowie Demethylierung in den MDA-SU Zelllinien sowie in der MDA-IM Zelllinie. Dabei fiel vor allem die Überexpression von demethylierenden TET1 in beiden Linien auf. In der MDA-IM Zelllinie konnte auch gezeigt werden, dass die gesamte genomische DNA der Tumorzellen weniger methyliert als die ihrer Kontrolllinie war.

Epigenetische Regulation könnte für die Veränderungen in der HIF-2 α Expression und damit für die Entstehung des invasiven Phänotyps ursächlich sein. Über den Zusammenhang von TET1 und HIF-2 α gibt es allerdings sehr wenige Studien. Wang et al. konnten zwar zeigen, dass TET1 HIF-2 α stabilisiert, beschrieben dies allerdings

unabhängig von der enzymatischen und damit demethylierdenden Aktivität von TET1.¹²³ Tsai et al. zeigten jedoch in Lungenkarzinomzellen, dass durch HIF-2 α TET1 stärker exprimiert wird. Durch Überexpression von HIF-2 α exprimierten die Zellen verstärkt TET1, während ein HIF-2 α knock-down eine verminderte TET1 Expression bewirkte.¹¹⁹ Inwiefern HIF-2 α wiederum von der TET1 Expression abhängig ist, und ob es eine Möglichkeit der Autoinduktion im Sinne der Arbeit von Koslowski et al. geben könnte, stellten sie nicht dar.⁵⁹ Um der Abhängigkeit von HIF-2 α zur TET1 Expression nachzugehen führten wir eine TET1 Überexpression in der ursprünglichen Brustkrebszelllinie ein. Die Zelllinie mit der TET1 Überexpression exprimierte unter Hypoxie verstärkt HIF-2 α sowie MMPs. Im Invasionsassay zeigte sich diese Zelllinie auch invasiver als ihre Kontrolle. Neben intermittierender Hypoxie konnte der invasive Phänotyp also auch durch TET1 Überexpression erzeugt werden. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass TET1 als zentraler Mediator an der Entstehung des invasiven Phänotyps und der stabilen Sensibilisierung auf sekundäre hypoxische beteiligt ist.

5.4 Schlussfolgerungen

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass Sunitinib zwar das Tumorwachstum suffizient inhibiert, jedoch zu verstärkter Metastasenbildung führt. In den mit Sunitinib behandelten Tumorzellen konnten wir einen durch Hypoxie generierten, invasiven Phänotyp nachweisen, bei dem wir HIF-2 α als Hauptmediator der Invasivität identifizierten. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass der epigenetische Regulator TET1 maßgeblich an der Entstehung dieses Phänotyps beteiligt ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine hypoxieabhängige Autoinduktion von HIF-2 α über TET1 nahe. In Anbetracht der Ergebnisse von Liu et al. sowie Tsai et al. könnte TET1 abhängige DNA-Demethylierung dabei eine entscheidende Rolle dabei spielen.^{68,119}

Die Schlussfolgerungen aus unseren Untersuchungen lassen sich in folgendem Modell zusammenfassen (Abb. 34): Anti-angiogene Therapie verursacht verstärkt hypoxische Verhältnisse im Tumor. In den hypoxischen Zellen kommt es zu einer Hochregulation von HIF-2 α . Dieses bewirkt eine verstärkte Expression von TET1, was eine DNA-Demethylierung und somit eine dauerhafte Veränderung des Genexpressionsmusters katalysiert. Die Folge der DNA-Demethylierung ist unter anderem eine verstärkte Expression von HIF-2 α , was zu einer Sensibilisierung der Tumorzellen auf sukzessive hypoxische Reize und zu einem aggressiveren Verhalten der Tumorzellen führt. Dadurch wächst der Tumor invasiver und es können sich mehr Metastasen bilden.



