

Die Interaktion von VHL und PTEN bei der Tumorinitiation und Progression

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Romy Keppler
geboren in Heiligenstadt

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2013

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Tumorgenese	1
1.2 VHL	5
1.2.1 Struktur und Lokalisation	5
1.2.2 Funktion und Regulation	7
1.2.3 Das VHL-Syndrom	10
1.2.4 Tiermodelle	14
1.3 PTEN	15
1.3.1 Struktur und Lokalisation	15
1.3.2 Funktion und Regulation	16
1.3.3 Das PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom (PHTS) und sporadische PTEN-assoziierte Tumore	20
1.3.4 Tiermodelle	22
1.4 Zielsetzung	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Material und Reagenzien	25
2.1.1 Puffer, Lösungen und Kulturmedien	25
2.1.2 Größenstandards	28
2.1.3 Antibiotika	28
2.1.4 Enzyme	28
2.1.5 Antikörper und Seren	29
2.1.6 Vektoren	30
2.1.7 Oligonukleotide	31
2.1.8 Kits	33
2.1.9 Bakterienstämme	33
2.1.10 Zelllinien	33
2.1.11 Tiere	34
2.1.12 Humanes Gewebe	35
2.1.13 Zellkulturmaterialien	35
2.1.14 Gebrauchsmaterialien	35
2.1.15 Chemikalien	36
2.1.16 Geräte	38
2.2 Methoden	40
2.2.1 DNA Standardmethoden	40
2.2.1.1 Extraktion genomischer DNA aus Zellen	40
2.2.1.2 Extraktion genomischer DNA aus Gewebe	40
2.2.1.3 Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	40
2.2.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren	41
2.2.1.5 Fällung von DNA	41
2.2.1.6 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen	42
2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.1.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion	42
2.2.1.9 DNA-Amplifikation	43

2.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.1.11 Quantitative real-time PCR (qPCR)	44
2.2.1.12 Sequenzierung der DNA	46
2.2.1.13 Luciferase-Assay	47
2.2.2 Klonierung von DNA-Fragmenten	48
2.2.2.1 Herstellung chemokompetenter Bakterien nach Hanahan	48
2.2.2.2 Linearisierung und Dephosphorylierung des Vektors	48
2.2.2.3 Ligation	48
2.2.2.4 Transformation mittels Hitzeschock	49
2.2.2.5 Selektion transformierter Bakterien	49
2.2.2.6 Analyse transformierter Bakterien	49
2.2.3 RNA Standardmethoden	49
2.2.3.1 RNA-Extraktion aus Zellen	49
2.2.3.2 RNA-Extraktion aus Gewebe	50
2.2.3.3 RNA-Amplifikation	50
2.2.3.4 Entfernung genomischer DNA und Aufreinigung	50
2.2.3.5 Messung der RNA-Integrität	51
2.2.3.6 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	51
2.2.4 Biochemische Analysen	52
2.2.4.1 Protein-Extraktion aus Zellen	52
2.2.4.2 Herstellung von Kernprotein-Extrakten	52
2.2.4.3 Protein-Extraktion aus Gewebe	52
2.2.4.4 Quantifizierung von Proteinen	52
2.2.4.5 Fällung von Proteinen	53
2.2.4.6 Immunpräzipitation (IP)	53
2.2.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.2.4.8 <i>Western Blot</i>	54
2.2.4.9 Immunologischer Proteinnachweis und autoradiographische Detektion	55
2.2.5 Zellbiologische Methoden	55
2.2.5.1 Kultivierung der Zellen	55
2.2.5.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen	56
2.2.5.3 Transiente Calciumphosphat-vermittelte Transfektion	56
2.2.5.4 Stabile Transfektion mit <i>Lipofectamine LTX</i>	56
2.2.5.5 Retrovirale Transduktion	57
2.2.5.6 Zelladhäsionsassay	58
2.2.5.7 Anoikis	59
2.2.5.8 Chemotaxis-Versuch	59
2.2.6 Maus-Experimente	59
2.2.6.1 Registrierung und Genotypisierung der Mäuse	60
2.2.6.2 Präparation von Gewebe, Serum und Urin	60
2.2.6.3 Altersbestimmung und Präparation pränataler Mausembryonen	60
2.2.6.4 Überführung von Embryonen / Gewebe in die Zellkultur	61
2.2.6.5 Metastasierungsexperiment	61
2.2.7 Immunochemische Methoden	62
2.2.7.1 Einbetten und Schneiden von Organen in Paraffin (Paraffinschnitte)	62
2.2.7.2 Gefrierschnitte (Kryodünnschnitte)	62
2.2.7.3 H/E-Färbung	62
2.2.7.4 Immunhistochemie (IHC)	63
2.2.7.5 Immunfluoreszenz (IF) auf Gewebeschnitten	63
2.2.7.6 Immunfluoreszenz (IF) auf Zellen	64
3 ERGEBNISSE	65
3.1 VHL reguliert PTEN durch unterschiedliche Mechanismen	65
3.1.1 Auswahl und Generierung der Zelllinien	65

3.1.2 VHL reguliert die intrazelluläre Proteinkonzentration von PTEN	67
3.1.2.1 VHL reguliert PTEN in embryonalen Zelllinien	67
3.1.2.2 VHL reguliert PTEN in Tumorzellen	69
3.1.2.3 VHL reguliert die Proteinmenge von PTEN in primären Nierenkarzinomen	70
3.1.3 Transkriptionelle Regulation der <i>PTEN</i> -Expression durch HIF	72
3.1.3.1 HIF reguliert PTEN in primären Tumorzellen	73
3.1.3.2 Promotor-Analyse von <i>PTEN</i>	74
3.1.3.3 HIF reguliert PTEN in embryonalen Zelllinien und Tumorzelllinien	75
3.1.4 Interaktionen von VHL und NEDD4-1	80
3.1.4.1 VHL reguliert NEDD4-1 in embryonalen Zelllinien und Tumorzellen	80
3.1.4.2 NEDD4-1-Expression in primären Normal- und Tumorgeweben	81
3.1.4.3 Interaktion von PTEN und NEDD4-1	85
3.1.4.4 Interaktion von VHL und NEDD4-1	86
3.1.4.5 Funktion der Interaktion von VHL und NEDD4-1	89
3.2 VHL und PTEN beeinflussen das Zellverhalten	95
3.2.1 Auswahl der Zelllinien	95
3.2.2 Adhäsion	95
3.2.3 Überlebensfähigkeit	97
3.2.4 Migration	101
3.2.5 Metastasierung im <i>in vivo</i> -Experiment	101
3.2.5.1 Makroskopische Beobachtungen	102
3.2.5.2 Mikrosatelliten-Analyse	103
3.3 VHL und PTEN wirken in der Tumorinitiation und –progression zusammen	104
3.3.1 Generierung von <i>compound Vhl/Pten</i> -defizienten Mausmodellen	104
3.3.2 Phänotyp-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten	106
3.3.3 Untersuchung der Nieren	110
3.3.3.1 Genotypisierung	110
3.3.3.2 Histologische Untersuchungen	111
3.3.3.3 Untersuchungen der Expression	113
3.3.4 Untersuchung der Nebennieren	119
3.3.4.1 Überprüfung des Genotyps	120
3.3.4.2 Histologische Untersuchungen	122
3.3.4.3 Expressionsanalysen	124
4 DISKUSSION	127
4.1 Die VHL-vermittelte Regulation von PTEN	127
4.1.1 VHL reguliert PTEN positiv	128
4.1.2 Die Hypoxie-vermittelte Inhibierung der <i>PTEN</i> -Transkription	131
4.1.3 Die VHL-NEDD4-1-Interaktion	134
4.2 Kontrolle des Zellverhaltens durch VHL und PTEN	146
4.3 Die kombinierte VHL- und PTEN-Defizienz induziert die Tumorgenese	153
4.3.1 Funktionalität der <i>in vivo</i> -Modelle	154
4.3.2 Analyse der Nieren	156
4.3.3 Analyse der Nebennieren	161
4.4 Ausblick	166
5 ZUSAMMENFASSUNG	168
6 LITERATURVERZEICHNIS	170
7 ANHANG	201

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Modelle der Tumorentstehung.....	2
Abb. 1.2 <i>Hallmarks of cancer</i>	4
Abb. 1.3 Einfluss der Tumor-Mikroumgebung (TME) auf die Tumorentwicklung.....	5
Abb. 1.4 Aufbau des <i>VHL</i> -Gens und der drei Isoformen des <i>VHL</i> -Proteins.....	7
Abb. 1.5 <i>VHL</i> vermittelte Regulation der <i>HIFα</i> -Untereinheiten.....	8
Abb. 1.6 Klinische Manifestierung des <i>VHL</i> -Syndroms.....	10
Abb. 1.7 Morphologie von klarzelligen Nierenkarzinomen und Phäochromozytomen.....	13
Abb. 1.8 Struktur des <i>PTEN</i> -Gens und des <i>PTEN</i> -Proteins.....	16
Abb. 1.9 Die duale Phosphatase-Aktivität von <i>PTEN</i>	18
Abb. 1.10 Die Regulation von <i>PTEN</i>	20
Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Vektoren pCDNA3.1- (A) und pBABE puro (B).....	31
Abb. 2.2 <i>Cre/LoxP</i> -System.....	34
Abb. 3.1 Expressionskonstrukte.....	67
Abb. 3.2 <i>VHL</i> reguliert <i>PTEN</i> in HEK293T herauf.....	68
Abb. 3.3 Einfluss von <i>VHL</i> auf den <i>PI3K</i> -Signalweg.....	69
Abb. 3.4 Nachweis der <i>VHL</i> -vermittelten Erhöhung der <i>PTEN</i> -Konzentration in Nierenkarzinom-Zelllinien.....	70
Abb. 3.5 Mutationsanalyse des <i>VHL</i> -Gens in humanen Nierenkarzinomen.....	71
Abb. 3.6 <i>PTEN</i> -Expression in <i>VHL</i> -defizienten klarzelligen Nierenkarzinomen.....	72
Abb. 3.7 Expressionsstudien von <i>VEGF</i> und <i>PTEN</i> in primären Tumorgeweben.....	74
Abb. 3.8 Promotor - Analyse von <i>PTEN</i> im Luciferase-Assay.....	75
Abb. 3.9 Expression von <i>PTEN</i> unter Hypoxie.....	76
Abb. 3.10 Kinetik der Hypoxie- vermittelten Regulation von <i>PTEN</i>	78
Abb. 3.11 Subzelluläre Umverteilung von <i>PTEN</i> in Cobaltchlorid-behandelten ST2028-Tumorzellen.....	79
Abb. 3.12 Einfluss einer <i>VHL</i> -Überexpression auf <i>NEDD4-1</i> in embryonalen und differenzierten Zelllinien.....	81
Abb. 3.13 <i>NEDD4-1</i> -Expressionsanalyse humaner ccRCCs im Vergleich zum gesunden Nierengewebe.....	82
Abb. 3.14 Analyse der Expression von <i>PTEN</i> und <i>NEDD4-1</i> im Tumor und korrespondierendem Normalgewebe.....	83
Abb. 3.15 Immunhistochemische Expressionsanalysen der ccRCCs.....	84
Abb. 3.16 Nachweis der Interaktion von <i>PTEN</i> und <i>NEDD4-1</i>	86
Abb. 3.17 Nachweis der Interaktion von <i>VHL</i> und <i>NEDD4-1</i>	87
Abb. 3.18 Identifizierung der <i>NEDD4-1</i> interagierenden <i>VHL</i> -Domänen.....	88
Abb. 3.19 Analyse der für die <i>VHL</i> -Bindung essentiellen <i>NEDD4-1</i> -Domänen.....	89
Abb. 3.20 <i>RNA-POL II</i> interagiert mit <i>VHL</i> und <i>NEDD4-1</i>	90
Abb. 3.21 Analysen der <i>FVHL</i> - und <i>FNEDD4-1</i> -vermittelten Ubiquitynylierung.....	92
Abb. 3.22 Einfluss der <i>NEDD4-1</i> -Domänen auf die Ubiquitynylierung.....	93
Abb. 3.23 Einfluss der Interaktion von <i>VHL</i> und <i>NEDD4-1</i> auf die Degradation der Bindungspartner.....	94
Abb. 3.24 Adhäsion von 786-O Zellen auf verschiedenen ECM-Bestandteilen.....	96
Abb. 3.25 Adhäsion von KTCTL-26A Zellen auf unterschiedlich beschichteten ECM-Untergründen.....	97
Abb. 3.26 Überlebensfähigkeit von 786-O.....	99
Abb. 3.27 Anoikis von 786-O Zellen.....	100
Abb. 3.28 Anoikis von KTCTL-26A.....	100
Abb. 3.29 Migration von 786-O Zellen.....	101
Abb. 3.30 Makroskopisch sichtbare Veränderungen frisch präparierter Lungen von NOD/SCID-/- Mäusen.....	102
Abb. 3.31 Relatives Metastasierungspotential von 786-O (A) und KTCTL-26A (B).....	103
Abb. 3.32 Verpaarungsstrategien.....	105
Abb. 3.33 Tumoröse Veränderungen der Maus-organe.....	107
Abb. 3.34 Zeitpunkt der Entstehung der zystischen Nieren und PCCs.....	108
Abb. 3.35 Morphologie der Nieren und Nebennieren.....	109
Abb. 3.36 Genotypisierung der Nieren.....	111
Abb. 3.37 H/E-Färbung der Nieren.....	112
Abb. 3.38 Einfluss von <i>Pten</i> auf die Zellzahl.....	113
Abb. 3.39 Expressionsanalyse der V2B-Punktmutante auf RNA-Ebene.....	114
Abb. 3.40 Expressionsanalysen der Nieren im <i>Western Blot</i>	115
Abb. 3.41 Lokalisierung von <i>Vhl</i> , <i>Pten</i> und <i>Nedd4-1</i> im Nieren-gewebe mittels Immunhistochemie.....	116
Abb. 3.42 Immunhistochemische Expressionsstudien im zystischen Nierengewebe.....	117

Abb. 3.43 Immunhistochemische Analyse von Zielmolekülen von Vhl und Pten.	119
Abb. 3.44 Basensequenz der V2B- und V2C-Punktmutation.	120
Abb. 3.45 Exemplarische H/E-Färbung einer Nebenniere jeden Genotyps.....	123
Abb. 3.46 Expressionsanalysen der Nebennieren im Western Blot.	124
Abb. 3.47 Nachweis der Vhl-, Pten- und Nedd4-1-Expression im Nebennieren-Gewebe durch Immunfluoreszenzfärbungen.	125
Abb. 3.48 Expressionsanalyse von Adrenomedullin in morphologisch veränderten Nebennieren.	126
Abb. 4.1 Modell der VHL- und NEDD4-1-vermittelten Ubiquitylierungen.	143
Abb. 4.2 Modell der VHL-vermittelten PTEN-Regulation.	146
Abb. 4.3 Modell der Zystenbildung und ccRCC-Entstehung.	157
Abb. 4.4 Modell der Entstehung von klarzelligem Nierenkarzinomen.	161
Abb. 4.5 Modell der Induktion von Phäochromozytomen.	165

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Klassifizierung der VHL-Erkrankung.	11
Tab. 3.1 Charakterisierung der verwendeten Nierenkarzinom-Zelllinien.	66
Tab. 3.2 Überblick über die durchgeführten Sequenzierungen.	122
Tab. 4.1 Funktionsdefekte der VHL-Mutationen.	139

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.bidest	<i>Aqua bidest</i> (doppelt destiliertes Wasser)
Ad	lat. auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
ccRCC	klarzelliges Nierenkarzinom (<i>clear cell renal cell carcinoma</i>)
cHbs	cerebrale Hämangioblastome
CSCs	<i>cancer stem cells</i> ; Tumorstammzellen
DAB	3,3-Diaminobenzidin
d.h.	das heisst
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Serum</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure/DNS)
DNase I	<i>Desoxyribonuklease I</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde
Hbs	Hämangioblastome
H/E	Hämatoxylin/Eosin
i.d.R.	in der Regel
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
ki	<i>Knockin</i>
kJ	Kilojoule
ko	<i>Knockout</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M	Molar
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
VI	

ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PCC	Phäochromozytom
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGL	Paragangliom
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure/RNS)
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TME	<i>tumour microenvironment</i> , Mikro-Tumorumgebung
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Einheiten (<i>Units</i>)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren: Einbuchstaben-Code

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Tumorgenese

Die Transformation einer gesunden Zelle zur Krebszelle geht meist mit vererbten oder sporadischen genetischen Veränderungen einher. Deletionen, Duplikationen, Punktmutationen aber auch chromosomale Aberrationen führen dabei zu einer veränderten Funktion (*gain of function*-Mutation) oder zu einem Verlust des Genproduktes (*loss of function*-Mutation). Auch Veränderungen der Expressionsstärke und der epigenetischen Regulation verschiedener Gene tragen häufig zur Umprogrammierung der Zelle zur Krebszelle bei. Die von den Mutationen betroffenen Gene werden in Onkogene und Tumorsuppressorgene (TSGs) eingruppiert. Eine ausbalancierte Regulation dieser Gene führt im Gewebe zu einem ausgewogenen Verhältnis von Wachstum und Tod. Die gesteigerte Aktivierung der Onkogene bzw. die Inhibierung der Tumorsuppressorgene trägt hingegen zur Krebsentstehung bei. Besonders häufig sind in Tumoren Mutationen bzw. eine veränderte Expression der Onkogene *c-MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) und *RAS* (*v-Ha-Ras harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) und der Tumorsuppressorgene *p53* (*tumour protein p53*), *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) und *RB* (*Retinoblastoma gene*) zu finden (Wang *et al.*, 2011; Sherr *et al.*, 2004). Das deutet daraufhin, dass diese Moleküle Schlüsselpositionen in der Regulation des Zellverhaltens einnehmen und dass die Tumorgenese aus einem mehrstufigen Prozess besteht.

1971 stellte Alfred Knudson erstmals die Hypothese auf, dass eine einzelne Veränderung im Genom nicht genügt, um die Krebsentwicklung zu induzieren. Er konnte zeigen, dass die Prädisposition zur Initiation des Retinoblastoms durch eine Keimbahnmutation nicht ausreichte, erst eine zweite somatische Veränderung des zweiten Allels des betroffenen Gens führte zur Ausbildung des Tumors. Auch für die Entstehung sporadischer Retinoblastome waren spontane biallelische „hits“ im selben Gen, in dem Fall beide somatisch, nötig (Knudson, 1971 und 1996). Dieses sogenannte *Two-hit-Modell* wurde über lange Zeit als Prinzip der Tumorgenese anerkannt. In den letzten 10 Jahren ließen jedoch neue Erkenntnisse Zweifel an der Allgemeingültigkeit des *Two-hit-Modells* aufkommen. Während für *RB1*, dessen Defizienz die Ausbildung des Retinoblastoms induziert, und *VHL* (*von Hippel-Lindau-syndrome gene*), dessen Funktionsverlust das *VHL-Syndrom* begründet, das *Two-hit-Modell* tatsächlich bestätigt werden konnte (Cavenee *et al.*, 1983; Dunn *et al.*, 1988; Prowse *et al.*, 1997), wurden für weitere Tumorsuppressoren andere Dosiseffekte ermittelt. Häufig ist eine Haploinsuffizienz, bei der lediglich ein Allel mutiert ist, bereits ausreichend, um die Tumorgenese zu initiieren. Beispiele hierfür sind u.a. *BRCA1* (*breast cancer 1 gene*), deren haploinsuffiziente Expression zur Entstehung von Mammakarzinomen führen kann (Bellacosa *et al.*, 2010), sowie *p53*, dessen heterozygoter Verlust viele Tumorerkrankungen induziert, die außerdem durch weiter sinkende *p53*-Dosen bis hin zum vollständigen Verlust an Malignität zunehmen können (Venkatachalam *et al.*, 1998). Verschiedene Erklärungsansätze versuchen dem Phänomen der Haploinsuffizienz auf die Spur zu kommen. So reicht möglicherweise eine verminderte Dosierung in Kombination mit weiteren Effekten in anderen Genen aus, um die Tumorgenese anzuregen. Eine weitere Möglichkeit stellt die obligate Haploinsuffizienz dar, welche bereits für *PTEN* gezeigt werden konnte. Die Mutation des zweiten *PTEN*-Allels führt hier zum Zelltod bzw. zur Seneszenz und in embryonalen Stadien sogar zur

Letalität des Organismus (Di Cristofano *et al.*, 1999). Tatsächlich konnte die Arbeitsgruppe von Pier Paolo Pandolfi nachweisen, dass bereits eine Reduktion des Pten-Gehalt um 20% genügt, um die Ausbildung verschiedener Tumore u.a. von Brustkrebs in Mäusen zu induzieren (Alimonti *et al.*, 2010). Dennoch kann in Tumoren, deren Entwicklung schon weiter vorangeschritten ist, zum Teil ein vollständiger Verlust des Tumorsuppressors Pten zu verzeichnet werden. In murinen Prostatakarzinomen geht die Pten-Defizienz häufig mit p53-Mutationen einher. Die durch den Verlust von Pten induzierte Seneszenz kann hier also mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Defekte in p53 nicht umgesetzt und so die Progression des Tumors vorangetrieben werden (Chen *et al.*, 2005). Dies stärkt die These, dass für die Initiation vieler Tumorerkrankungen zwei *hits* genügen, für die Progression jedoch weitere Veränderungen in anderen Genen nötig sind (Vogelstein und Kinzler, 1993). Neben den Tumorsuppressorgenen scheinen auch die Onkogene Dosis-Effekten zu unterliegen. So führt die stetig zunehmende Expression von *c-MYC* und *RAS* nicht zu einem fortwährend steigenden Tumorwachstum, sondern scheint einen Schutzmechanismus zu induzieren, bei dem durch das Überschreiten einer Expressionsschwelle die Apoptose der Zelle eingeleitet wird (Evan *et al.*, 1992; Serrano *et al.*, 1997). Die unterschiedlichen Modelle der Tumorentstehung in Abhängigkeit der Dosis der TSGs und Onkogene sind in Abb. 1.1 Modelle der Tumorentstehung veranschaulicht (Abb. 1.1).