Abbildung 34: Möglicher Ablauf der Entstehung des aggressiveren Phänotypes nach antiangiogener Therapie

Um den genauen Ablauf der Entstehung des Phänotyps zu identifizieren, müsste die Generierung der Hyopxielinien sowohl mit einem HIF- 2α , als auch mit einem TET1 knock-down wiederholt werden. Die Generierung eines TET1 knock-down gestaltete sich jedoch als extrem schwierig. Obwohl wir alle kommerziell erhältlichen siRNA sowie shRNA Kontrukte einsetzten, ließ sich kein suffizienter knock-down in den Brustkrebsszellen Des Weiteren die generieren. wäre Identifikation des Methylierungszustands des HIF-2a Promotors in den MDA-SU Zelllinien sowie in den MDA-IM Zelllinien wichtig, um zu zeigen, dass eine Demethylierung dem Mechanismus zu Grunde liegt.

5.5 Klinischer Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren einige Optimierungsansätze anti-angiogener Therapie mit Sunitinib und ähnlich wirkender Agenzien. Zum einen die Inhibition des maßgeblichen Mediators des Mechanismus HIF- 2α sowie die Inhibition der TET1 vermittelten DNA-Demethylierung.

Die bisherige Forschung konzentrierte sich überwiegend auf die HIF-1 α Inhibtion.¹²⁶ Seit 2016 befinden sich jedoch HIF-2 α Inhibitoren in präklinischen Testungen und erweisen sich *in vivo* Modellen mit stark HIF-2 α abhängigen Tumoren, wie zum Beispiel des klarzelligen Nierenzellkarzinoms, als äußerst wirksam.^{15,122} Mit Hilfe dieser Inhibitoren könnte in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit versucht werden, die Entstehung der evasiven Resistenz zu verhindern. Versuche zu einer Ko-Therapie von Sunitinib und den neuen HIF-2 α Inhibitoren müssten durchgeführt werden, um einen möglichen Einsatz in der Klinik zu überprüfen.

Ein zweiter Ansatz zur Optimierung anti-angiogener Therapie, den die Ergebnisse dieser Arbeit nahelegen, ist die Inhibition der DNA-Demethylierung. Bereits 1994 wurde die Idee der Tumortherapie durch Inhibitoren epigenetischer Vorgänge diskutiert.¹¹³ Im Vergleich zu somatischen Mutationen in der DNA sind epigenetische Veränderungen durch Inhibitoren reversibel. Einige Erfolge konnten im Hinblick auf diese Therapieform bereits erzielt werden. AZA ist seit 2004 für die Therapie einiger maligner Erkrankungen des blutbildenden Systems unter bestimmten Voraussetzungen zugelassen.³² Auch die Wirksamkeit von Inhibitoren Histon-modifizierender Enzyme ist zur Zeit Gegenstand von Studien.¹⁴ Für TET existieren bis auf Metabolite mutierter Enzyme keine Inhibitoren.¹⁰² Sollten solche Inhibitoren entdeckt werden, könnte durch eine Ko-Therapie mit einem RTKI eventuell die Resistenzbildung verhindert beziehungsweise die Ansprechrate auf anti-angiogene Therapie erhöht werden.

Ein weiterer Ansatz, den diese Arbeit impliziert, ist die Verwendung von TET1 beziehungsweise DNA-Methylierungsstellen als Prognosefaktor. Epigenetische Komponenten der Tumorenstehung werden bereits als Prognosefaktoren für Anprechraten auf Chemotherapien und das Gesamtüberleben verwendet. Bei Patienten mit Glioblastoma multiforme wird ein epigenestisches Screening durchgeführt. Dabei wird der Methylierungsstatus eines Enzympromotors (MGMT) überprüft. Ist dieser methyliert, haben die Patienten statistisch gesehen ein verlängertes Gesamtüberleben.¹²⁷ Ebenso kann über den Methylierungsstatus des MGMT Promotors die Ansprechrate auf eine Chemotherapie abgeschätzt werden. Ist der Promotor methyliert, sprechen Patienten besser auf die Chemotherapie an.³⁰

In diesem Sinne könnte auch bei Patienten, die für eine Behandlung mit einem RTKI wie Sunitinib in Frage kommen, ein Screening auf TET1 Expression oder den Methylierungsstatus des HIF-2 α Gens in ihren Tumoren stattfinden. Beides könnte somit als Prognosefaktor für einen Therapieerfolg des RTKI, beziehungsweise zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung, dienen.