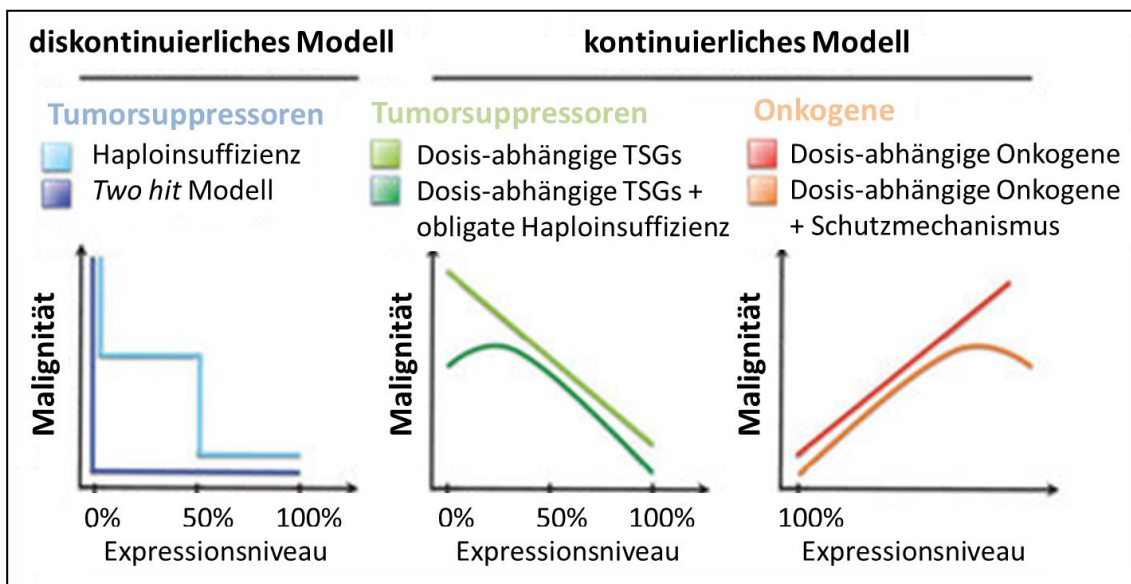


Abb. 1.1 Modelle der Tumorentstehung. Das diskontinuierliche Modell beschreibt die Tumorgenese einerseits als zweistufigen Prozess, bei dem erst der Verlust beider Allele zu einer malignen Entartung (*Two hit* Modell) führt. Andererseits induziert bereits eine Gendefizienz aufgrund der Schädigung eines Allels die Ausbildung des tumorösen Phänotyps (Haploinsuffizienz), welcher jedoch bei zusätzlichem Verlust des zweiten Allels verstärkt wird. Das kontinuierliche Modell zeigt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Tumorentwicklung proportional zur Fehlregulation des Tumorsuppressors bzw. Onkogens. Der vollständige Verlust des Tumorsuppressors bzw. eine extreme Funktionssteigerung des Onkogens können hier gegebenenfalls zur Einleitung verschiedener Schutzmechanismen führen, die den Zelltod einleiten. Jedes dieser Modelle ist für ein oder mehrere an der Tumorgenese beteiligten Gene belegbar (modifiziert nach Berger *et al.*, 2011).

Die genetischen Defekte tragen dazu bei, dass eine gesunde Zelle die Eigenschaften einer Tumorzelle annimmt. Zu diesen Eigenschaften gehören ein gesteigertes Wachstum, die Verstärkung der Angiogenese, die Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung, die Deregulation des

Energiehaushaltes und die gezielte Beeinflussung der direkten Tumor-Mikroumwelt (Hanahan und Weinberg, 2011). Das vermehrte Wachstum wird durch eine Proliferationssteigerung hervorgerufen, welche durch die erhöhte Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren bzw. ihrer Rezeptoren, die Aktivierung nachgeschalteter Signalmoleküle oder die Inhibierung negativer Regulatoren der nachfolgenden Signalwege erzeugt wird. So bewirkt beispielsweise die Inhibierung von p53 eine verminderte Fähigkeit zur Seneszenz (Wang *et al.*, 1998). Die erhöhte Expression der Telomerase induziert durch die Verlängerung der Telomer-Enden der Chromosomen ebenfalls die Hemmung des Alterungsprozesses der Zelle (Kim *et al.*, 1994). In letzter Konsequenz führen diese fehlregulierten Signalwege bzw. Signalmoleküle zu einer Deregulation der Kontrollmechanismen des Zellzyklus und somit zu einer unkontrollierten Zellvermehrung. Neben der Proliferationssteigerung trägt auch die erworbene Resistenz der Zellen gegen Zelltod-induzierende Signale zur neoplastischen Ausbildung eines Tumors bei. Die Inhibierung von p53 (Yonish-Rouach *et al.*, 1991) sowie die Fehlregulation einzelner Mitglieder der BCL-2-Familie (Adams und Cory, 2007) führen beispielsweise dazu, dass bei Zellschädigungen die Initiation der Apoptose ausbleibt. Auch der Mechanismus der Autophagozytose kann in Krebszellen fehlgesteuert sein, wobei er die Tumorgenese sowohl fördern als auch hemmen kann.

Neben dem gesteigerten Wachstum erlangen Krebszellen auch die Fähigkeit zur Induktion der Angiogenese. Diese Ausbildung neuer Blutgefäße, ausgehend von bereits bestehenden Kapillaren hin zum Tumorgewebe, wird durch den Sauerstoffmangel der Zellen bewirkt, welcher u.a. die Expression des angiogenen Faktors VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) in den Krebszellen veranlasst. Die Überexpression bzw. Aktivierung von VEGF kann jedoch noch vor der Entstehung einer hypoxischen Umgebung durch die Regulation von Onkogenen induziert werden (Carmeliet, 2000).

Die gesteigerte Fähigkeit von Tumorzellen zur Invasion und Metastasierung wird sowohl durch intra- als auch extrazelluläre Signale beeinflusst. So wird häufig eine Fehlregulation der Familie der Cadherine durch die Tumorzelle selbst induziert (Bex und van Roy, 2009). Nachbarzellen wie z.B. Makrophagen steuern zusätzlich proteolytische Enzyme bei, die an der Umgestaltung der Extrazellulärmatrix (ECM) beteiligt sind (Joyce und Pollard, 2009). Die Lockerung der extrazellulären Gerüststrukturen und der verminderte Kontakt der Tumorzelle mit ihrer Außenwelt kann zu einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) führen (Yilmaz und Christofori, 2009), welche es der Zelle erleichtert, sich aus dem Zellverband zu lösen, zu naheliegenden Blut- oder Lymphgefäßen zu migrieren, zu invadieren und schließlich in ein neues Gewebe zu extravadiieren und Metastasen zu bilden. Für die Manifestation der Mikrometastasen sind v.a. die Integrine von großer Bedeutung, die in Tumorzellen oftmals ebenfalls einer veränderten Regulation unterliegen (Kaplan *et al.*, 2005).

Neben diesen bereits im Jahr 2000 beschriebenen Kennzeichen der Tumorgenese nahmen Hanahan und Weinberg 2011 zwei weitere Eigenschaften von Tumorgeweben in ihre „*Hallmarks of cancer*“ auf, nachdem sich in den letzten Jahren zunehmend deren Relevanz für die Krebsentstehung abzeichnete (Abb. 1.2). So ist in vielen Tumoren eine Umprogrammierung des Energie-Metabolismus von oxidativer Phosphorylierung auf aerobe Glycolyse nachzuweisen (Warburg, 1956). Dieser sogenannte Warburg-Effekt führt zu einer stark verminderten Energiebilanz der Tumorzelle, die jedoch durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. eine vermehrte Aufnahme von Glucose aufgrund der Heraufregulation von GLUT1 (*Glucose transporter 1*), in ihrer Effizienz gesteigert wird (Hsu und Sabatini, 2008). Dennoch scheint die Energiegewinnung mittels aerober Glycolyse einen

Selektionsvorteil darzustellen. So werden die Substrate unmittelbar zur Synthese von Biomasse freigesetzt und die Bildung von freien Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS) vermieden.

Schließlich scheinen Tumorzellen in Organismen mit intaktem Immunsystem die Fähigkeit zu entwickeln, Tumor-inhibierende Effekte zu umgehen oder zu neutralisieren. So sezernieren Tumorzellen beispielsweise TGF- β (*transforming growth factor beta*) oder andere immunsuppressive Signalmoleküle in ihre unmittelbare Umgebung, die vom Immunsystem entsandte T-Zellen und Killerzellen inhibieren (Yang *et al.*, 2010).

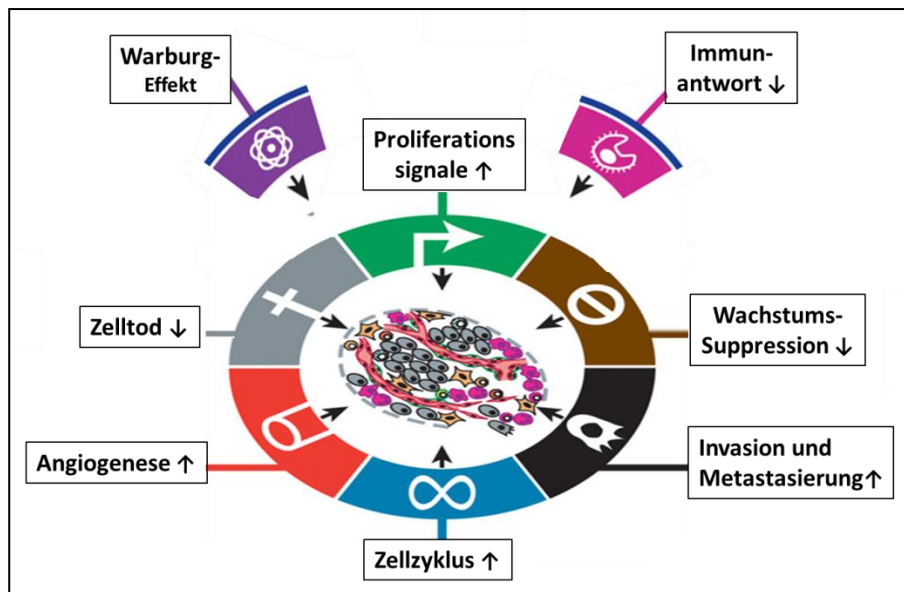


Abb. 1.2 Hallmarks of cancer. Die „Hallmarks of cancer“ beschreiben die Eigenschaften einer Zelle, die zur Transformation einer Tumorzelle führen und so die Tumorentstehung bewirken. Dazu gehören die Verstärkung der Proliferationssignale und der Replikation, die Verminderung der Wachstums-suppression und des Zelltods und die Induktion der Angiogenese, Invasion und Metastasierung. In den letzten Jahren wurde weiterhin deutlich, dass auch der veränderte Energie-Metabolismus (Warburg-Effekt) und die Inhibition des Immunsystems typische Kennzeichen der Tumorgenese darstellen (modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2011).

Tumorgewebe sind meist durch eine starke Inhomogenität gekennzeichnet. So findet ein Tumor zwar seinen Ursprung in einer einzigen kanzerogen veränderten Zelle, dennoch können im Verlauf der Proliferation der Zelle und der damit einhergehenden Progression des Tumors in einzelnen Zellen weitere spontane Veränderungen auftreten, die diesen Zellen neue Eigenschaften verleihen. Dadurch können innerhalb eines tumorösen Gewebes verschiedene Populationen mit unterschiedlich hoher Malignität entstehen. Viele Tumore unterschiedlicher Gewebe enthalten in einzelnen Regionen Tumorstammzellen (*cancer stem cells*, CSCs). Da in allen Geweben Stammzell-Nischen existieren, in denen Zellen mit unbegrenztem Erneuerungspotential und der Fähigkeit zur Ausdifferenzierung zu finden sind, besteht die Möglichkeit, dass sich der Tumor aus einer Stammzelle entwickelt hat. Als weitere Ursache muss jedoch immer in Erwägung gezogen werden, dass einzelne Zellen während der Tumorentwicklung wieder embryonale Eigenschaften annehmen und durch andauernde Proliferation eine eigene Population innerhalb des neuen Gewebes ausbilden können (Clarke und Fuller, 2006). Neben den Krebszellen sind auch eine Vielzahl an nicht tumorösen Zellen im Tumor vertreten, welche die Tumor-Mikroumgebung (*tumour microenvironment*, TME) bilden. Die Zusammensetzung der TME wird aktiv von den Tumorzellen mitbestimmt, welche u.a. Fibroblasten und Endothelzellen

rekrutieren. Außerdem wird das Gewebe von Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten infiltriert, die von Immunsystem entsandt werden. All diese Zellen gestalten die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (ECM) und das Milieu der TME durch Freisetzung verschiedener Signalmoleküle und Enzyme, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Cytokine oder Proteasen. Die Tumorzellen und die TME üben einen wechselseitigen Selektionsdruck aus und formen so den Phänotyp des anderen mit. Diese Interaktion ist somit essentiell für die Progression des Tumors (Joyce und Pollard, 2009; Witz, 2009; Abb. 1.3).

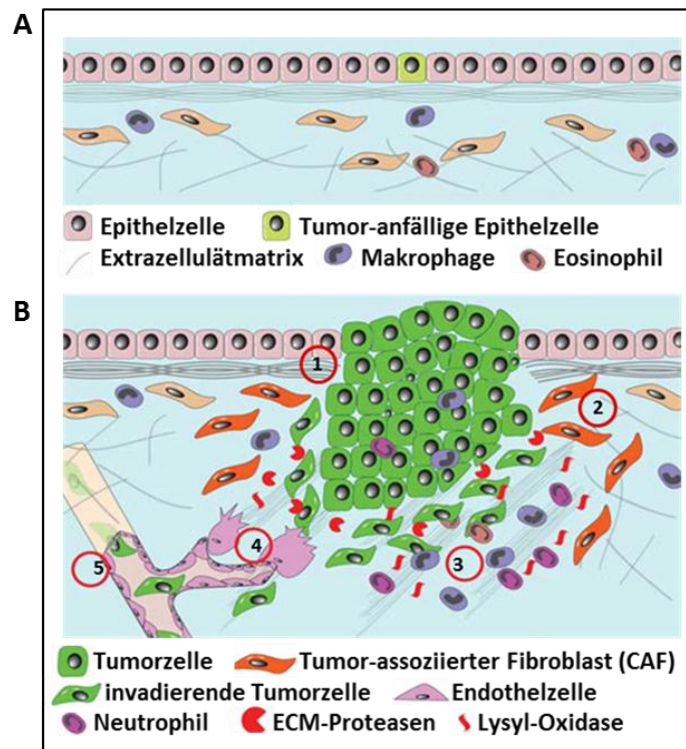


Abb. 1.3 Einfluss der Tumor-Mikroumgebung (TME) auf die Tumorentwicklung. **A** Mikroumgebung eines gesunden Epithelgewebes. **B** Interaktion des Tumors und der TME. Genetische Veränderungen lassen aus einer Tumor-anfälligen Epithelzelle eine echte Tumorzelle entstehen, die daraufhin beginnt zu proliferieren (1). Die Induktion Tumor-assoziiertes Fibroblasten fördert durch die Freisetzung von Enzymen, die die Extrazellulärmatrix (ECM) modifizieren, eine Umstrukturierung der ECM (2). Immunzellen werden vermehrt vom Immunsystem in die TME entsandt, im weiteren Verlauf verstärken sie die Progression der Tumorentwicklung (3). Die Freisetzung von Chemokinen in die TME bewirkt die Vaskulogenese und Angiogenese in Richtung des Tumorgewebes (4). Die poröse ECM erleichtert die Invasion der Tumorzellen in die neu verzweigten Blutgefäße (5) und leitet so den Metastasierungsprozess ein (modifiziert nach Lu *et al.*, 2012).

1.2 VHL

1.2.1 Struktur und Lokalisation

VHL (von *Hippel Lindau*) ist ein Tumorsuppressor (TSG) mit einer Vielzahl verschiedener Funktionen, dessen Verlust oder Funktionsminderung zur Ausbildung unterschiedlicher Tumorerkrankungen führen kann, die unter dem VHL-Syndrom zusammengefasst werden. Das VHL-Gen ist auf Chromosom 3p25-26 zu finden und liegt damit in unmittelbarer Nähe zu weiteren TSGs, deren Fehlregulation u.a. mit der Entwicklung von Lungentumoren, Kolonkarzinomen und Brustkrebs assoziiert werden (Zabarovsky *et al.*, 2002). VHL ist *downstream* eines GC-reichen Promotors

lokalisiert, welcher keine TATA- bzw. CCAAT-Sequenzen enthält, jedoch 60 bp *upstream* des ersten Startkodons eine SP1-Bindestelle und Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren PAX (*paired box gene*) und NRF1 (*nuclear respiratory factor 1*) besitzt (Kuzmin *et al.*, 1995). Das *VHL*-Gen besteht aus einem 642 bp großen kodierenden Bereich, welcher 3 Exons umfasst (Abb. 1.4; Richards *et al.*, 1996). Die Transkription von *VHL* führt zur Synthese einer 6 kb großen mRNA. Durch alternatives Splicing entsteht die Isoform II, der die von Exon 2 kodierte Sequenz fehlt (Latif *et al.*, 1993; Richards *et al.*, 1996). Die Existenz von zwei AUG-Translationsstartpunkten begründet die Bildung von verschiedenen VHL-Proteinen der Größe 30 kDa (Isoform I) und 19 kDa (Isoform III), die jedoch beide in gleichem Maße biologisch aktiv zu sein scheinen (Iliopoulos *et al.*, 1998). Der Isoform III fehlen die ersten 53 Aminosäuren, welche die achtfache Repeatsequenz Gly-X-Glu-Glu-X ((GXEEEX)₈) umspannt. Diese Repeats sind evolutionär wenig konserviert, sie fehlen beispielsweise in Nagetieren vollständig. Auch pathologische Mutationen sind nicht für diesen Bereich bekannt, so dass er vermutlich nicht für die Funktionsausübung von VHL benötigt wird. Die sich anschließenden β -Domäne (63-154 Aminosäuren) und α -Domäne (155-192 Aminosäuren), die für die Struktur und Funktion von VHL entscheidend sind, liegen hingegen hoch konserviert in Primaten und Nagetieren vor (Abb. 1.4). Selbst Homologien zu *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* sind nachweisbar (Richards *et al.*, 2001).