6 Anhänge

6.1 Zusammenfassung

Anti-angiogene Tumortherapie konnte in vielen Studien bereits als eine äußerst wirksame Therapieform dargestellt werden und hat bereits Einzug in den klinischen Alltag gehalten. Widererwartend findet auch bei dieser Therapieform, die Tumorzellen nicht direkt angreift, eine Resistenzbildung statt. Eine klinische Herausforderung ist die evasive Resistenz, die sich durch verstärkte Metastasenbildung auszeichnet. Ziel dieser Arbeit war es, dem Mechanismus dieser evasiven Resistenzbildung nachzugehen, um etwaige Therapieansätze verbessern zu können und das Risiko der Resistenzbildung zu minimieren.

Dazu wurden *in vivo* Mäuse, die einen humanen Brustkrebstumor trugen, anti-angiogen mit Sunitinib behandelt und nach Ende der Therapie die Tumorzellen isoliert. Während der Therapie wurde mittels IVIS die Ausprägung der Hypoxie in den Tumoren gemessen. Parallel dazu wurde *in vitro* die gleiche Brustkrebszelllinie wechselnden Zuständen der Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung (intermittierende Hypoxie) ausgesetzt. Beide Zelllinien wurden anschließend molekularbiologisch mittels Western Blot, quantitativer PCR und Zellkulturassays charakterisiert.

Im Einklang mit den vorherigen Studien entwickelten die anti-angiogen behandelten Mäuse signifikant mehr Metastasen. Kongruent dazu zeigten die Tumorzellen, die aus behandelten Tumoren reisoliert wurden, einen invasiveren Phänotyp. Er zeichnete sich vor allem durch die verstärkte Expression von HIF-2 α , die vermehrte Invasion im modifiziertem Boyden-Chamber-Assay und einem erhöhtem Tumorstammzell-Phänotyp aus. In Analysen der IVIS-Aufnahmen zeigten sich verstärkt hypoxische Zustände in den behandelten Tumoren. Passend dazu konnte ein analoger Phänotyp in dem *in vitro* erzeugten Modell ausschließlich durch intermittierende Hypoxie nachgestellt werden. Durch ein knock-down von HIF-2 α mittels shRNA konnte HIF-2 α als treibende Kraft der verstärkten Invasivität herausgestellt werden. Nach Analysen der Schlüsselenzyme der DNA-Demethylierung wurde in einem Überexpressionsmodell TET1 als möglicher Auslöser des Phänotypwechsels identifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Hypoxie im Tumormikromilieu, ausgelöst durch anti-angiogene Therapie, mittels TET1 vermittelter DNA-Demethylierung und verstärkter HIF-2α Expression einen Phänotypwechsel in den Tumorzellen auslöst und somit die Grundlage zur Resistenzbildung schafft. Eine Inhibition dieses Phänotypwechsels könnte die Resistenzbildung auf anti-angiogene Therapie vermindern sowie die klinische Ansprechraten erhöhen.
6.2 Summary

Several studies proved anti-angiogenic therapy to be effective against several types of cancer and it already found its way into clinical practice. Although this therapy does not target tumor cells directly, tumors develop anti-angiogenic resistances. In particular the evasive resistance, which is characterized by the increased formation of metastases, is clinically challenging. The aim of this work was to investigate the mechanism of the evasive resistance to further improve anti-angiogenic therapy and counteract the development of resistance.

For this purpose, nude mice with human breast carcinoma xenograft, recived antiangiogenic treatment with Sunitinib. During the treatment the animals were imaged using the IVIS to monitor the development of hypoxia. Following the therapy tumor cells were isolated for cell culture. In parallel the same breast carcinoma cell line was exposed to repeated cycles of hypoxia and re-oxygenation (intermittent hypoxia). Both lines were extensively characterized using Western blot, quantitative PCR and cell culture assays.

In line with previous studies anti-angiogenic treated mice suffered from increased metastasis formation. Importantly, isolated tumorcells from treated animals presented a more invasive phenotype. The phenotype was characterized by the increased expression of HIF-2 α , enhanced invasion in the modified Boyden-Chamber-Assay and increased cancer stem cell phenotype. The IVIS-imaging proved that anti-angiogenic treated tumors exhibited increased hypoxia. Interestingly, an analogous phenotype was reproduced in cell lines exposed to intermittent hypoxia. Mechanistically, using a knock down of HIF-2 α via shRNA, we could show that HIF-2 α is responsible for the increased invasive behavior of tumor cells. Following the analysis of key enzymes involved in DNA-methylation we could identify TET1 as a possible regulator of the phenotypic switch triggered by anti-angiogenic treatment or intermittent hypoxia.