VHL ist sowohl im Kern als auch im Zytoplasma frei oder Membran-assoziiert lokalisiert. Die Verteilung innerhalb der Zelle ist jedoch von der entsprechenden VHL-Isoform und ihrer Dosis abhängig. Während die Isoform I bevorzugt im Zytoplasma vorliegt und nur bei abnehmenden Proteinmenge an die Membran oder in den Kern transloziert, ist die Isoform III gleichermaßen im Kern und im Zytoplasma, jedoch nie an der Membran zu finden (Iliopoulos *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1995). Der Transport aus dem Kern ins Zytoplasma wird ATP-abhängig von der GTPase RAN (*RAS related nuclear protein*) vermittelt, welche VHL im C-terminalen Bereich der β -Domäne bindet, die von Exon 2 kodiert wird (Groulx *et al.*, 2000). Dies begründet die ausschließlich nukleäre Lokalisation der Isoform II, der aufgrund des vorangegangenen alternativen Splicing die Aminosäuren 114-154 fehlen (Richards *et al.*, 2001). Die Verbreitung von VHL im Organismus ist bereits während der Embryonalentwicklung ubiquitär. Eine besonders hohe Expression ist jedoch im Urogenitalsystem, im Gehirn, im Auge und in der Lunge detektierbar. Das Expressionmuster der Isoform I und II variiert dabei nicht (Richards *et al.*, 1996). Die Expression von VHL ist während der Embryogenese essentiell, so konnte bereits im Mausmodell gezeigt werden, dass ein homozygoter VHL-Verlust die Letalität der Embryonen von Tag 10,5 bis 12,5 induziert (Gnarra *et al.*, 1997).

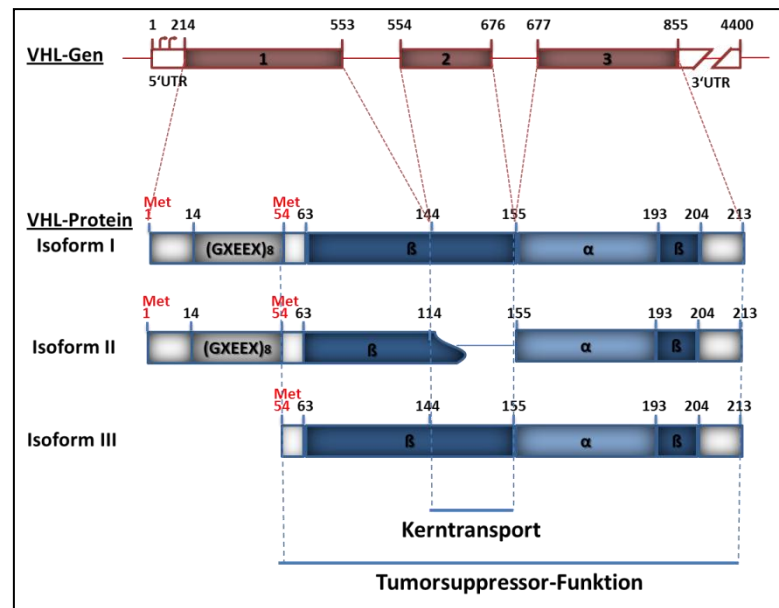


Abb. 1.4 Aufbau des VHL-Gens und der drei Isoformen des VHL-Proteins. Das VHL-Gen besteht aus einer 642 bp großen DNA-Sequenz, die 3 Exons umfasst. Die Protein-Isoform I entspricht dem vollständig transkribierten und translatierten VHL und enthält, neben einer N-terminalen Repeatsequenz, die zur Funktionsausübung essentielle β - und α -Domäne. Die Isoform II entsteht durch alternatives Splicing, wodurch das zweite Exon entfernt wird und dem VHL-Protein die zum Kerntransport nötige Domäne fehlt. Aufgrund eines zweiten Translationsstartpunktes an Position 54 fehlt der Isoform III die N-terminale Repeatsequenz, was die Funktionsfähigkeit des Proteins jedoch nicht beeinflusst.

1.2.2 Funktion und Regulation

Funktion

VHL nimmt auf unterschiedlichste Weise Einfluss auf viele Zellprozesse, wobei die Art der Interaktion mit den Bindungspartnern und die damit einhergehende Regulation oftmals nur in Ansätzen bekannt ist. Eine bereits gut beschriebene und essentielle Rolle füllt VHL als RING E3 Ubiquitin-Ligase im VCB-Komplex aus, welcher die Ubiquitinylierung seiner Substrate induziert und dadurch deren proteasomalen Abbau über das 26S Proteasom bewirkt. Dabei vermittelt das Chaperon TRIC (TCP-1 ring complex) zunächst die Interaktion von Elongin C mit der α -Domäne des VHL-Moleküls (Feldmann *et al.*, 1999). Anschließend werden Elongin B, Cullin-2, Rbx1 (*Ring-Box 1*) und NEDD8 (*Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8*) angelagert und bilden so den VCB-Komplex, dessen Aktivität durch die Neddylierung von Cullin-2 noch gesteigert werden kann. RBX1 rekrutiert schließlich ein E2-Enzym, welches die Ubiquitinylierung des Substrates, das dem VCB-Komplex durch die Interaktion mit der β -Domäne des VHL-Proteins zugänglich gemacht wird, katalysiert (Kamura *et al.*, 1999; Sufan *et al.*, 2004). Die bekanntesten Substrate der VHL-vermittelten Ubiquitinylierung sind die α -Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren HIF1 (*Hypoxia inducible factor 1*) und HIF2 (*Hypoxia inducible factor 2*) (Maxwell *et al.*, 1999). HIF α wird zunächst durch eine Hydroxylierung der Prolinreste der NTAD (N-terminale Aktivierungs-)Domäne für VHL zugänglich gemacht. Diese Hydroxylierung wird durch eine von drei Sauerstoff- und Eisen-abhängigen Prolylhydroxylasen (PHD1-3 bzw. EGLN1-3) vermittelt, wobei PHD2 die primäre HIF α -Hydroxylase darstellt (Jaakkola *et al.*, 2001; Berra *et al.*, 2003). Unter normoxischen Bedingungen wird HIF α daher von VHL erkannt, über den VCB-Komplex ubiquitinyliert und schließlich proteasomal abgebaut. Bei Verminderung der Sauerstoffzufuhr, die u.a. während der Tumorgenese

auftritt, wird jedoch die PHD inhibiert, so dass die Hydroxylierung von HIF α ausbleibt, dieses nicht von VHL gebunden werden kann und somit stabilisiert wird. Auch ein Funktionsverlust von VHL kann zur Aktivierung von HIF α führen, welches in den Kern transloziert und mit der ARNT-Untereinheit zum funktionsfähigen Transkriptionsfaktor HIF fusioniert (Abb. 1.5). Die Aktivierung von HIF1 und HIF2 führt zu einer veränderten Transkription von über 200 Genen, welche häufig auch mit der Tumorgenese assoziiert werden. Dazu gehören u.a. VEGF (*Vascular endothelial growth factor A*) und PDGF (*Platelet derived growth factor*), die die Angiogenese fördern, TGF α (*Transforming growth factor alpha*) und EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), welche die Proliferation sowie das Überleben der Zellen stärken, MMPs (*Matrix metalloproteinases*), E-Cadherin und CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor 4*), die die Zell-Zell-Interaktionen vermindern und dadurch verstärkt zu epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) und Invasion führen sowie schließlich GLUT1, der den Tumor-eigenen Metabolismus unterstützt (Kaelin, 2008).

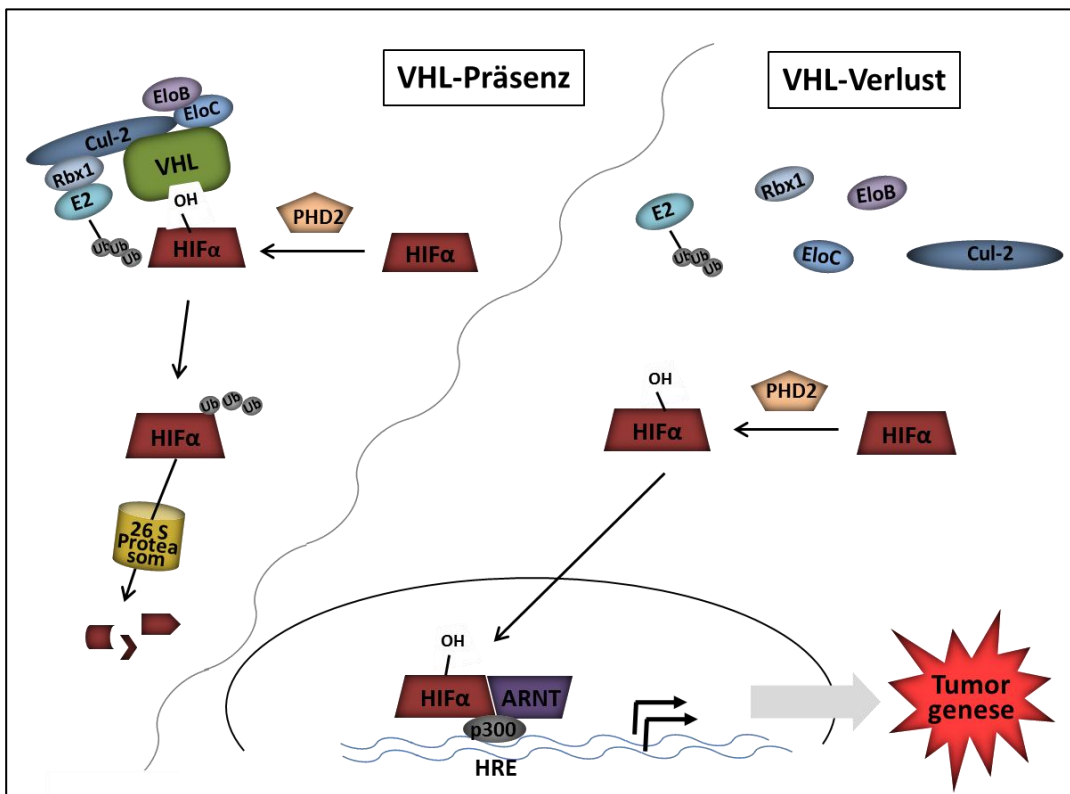


Abb. 1.5 VHL vermittelte Regulation der HIF α -Untereinheiten. Indem VHL über seine α -Domäne mit dem Ubiquitinierungskomplex, bestehend aus Elongin B, Elongin C, Cullin-2, Rbx1 und dem Ubiquitin-übertragenden E2-Enzym, in Kontakt tritt und über die β -Domäne das Substrat HIF α bindet, vermittelt es deren Interaktion und damit die Ubiquitinierung des Substrates durch den VBC-Komplex sowie die anschließende proteasomale Degradation. Der Verlust von VHL bewirkt eine Stabilisierung von HIF α , welches in den Kern transloziert, mit seinem Bindungspartner ARNT fusioniert und die Expression von über 200 Hypoxie-regulierten Genen bewirkt, welche die Tumorentstehung fördern.

Neben der Vermittlung der Degradation von HIF α wirkt VHL auch HIF-unabhängig der Tumorentstehung entgegen, indem es die Mechanismen stärkt, die die Überlebensfähigkeit und die Proliferation der Zellen mindern. So induziert VHL beispielsweise die Ubiquitinierung von MDM2, wodurch dessen Kernexport eingeleitet und die MDM2-vermittelte Inhibierung von p53 verhindert wird, so dass p53 stabilisiert und aktiviert vorliegt (Roe *et al.*, 2006). Des Weiteren agiert VHL als

Adaptorprotein für die Casein Kinase II, die daraufhin CARD9 (*Caspase recruitment domain containing protein 9*) phosphoryliert und inhibiert, wodurch die Induktion von NFκB ausbleibt (Yang *et al.*, 2007). VHL bewirkt auch die Ubiquitylierung der aPKC (atypische Proteinkinase C) (Okuda *et al.*, 2001), wodurch JunB (*oncogene Jun-B*) verstärkt inhibiert wird, was schließlich zur neuronalen Apoptose führen kann (Lee *et al.*, 2005). Auch Seneszenz-regulierende Prozesse werden durch VHL moduliert. Die Heraufregulation von p400 durch VHL bewirkt z.B. die Inhibierung von Rb, was die Bereitschaft der Zelle zur Seneszenz vermindert (Young *et al.*, 2008). Durch den VHL-vermittelten Abbau der hsRPB7 (*human RNA polymerase II seventh subunit*) greift VHL aktiv in die Mechanismen der DNA-Reparatur ein und verhindert die RNA-POLII-vermittelte Transkription (Na *et al.*, 2003).

Schließlich reguliert VHL auch die Gerüststrukturen innerhalb und außerhalb der Zelle, was zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität, verstärkten Zell-Zellkontakten und somit zu einer verminderten Invasionsfähigkeit führt. Dafür assoziiert VHL mit den Mikrotubuli der Zelle und schützt diese vor der Depolymerisation (Hergovich *et al.*, 2003), wodurch es in Kooperation mit GSK3β (*glycogen synthase kinase 3 beta*) eine wichtige Rolle in der Organisation von Cilien spielt (Thoma *et al.*, 2007). Ein VHL-Verlust bewirkt demnach u.a. eine fehlerhafte Orientierung der Mitosespindeln und eine damit einhergehende chromosomale Instabilität (Thoma *et al.*, 2009). Letztlich greift VHL auch in die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix ein, indem es NEDD8-abhängig die Transkription von Fibronectin und dessen Zusammenlagerung fördert (Ohh *et al.*, 1998; Bluysen *et al.*, 2004; Stickle *et al.*, 2004) und durch die Bindung an Col4A2 (*Collagen IV alpha 2*) die Bildung des Collagen-Netzwerkes steuert (Kurban *et al.*, 2007; Grosfeld *et al.*, 2007).

Regulation

Während bereits eine Vielzahl von Funktionen für VHL bekannt sind und stetig weitere Interaktionen entdeckt werden, sind die Regulationsmechanismen, denen VHL selbst ausgesetzt ist, bisher nur wenig erforscht. Dies ist möglicherweise auch darauf zurückzuführen, dass VHL in der Zelle konstant vorliegt und so eventuell nur einem geringen *turnover* ausgesetzt ist. Dennoch ist bereits bekannt, dass die Expression von *VHL* von den Transkriptionsfaktoren SP1, PAX (*Paired box gene*) und NRF1 (*nuclear respiratory factor*) kontrolliert wird (Kuzmin *et al.*, 1995). Auf Proteinebene wird VHL u.a. durch Phosphorylierungen reguliert. So phosphoryliert die Proteinkinase CK2 (*Casein kinase 2*) VHL an den Serinresten 33, 38 und 43, was zu einer Destabilisierung des Proteins führt (Ampofo *et al.*, 2010). SRC (*v-Src avian sarcoma viral oncogene*) phosphoryliert VHL am Tyrosinrest 185, wodurch eine Ubiquitylierung und darauffolgend der proteasomale Abbau von VHL induziert wird (Chou *et al.*, 2010). Des Weiteren wird VHL reversibel am Lysinrest 171 mit SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) verknüpft. Diese SUMOylierung bewirkt die Oligomerisierung von VHL-Molekülen, welche durch die Konjugation mit PIASy (*protein inhibitor of activated STAT*) noch gesteigert wird. In diesem Zustand liegt VHL stabilisiert vor, kann jedoch seine Funktionen nur noch begrenzt ausüben. Die PIASy-Bindung verstärkt den nukleären Import von VHL und hemmt gleichzeitig die Ubiquitylierung von VHL am Lysinrest 171, welcher auch durch SUMO blockiert vorliegen kann, und am Lysinrest 196. Liegt jedoch keine PIASy-vermittelte SUMOylierung vor, kann VHL an K171 ubiquityliert werden, was auch die Ubiquitylierung von K196 induziert. Diese bewirkt daraufhin, dass das VHL-Protein im Zytoplasma lokalisiert wird (Cai *et al.*, 2010; Cai und Robertson, 2010). Innerhalb der VHL-assoziierten Tumorgenese spielen Fehlregulationen dieser Mechanismen allerdings

meist keine Rolle. So sind fast alle Erkrankungen auf einen teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust von VHL, aufgrund von Mutationen des VHL-Gens oder aber epigenetischer Inaktivierung zurückzuführen (Arai *et al.*, 2010).

1.2.3 Das VHL-Syndrom

Bereits 1904 beschrieb Eugen von Hippel die Entdeckung von Hämangiomen der Netzhaut (von Hippel, 1904). Arvid Lindau verwies 1927 darauf, dass betroffene Patienten oftmals auch ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Hämangioblastomen im Kleinhirn und in den Spinalganglien besitzen (Lindau, 1927). Später wurde die Bezeichnung von Hippel Lindau (VHL)-Syndrom für die autosomal dominante, hereditäre Erkrankung geprägt und schließlich 1993 das Krankheits-assoziierte Tumorsuppressorgen *VHL* beschrieben (Latif *et al.*, 1993). Das VHL-Syndrom hat eine Inzidenz von 1:36000 und erreicht im Alter von 65 Jahren eine Penetranz von ca. 90% (Lonser *et al.*, 2003). Inzwischen lassen sich dem VHL-Syndrom neben den bereits beschriebenen Hämangioblastomen noch weitere durch den VHL-Verlust induzierte Neoplasien viszeraler Gewebe zuordnen. Das Tumorspektrum umfasst Hämangiome der Retina (rHbs), des Kleinhirns und des Rückenmarks (cHbs), Nierenzysten und klarzellige Nierenkarzinome (ccRCC), Phäochromozytome (PCCs) und Paragangliome (PGLs), Pankreaszysten und Tumore der Inselzellen des Pankreas, Tumore des Endolymphsackes des Innenohrs und Zystadenome der Nebenhoden bzw. des *Ligamentum latum* (Maher und Kaelin, 1997; Gruber *et al.*, 1980, Abb. 1.6).

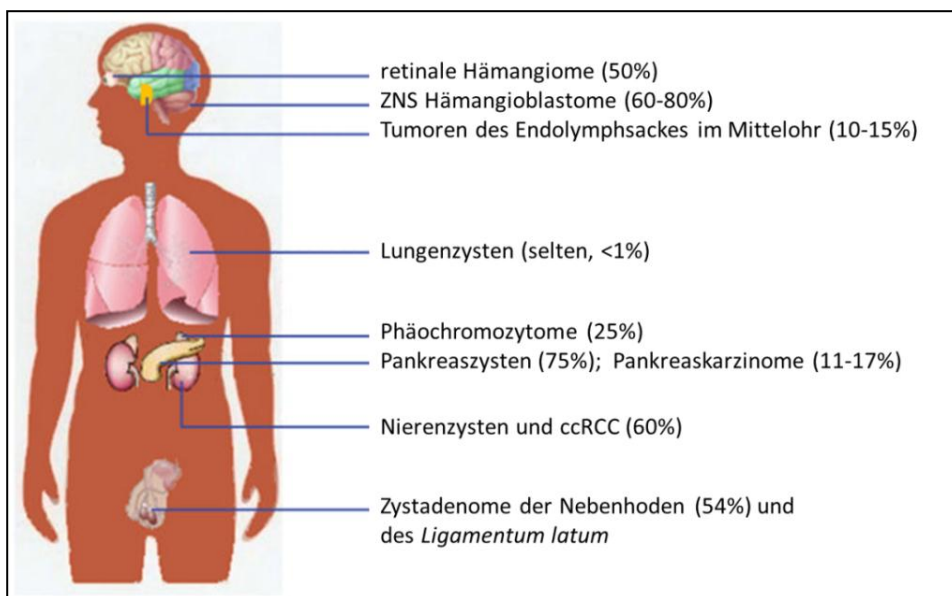


Abb. 1.6 Klinische Manifestierung des VHL-Syndroms. Charakteristisch für die VHL-Erkrankung sind Hämangioblastome des Auges und des ZNS, Nierenzysten und klarzellige Nierenkarzinome, Phäochromozytome und Pankreaszysten. Seltener entwickeln VHL-Patienten Adenome in den Nebenhoden, Pankreaskarzinome und Tumore im Endolymphsack des Ohres. ZNS: Zentralnervensystem, ccRCC: klarzelliges Nierenkarzinom (modifiziert nach Li und Kim, 2011).

Die meist benignen Tumore entwickeln sich häufig multifokal und bilateral. Obwohl VHL ubiquitär exprimiert wird und somit dessen Verlust theoretisch zu einer Tumorinduktion in jedem Gewebe

führen könnte, entstehen VHL-assoziierte Tumore lediglich in Organen, in denen die VHL-Expression bereits während der Embryogenese besonders stark war. Patienten mit VHL-Syndrom besitzen eine inaktivierende Keimbahn-Mutation im *VHL*-Gen. Eine spontane, somatische Mutation des zweiten *VHL*-Allels, die einen teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust (*loss of heterozygosity, LOH*) von *VHL* bewirkt, vermindert oder inhibiert dessen Tumorsuppressorwirkung, so dass die Tumorgenese innerhalb des Gewebes eingeleitet wird (Prowse *et al.*, 1997). VHL-assoziierte Tumore entwickeln sich sporadisch auch in nicht prädispositionierten Patienten, doch auch hier ist die Ursache der Tumorentwicklung ein Funktionsverlust von VHL, der durch spontane, somatische Mutationen beider *VHL*-Allele induziert wird (Maher *et al.*, 2011).

Klinisch wird das VHL-Syndrom in die VHL Typ 1-Erkrankung, welche keine Phäochromozytome induziert, und VHL Typ 2-Erkrankung, bei der Phäochromozytome ausgebildet werden, eingeordnet (Neumann und Wiestler, 1991). 80% der VHL-Patienten können dem VHL Typ 1 zugeordnet werden, der durch einen vollständigen Funktionsverlust von *VHL* aufgrund von Deletionen, *Nonsense*- oder *Missense*-Mutationen gekennzeichnet ist und zur Entstehung von Hämangioblastomen und klarzelligem Nierenkarzinomen führt. 20% der VHL-Patienten entsprechen dem VHL Typ 2, der durch *Missense*-Mutationen entsteht, die zu einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit von *VHL* führen. Der VHL Typ 2 wird weiter in 2A, 2B und 2C unterteilt (Brauch *et al.*, 1995; Hoffman *et al.*, 2001). Eine VHL Typ 2A (V2A)-Mutation bewirkt eine geringe Abschwächung der E3-Ligase-Funktion für HIF α und den Verlust der Mikrotubuli-Stabilisierung durch VHL, was scheinbar zur Ausbildung von Hämangioblastomen und Phäochromozytomen beiträgt. Die VHL Typ 2B (V2B)-Mutation vermindert die VHL-vermittelte HIF α -Degradation deutlich und ist an der Entstehung von Phäochromozytomen, Hämangioblastomen und klarzelligem Nierenkarzinomen beteiligt. Die VHL Typ 2C (V2C)-Mutation erhält hingegen die VHL-induzierte Ubiquitylierung von HIF α , stört jedoch die VHL-Interaktion mit der Fibronectin-Matrix und trägt ausschließlich zur Bildung von Phäochromozytomen bei (Richard *et al.*, 2012)(Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Klassifizierung der VHL-Erkrankung. Der VHL Typ 1 ist durch einen vollständigen Funktionsverlust von VHL charakterisiert, der die Ausbildung von Hämangioblastomen und klarzelligem Nierenkarzinomen induziert. Der VHL Typ 2 ist durch *Missense*-Mutationen gekennzeichnet, welche nur einen teilweisen Funktionsausfall des VHL-Proteins bewirken. Eine VHL Typ 2A-Mutation beeinträchtigt den HIF α -Abbau und die Mikrotubuli-Stabilität und führt zur Bildung von Hämangioblastomen (Hbs) und Phäochromozytomen (PCCs). VHL Typ 2B-Mutationen vermindern die E3-Ligase-Funktion für HIF α deutlich und induzieren Hbs, klarzellige Nierenkarzinome (ccRCC) und PCC. VHL 2C-Mutationen werden mit einer Destrukturierung der Fibronectin-Matrix assoziiert und bewirken die Ausbildung von PCCs Mts: Mikrotubuli, Fn: Fibronectin

VHL-Syndrom Typ	VHL-Mutation	Tumorart			Funktionsminderung von VHL
		Hbs	ccRCC	PCC	
1	Deletion, <i>Nonsense</i> <i>Missense</i>	+	+	–	vollständiger Funktionsverlust: HIF α ↑↑↑; Mts ↓; Fn↓
2A	<i>Missense</i>	+	–	+	HIF α ↑; Mts ↓
2B	<i>Missense</i>	+	+	+	HIF α ↑↑
2C	<i>Missense</i>	–	–	+	Fn↓

Hämangioblastome (Hbs)

Hämangioblastome bestehen aus einer Mischung aus Endothelzellen, Perizyten und Stromazellen. Den Ursprung der Hbs bilden dabei wahrscheinlich die Stromazellen, die aus arretierten Hämangioblasten entstehen und in denen ein VHL-Verlust nachweisbar ist. Die Schädigung des zweiten VHL-Allels scheint also bereits während der Entwicklung des Nervensystems stattzufinden. Die Tumore weisen eine erhöhte Expression der HIF-Zielgene VEGF, PDGF- β , EPO (*Erythropoietin*) und TGF- α auf, die zum einen die Vaskulogenese und Angiogenese induzieren, zum anderen die Proliferation fördern und so das Erscheinungsbild von Hbs formen (Kaelin *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2007). Zerebrale Hämangioblastome (cHbs) treten in 60-80% der VHL-Patienten auf, das Durchschnittsalter der Diagnose beträgt 30 Jahre. Sie entwickeln sich entlang der kraniospinalen Achse bevorzugt im Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark meist multizystisch und seltener als solide Tumore oder Tumore mit einem gemischten Erscheinungsbild (Wanebo *et al.*, 2003). Die Tumore wachsen langsam, führen jedoch ab einer gewissen Größe, aufgrund des erhöhten intrakraniellen Drucks, zu Kopfschmerzen. Seltener treten auch Schwindelgefühle, Übelkeit und Ataxien auf. Als Therapie bleibt derzeit nur die operative Entfernung des Tumorgewebes, der auch bei fortgeschrittener Operationstechnik stets kleine Bereiche des gesunden Nervengewebes zum Opfer fallen (Richard *et al.*, 1998). Die Bildung und das Wachstum neuer cHbs kann jedoch nicht vermindert werden, so dass die multifokale Erscheinung schließlich, aufgrund der Verdrängung gesunden Gewebes und der häufigen chirurgischen Eingriffe, die Malignität vieler cHbs begründet. Retinale Hämangioblastome (rHbs) entstehen in über 50% der VHL-Patienten, meist multipel und bilateral. Die Diagnose wird mittels Fundoskopie durchschnittlich im Alter von 25 Jahren gestellt und die Behandlung erfolgt durch Photokoagulation oder Kryotherapie. Die nicht rechtzeitige Therapie kann zur Netzhautablösung, Glaukomen oder Erblindung führen (Dollfus *et al.*, 2002).

Klarzellige Nierenkarzinome (*clear cell renal cell carcinoma*, ccRCC)

Klarzellige Nierenkarzinome entwickeln sich in ca. 70% der VHL Typ 1 und Typ 2B-Patienten und stellen die häufigste Todesursache von VHL-Patienten dar. Das Durchschnittsalter der Diagnose beträgt 40 Jahre, wobei dies darauf zurückzuführen ist, dass die Erkrankung meist symptomfrei verläuft und so erst spät entdeckt wird. Vom VHL-Syndrom betroffene Familien erhalten jedoch eine verbesserte Prognose durch häufige Untersuchungen der Niere auf Neoplasien. Ihren Ursprung finden ccRCCs in den Epithelzellen des proximalen und seltener des distalen Tubulus (Mandriota *et al.*, 2002). Als Vorläufer bilden sich meist multiple Zysten, aus denen dann vereinzelt ccRCCs hervorgehen können. Histologisch lassen sich ccRCCs deutlich von anderen Nierenkarzinomen abgrenzen. Die Einlagerung von großen Mengen an Lipiden und Glykogen lässt das Zytoplasma in der H/E-Färbung klar erscheinen, was den Tumoren ihren Namen verleiht (Algaba *et al.*, 2011; Abb. 1.7A). Der Entstehungsmechanismus der ccRCCs ist derzeit weitgehend unbekannt. So bilden sich nach dem Verlust des verbliebenen wildtypischen Allels wahrscheinlich zunächst Nierenzysten. Dieser *LOH* von VHL scheint jedoch nicht zu genügen, um die Epithelzellen des Tubulus in Tumorzellen zu transformieren. Möglicherweise ist dafür ein dritter *hit* in einem anderen Gen, welches bisher noch nicht identifiziert wurde, unumgänglich (Kaelin, 2005). Außerdem scheint sich während der Tumorgenese eine Verschiebung des Verhältnis von HIF1 zu HIF2 zu ergeben, die Stabilisierung von HIF2 α ist möglicherweise entscheidend für die Progression des ccRCCs (Kondo *et al.*, 2003; Zimmer *et al.*, 2004). Neben den bereits für Hbs beschriebenen HIF1-Zielgenen VEGF, PDGF- β und

TGF α , die zur Tumorentstehung beitragen, ist in fortgeschrittenen Tumoren auch verstärkt das HIF2-Zielgen CXCR4 nachweisbar, welches das metastatische Potential des Tumors erhöht (Haase, 2006). Maligne ccRCCs induzieren multiple Metastasen, die sich v.a. im Knochen und in der Leber manifestieren (Leibovich *et al.*, 2005). Die Therapie der Wahl stellt derzeit auch für ccRCCs noch die Entnahme des Tumorgewebes dar (Roupret *et al.*, 2003), was nach großen oder mehrfachen Eingriffen zwangsläufig zu einer Niereninsuffizienz führt, wodurch häufig eine Dialyse notwendig wird.

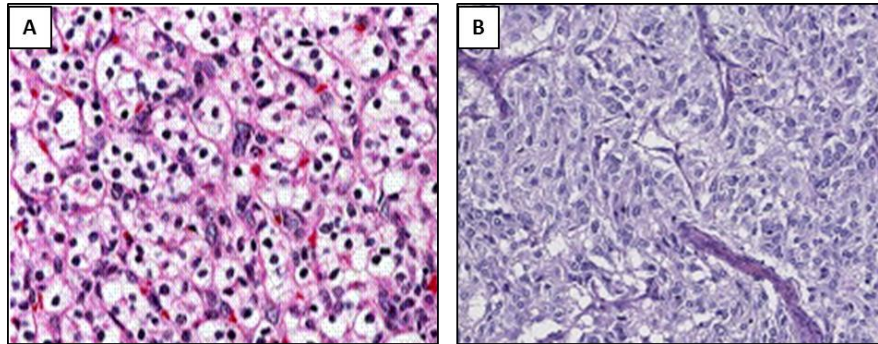


Abb. 1.7 Morphologie von klarzelligen Nierenkarzinomen und Phäochromozytomen. A Die Morphologie des klarzelligen Nierenkarzinoms ist in der H/E-Färbung durch ein klares Zytoplasma gekennzeichnet, welches auf den hohen Gehalt von nicht angefärbten Lipiden und Glykogen zurückzuführen ist (modifiziert nach Linehan und Ricketts, 2012). B Phäochromozytome entstehen aus dem Nebennierenmark und sind durch polygonale Zellen mit granulärem Zytoplasma und viele Blutgefäße charakterisiert (modifiziert nach Kominoth *et al.*, 2009)

Phäochromozytome (PCCs) und Paragangliome (PGLs)

Zwischen 16-30% der VHL Typ 2-Patienten entwickeln Phäochromozytome, welche in einem Durchschnittsalter von 30 Jahren diagnostiziert werden. Das Risiko für Paragangliome, die extraadrenalen PCCs entsprechen, ist hingegen deutlich geringer (Maher *et al.*, 2011). PCCs und PGLs entstehen aus neuronalen Vorläuferzellen und sind charakterisiert durch Nester großer, polygonaler Zellen mit granulärem Zytoplasma, die mit vielen, kleinen Kapillaren durchzogen sind (Koch *et al.*, 2002; Abb. 1.7 B). VHL-assoziierte PCCs sind im Nebennierenmark lokalisiert, während PGLs in der Umgebung von sympathischen Ganglien oder entlang der viszeralen Verzweigungen sympathischer Nervenfasern auftreten (Komminoth *et al.*, 2009). Die VHL-induzierte Tumorgenese der PCCs und PGLs ist mit einer zumindest teilweise erhaltenen VHL-vermittelte HIF α -Degradierung korreliert, so dass HIF im Entstehungsprozess dieser Tumore wohl keine entscheidende Rolle spielt. Stattdessen scheint der Verlust von VHL oder anderer PCC-assoziiierter Gene in der späten Embryonalentwicklung den durch Reduktion des NGF (*nerve growth factor*) induzierten Zelltod der neuronalen Vorläuferzellen zu verhindern (Lee *et al.*, 2005). PCCs weisen neben einer erhöhten Expression extrazellulärer Proteine einen Verlust des Enzyms PMNT (*phenylethanolamine-N-methyltransferase*) auf. Dadurch wird die Bildung von Adrenalin verhindert und Noradrenalin vermehrt, was u.a. zu Kopfschmerzen, Bluthochdruck und häufigerem Schwitzen führen kann (Eisenhofer *et al.*, 2003 und 2004). Obwohl PCCs nur selten maligne werden, ist die Therapie der Wahl meist eine teilweise oder vollständige operative Entfernung des Tumors (Jaroszewski *et al.*, 2003).

1.2.4 Tiermodelle

Um die Grundlagen einer Erkrankung zu erforschen, sind die Möglichkeiten von *in vitro*-Experimenten meist frühzeitig erschöpft. Die detaillierte Analyse des Einflusses spezifischer Gene auf die Entwicklung eines Organismus oder einer Erkrankung wird daher oftmals unumgänglich *in vivo* vorgenommen. Diese Tiermodelle bieten auch die Möglichkeit, diverse Therapeutika in Organismen, die dem Menschen genetisch stark ähneln, zu testen, bevor sie in klinischen Studien auf den Menschen angewandt werden. Um das VHL-Syndrom besser zu verstehen, wurden von mehreren Arbeitsgruppen bereits einige konstitutive und konditionale Tiermodelle generiert. Bereits in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* konnte der hoch konservierte Regulationsmechanismus von HIF durch VHL- und PHD-Homologe gezeigt werden (Epstein *et al.*, 2001; Arquier *et al.*, 2006). In *C.elegans* reguliert das VHL-Homolog sowohl HIF-abhängig als auch HIF-unabhängig v.a. den Energiemetabolismus (Bishop *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005). Der konstitutive *dVHL*-Verlust induziert in *Drosophila* den Tod in frühen Larvenstadien aufgrund der Fehlbildung der Tracheen (Adryan *et al.*, 2000). Im Zebrafisch (*Danio rerio*) konnte gezeigt werden, dass eine *zVHL-nonsense*-Mutation zu einer Neovaskularisierung im Hirn und im Auge, die auch zur Entstehung von Hbs im Menschen beiträgt, und zu Symptomen der Cuvash Polycythämie führt (Rooijen *et al.*, 2009 und 2010). Die erste *Vhl-Knockout*-Maus wurde 1997 von Gnarra *et al.* publiziert. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass der homozygote *Vhl*-Verlust die Letalität der Föten an Tag 10.5-12.5 der Embryogenese aufgrund der Fehlregulation der Vaskuloangiogenese bewirkt (Gnarra *et al.*, 1997). Diese Erkenntnisse aus unterschiedlichsten Tiermodellen verdeutlichen die essentielle Funktion der Regulation der Gefäßneubildung durch VHL. So führt auch die Endothelzell-spezifische *Vhl*-Defizienz in Mäusen zu einer defekten Vaskulogenese in der Plazenta, erweiterten Gefäßen mit reduzierter Komplexität und erhöhter Permeabilität, wodurch der Tod des Embryos induziert wird (Tang *et al.*, 2006). Um ccRCCs näher zu erforschen, wurden bereits mehrere konditionale Mausmodelle entwickelt. Allerdings führte der spezifische *Vhl*-Verlust in proximalen Tubuluszellen lediglich in 20% der Tiere zu Mikrozysten (Rankin *et al.*, 2006), in distalen Tubuluszellen entwickelten sich oftmals Hydronephrosen (Frew *et al.*, 2008) und in Podocyten kam es zur Glomerulomegalie (Brukamp *et al.*, 2007). Auch die Inaktivierung von *Vhl* in neuroepithelialen Vorläuferzellen führt zwar zu abnormaler neuronaler Differenzierung und embryonaler Letalität, konnte aber noch nicht mit der Entstehung von PCCs in Verbindung gebracht werden (Kapitsinou und Haase, 2008). Lediglich der spezifische *Vhl*-Verlust in Pankreas-Vorläuferzellen induziert mit Zystadenomen und Hyperplasien ein für das VHL-Syndrom typisches Krankheitsbild (Shen *et al.*, 2009). Weitere Mausmodelle untersuchen u.a. die Auswirkungen eines VHL-Verlustes in der Leber (Haase *et al.*, 2001), dem Knochen (Wang *et al.*, 2007) und im Thymus (Neumann *et al.*, 2005). Die derzeit bekannten Tiermodelle weisen die Relevanz von VHL in der Entwicklung vieler Gewebe nach, können jedoch nicht die mit einer VHL-Defizienz assoziierten Symptome des VHL-Syndroms erklären.

1.3 PTEN

1.3.1 Struktur und Lokalisation

Die Entstehung von Tumoren in unterschiedlichen Geweben ist häufig mit einem Verlust des Chromosomenbereiches 10q23 assoziiert. 1997 fanden zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein Gen auf Chromosom 10q23.3, dem die entscheidende Tumorsuppressorfunktion zugeordnet werden konnte und das den Namen PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) bzw. MMAC1 (*mutated in multiple advanced cancers 1*) erhielt (Li *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997). PTEN ist 108,8 kb groß und besteht aus 9 Exons (www.ensembl.org). Durch alternatives Splicing entstehen nach der Transkription 3 reife mRNAs. Die häufigste, 5,5 kb große PTEN-Isoform umfasst alle abgelesenen Exons und führt nach der Translation zu einem stabilen Protein von 403 Aminosäuren. Die beiden anderen mRNA-Isoformen enthalten einerseits einen Teil des Introns E, auch Exon 5b genannt (PTEN-B), und andererseits den 5'-Bereich des Introns H (PTEN-Δ). In beiden Intronbereichen liegt ein Stopcodon, welches die Translation verkürzter, instabiler Proteine bewirkt, die eine niedrige enzymatische Aktivität aufweisen und frühzeitig abgebaut werden (Sharrard und Maitland, 2000). Das stabilisierte PTEN-Protein enthält N-terminal eine konservierte dualspezifische Phosphatase-Domäne mit dem katalytisch aktiven Zentrum HCXXGXXR, wie sie auch in anderen Protein-Phosphatasen zu finden ist (Denu *et al.*, 1996). Außerdem besitzt PTEN eine C2-Domäne, welche neben der eigenen Phosphatase-Domäne auch Phospholipide bindet (Leslie and Downes, 2004; Vazquez *et al.*, 2001). Der C-Terminus besteht aus einer PEST-Sequenz und einer PDZ-Domäne, die die Interaktion mit anderen Proteinen induzieren und die Stabilität des Proteins beeinflussen (Lee *et al.*, 1999; Georgescu *et al.*, 1999).