The results of this thesis suggest that hypoxia in the tumormicroenviroment, which is caused by anti-angiogenic therapy, leads to a phenotypic switch caused by increased DNA-demethylation and HIF-2 α expression. From a therapeutic point of view, the inhibition of this switch could be an interesting avenue to to mitigate evasive resistance and improve the therapeutic outcome of anti.angiogenic therapy.

6.3 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
AZA	5-aza-deoxycytidin
CAIX	Carboanhydrase 9
CpG	Cytosin-phophatidyl-Guanin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMT	DNA-Methyltransferase
ECM	Extrazellularmatrix
EGFR	Epidermal growth factor Rezeptor
EMT	Epitheliale-mesenchymale-Transition
FGF	Fibroblasts growth factor
FIH	Factor inhibiting HIF
GBM	Glioblastoma Multiforme
HIFs	Hypoxie-induzierten Faktoren
IVIS	In-Vivo-Imaging-System
MAT2A	Methionin-adenosyltransferase 2A
MBI	Modified Boyden Chamber Invasion Assay
MDA-CH	Zellinie nach 30-tägiger Hypoxie
MDA-CO	Isolierte Zellen aus der Kontrollgruppe des
	In Vivo Experiments / Kontrollinie der Hypoxielinien
MDA-IM	Zellinie nach intermittierender Hypoxie
MDA-MB-231	Brustkrebszelllinie MDA-MB-231
MDA-SU	Isolierte Zellen aus der Behandlungsgruppergruppe
McC	des In Vivo Experiments
MeC	Methyliertes Cytosin
MMP	Matrix-Metalloproteinase
nsc	Nonsilencing control
ODD	Oxygen-dependent-degradation-domain
PBS	Phosphate Buffed Saline
PDGF	platelet derived growth factor
PHD	Prolyl-Hydroxylase-Domäne
RTKI	Rezeptor-Tyrosinkinase-Iinhibitoren
shHIF2α	HIF-2a knock-down
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TET	Ten-eleven-translocation 5-methylcytosine dioxygenase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau-Enzym

6.4 Literaturverzeichnis

- 1. Andrae, J. Gallini, R. & Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine, *Genes & development* 22, 1276–1312 (2008).
- Asahara, T. & Kawamoto, A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis, *American journal of physiology. Cell physiology* 287, C572-9 (2004).
- 3. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications, *Cell research* **21**, 381–395 (2011).
- 4. Bartolomei, M. S. & Ferguson-Smith, A. C. Mammalian genomic imprinting, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3** (2011).
- 5. Bergers, G. Song, S. Meyer-Morse, N. Bergsland, E. & Hanahan, D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors, *J. Clin. Invest.* **111**, 1287–1295 (2003).
- 6. Bergers, G. & Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy, *Nature reviews. Cancer* **8**, 592–603 (2008).
- 7. **Brat, D. J. &** Van Meir, E G. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research, *Am J Pathol* **158**, 789–796 (2001).
- 8. Brem, S. Brem, H. Folkman, J. Finkelstein, D. & Patz, A. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous, *Cancer research* 36, 2807–2812 (1976).
- 9. Brocato, J. & Costa, M. Basic mechanics of DNA methylation and the unique landscape of the DNA methylome in metal-induced carcinogenesis, *Critical reviews in toxicology* **43**, 493–514 (2013).
- 10. Carmeliet, P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele, *Nature* **380**, 435–439 (1996).
- 11. Carmeliet, P. *et al.* Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis, *Nature* **394**, 485–490 (1998).
- 12. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature* **473**, 298–307 (2011).
- 13. Casanovas, O. Hicklin, D. J. Bergers, G. & Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors, *Cancer cell* 8, 299–309 (2005).
- 14. Chen, Q. W. Zhu, X. Y. Li, Y. Y. & Meng, Z. Q. Epigenetic regulation and cancer (review), *Oncology reports* **31**, 523–532 (2014).
- 15. Chen, W. *et al.* Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist, *Nature* **539**, 112–117 (2016).
- 16. Chow, Laura Q M & Eckhardt, S. G. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy, *J Clin Oncol* 25, 884–896 (2007).

- 17. Cohen, M. H. Gootenberg, J. Keegan, P. & Pazdur, R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer, *The oncologist* 12, 713–718 (2007).
- Cohen, M. H. Gootenberg, J. Keegan, P. & Pazdur, R. FDA drug approval summary: bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer, *The oncologist* 12, 356–361 (2007).
- 19. Cross, M. J. Dixelius, J. Matsumoto, T. & Claesson-Welsh, L. VEGF-receptor signal transduction, *Trends in Biochemical Sciences* 28, 488–494 (2003).
- 20. **Davidoff, A. M.** *et al.* Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice, *Clin Cancer Res* **7**, 2870–2879 (2001).
- 21. Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription, *Genes & development* 25, 1010–1022 (2011).
- 22. **Donnem, T.** *et al.* Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment?, *Cancer medicine* **2**, 427–436 (2013).
- 23. **Druker, B. J.** *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells, *Nature medicine* **2**, 561–566 (1996).
- 24. **Druker, B. J.** *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* **344**, 1031–1037 (2001).
- 25. Dunleavey, J. M. & Dudley, A. C. Vascular Mimicry: Concepts and Implications for Anti-Angiogenic Therapy, *Current angiogenesis* 1, 133–138 (2012).
- 26. **Du**, **R**. *et al*. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion, *Cancer cell* **13**, 206–220 (2008).
- 27. Ebos, John M L *et al*. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis, *Cancer cell* **15**, 232–239 (2009).
- 28. Efferth. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (Review), *Int J Oncol* **34** (2009).
- 29. Ehrlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little, *Oncogene* 21, 5400–5413 (2002).
- 30. Esteller, M. *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents, *N Engl J Med* **343**, 1350–1354 (2000).
- 31. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future, *Oncogene* **21**, 5427–5440 (2002).
- Estey, E. H. Epigenetics in clinical practice. The examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia, *Leukemia* 27, 1803–1812 (2013).

- 33. Genentech, Inc. Prescribing Invformation for Avastin (bevacizumab). Reference ID: 4190806
- 34. Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts, *Nature* **301**, 89–92 (1983).
- 35. Feinberg, A. P. & Tycko, B. The history of cancer epigenetics, *Nature reviews*. *Cancer* **4**, 143–153 (2004).
- 36. Ferrara, N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth, *European cytokine network* **20**, 158–163 (2009).
- 37. Ferrara, N. From the discovery of vascular endothelial growth factor to the introduction of avastin in clinical trials - an interview with Napoleone Ferrara by Domenico Ribatti, *The International journal of developmental biology* 55, 383–388 (2011).
- 38. Folberg, R. & Maniotis, A. J. Vasculogenic mimicry, *APMIS* 112, 508–525 (2004).
- Folkman, J. Merler, E. Abernathy, C. & Williams, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis, *The Journal of experimental medicine* 133, 275–288 (1971).
- 40. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N Engl J Med* **285**, 1182–1186 (1971).
- 41. Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J Natl Cancer Inst* 82, 4–6 (1990).
- 42. Gama-Sosa, M. A. *et al.* The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors, *Nucleic acids research* **11**, 6883–6894 (1983).
- 43. Gimbrone, M. A. Leapman, S. B. Cotran, R. S. & Folkman, J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization, *The Journal of experimental medicine* **136**, 261–276 (1972).
- 44. Gotink, K. J. & Verheul, Henk M W. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?, *Angiogenesis* 13, 1–14 (2010).
- 45. Grosser, C. Wagner, N. Grothaus, K. & Horsthemke, B. Altering TET dioxygenase levels within physiological range affects DNA methylation dynamics of HEK293 cells, *Epigenetics* **10**, 819–833 (2015).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144, 646–674 (2011).
- 47. Holash, J. *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF, *Science* 284, 1994–1998 (1999).
- 48. Hotfilder, M. Nowak-Gottl, U. & Wolff, J. E. Tumorangiogenesis: a network of cytokines, *Klinische Padiatrie* 209, 265–270 (1997).
- 49. Huang, L. E. Gu, J. Schau, M. & Bunn, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7987–7992 (1998).