PTEN ist sowohl im Zytoplasma, wo es zum Teil diffus und zum Teil an die Membran gebunden vorliegt, als auch im Kern lokalisiert (Das *et al.*, 2003; Ginn-Pease *et al.*, 2003). Der Transport aus dem Zytoplasma in den Kern wird dabei durch eine NEDD4-1-vermittelte Mono-Ubiquitylierung an Lys289 induziert (Trotman *et al.*, 2007)(Abb. 1.8). PTEN wird bereits in der Embryoentwicklung ubiquitär exprimiert und führt bei einem vollständigen Funktionsverlust in Mäusen an Tag 6,5 zum Tod des Embryos (Podsypannina *et al.*, 1999). Das humane PTEN wird im adulten Organismus verstärkt in Geweben gebildet, die bei einer Fehlregulation von PTEN vom Cowden-Syndrom und vom Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom betroffen sind. So wird es in der Haut, der Schilddrüse und im Zentralnervensystem, aber auch im Gastrointestinaltrakt, peripheren und autonomen Nervensystem vermehrt exprimiert (Gimm *et al.*, 2000).

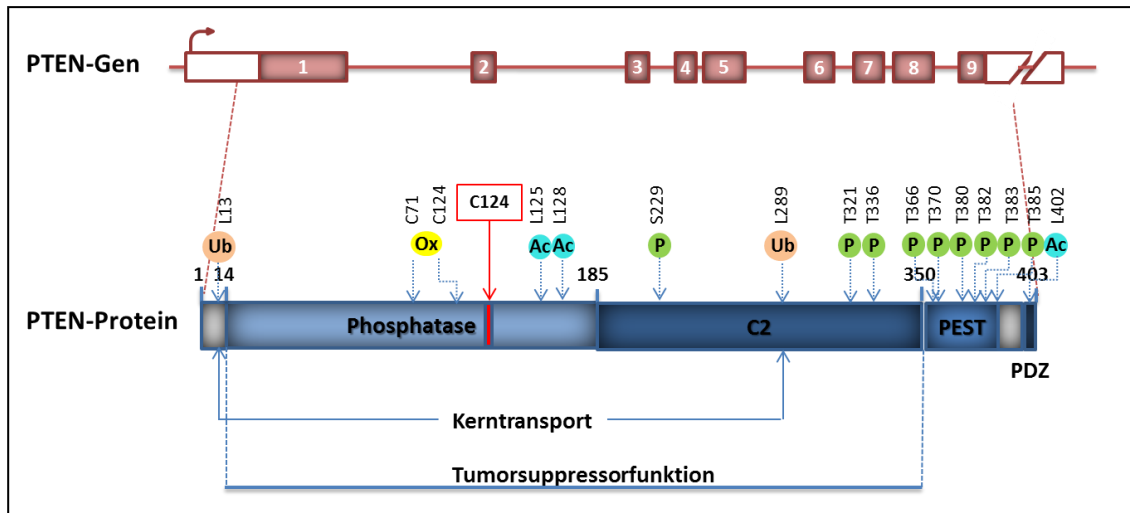


Abb. 1.8 Struktur des PTEN-Gens und des PTEN-Proteins. Das *PTEN*-Gen liegt auf Chromosom 10q23.3 und besteht aus 9 Exons, die sich über eine DNA-Sequenz von 108,8 kb erstrecken. Das Genprodukt enthält N-terminal eine duale Phosphatase-Domäne mit dem katalytischen Zentrum C124 und eine C2-Domäne, die für die Funktion der Tumorsuppression nötig sind. C-terminal schließen sich PEST-Sequenzen, die Angriffsstellen für Regulationsmechanismen bieten, und eine PDZ-Domäne, die das Molekül an der Membran lokalisiert, an. Die Mono-Ubiquitinierung induziert den Kerntransport. P: Phosphorylierungsstelle, Ub: Ubiquitinierungsstelle, Ac: Acetylierungsstelle, Ox: Oxidationsstelle

1.3.2 Funktion und Regulation

Funktion

PTEN übt seine Tumorsuppressorfunktion größtenteils über seine dualespezifische Phosphatase-Domäne aus, mit der es sowohl mit Lipiden als auch Proteinen interagieren und diese dephosphorylieren kann. Eine bedeutende Rolle spielt PTEN bei der Inhibierung des PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*)-Signalweges, welcher das Wachstum, den Zelltod und Bewegungsvorgänge der Zelle auf vielfältige Weise reguliert. PI3K wird dabei durch Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), die extrazelluläre Signale ins Innere der Zelle vermitteln, direkt oder über Adaptorproteine aktiviert und katalysiert daraufhin die Phosphorylierung des membranständigen Lipids PIP_2 (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphatate*) zu PIP_3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphatate*). PTEN kehrt diese Reaktion um, indem es PIP_3 dephosphoryliert, wodurch es die Signalweiterleitung unterbricht und den PI3K-Weg vollständig inhibiert (Manning und Cantley, 2007; Cantley und Neel, 1999).

Ein PTEN-Verlust, wie er häufig in Tumoren zu finden ist, führt zu einer ungebremsten Signalweiterleitung und einem veränderten Zellverhalten. PIP_3 rekrutiert AKT (*v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog*)/PKB (*Protein kinase B*) und PDK1 (*pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1*) an die Membran, was die PDK1-vermittelte Aktivierung von AKT induziert (Alessi *et al.*, 1997). AKT ist ein Schlüsselmolekül im PI3K-Signalweg und reguliert im aktivierten Zustand durch Phosphorylierungen alle nachgeschalteten Moleküle. So wird u.a. das Überleben der Zellen durch die Inhibierung von Apoptose-Mechanismen gesichert. Das proapoptotische BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familienmitglied BAD (*Bcl-2 antagonist of cell death*) wird dabei sowohl direkt von AKT inaktiviert (Datta *et al.*, 1997), als auch indirekt über die Blockade des Transkriptionsfaktors FOXO (*Forkhead box O*) gehemmt, dessen AKT-vermittelter Kernexport die Expression von diversen Molekülen verhindert, die den Zelltod, den Zellzyklus-Arrest und den Energiemetabolismus

regulieren (Tran *et al.*, 2003). AKT inhibiert auch die Caspase 9, welche eine Kaskade von weiteren Proteasen initiiert, die den apoptotischen Zelltod vermitteln (Cardone *et al.*, 1998). Schließlich bewirkt AKT die Translokation von Mdm2 (*mouse double minute 2 homolog*) in den Kern, wo es p53, einen Hauptinitiator des Zelltodes, inhibiert (Zhou *et al.*, 2001). Die Proliferation wird durch den PI3K-Signalweg gefördert, indem AKT u.a. die Zellzyklus-Inhibitoren p27 und p21 und inhibiert (Liang *et al.*, 2003; Heron-Mihavet *et al.*, 2006). Außerdem inaktiviert AKT die Kinase GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*), die die Degradation der Zellzyklus-fördernden Cycline D und E und der Transkriptionsfaktoren c-JUN (*v-JUN avian sarcoma virus 17 oncogene homolog*) und c-MYC induziert (Cross *et al.*, 1995; Mishra, 2010). Eine entscheidende Rolle für das Wachstum der Zelle und die Tumorgenese spielt mTOR (*mammalian target of rapamycin*), das durch AKT aktiviert wird und sich daraufhin zum mTORC1-Komplex zusammenlagert und die Translation einer Vielzahl von mRNAs u.a. Cyclin D1 und c-Myc fördert (Mamane *et al.*, 2004). Des Weiteren aktiviert mTORC1 auch die Translation von HIF1 α (Hudson *et al.*, 2002), das in Kombination mit seinem Bindungspartner ARNT u.a. die Expression von VEGF induziert, welches wiederum den PI3K-Signalweg anschaltet und somit einen positiven *Feedback*-Mechanismus bewirkt (Forsythe *et al.*, 1996). VEGF initiiert zusätzlich, wie auch die AKT-aktivierte eNOS (*Endothelial nitric oxide synthase*), die Angiogenese (Dimmeler und Zeiher, 1999).

Auch der Energie-Metabolismus der Zelle wird über den PI3K-Signalweg reguliert. So werden die Glucosetransporter GLUT-1 und GLUT-4 heraufreguliert bzw. transloziert (Taha *et al.*, 1999; Kohn *et al.*, 1996), Enzyme des Glucoseabbaus, wie die *Hexokinase*, stimuliert (Robert und Hay, 2006) und über GSK3 auch die Lipidproduktion beeinflusst (Sundqvist *et al.*, 2005; Abb. 1.9).

Neben all diesen Mechanismen, die zum Tumorwachstum beitragen können, inhibiert PTEN weiterhin Migrations- und Invasionsvorgänge der Zelle. Es hemmt die AKT-abhängige Aktivierung der Rho-GTPasen CDC42 (*Cell division cycle*) und RAC1 (*RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1*), die die Organisation des Aktingerüsts regulieren und so die Migrationsfähigkeit der Zelle erhöhen (Liliental *et al.*, 2000). In chemotaktischen Zellen, wie dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum amoebae*, induzieren diese Rho-GTPasen die Ausbildung von Pseudopodien. Auch der durch die PI3K und PTEN-vermittelte PIP₂-PIP₃-Gradient trägt zur gerichteten Bewegung von Einzelzellen bei (Iijima und Devreotes *et al.*, 2002; Postma *et al.*, 2004). Dieser Mechanismus führt ebenso zur Ausbildung der Zellpole und trägt damit zur Differenzierung von Epithelzellen und Neuronen im Gewebe bei. Außerdem beeinflusst der PIP₂-PIP-Gradient die Zellteilung und die Aktivierung von T-Zellen (Leslie *et al.*, 2008). Aber auch über seine Protein-Phosphatase-Funktion kann PTEN die Zellmotilität beeinträchtigen. Indem PTEN die Adaptorproteine SHC und FAK (*Focal adhesion kinase*) dephosphoryliert, inhibiert es deren Integrin-induzierte Signalweiterleitung und die darauffolgende Umgestaltung der fokalen Kontakte an der Zellmembran. Die Migration wird normalerweise über das FAK-induzierte p130Cas und über die SHC-vermittelte Aktivierung des RAS/MAPK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*)-Signalweges reguliert (Gu *et al.*, 1999; Yamada und Araki, 2001; Abb. 1.9).

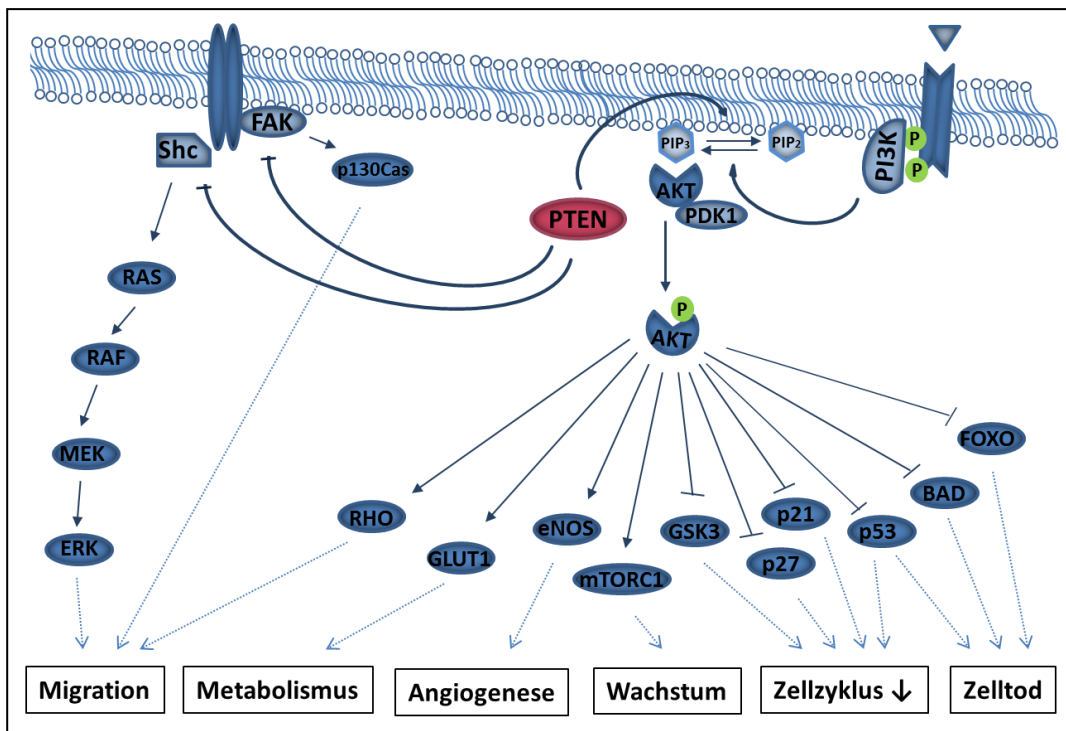


Abb. 1.9 Die duale Phosphatase-Aktivität von PTEN. PTEN inhibiert den PI3K-Signalweg, indem es das an der Membran lokalisierte Lipid PIP₃ dephosphoryliert und dadurch die PIP₃-vermittelte Aktivierung von AKT verhindert. AKT ist ein Schlüsselmolekül des PI3K-Weges und reguliert über die Aktivierung bzw. Inaktivierung vieler verschiedener Moleküle das Wachstum, die Proliferation, den Zelltod, die Angiogenese, den Energie-Metabolismus und die Bewegungsvorgänge der Zelle. Des Weiteren hemmt PTEN die Proteine SHC und FAK durch eine Dephosphorylierung und unterbindet dadurch die Aktivierung von p130CAS und des RAS/MAPK-Signalweges, die die Migration und Invasion der Zelle fördern.

Der Verlust des PTEN-Proteins im Kern ist mit der Entwicklung von deutlich aggressiveren Tumoren assoziiert. Dies verdeutlicht, dass PTEN auch nukleär eine Tumorsuppressorfunktion ausübt. PTEN komplexiert im Kern mit p53, wodurch p53 stabilisiert, dessen Funktion als Transkriptionsfaktor verstärkt und so die Zellzyklus-Regulation und die Seneszenz-Antwort auf Schädigungen der Zelle aufrechterhalten wird (Freeman *et al.*, 2003). PTEN bindet auch die E3-Ligase APC/C (*anaphase promoting complex; also known as the cyclosome*), wodurch deren Interaktion mit ihrem Coaktivator CDH1 (*CDC20 homologue 1*) gesteigert wird, was zu einer erhöhten APC/C-vermittelten Degradation Zellzyklus-relevanter Moleküle führt (Song *et al.*, 2011). Des Weiteren erhöht PTEN die genomische Stabilität, indem es die Chromosomen durch die Interaktion mit dem Kinetochor-assoziierten Protein CENPC stabilisiert und die Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA (DSBs) durch Aktivierung der RAD51-Expression und durch Inhibierung der Inaktivierung von CHEK1 (*checkpoint kinase 1*) stärkt (Shen *et al.*, 2007; Puc *et al.*, 2005).

Regulation

Die Regulation von PTEN ist vielseitig und greift auf DNA-, RNA- und Proteinebene in die Expression, Stabilität und Funktionsfähigkeit des Moleküls ein. Die Transkription von *PTEN* wird durch eine große Zahl von Transkriptionsfaktoren, die selbst den Tumorsuppressoren oder Onkogenen zugeordnet werden, reguliert. So wird die Expression von *PTEN* u.a. durch p53 (Stambolic *et al.*, 2001), EGR1 (*early growth response 1*; Virolle *et al.*, 2001) und PPAR γ (*Peroxisome proliferator activated receptor gamma*; Patel *et al.*, 2001) aktiviert, die tumor-hemmende Funktionen wie

Zellzyklus-Inhibierung, Förderung der Differenzierungs- und Apoptose-Mechanismen und die Regulation des Metabolismus besitzen. Wachstumsfördernde Transkriptionsfaktoren, wie c-Jun (Hettinger *et al.*, 2007), NFκB (*Nuclear factor Kappa B*; Xia *et al.*, 2007) und BMI1 (*Leukemia viral BMI-1 oncogene*; Song *et al.*, 2009) hemmen hingegen die Transkription von *PTEN*. Weiterhin führen epigenetische Signale zur Stilllegung des *PTEN*-Gens. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass Methylierungen im Promotor und SALL4-induzierte Deacetylierungen zur Inhibierung der Transkription von *PTEN* führen (Rennie und Nelson, 1998-1999; Lu *et al.*, 2009).

Auch posttranskriptional nehmen diverse Transkriptionsfaktoren indirekt Einfluss auf das *PTEN*-Transkript, indem sie *PTEN*-spezifische miRNAs (microRNAs) heraufregulieren. MiRNAs bestehen aus einer ca. 25 bp langen, nicht kodierenden aber zur Ziel-mRNA komplementären Sequenz. Durch Anlagerung einer miRNA wird das *PTEN*-Transkript doppelsträngig, wodurch die Translation der mRNA unmöglich wird und stattdessen ein RISC-vermittelte Abbau stattfindet. Eine mit *PTEN*-Verlust assoziierte und oft in Tumoren heraufregulierte miRNA ist miR-21, die u.a. verstärkt in Glioblastomen und Brustkrebs-Zellen nachgewiesen werden konnte (Salmena *et al.*, 2008). Die Expression des Pseudogens *PTENP1*, welches auf Chromosom 9p13.3 kodiert ist und Homologien zu *PTEN* zeigt, stabilisiert die *PTEN*-mRNA, indem *PTENP1*-Transkripte *PTEN*-assoziierte miRNAs abfangen. Wie bedeutend dieses Pseudogen für die Stabilisierung von *PTEN* ist, zeigt der häufige Verlust von *PTENP1* in Tumoren (Poliseno *et al.*, 2010). Auch ceRNAs (*competing endogenous RNAs*), Protein-kodierende RNAs mit *PTEN*-Homologien wie *ZEB2* (*Zink finger E-box binding homeobox 2*), stabilisieren *PTEN*, indem sie miRNAs binden (Tay *et al.*, 2011; Karreth *et al.*, 2011).

Posttranslational wird *PTEN* v.a. in der C2-Domäne und dem C-Terminus chemisch modifiziert. Einen großen Einfluss nimmt dabei v.a. die CK2 auf die Stabilität des Proteins, die *PTEN* in den PEST-Sequenzen an S380, T382, T383 und S385 phosphoryliert. Dies führt zu einer Konformationsänderung, bei der der negativ geladene C-Terminus mit positiv geladenen Aminosäuren des Proteins interagiert, wodurch *PTEN* stabilisiert wird, jedoch nicht mehr an der Membran gebunden werden und seine Phosphatase-Funktion nicht mehr ausüben kann (Vazquez *et al.*, 2001; Torres und Polido, 2001). Die Acetylierungen von *PTEN* an K125 bis K128 durch PCAF (*p300/CBP-associated factor*) und an K402 durch CBP (*CREB binding protein*) inaktivieren die Phosphatase-Domäne und steigern PDZ-vermittelte Interaktionen mit anderen Molekülen (Okumura *et al.*, 2006; Ikenoue *et al.*, 2008). Des Weiteren ist *PTEN* auf oxidativen Stress (*ROS*; *reactive oxygen species*) sensibilisiert, der die Oxidation des katalytischen Zentrums und somit die Bildung einer Disulfid-Brücke zwischen C71 und C124 veranlasst, was zur Inaktivierung des Proteins führt (Lee *et al.*, 2002). Schließlich wird *PTEN* durch die HECT-E3-Ligase NEDD4-1 (*neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4-1*) an K13 und K289 ubiquitinyliert. Während die Poly-Ubiquitinylierung die proteasomale Degradation von *PTEN* induziert (Wang *et al.*, 2007), bewirkt die Mono-Ubiquitinylierung dieser Aminosäurereste die Translokation von *PTEN* in den Kern (Trotman *et al.*, 2007), welche durch die HAUSP (*herpesvirus associated ubiquitin specific protease*)-vermittelte Deubiquitinylierung rückgängig gemacht werden kann (Song *et al.*, 2008; Abb. 1.8).