- 50. Ide, A. G. Baker, N. H. & Warren, S. L. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chambers. *AJR*, 891–899 (1939).
- 51. Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation, *Nature medicine* **9**, 685–693 (2003).
- 52. Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy, *Science* **307**, 58–62 (2005).
- 53. Jin, C. *et al.* TET1 is a maintenance DNA demethylase that prevents methylation spreading in differentiated cells, *Nucleic acids research* **42**, 6956–6971 (2014).
- 54. **Jing, S.-W.** *et al.* HIF-1alpha contributes to hypoxia-induced invasion and metastasis of esophageal carcinoma via inhibiting E-cadherin and promoting MMP-2 expression, *Acta medica Okayama* **66**, 399–407 (2012).
- 55. John M. L. Ebos, Christina R. Lee *et al.* Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 17069–17074.
- 56. Kaban, L. B. *et al.* Antiangiogenic therapy of a recurrent giant cell tumor of the mandible with interferon alfa-2a, *Pediatrics* **103**, 1145–1149 (1999).
- 57. Kaelin, W. G. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway, *Molecular cell* **30**, 393–402 (2008).
- 58. Kim, K. J. *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo, *Nature* **362**, 841–844 (1993).
- 59. Koslowski, M. Luxemburger, U. Tureci, O. & Sahin, U. Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1alpha, *Oncogene* **30**, 876–882 (2011).
- 60. Krock, B. L. Skuli, N. & Simon, M. C. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil, *Genes & cancer* 2, 1117–1133 (2011).
- 61. Kumar, Ram Mohan Ram, Arlt, M. J. Kuzmanov, A. Born, W. & Fuchs, B. Sunitinib malate (SU-11248) reduces tumour burden and lung metastasis in an intratibial human xenograft osteosarcoma mouse model, *American journal of cancer research* **5**, 2156–2168 (2015).
- 62. Kusaka, M. *et al.* Cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470), *Br J Cancer* **69**, 212–216 (1994).
- 63. Le Tourneau, C. Raymond, E. & Faivre, S. Sunitinib: a novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST), *Therapeutics and clinical risk management* **3**, 341–348 (2007).
- 64. Lee, K. *et al.* Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization, *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17910–17915 (2009).

- 65. Leenders, William P J *et al.* Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option, *Clin Cancer Res* **10**, 6222–6230 (2004).
- 66. Leung, D. W. Cachianes, G. Kuang, W. J. Goeddel, D. V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science (New York, N.Y.)* **246**, 1306–1309 (1989).
- 67. Liu, F.-S. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy--a quick review, *Taiwan J Obstet Gynecol* **48**, 239–244 (2009).
- 68. Liu, Q. *et al.* Hypoxia induces genomic DNA demethylation through the activation of HIF-1alpha and transcriptional upregulation of MAT2A in hepatoma cells, *Molecular cancer therapeutics* **10**, 1113–1123 (2011).
- 69. Liu, Z.-J. Semenza, G. L. & Zhang, H.-F. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis, *Journal of Zhejiang University. Science. B* 16, 32–43 (2015).
- Loges, S. Mazzone, M. Hohensinner, P. & Carmeliet, P. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited, *Cancer cell* 15, 167– 170 (2009).
- Maniotis, A. J. *et al.* Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry, *The American journal of pathology* 155, 739– 752 (1999).
- 72. Mariani, C. J. *et al.* TET1-mediated hydroxymethylation facilitates hypoxic gene induction in neuroblastoma, *Cell reports* **7**, 1343–1352 (2014).
- 73. Matsumoto, T. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction, *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001, re21 (2001).
- 74. **Mendel, D. B.** *et al.* In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 327–337 (2003).
- 75. **Mendel, D. B.** *et al.* In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 327–337 (2003).
- Millauer, B. *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis, *Cell* 72, 835– 846 (1993).
- 77. **Morabito**, **A.** *et al.* Vandetanib (ZD6474), a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases: current status and future directions, *The oncologist* **14**, 378–390 (2009).

- 78. Motzer, R. J. *et al.* Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma, *The New England journal of medicine* **356**, 115–124 (2007).
- 79. Motzer, R. J. *et al.* Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma, *J Clin Oncol* 27, 3584–3590 (2009).
- Munoz-Najar, U. M. Neurath, K. M. Vumbaca, F. & Claffey, K. P. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation, *Oncogene* 25, 2379–2392 (2006).
- Narayana, A. *et al.* Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent highgrade glioma: impact on local control and patient survival, *Journal of neurosurgery* 110, 173–180 (2009).
- 82. Nguyen, D. X. Bos, P. D. & Massagué, J. Metastasis: from dissemination to organspecific colonization, *Nature reviews. Cancer* 9, 274–284 (2009).
- 83. **O'Farrell, A.-M.** *et al.* SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo, *Blood* **101**, 3597–3605 (2003).
- 84. **O'Reilly, M. S.** *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell* **79**, 315–328 (1994).
- Paez-Ribes, M. *et al.* Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis, *Cancer cell* 15, 220–231 (2009).
- Pàez-Ribes, M. *et al.* Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis, *Cancer cell* 15, 220–231 (2009).
- 87. **Papaetis, G. S. & Syrigos, K. N.** Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies, *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* **23**, 377–389 (2009).
- 88. Papandreou, I. Cairns, R. A. Fontana, L. Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption, *Cell Metabolism* 3, 187–197 (2006).
- Partanen, T. A. Alitalo, K. & Miettinen, M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors, *Cancer* 86, 2406–2412 (1999).
- 90. Patan, S. Haenni, B. & Burri, P. H. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM), *Microvasc Res* 53, 33–52 (1997).
- 91. **Peng, C.-L.** *et al.* Sorafenib induces growth inhibition and apoptosis in human synovial sarcoma cells via inhibiting the RAF/MEK/ERK signaling pathway, *Cancer Biol Ther* **8**, 1729–1736 (2009).
- 92. **Pezzella, F.** *et al.* Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis, *The American journal of pathology* **151,** 1417–1423 (1997).

- 93. Presta, L. G. *et al.* Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders, *Cancer Res* 57, 4593–4599 (1997).
- 94. Ribatti, D. & Djonov, V. Intussusceptive microvascular growth in tumors, *Cancer letters* **316**, 126–131 (2012).
- 95. Rini, B. I. & Atkins, M. B. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma, *The Lancet. Oncology* **10**, 992–1000 (2009).
- 96. **Risau, W.** *et al.* Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies, *Development* **102**, 471–478 (1988).
- 97. Risau, W. & Flamme, I. Vasculogenesis, *Annual review of cell and developmental biology* **11**, 73–91 (1995).
- 98. Rosenthal, R. A. Megyesi, J. F. Henzel, W. J. Ferrara, N. & Folkman, J. Conditioned medium from mouse sarcoma 180 cells contains vascular endothelial growth factor, *Growth factors (Chur, Switzerland)* 4, 53–59 (1990).
- 99. **Rubenstein, J. L.** *et al.* Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption, *Neoplasia (New York, N.Y.)* **2**, 306–314 (2000).
- 100. Sakai, I. Miyake, H. & Fujisawa, M. Acquired resistance to sunitinib in human renal cell carcinoma cells is mediated by constitutive activation of signal transduction pathways associated with tumour cell proliferation, *BJU international* 112, E211-20 (2013).
- Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 103, 211–225 (2000).
- 102. Scourzic, L. Mouly, E. & Bernard, O. A. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer, *Genome medicine* **7**, 9 (2015).
- 103. Senger, D. R. *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science* **219**, 983–985 (1983).
- 104. Serrano-Gomez, S. J. Maziveyi, M. & Alahari, S. K. Regulation of epithelialmesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications, *Molecular Cancer* 15, 18 (2016).
- 105. Shah, T. *et al.* HIF isoforms have divergent effects on invasion, metastasis, metabolism and formation of lipid droplets, *Oncotarget* 6, 28104–28119 (2015).
- 106. Shaked, Y. *et al.* Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors, *Science (New York, N.Y.)* **313,** 1785–1787 (2006).
- 107. Shalaby, F. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice, *Nature* **376**, 62–66 (1995).
- 108. Shih, T. & Lindley, C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies, *Clinical therapeutics* 28, 1779–1802 (2006).
- 109. **Shojaei, F.** *et al.* Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells, *Nat Biotechnol* **25**, 911–920 (2007).