Neben den chemischen Modifikationen wird das *PTEN*-Protein auch durch Interaktionen mit anderen Proteinen reguliert. So bewirkt u.a. die Interaktion von *PTEN* und MAGI2 (*Membrane associated guanylate kinase inverted 2*) bzw. β-Arrestin eine erhöhte Lipidphosphatase-Aktivität (Wu *et al.*, 2000; Valiente *et al.*, 2005). Die Interaktion mit Myosin V ist abhängig von CK2- bzw. GSK3-vermittelten Phosphorylierungen von *PTEN* und rekrutiert dieses an die Membran (van Diepen *et al.*,

2009). NHERF (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*) lokalisiert PTEN in der Nähe des PDGF (*Platelet derived growth factor*)-Rezeptors und steigert so die Inhibierung der PI3K-induzierte Signale (Takahashi *et al.*, 2006). Negativ wird PTEN u.a. durch die Interaktion mit DJ1 (*PARK7*; *Parkinson protein 7*), die durch oxidativen Stress gefördert wird (Kim *et al.*, 2009), und MSP58, die durch die Phosphorylierung von T366 induziert wird (Okumura *et al.*, 2005), reguliert. Auch den Bindungen an PREX2a (*PIP₃ dependent RAC exchanger factor 2a*), SIPL1 (*shank interacting protein like 1*) und MAN2C1 (*α-mannosidase 2C1*) wird eine hemmende Wirkung auf PTEN zugeschrieben (Fine *et al.*, 2009; He *et al.*, 2010 und 201; Abb. 1.10).

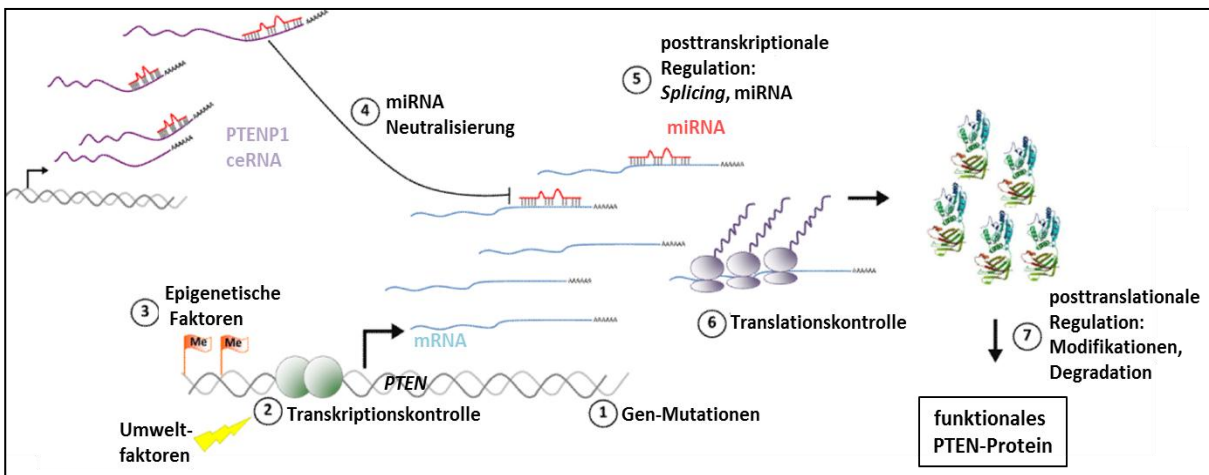


Abb. 1.10 Die Regulation von PTEN. PTEN ist einer Vielzahl von Regulationsmechanismen auf allen Expressionsebenen unterworfen. Die Expression kann durch mögliche Gen-Mutationen und die Anzahl der Genkopien von *PTEN* verändert werden (1). Transkriptionsfaktoren kontrollieren die Transkription, ihre Aktivität wird jedoch durch Umweltfaktoren und epigenetische Modifikationen der DNA beeinflusst (2,3). Posttranskriptional wird die mRNA durch Spleiß-Mechanismen verändert und durch miRNAs, welche jedoch auch vom Transkript des *PTEN*-Pseudogens *PTENP1* und von ceRNAs abgefangen werden können, inhibiert (4,5). Durch die Regulation von Translationsvorgängen wird indirekt auch die Translation der *PTEN*-mRNA kontrolliert (6). Schließlich wird das PTEN-Protein auch posttranslational vielfältig durch Phosphorylierungen, Acetylierungen, Ubiquitynlierungen und Oxidation modifiziert und durch Interaktion mit anderen Molekülen stabilisiert bzw. degradiert (7) (modifiziert nach Berger *et al.*, 2011).

1.3.3 Das PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom (PHTS) und sporadische PTEN-assoziierte Tumore

Das PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom wird in die vier Krankheitsbilder des Cowden-Syndroms (CS), des Lhermitte-Duclos-Syndroms (LS), des Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndroms (BRRS) und des Proteus-Syndroms (PS) unterteilt (Blumenthal und Dennis, 2008). All diesen Erkrankungen wird eine Keimbahn-Mutation von *PTEN* zugrunde gelegt. 80% der Patienten mit Cowden-Syndrom enthalten vererbte *PTEN*-Mutationen, die bei einer weiteren somatischen Mutation zu einem Funktionsverlust führen und von denen die meisten Veränderungen in Exon5, 7 und 8 zu finden sind (Marsh *et al.*, 1998). Weitere 10% der Patienten zeigen Mutationen im *PTEN*-Promotor, die zu einer Verminderung der Expression führen (Zhou *et al.*, 2003). CS weist als einziges der Syndrome sowohl benigne als auch maligne Symptome auf. So entwickeln CS-Patienten mit einer Penetranz von 99% im ersten Drittel ihres Lebens Hamartome der Haut und Schleimhaut, wie Trichilemmome und Papillome (Eng, 2000). CS ist außerdem in über 60% der Fälle mit gastrointestinalen Polypen, Schilddrüsenadenomen und nahezu 100% mit einer Makrozephalie assoziiert (Starink *et al.*, 1986;

Hanssen und Fryns, 1995). CS-Patienten haben weiterhin ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs, Schilddrüsentumoren und Endometriumkarzinomen zu erkranken (Pilarski *et al.*, 2004). Seltener treten auch Melanome, Gliome und klarzellige Nierenkarzinome auf (Eng, 2000). Als Unterform des Cowden-Syndroms wird das Lhermitte-Duclos-Syndrom eingeordnet, welches durch die Vergrößerung des Zerebellums charakterisiert ist und zu Ataxien, intrakranialen Druckempfindungen und Anfällen führen kann. Auch hier ist in 66% der Patienten ein PTEN-Verlust nachweisbar (Zhou *et al.*, 2003).

Patienten des Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndroms weisen ebenfalls zu 60% Keimbahnmutationen des *PTEN*-Gens auf (Marsh *et al.*, 1999). BRRS-Patienten zeigen Makrozephalien, Lipome, Hämangiome, intestinale Polypen, Pigmentflecken des Penis, Skoliose, Myopathien und Entwicklungsverzögerungen (Hobert und Eng, 2009).

Das Proteus-Syndrom ist eine seltene, vielseitige Erkrankung, die durch einen postnatalen, mosaikalen Überwuchs gekennzeichnet ist, der auch zur Tumorbildung führen kann. PS-Patienten können u.a. Wirbelsäulenanomalien, einen asymmetrischen Überwuchs der Extremitäten, Knochenhyperplasien, eine asymmetrische Muskelbildung, eine asymmetrische Fettverteilung, Fehlbildungen der Haut und Gefäßdeformierungen entwickeln (Jamis-Dow *et al.*, 2004). Ein Funktionsverlust von PTEN in PS-Patienten ist nur selten nachweisbar, so dass die Rolle von PTEN für die Entstehung des Proteus-Syndroms noch stark umstritten ist (Blumenthal und Dennis, 2008).

Das Proteus-like Syndrom weist Merkmale des Proteus-Syndroms auf. Patienten des Proteus-like Syndroms lassen sich jedoch diagnostisch nicht eindeutig zuordnen und zeigen wesentlich häufiger PTEN-Mutationen als Patienten des Proteus-Syndroms (Eng, 2012). Die Vielseitigkeit der Erkrankungen und der betroffenen Gewebe des PHTS beweist, dass PTEN sowohl in der Entwicklung als auch bei der Homeostase der Zelleigenschaften von vielen Geweben beteiligt ist. Außerdem scheint die Art der *PTEN*-Mutationen, die Zygote und gegebenenfalls Fehlregulationen weiterer Gene eine Rolle in der Ausbildung der diversen Phänotypen zu spielen.

Auch in sporadischen Tumoren, die ihren Ursprung in PHTS-assoziierten Geweben haben, sind häufig Fehlregulationen oder Mutationen von *PTEN* zu finden, welche zu einer Funktionsminderung oder zum vollständigen Verlust von PTEN führen und so möglicherweise zur Krebsentstehung oder zur Progression des Tumors beitragen. Zwar sind nur in 5% der sporadischen Brusttumore *PTEN*-Mutationen nachweisbar, stattdessen zeigen jedoch 50% Methylierungen im Promotorbereich und 40% der Tumore einen Expressionsverlust von *PTEN* (*loss of heterozygosity, LOH*; Garcia *et al.*, 2004). Auch in über 50% der sporadischen Endometriumkarzinome, papillärer Schilddrüsenkarzinome und Glioblastome treten Fehlregulationen oder Mutationen auf, die zum *LOH* von *PTEN* führen (Tashiro *et al.*, 1997; Alvarez-Nunez *et al.*, 2006; Puxedo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1997). Sogar die Amplifikation der miRNA miR-26a, welche das *PTEN*-Transkript bindet, konnte in Gliomen bestätigt werden (Huse *et al.*, 2009). Die Fehlregulation von PTEN ist weiterhin mit der Progression der Glioblastome assoziiert und führt zu einer schlechteren Prognose für die Patienten (Sano *et al.*, 1999).

Erstaunlicherweise sind auch in sporadischen Tumoren, die in Geweben entstehen, die nicht vom PHTS betroffen sind PTEN-Veränderungen nachweisbar. So besitzen ca. 20% analysierter Prostatakarzinome *PTEN*-Deletionen und davon wiederum fast die Hälfte eine Mutation im zweiten *PTEN*-Allel (Cairns *et al.*, 1997). Auch bei der Entstehung von akuter Leukämie und Non-Hodgkin's-

Lymphomen scheint der PTEN-Verlust eine Rolle zu spielen (Dahia *et al.*, 1999). Melanome und Lungenkarzinome zeigen ebenso häufig eine verminderte Expression oder einen *LOH* von *PTEN*, der v.a. auf Mutationen, Deletionen und Promotor-Methylierungen zurückzuführen ist (Guldberg *et al.*, 1997; Mirmohammadsadegh *et al.*, 2006; Kohno *et al.*, 1998; Soria *et al.*, 2002). In malignen Pankreastumoren sind nur selten Mutationen des PTEN-Gens nachweisbar, stattdessen ist oftmals eine Umverteilung von PTEN zu erkennen, bei der PTEN fast vollständig im Zytoplasma lokalisiert vorliegt (Perren *et al.*, 2000).

In Überschneidung mit dem VHL-Syndrom ist auch in einigen Fällen von klarzelligen Nierenkarzinomen (ccRCCs) und Phäochromozytomen (PCCs) eine Fehlregulation von PTEN zu finden. Brenner *et al.* zeigten, dass die Expression von *PTEN* in weniger als 10% der ccRCCs vermindert ist, dass das PTEN-Protein jedoch die Fähigkeit verliert sich an der Membran zu lokalisieren (Brenner *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass PTEN sowohl in primären als auch metastatischen ccRCC herabreguliert wird (Schultz *et al.*, 2011). Kondo *et al.* schlussfolgerten aus ihren Analysen, dass PTEN-Mutationen erst zu einem späten Zeitpunkt der ccRCC-Entwicklung entstehen und dies zu einem invasiven, metastasierenden Phänotyp führt, wohingegen Hager *et al.* keinen Einfluss der Fehlregulation von PTEN auf die Progression erkennen konnten (Kondo *et al.*, 2001; Hager *et al.*, 2007). Auch die Ergebnisse der Analysen zur Relevanz der PTEN-Fehlregulation in der Entstehung von PCCs sind konträr. So zeigten Puc *et al.*, dass die *PTEN*-Expression in sporadischen PCCs unverändert vorliegt (Puc *et al.*, 2006). Dies wurde auch von Fassnacht *et al.* bestätigt, die jedoch auch eine deutliche Heraufregulation von phosphoryliertem AKT in fast 50% der PCCs nachwies (Fassnacht *et al.*, 2005). Gegensätzlich dazu zeigten Qin *et al.*, dass die PTEN-Expression von Adenomen zu Adenokarzinomen und von benignen zu malignen PCCs stetig abnimmt (Qin *et al.*, 2007). Dies bestätigten auch van Nederveen *et al.*, die jedoch auch zeigten, dass die Herabregulation von PTEN nicht mit dem Tumorgrad korreliert. Sie schlussfolgerten, dass PTEN nur eine untergeordnete Rolle in der Entwicklung maligner PCCs spielt (van Nederveen *et al.*, 2006).

1.3.4 Tiermodelle

Neben den PHTS-assoziierten Erkrankungen ist PTEN in einer Vielzahl sporadischer Tumore unterschiedlicher Gewebe fehlreguliert. Dabei ist meist unklar, ob die Funktionsminderung oder der Verlust von PTEN die Tumorentstehung induziert oder ein sekundärer Effekt während der Entwicklung der Neoplasie ist, der möglicherweise erst die Progression des Tumors. Dieser Sachverhalt wurde bereits für viele Gewebe in verschiedenen Tiermodellen näher untersucht. Die Funktion der Dephosphorylierung von PIP₃ durch PTEN ist evolutionär hoch konserviert und bereits bei *C. elegans*, *D. melanogaster* und im Zebrafisch nachweisbar (Ogg und Ruvkun, 1998; von Stein *et al.*, 2005; Faucherre *et al.*, 2008). Der Verlust des PTEN-Homologs DAF-18 (*abnormal dauer formation 18*) führt in *C. elegans* nicht zur Letalität, bewirkt jedoch ein unverhältnismäßiges Wachstum während der Larvenentwicklung, Reproduktionsdefekte und eine verkürzte Lebensspanne (Masse *et al.*, 2005; Fukuyama *et al.*, 2006). In *Drosophila* induziert der dPTEN-Verlust die Letalität in frühen Embryonalstadien aufgrund eines hyperplastischen Wachstums. Auch die Überexpression von dPTEN führt durch die Hemmung des Zellzyklus und die Förderung der Apoptose zum Tod des Embryos (Gao *et al.*, 2000). Der Zebrafisch besitzt zwei verwandte *PTEN*-Gene, die für zPTENa und

zPTENb kodieren. Während der Ausfall eines PTEN-Homologs keinen Einfluss auf die Entwicklung nimmt, induziert der Verlust beider homologen Proteine die embryonale Letalität. Des Weiteren entwickeln zPTENb-negative Organismen in späten Lebensphasen Tumore des Auges (Faucherre *et al.*, 2008). Auch im Mausmodell bewirkt der homozygote Pten-Verlust die Letalität an Tag E7,5 der Embryonalentwicklung aufgrund der fehlerhaften Regulation der Differenzierung in Endoderm, Ektoderm und Mesoderm (Di Cristofano *et al.*, 1999). Diese Resultate aus Tiermodellen zeigen deutlich, dass PTEN eine entscheidende Funktion in der Reifung von Zellen und Geweben besitzt, indem es embryonalen Eigenschaften der Zellen entgegenwirkt und deren Differenzierung begünstigt. Die Fehlregulation nur eines Pten-Allels simuliert den Ursprung des PHTS und führt tatsächlich u.a. zu typischen Symptomen des Cowden-Syndroms wie Brustkrebs, Endometriumkarzinomen und intestinalen Polypen (Stambolic *et al.*, 2000). In konditionalen Mausmodellen konnten weiterhin sporadische Tumore näher untersucht werden. Der Pten-Verlust führt zur Entwicklung von Brusttumoren, welche jedoch umso häufiger entstehen, wenn der Pten-Gehalt der Zellen nur etwas gesenkt wird (Alimonti *et al.*, 2010). Die Haploinsuffizienz von *Pten* induziert Hyperplasien und teilweise Karzinome des Endometriums, der Verlust des zweiten *Pten*-Allels bewirkt hier zusätzlich die Progression zu malignen Tumoren (Stambolic *et al.*, 2000). Eine Pten-Defizienz allein induziert häufig Prostatatumore (Trotman *et al.*, 2003), ein vollständiger PTEN-Verlust bewirkt in Abhängigkeit eines p53-Ausfalls jedoch in kürzester Zeit die Bildung von metastasierenden Prostatakarzinomen (Chen *et al.*, 2005). Im Gehirn bewirkt eine *Pten*-Deletion allein ebenso lediglich die Ausbildung PHTS-typischer Erkrankungen (Kwon *et al.*, 2001). Eine zusätzliche Tumor-fördernde Mutation in einem anderen Gen wie die Überexpression von *Pdgf* oder der p53-Verlust führt jedoch zu Glioblastomen (Huse *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2008). Auch für die Entstehung von Pankreastumoren, Melanomen und Lungenkarzinomen ist der heterozygote oder homozygote Verlust von Pten nicht ausreichend, um die Tumorentwicklung zu induzieren. In allen Fällen ist ein weiterer genetischer Defekt in einem Onkogen oder einem weiteren Tumorsuppressorgen für die Tumorgenese nötig (Xu *et al.*, 2010; Dankort *et al.*, 2009; Marsit *et al.*, 2005). Für die Induktion und die Progression von Phäochromozytomen scheint der vollständige Pten-Verlust hingegen ausreichend zu sein, obwohl in einigen der Tumore spontane Deletionen anderer Chromosomenbereiche nachgewiesen werden konnten (Korpershoek *et al.*, 2009). Ein Tiermodell zur Analyse der Rolle von Pten in der Entstehung von klarzelligen Nierenkarzinomen steht derzeit noch aus. Lediglich in einem Mausmodell, in dem eine Pten-Defizienz in Urothelzellen induziert wurde, konnten in 20% der Mäuse Hydronephrosen und Nierentumore nachgewiesen werden, welche jedoch nicht näher bestimmt wurden (Yoo *et al.*, 2006).

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche Interaktion von VHL und PTEN analysiert und die Auswirkung des teilweisen Verlustes beider Tumorsuppressoren auf die Tumorgenese überprüft werden. Für viele Tumorsuppressoren und Onkogene ist bereits bekannt, dass sie sich untereinander regulieren, was zur Stabilisierung, Aktivierung oder Inhibierung des einen oder anderen Bindungspartners führt und somit die Effekte auf die Zelle verstärken kann. Um nun die mögliche Interaktion von VHL und PTEN zu untersuchen, sollte hier zunächst der Effekt beider Moleküle aufeinander ermittelt werden. Dafür sollte der Einfluss einer Überexpression des einen oder anderen Tumorsuppressors auf die endogene Proteinmenge des potentiellen Bindungspartners in Zelllinien

embryonalen und tumorösen Ursprungs untersucht werden. Außerdem sollte der PTEN-Gehalt in VHL-defizienten klarzelligen Nierenkarzinomgeweben analysiert werden. Um den vorliegenden Regulationsmechanismus näher zu definieren, sollten im Anschluss mit Hilfe von zellbiologischen und biochemischen Analysen Erkenntnisse über diese Interaktion erlangt werden.

Des Weiteren sollte analysiert werden, wie VHL und PTEN das Zellverhalten regulieren und inwieweit die Auswirkungen der beiden Tumorsuppressoren auf die Zelle übereinstimmen, um daraufhin Rückschlüsse über kooperierende Effekte ziehen zu können. Dafür sollte die Adhäsions-, Migrations- und Überlebensfähigkeit von Tumor-Zelllinien mit restituiertem VHL bzw. PTEN überprüft werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die verminderte Funktionsfähigkeit von VHL und PTEN in der Tumorentwicklung zusammen wirken. Das VHL-Syndrom ist mit klarzelligen Nierenkarzinomen assoziiert, jedoch führte noch kein *in vivo*-Vhl-Modell zur Ausbildung dieser Tumore. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Fehlregulation eines weiteren Gens nötig ist, um das klarzellige Nierenkarzinom zu induzieren. Die Fehlregulation von PTEN ist in Tumorgeweben nach p53 am häufigsten nachzuweisen. In Mausmodellen konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass der heterozygote oder homozygote Verlust von *Pten* meist die Progression der Tumore einleitet. Um nun zu ermitteln, ob eine *Pten*-Defizienz in *Vhl*-mutierten Nierengeweben die Entwicklung eines klarzelligen Nierenkarzinoms fördert, sollten hier konstitutive Mausmodelle generiert werden, die neben einer Haploinsuffizienz von *Pten* heterozygote *Vhl*-Mutationen des VHL Typs 1, 2B oder 2C aufwiesen. Die Nieren sollten dann in unterschiedlichen Lebensabschnitten der Mäuse präpariert und auf Zysten und tumoröse Regionen untersucht werden. Anschließend sollte die Expression von *Vhl*, *Pten* und ihren nachgeschalteten Signalwegen, mittels proteinbiochemischer und immunhistochemischer Analysen, überprüft werden. Da sowohl der VHL Typ 2 als auch der *Pten*-Verlust zur Ausbildung von Phäochromozytomen führt, sollte weiterhin analysiert werden, ob möglicherweise diese Fehlregulation beider Tumorsuppressoren nötig ist, um die Entstehung der Nebennierentumore zu induzieren bzw. deren Inzidenz oder Progression zu erhöhen. Dafür sollten den Mäusen ebenfalls die Nebennieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen werden. Anschließend sollte deren Morphologie untersucht und die gegebenenfalls veränderte, für Phäochromozytome charakteristische Expression näher analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Reagenzien

2.1.1 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Agarplatten	15 g Agar-Agar ad 1 l LB-Medium
Agarosegel (1%)	1 g Agarose 100 ml 1 x TBE
DNA-Ladepuffer	15 g Sucrose 0,175 g Orange G ad 50 ml <i>A.bidest</i>
DNA-Lysepuffer	50 mM Tris HCl pH 7,4 100 mM EDTA 10 mM NaCl 1% SDS 100-600µg Proteinase K (frisch hinzufügen)
2x HBS	50 mM HEPES pH 7,05 10 mM KCl 12 mM Dextrose 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄
10 x Laufpuffer	44 g Glycin 30 g Tris 1% SDS ad 1 l <i>A.bidest</i>
LB (Luria Bertani)-Medium	50 g Trypton 25 g Hefeextrakt 50 g NaCl ad 5 l <i>A.bidest</i> , pH 7,5
Lysepuffer	200 mM NaOH 1% SDS
100 bp Marker	800 µl <i>A.bidest</i> 150 µl 6 x blue-Marker 50 µl Marker (1µg/ml)
Neutralisierungspuffer	7,5 M Ammoniumacetat

Orange Dye	15 g Sucrose 0,175 g Orange G ad 50 ml <i>A.bidest</i>
10 x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l <i>A.bidest</i> , pH 7,4
1 x PBT	100 ml 10 x PBS 0,05% Tween 20 ad. 1 l <i>A.bidest</i>
10 x PCR-Puffer	500 mM KCl 100 mM TrisHCl pH8,3 15 mM MgCl ₂
6 x Proteinladepuffer	350 mM Tris/HCL pH 6,8 34,4% Glycerol (w/v) 10% SDS 10% β-Mercaptoethanol (w/v) 0,06% Bromphenolblau (w/v)
Proteinlysepuffer I	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ Zusätze (frisch hinzufügen): 0,5 mM DTT Benzonase (5 U/ml) 2% Protease-Inhibitor 0,25% NP-40
Proteinlysepuffer II	20 mM HEPES pH 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 420 mM NaCl 0,2 mM EDTA 25% Glycerin Zusätze (frisch hinzufügen): 0,5 mM DTT Benzonase (5 U/ml) 2% Protease-Inhibitor 0,25% NP-40
Puffer nach Weise	1 Puffertablette nach Weise ad 1 l <i>A.bidest</i> pH 6,8

Resuspensionspuffer	50 mM TrisHCL, pH 8,0 10 mM EDTA
RIPA	100 µg/ml RNase A 1% sodium deoxycholate 0,15 M NaCl 0,01 M Na ₃ PO ₄ pH 7,2 2 mM EDTA 0,1% SDS 1% NP-40 Zusätze (frisch hinzufügen): 1 mM DTT Benzonase (5 U/ml) 2% Protease-Inhibitor 1 mM PMSF 50 mM NaF 0,2 mM Na ₃ VO ₄ 100 U/ml Aprotinin
50 x TAE	2 M Tris-Acetat 0,05 M EDTA pH 8,3
10 x TBE	890 mM Tris 890 mM Borsäure 25 mM Na ₂ EDTA pH 8,3
10 x TBS	24,2 g Tris 80 g NaCl ad 1 l <i>A.bidest</i>
10 x TE	100 mM TrisHCl pH 7,0-8,0 10 mM EDTA pH 8,0
TfB I-Puffer	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerin, pH 8,0 (mit Essigsäure)
TfB II-Puffer	10 mM NaMOPS pH 7,0 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15% Glycerin
10 x Transferpuffer	144 g Glycin 30 g Tris ad 1 l <i>A.bidest</i>

Tris-EDTA-Puffer	2,2 g Tris 0,86 g EDTA ad 500 ml <i>A.bidest</i> , pH 9
TSA	10 mM Tris pH 8,0 140 mM NaCl
Urea-SDS-Puffer	6,7 M Harnstoff 10 mM Tris HCl pH 6,8 1 mM DTT 10% Glycerol (v/v) 1% SDS (w/v)

2.1.2 Größenstandards

1kb DNA Ladder	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
100bp DNA Ladder	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Rainbow Marker RPN800	Fa. Amersham (Freiburg)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fa. Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.3 Antibiotika

Ampicillin	Fa. Roche (Mannheim)
Kanamycin	Fa. Roth (Karlsruhe)
Neomycin (G418)	Fa. Roth (Karlsruhe)
Puromycin	Fa. Roth (Karlsruhe)

2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fa. Roche (Mannheim)
Antarktische Phosphatase	Fa. NEB (Frankfurt)
Benzonase	Fa. Merck (Darmstadt)
DNase I	Fa. Roche (Mannheim)
Exo I	Fa. Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinase K	Fa. Roche (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Fa. NEB (Frankfurt)
M-MLV Reverse Transkriptase	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Ribonuclease Inhibitor	Fa. MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
Platinum <i>Taq</i> DNA <i>Polymerase</i>	Fa. Invitrogen (Carlsbad, Ca, USA)
Labor- <i>Taq</i> DNA <i>Polymerase</i>	

2.1.5 Antikörper und Seren

Primär-Antikörper

Monoclonal anti- β -Actin clone AC-15	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Phospho-AKT (Ser473) Ab	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
AKT Ab	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
Egr-1 (C-19)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Anti-FLAG M2 Monoclonal Ab	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Rabbit Anti-Mouse Glut-1 IgG (aff pure)	Fa. Alpha Diagnostic (Aachen)
GST Rabbit Ab	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-HA-Peroxidase, High Affinity (3F10)	Fa. Roche (Mannheim)
Monoclonal Anti-HA Biotin Conjugate clone HA-7	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Mouse Monoclonal antiHIF-1 alpha (H1alpha67)	Fa. Novus (Littleton, USA)
HIF-1alpha [H1alpha67-sup] Ab	Fa. Novus (Littleton, USA)
Purified Mouse Anti-Human HIF1 α	Fa. BD Transduction (Franklin Lakes, USA)
HIF1 α (H-206)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
HIF-2alpha [Ep190b] Ab	Fa. Novus (Littleton, USA)
HIF-2alpha Ab (NB100-122)	Fa. Novus (Littleton, USA)
Anti-His6-Peroxidase	Fa. Roche (Mannheim)
NEDD4-1 (H-135)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
NEDD4 (C5F5) Rabbit mAb	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-rNedd4-1; HECT 5606	Departement de Pharmacologie & Toxicologie Lausanne (Lausanne)
p21 (C-19)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
p27 (C-19)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
p-PI 3-kinase p85 α (Tyr 508)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Mono RNA POL II	Fa. Covance (München)
Phospho-PTEN (Ser380/Thr382/383) Ab	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
PTEN (26H9) Mouse mAb	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
PTEN (N-19)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Phospho-Rb (Ser807/811) Ab	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
Purified Mouse Anti-Human Retinoblastoma Protein	Fa. BD Pharmingen (Heidelberg)
POL II (N-20)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
RNA <i>Polymerase</i> II 8WG16 Monoclonal Ab	Fa. Covance (München)
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Ab	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr421/Ser424) Ab	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
p70 S6 Kinase (49D7) Rabbit mAb	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
S6 Ribosomal Protein (54D2) Mouse mAb	Fa. Cell Signaling (Danvers, USA)
TGF β 1 (V)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Ub (P4D1) HRP	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Mouse Anti V5-Tag: HRP (MCA1360P)	Fa. Serotec (Boston, USA)
VEGF (A-20)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
Purified Mouse Anti-VHL Monoclonal Ab	Fa. BD Pharmingen (Heidelberg)

Sekundär-Antikörper

Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins / HRP	Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / HRP	Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins / HRP	Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)

Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins / HRP	Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)
Bovine anti –goat IgG-HRP	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)

Immunhistochemie-Antikörper

Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (H+L)	Fa. Invitrogen (Eugene, Oregon)
Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG (H+L)	Fa. Invitrogen (Eugene, Oregon)
Alexa Fluor 594 goat anti rabbit IgG (H+L)	Fa. Invitrogen (Eugene, Oregon)
Cy TM 3 conjugated Affini Pure goat anti mouse IgG (H+L)	Fa. Jackson Immuno Research Lab (Newmarket, UK)
Cy TM 5 conjugated Affini Pure F(ab') ₂ Fragment	Fa. Jackson Immuno Research Lab (Newmarket, UK)

Seren

Rabbit Serum (Normal) Code X0902	Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)
Mouse Serum (Normal) Code No. X0910	Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)
Goat Serum (Normal) Code X0907	Fa. Dako (Glostrup, Dänemark)
Normal Goat Serum	Fa. Vector (Burlingane, CA)

2.1.6 Vektoren

pBABE puro	Morgenstern und Land, 1990
pCDNA3.1-	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
pCI Eco	Naviaux et al., 1996
pCMV-FLAG	Fa. Sigma (Steinheim)
pCRII TOPO	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)

Bevorzugt wurden die Vektoren pCDNA3.1- und pBABE puro verwendet. Der Vektor pCDNA3.1- ist besonders für die Transfektion von *large T*-exprimierenden Zellen geeignet. Er enthält einen Zytomegalievirus (CMV)-Promotor für ein hohes Expressionslevel, einen T7-Promotor, eine bidirektionale *large multiple cloning site* (MCS), gefolgt von einem *Bovine Growth Hormone* (BGH)-Polyadenylierungssignal und einer Sequenz zur Transkriptions-Termination für erhöhte RNA-Stabilität. An diese Sequenzen schließen sich ein SV40 *origin* zur Transkription und Replikation des Plasmids in Zellen mit *large T*-Expression, ein SV40-Polyadenylierungssignal und ein pUC *origin* an. Des Weiteren enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion der Bakterien und ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion transfizierter Zellen. Der Vektor pBABE puro ist besonders für die retrovirale Transduktion geeignet. Er enthält ein als Promotor fungierendes 5'LTR (*long terminal repeats*) und ein 3'LTR. Zwischen diesen *Repeat*-Sequenzen werden die DNA-Konstrukte inseriert. Des Weiteren besitzt der Vektor ein SV40 *origin* zur Replikation, ein Puromycin- und ein Ampicillin-Resistenzgen (Abb. 2.1).

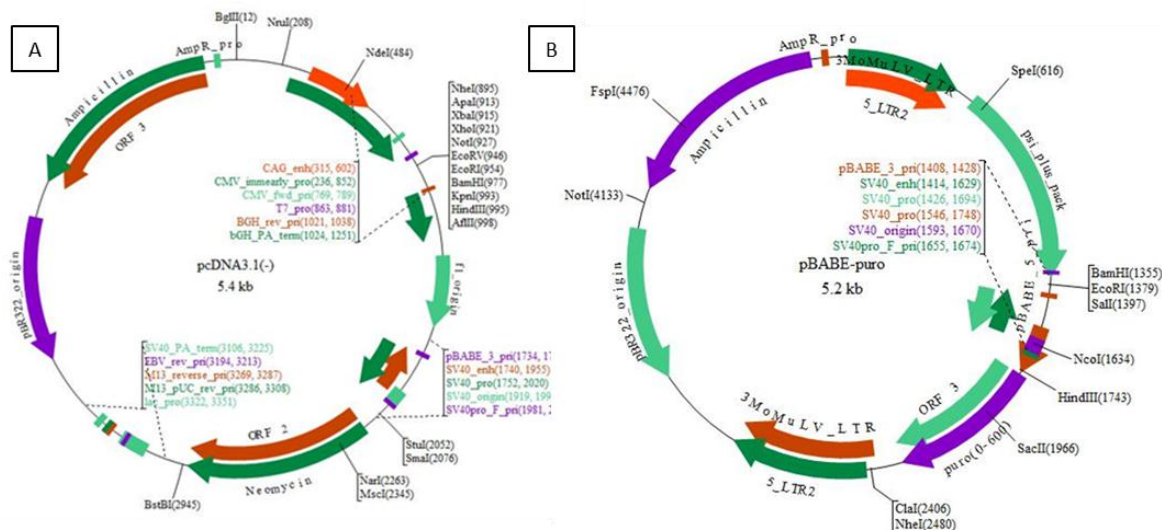


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Vektoren pCDNA3.1- (A) und pBABE puro (B). Die Abbildung zeigt den Aufbau der beiden Plasmide mit ihren Leserahmen, *multiple cloning sites* und Resistenzgenen. pCDNA3.1-Konstrukte wurden v.a. für die Calciumphosphat-vermittelte Transfektion verwendet, während pBABE puro-Konstrukte in die retrovirale Transduktion eingesetzt wurden.

2.1.7 Oligonukleotide

cDNA - Oligonukleotide

PTEN RQ F1	5'- CAG C?G TTA CCT GTG TGT GG-3'
PTEN RQ R1	5'- TTG AAC TGC TAG ?CT ??? GA -3'
NEDD4-1 RQ F	5'- TCA CCA TTG TCA ACC AGC AG -3'
NEDD4-1 RQ R	5'- ACA CAA TCT GAC GGT CAG CA -3'
mPTEN F1	5'- TCA GCC ATT GCC TGT GTC TG -3'
mPTEN R1	5'- AAG TAT CGG TTG GCC TTG TC -3'
mNEDD4 RT F	5'- CTT CAA GTT CAT TGG CCG TG -3'
mNEDD4 RT R	5'- TGA CCT GGT GGT TCA TGC TG -3'
mVEGF A F	5'- CCA CGT CAG AGA GCA ACA TCA -3'
mVEGF A R	5'- TCA TTC TCT CTA TGT GCT GGC TTT -3'
mVHL F	5'- CCA CAC CTA CCG AGG TCA TC -3'
mVHL R	5'- CTG TAT GTC CTT CCG CAC AC -3'

DNA - Oligonukleotide (Charakterisierung der Mäuse)

PTEN flox1	5'- CTC CTC TAC TCC ATT CTT CCC -3'
PTEN flox2	5'- ACT CCC ACC AAT GAA CAA AC -3'
PTENloxout 1	5'- GTC ACC AGG ATG CTT CTG AC -3'
PTENloxout 2	5'- ACT ATT GAA CAG AAT CAA CCC -3'

Hif1a-H1	5'- CTG TCT TCC CTG CTT AGG TCT TTC TAA C-3'
Hif1a-H2	5'- GAG ATG GAG AAG GAG GTT AGT GTA TCC-3'
Hif1a-H3	5'- ACG TTG GCT CAT GGT GTA CTT TG -3'
8w-a	5'- TAA ACA AGG TCC GGA GCC CA -3'
LA-LoxP	5'- ACT TCT GCA AGA GGT CCC CT -3'
mEllf	5'- GCA GGC ATC AGG ACC TCA GTT TGA TCC -3'
mSAr	5'- AGA GTG AAG CCG TGG TAG GTG AGC TT -3'
5'-Mutag. VHLH F	5'- GCA CAG TGA GAC CTG CTG AA -3'
3'-Mutag. VHLH R	5'- CTC CTC TTC CAG GTG CTG AC-3'
V1KO F1	5'- TCA GGT ATG TGT GTG CGC AA -3'
V1KO F2	5'- CCT GCC TTG GTG ATG ACA AC -3'
V1KO R	5'- ACC TGA GAG CGG CTT CAC TT -3'
V2KO F1	5'- CTC TTG ACC TAG CTG CAC TT -3'
V2KO F2	5'- CCA ACA TCA CAT TGC CAG GT -3'
V2KO R1	5'- GTA CGT CTG AGG CAC ATC TT -3'
Cre Ert2 f	5'- ACC AGC CAG CTA TCA ACT C -3'
Cre Ert2 R	5'- TAT ACG CGT GCT AGC GAA GAT CTC CAT CTT CCA GCA G- 3'
Cre B f	5'- TCC AAT TTA CTG ACC GTA CAC C -3'
Cre B r	5'- TAC GCG TTA ATG GCT AAT CGC C- 3'

Sequenzier –Primer (murin)

mPTEN Ex1 F	5'-AGT CCA GAG CCA TTT CCA TC-3'
mPTEN Ex1 R	5'-TCT AGA AAT GCG CCC AGA AT-3'
mPTEN Ex2 F	5'-CTA GCG TGG GAA AAG CTA A-3'
mPTEN Ex2 R	5'-CCA AAA CAC ATC AAA ATG CAA-3'
mPTEN Ex3 F	5'-CTG TTT TAG TCC TGT GCA GC-3'
mPTEN Ex3 R	5'-CAG GAA TCC AGG TCC TCA AA-3'
mPTEN Ex4 F	5'-AGC GCA GTG TTT TTA CAT GA-3'
mPTEN Ex4 R	5'-TCA CCA GGC AGT AAA AGA C-3'
mPTEN Ex5 F	5'-TGA CGT GTT CCC TTC ATG CAC AGA-3'
mPTEN Ex5 R	5'-TGT GTG CCT AGC ACC TAC TCC AGG-3'
mPTEN Ex6 F	5'-TTT GTC TCC CTC CTC CCT CT-3'-3'
mPTEN Ex6 R	5'-CAC CAA AAT TCA TTG GGT TAG C

mPTEN Ex7 F	5'-GAA GTC CTT ACA TGG GTT GG-3'
mPTEN Ex7 R	5'-AAG GCT TTA AGC AAA AGG TCT G-3'
mPTEN Ex8 F	5'-CAC AAG GTG TTT GCC TTC AC-3'
mPTEN Ex8 R	5'-CAG AAA AGG AAA GGC TAC GC-3'
mPTEN Ex9 F	5'-GGT CAT CTG AAA AGC AGT GCC CT-3'
mPTEN Ex9 R	5'-TGG ACA ACA AGT GTC AAA ACC CTG T-3'
mVHL Ex1 F	5'-CCA ACT GCC CTT GGT CCC TGT TC-3'
mVHL Ex1 R	5'-GCC GGG CAT TTT CTC GGG GTA G-3'
mVHL Ex2 F	5'-CTT CCA GAG GAG TGC CGT TG-3'
mVHL Ex2 R	5'-TCA GGC CTA TAA TCG CAG CA-3'
mVHL Ex3 F	5'-TGA CTG TTG TTG CTT GGT GG-3'
mVHL Ex3 R	5'-TCA ACT TCC AGC CTC ACC AG-3'

2.1.8 Kits

<i>ABC Vectastain Kit</i>	Fa. Vextor Laboratories (Burlingame, CA)
<i>BigDye Sequencing Version 3.1-Kit</i>	Fa. Genterprise (Mainz)
<i>DAB Peroxidase Substrat Kit</i>	Fa Vector Laboratories (Burlingame, USA)
<i>Endofree Plasmid Kit</i>	Fa. Qiagen (Hilden)
<i>GFX DNA and Gel Band Purification-Kits</i>	Fa. Amersham (Freiburg)
<i>Light Cycler Fast Start DNA Master</i>	Fa. Roche (Mannheim)
<i>SYBR Green I-Kit</i>	Fa. Roche (Mannheim)
<i>Qiagen Gel Extraction-Kit</i>	Fa. Qiagen (Hilden)
<i>Qiagen RNeasy Mini-Kit</i>	Fa. Qiagen (Hilden)
<i>RNA 6000 Nano-Kit</i>	Fa. Agilent (Böblingen)
<i>RNA Amplification Kit</i>	Fa. Ambion (Austin, TX)
<i>GST pulldown Kit</i>	Fa. Thermo Scientific (Rockford, IL)

2.1.9 Bakterienstämme

MAX Efficiency DH5 α chemically competent cells	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
BL2(DE3)pLysS Singles TM competent cells	Fa. Novagen (San Diego, Ca)

2.1.10 Zelllinien

786-O	Fa. ATCC (Manassas, USA)
A498	Fa. ATCC (Manassas, USA)
pC12	DKFZ (Heidelberg)
CAKI-1	Fa. ATCC (Manassas, USA)
HEK293	Fa. ATCC (Manassas, USA)

HEK293T
 KTCTL26A
 T47D

Fa. ATCC (Manassas, USA)
 Fa. ATCC (Manassas, USA)
 Fa. ATCC (Manassas, USA)

2.1.11 Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit transgenen Mäusen gearbeitet und teilweise *das Cre/LoxP*-System für die Generierung des gewünschten Genotyps genutzt. Sowohl die *Cre* (*causes recombination*) Rekombinase als auch die *loxP* (*locus of crossover [x]in P1 bacteriophage*)-Stellen entstammen dem P1 Bakteriophagen, der dieses Rekombinationssystem für seinen Lebenszyklus nutzt. Ein *loxP* besteht aus zwei palindromischen Bereichen, die durch eine nichtpalindromische Sequenz getrennt werden. *Cre* bindet an die *loxPs* und vermittelt ohne die Beanspruchung weiterer Cofaktoren die Rekombination der *loxP sites* zwischengelagerten Sequenz (Kühn und Torres, 2003). Die Orientierung der *loxPs* bestimmt dabei, ob die Sequenz vollständig herausgeschnitten oder invertiert wieder eingefügt wird. Dieser Mechanismus wird sich bei der Generierung von Mausmodellen zunutze gemacht. Innerhalb dieser Arbeit wurde das Excisionsmodell verwendet (Abb. 2.2).