- 110. Sidky, Y. A. & Borden, E. C. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses, *Cancer Res* 47, 5155–5161 (1987).
- 111. Summers, J. Cohen, M. H. Keegan, P. & Pazdur, R. FDA drug approval summary: bevacizumab plus interferon for advanced renal cell carcinoma, *The oncologist* **15**, 104–111 (2010).
- 112. Sweet, J. A. Feinberg, M. L. & Sherman, J. H. The role of avastin in the management of recurrent glioblastoma, *Neurosurgery clinics of North America* 23, 331-41, x (2012).
- 113. Szyf, M. DNA methylation properties. Consequences for pharmacology, *Trends in pharmacological sciences* 15, 233–238 (1994).
- 114. Szyf, M. Pakneshan, P. & Rabbani, S. A. DNA methylation and breast cancer, *Biochemical pharmacology* 68, 1187–1197 (2004).
- 115. **Takahashi, H. & Shibuya, M.** The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions, *Clinical science (London, England : 1979)* **109,** 227–241 (2005).
- 116. **Tappenden, P. Jones, R. Paisley, S. & Carroll, C.** Systematic review and economic evaluation of bevacizumab and cetuximab for the treatment of metastatic colorectal cancer, *Health Technol Assess* **11**, 1-128, iii-iv (2007).
- 117. Taylor, S. & Folkman, J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis, *Nature* 297, 307–312 (1982).
- 118. Thompson, W. D. Shiach, K. J. Fraser, R. A. McIntosh, L. C. & Simpson, J. G. Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth, *J Pathol* 151, 323–332 (1987).
- 119. **Tsai, Y.-P.** *et al.* TET1 regulates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition by acting as a co-activator, *Genome biology* **15**, 513 (2014).
- 120. Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression, *Oncologist* 9 Suppl 5, 10–17 (2004).
- 121. Verheul, H. M.W. & Pinedo, H. M. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Tumor Angiogenesis and Early Clinical Development of VEGFReceptor Kinase Inhibitors, *Clinical Breast Cancer* 1, S80-S84 (2000).
- 122. Wallace, E. M. *et al.* A Small-Molecule Antagonist of HIF2alpha Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma, *Cancer Res* **76**, 5491–5500 (2016).
- 123. **Wang, J.** *et al.* Tet1 facilitates hypoxia tolerance by stabilizing the HIF-alpha proteins independent of its methylcytosine dioxygenase activity, *Nucleic acids research* (2017).
- 124. Widmer, D. S. *et al.* Hypoxia contributes to melanoma heterogeneity by triggering HIF1alpha-dependent phenotype switching, *The Journal of investigative dermatology* **133**, 2436–2443 (2013).
- 125. Yang, J. & Weinberg, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis, *Developmental cell* 14, 818–829 (2008).

- 126. Yu, T. Tang, B. & Sun, X. Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy, *Yonsei medical journal* 58, 489–496 (2017).
- 127. Zhang, K. Wang, X.-q. Zhou, B. & Zhang, L. The prognostic value of MGMT promoter methylation in Glioblastoma multiforme. A meta-analysis, *Familial cancer* 12, 449–458 (2013).

128. **Zhao, Y, Adijej A.A.** Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist* **20**, 660 - 673 (2015)

6.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus – Liebig - Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

6.6 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Till Acker für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Nutzung des Labors für Neuropathologie sowie die geduldige und sorgfältige Betreuung als Doktorvater.

Weiterhin möchte ich meinen besonderen Dank an meinen Betreuer im Labor für Neuropathologie Omelyan Trompak aussprechen. Vielen Dank für die spannenden Nächte in Frankfurt und Gießen, es war immer ein Vergnügen sich mit dir die Nächte um die Ohren zu schlagen.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Neuropathologie bedanken, die mir die mir bei Problemen und Rückfragen jeglicher Art stets hilfreich zur Seite gestanden haben und mich bei vielen Aufgaben tatkräftig unterstützten.

Ich möchte auch meinen Freunden, allen voran Anika, danken, dass sie mich in während dieser spannenden Zeit begleitet haben und immer aufbauende Worte parat hatten.

Schließlich möchte ich noch meinen Eltern danken. Danke für die fortwährende Unterstützung und das Vertrauen.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.