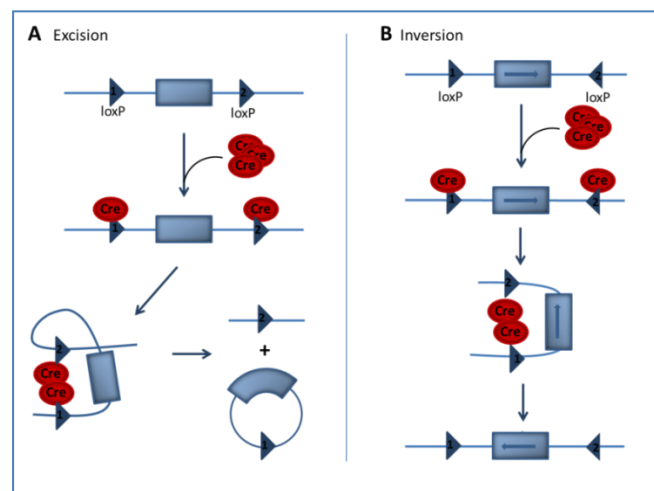


Abb. 2.2 Cre/LoxP-System. Die Cre-Rekombinase erkennt sogenannte *loxP* - Sequenzen innerhalb der DNA und schneidet die flankierte Sequenz heraus. Je nach Orientierung der *loxPs* wird diese Sequenz vollständig aus der DNA entfernt (Excision, A) oder invers wieder eingefügt (Inversion, B). Diese Methode wird verwendet, um gezielt Gene in Tiermodellen zu inaktivieren.

Das Gen der *Cre*-Rekombinase wird einem spezifischen Promotor nachgeschaltet und als Transgen in das Genom des Effektorstammes integriert. Durch die Wahl des Promotors kann eine gezielte Gewebe- und Entwicklungsspezifische Expression der *Cre*-Rekombinase erzeugt werden. Hier wurde der *Aktin*-Promotor verwendet, welcher bewirkt, dass *Cre* konstitutiv exprimiert wird. Die Verpaarung mit einem Tier eines Responderstammes, welches ein oder mehrere *loxP* flankierte Gene trägt, generiert in der F1-Generation Tiere, die sowohl das *Cre*- Gen als auch die *loxP sites* im Genom tragen. Die Expression von *Cre* bewirkt schließlich die Excision des *loxP* flankierten Bereiches und damit den Verlust der Expression bzw. der Expression eines veränderten Moleküls. Hier wurden die Responderstämme KI-Vhlh-FI (V1KO) und KI-PTEN-fl (PT), die *loxP*-Stellen im Gen *Vhl* bzw. *Pten* enthalten, verwendet. Die Verpaarung mit dem Effektorstamm Act-Cre (AC) führte zu einem

konstitutiven Verlust essentieller Genbereiche und somit zu einem *Knockout* der Gene. Des Weiteren wurden Mausstämme verwendet, die eine Keimbahnmutation in *Vhl* tragen, die zur Ausbildung eines V2B- oder V2C-Phänotyps führen und als *Knockin*-Mauslinien geführt wurden.

Die Mäuse wurden eigenständig gezüchtet und gemäß der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten. Dafür wurden freundlicherweise Tiere der Mausstämme C57BL/6 ; FVB/N ; 129 ; BALB/c und NOD/SCID^{-/-} zur Verfügung gestellt, welche bereits die folgenden Transgene enthielten:

Effektorstamm

Act-Cre (AC)

AG Kanzler, Universitätsklinik Mainz;
Lewandoski *et al.*, 1997

Responderstämme

KI-Vh1h-FI (V1KO)

Haase *et al.*, 2001

KI-Vh1-2B (V2B)

Labor-intern generiert

KI-Vh1-2C (V2C)

Labor-intern generiert

KI-PTEN-fl (PTEN)

AG Brenner, Universitätsklinik Mainz;
Suzuki *et al.*, 2001

2.1.12 Humanes Gewebe

Das Primärgewebe der klarzelligen Nierenkarzinome und der korrespondierenden Normalgewebe wurden nach operativer Entnahme von der Urologischen Klinik (Leiter: Prof. Dr. med. Thüroff) der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt.

2.1.13 Zellkulturmaterialien

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Fa. Gibco (Grand Island, NY)

Fetal calf serum (FCS)

Fa. PAA Laboratories
(Pasching, Österreich)

L-Glutamin

Fa. Invitrogen (Karlsruhe)

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x)

Fa. Gibco (Grand Island, NY)

Penicillin / Streptomycin

Fa. Gibco (Grand Island, NY)

Trypsin/EDTA

Fa. Gibco (Auckland, NZ)

Die Zellkulturgefäße wurden von der Firma Greiner GmbH (Frickenhausen) bezogen.

2.1.14 Gebrauchsmaterialien

Boyden-Kammer

Fa. Costar (Bodenheim)

Deckgläser

Fa. IDL (Nidderau)

Eppendorffgefäße (1,5 ml und 2 ml)

Fa. Eppendorff (Hamburg)

Filmkassetten

Fa. Amersham (Freiburg)

Filterklemmen	Fa. Costar (Bodenheim)
Filterwischer	Fa. Costar (Bodenheim)
Handschuhe Safe Skin purple nitrile	Fa. Kimberly-Clark (Roswell, USA)
Histosette II	Fa. Simport (Beloeil, Kanada)
Hybond TM -ECL TM (Nitrocellulosemembran)	Fa. Amersham (Freiburg)
Hyperfilme	Fa. Amersham (Freiburg)
Kryoröhrchen	Fa. Nalgene (Schwerte)
Küvetten	Fa. Greiner (Kremsmünster)
Lab-Tek Chamber Slide	Fa. Thermo Scientific (Rochester, NY, USA)
Neubauer-Kammer	Fa. Merck (Darmstadt)
Objektträger	Fa. Menzel-Gläser (Wiesbaden)
Parafilm 'M'	Fa. Pechiney (Chicago, USA)
Pasteurpipetten	Fa. Brand (Wertheim)
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Fa. Peqlab (Erlangen)
Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt (Nürnbrecht)
Pipettenspitzen gestopft	Fa. Peqlab (Erlangen)
Pinzetten	Fa. Labotec (Wiesbaden)
PP-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Fa. Becton Dickinson (Franklin Lalus, USA)
Schaber (<i>Cell Lifter</i>)	Fa. Biologix (Lenexa, USA)
Scheren	Fa. Labotec (Wiesbaden)
Skalpelle	Fa. Dahlhausen (Köln)
Snap cap PP-Röhrchen (14ml)	Fa. Becton, Dickinson and Company (Le Pont De Croix, France)
Spritzen (1, 2, 5, 10, 20ml)	Fa. Fa. Braun (Melsungen)
96 well PCR Detection Plate	Fa. Thermo, Scientific (Rockford, IL)
Whatman-Papier (3mm)	Fa. Biologix (Lenexa, USA)

2.1.15 Chemikalien

Aceton	Fa. VWR (Fontenay-Sous-Bois, Frankreich)
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Fa. Roth (Karlsruhe)
Agar	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Agarose	Fa. Starlab (Ahrensburg)
Ammoniumacetat	Fa. Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat	Fa. Serva (Heidelberg)
Aprotinin	Fa. Roche (Mannheim)
<i>A. bidest</i>	Fa. Braun (Melsungen)
Betaine solution	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Benzonase	Fa. Merck (Darmstadt)
BIO-RAD Protein Assay	Fa. BIORAD (München)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Fa. PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Bromphenolblau	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
<i>5x buffer for empliTaq FS</i>	Fa. LifeTechnologies (Weiterstadt)
1-Butanol	Fa. Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Fa. Merck (Darmstadt)
Chloroform	Fa. Sigma (Steinheim)

<i>DAPI antifade solution</i>	Fa. Millipore (Billerica, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Dithiothreitol (DTT)	Fa. Biorad (München)
<i>DPX Mountant for histology</i>	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
<i>ECL Plus Western Blotting Detection System</i>	Fa. GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Einbettmedium (<i>Tissue Tec</i>)	Fa. Sigma Aldrich (München)
Entellan	Fa. Merck (Darmstadt)
Eosin	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Essigsäure	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Ethanol	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Ethidiumbromid	Fa. AppliChem (Darmstadt)
<i>Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)</i>	Fa. MP (Illkirch, Frankreich)
Fibronectin	Fa. Merck (Darmstadt)
D-Glucose	Fa. Sigma Aldrich (Deisenhofen)
Glycerin	Fa. Merck (Darmstadt)
Glycin	Fa. AppliChem (Darmstadt)
Hämatoxylin	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Hefeextrakt	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
HEPES	Fa. Gerbu (Gaiberg)
<i>Hi-Di Formamide</i>	Fa. Life Technologies (Weiterstadt)
Igepal CA-630 (NP-40)	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Immersionsöl	Fa. Merck (Darmstadt).
Kaliumchlorid	Fa. Merck (Darmstadt)
Kaliumhydrogenphosphat	Fa. Merck (Darmstadt)
Magermilchpulver	Fa. Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
2-Mercaptoethanol	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Methanol	Fa. J.T.Baker (Deventer, Niederlande)
MOPS	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Natriumacetat	Fa. Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Natriumdeoxycholat	Fa. AppliChem (Darmstadt)
Natriumfluorid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Fa. Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Fa. Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Fa. Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Natronlauge	Fa. Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyde (PFA)	Fa. Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fa. Boehringer (Mannheim)
Phosphatase-Inhibitor COMPLETE	Fa. Roche (Mannheim)
PhosSTOP	Fa. Roche (Mannheim)
2-Propanol (Isopropanol)	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Rotihistol	Fa. Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese-Gel 30	Fa. Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Fa. Merck (Darmstadt)
Sephadex	Fa. GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Sodium dodecylsulfate (4x SDS)	Fa. Roth (Karlsruhe)
Sucrose	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)

TEMED	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Tris	Fa. Biomol (Hamburg)
Tris-Hydrochlorid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Fa. Boehringer Mannheim (Mannheim)
Trizol	Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA)
Trypton	Fa. Becton, Dickinson and Company (Le Pont De Croix, France)
Tween-20	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Vitronectin	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid	Fa. Roth (Karlsruhe)
Xylol	Fa. Roth (Karlsruhe)

Protein A7G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, USA)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammten von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich (Steinheim).

2.1.16 Geräte

Agarosegelelektrophorese	Fa. Owl Separation Systems (Portsmouth, USA)
Easy-Cast electrophoresis system	Model 40-1214; Fa. Peqlab (Erlangen)
Autoklav	Typ V150; Fa. Systec (Osnabrück)
Bakterieninkubator B 6200	Fa. Heraeus (Hanau)
2100 Bioanalyser	Fa. Agilent (Böblingen)
ChemiDoc	Chemo Doc XRS; Fa. Biorad (München)
Einbettmaschine	Leica EG 11404; Fa. Leica (Solms)
ELISA Reader	ELISA reader sunrise; Fa. Tecan (Männedorf, Schweiz)
Entwicklermaschine	CURIX 60; Fa. AGFA (Mortsel, Belgien)
Geldokumentation	E.A.S.Y 429K; Fa. Herolab (Wiesloch)
Gelkammern	diverse Größen; Fa. Peqlab (Erlangen)
Heizblock	Thermomixer comfort; Fa. Eppendorff (Hamburg) Thermomixer 5436; Fa. Eppendorff (Hamburg) CH-100; Fa. Eppendorff (Hamburg)
Homogenisator	Ultra-Turrax T125; Fa. Janke und Kunkel, Stauffen
Kamera	EC3; Fa. Leica Microsystems, Heerbrugg CCD Videocamera Module
Kryostat	1720; Fa. Leica (Wetzlar)
Luminometer	Lumat LB-9507; Fa. Berthold (Wildbad)
Magnetrührer	VMS-A; Fa. VWR (Darmstadt)
Mikroskope	Eclipse TS100; Fa. Nikon (Tokio, Japan) ID 03; Fa. Zeiss (Jena) Leica DMRXA; Fa. Leica (Wetzlar)
Mikrotom	Leica RM 2165; Fa. Leica (Solms)
Mikrowelle	NN-E245W; Fa. Panasonic (Hamburg)

Mini-Protean System	Fa. Biorad (München)
NanoDrop	Spectrophotometer ND-1000; Fa. Peqlab (Erlangen)
Netzgeräte	LKB.ECPS; Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden) 3000 / 150; Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Electrophoresis Power Supply; EV 243	Fa. Peqlab (Erlangen) E861; Fa. Consort (Turnhout, Belgien) PowerPac HC; Fa. Biorad (München)
PCR-Geräte	PTC-200 Pettier Thermal Cycler; Fa. Biozym (Oldendorf) Mastercycler gradient; Fa. Eppendorff (Hamburg) TRIO-Thermoblock; Fa. Biometra (Göttingen) T-Gradient; Fa. Biometra (Göttingen)
qPCR-Geräte	LightCycler 1.5 R04E, Fa. Roche (Mannheim) C1000 Thermal Cycler CFX384 / CFX96, Fa. Biorad (München)
pH-Meter	Lab 850; Fa. Schott (Mainz) Lab 850; Fa. Schott (Mainz)
Photometer	Ultrospec 2000; Fa. Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) Ulrospec III; Fa. Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Rotator 4°Raum	Fa. Heidolph (Schwalbach)
Schüttelinkubator(Certomat)	Fa. Braun Biotech (Melsungen)
Schüttler	Duomax 1030; Fa. Heidolph (Schwalbach) REAX 2; Fa. Heidolph (Schwalbach) WT12; Fa. Biometra (Göttingen)
Sequenziergerät	Sequencer 3130 xl Genetic Analyser; Fa. ABI (Weiterstadt)
Sterilbank	LaminAir Modell 1.2; Fa. Holten (Berlin)
Tank-Blotting-Apparatur	Fa. VWR (Darmstadt)
Taumeltisch	WT12; Fa. Biometra (Göttingen) Duomax 1030; Fa. Heidolph (Schwalbach)
Ultraschallstab	HTU SONI 130; Fa. Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
UV-Tisch	Fa. Peqlab (Erlangen)
Vortexer	Art.-Nr. 444-1372; Fa. VWR (Darmstadt) REAX 2000; Fa. Heidolph (Schwalbach) MS1 Minishaker, Fa. Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Waagen	Extend ED 2202S-CW; Fa. Sartorius (Göttingen) LC2201S; Fa. Sartorius (Göttingen) Feinwaage Sartorius basic; Fa. Sartorius (Göttingen)
Wasserbäder	Wasserbad 1002; Fa. GFL (Eppelheim) Leica HI 1210; Fa. Leica (Solms)
Zellkulturinkubator	HERA safe type KS12; Fa. Heraeus (Hanau) Modell T6120; Fa. Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	Galaxy Mini; Fa. VWR (Darmstadt) Biofuge fresco und pico; Fa. Heraeus (Hanau) Z233 Mk-2; Fa. Hermle (Wehingen)

Multifuge 3S-R; Fa. Heraeus (Hanau)
Megafuge 1.0; Fa. Heraeus (Hanau)
Centrifuge 5417 R; Fa. Eppendorff (Hamburg)
Sorvall RT 6000 B; Fa. Dupont (Lahr)

Die Kühl- und Gefrierschränke wurden von den Firmen Bosch, Dometic, Heraeus, Liebherr, Philipp Kirsch und Siemens bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA Standardmethoden

2.2.1.1 Extraktion genomischer DNA aus Zellen

Die Zellen wurden zunächst in *24well* oder *6well* Platten ausplattiert und bis zum Erreichen einer 70 - 90%igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert (Details siehe 2.2.5.1), in 15 ml PP-Röhrchen überführt und 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 750 µl DNA-Lysepuffer aufgenommen, mit 100-600 µg/ml *Proteinase K* (Fa. Roche, Mannheim) versetzt und 2 – 4 h bei 54°C verdaut. Dann wurde der Zellsuspension 200 µl 4M NaCl hinzugefügt und diese 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß übertragen und zur DNA-Fällung mit 750 µl Isopropanol versetzt, mehrfach invertiert und 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol für 20 min bei 13000 rpm gewaschen. Anschließend wurde der Alkohol vollständig entfernt, das DNA-Pellet 5 min getrocknet und in 400 µl 0,1x TE gelöst.

2.2.1.2 Extraktion genomischer DNA aus Gewebe

Zur DNA-Extraktion wurden 0,2 - 0,5 cm² große Gewebeproben eingesetzt. Das Gewebe wurde nach der Entnahme bis zur DNA-Isolierung zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt oder direkt verarbeitet. Das Gewebe wurde mit 750 µl DNA-Lysepuffer und 100-600 µg/ml *Proteinase K* (Fa. Roche, Mannheim) versetzt und üN bei 54°C verdaut. Die weitere DNA-Präparation erfolgte wie unter 2.2.1.1 angegeben.

2.2.1.3 Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Zur Analyse von Plasmiden sind bereits geringe Mengen an Plasmid-DNA ausreichend, welche mit Hilfe einer Mini-Präparation nach H.C. Birnboim und J. Doly extrahiert wurden (Birnboim und Doly, 1979). Dafür wurden am Vortag *Snap Cap* PP-Röhrchen mit 3 ml LB-Medium beschickt, das zuvor mit einem zur spezifischen Selektion geeigneten Antibiotikum (100 µg/ml) versetzt wurde. Die Bakterienklone wurden von selektiven LB-Agar-Platten gepickt, das LB-Medium beimpft und üN bei 37°C im Schüttelinkubator (Fa. Braun, Melsungen) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der

Bakteriensuspension in 1,5 ml Eppendorffgefäße überführt, für 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und intensiv gevortext. Dann wurde der Suspension 400 µl Lysepuffer hinzugefügt, diese mehrfach invertiert und die Bakterien bei 5 min auf Eis lysiert. Schließlich wurden 300 µl Neutralisierungspuffer zugeführt, gevortext, 10 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Plasmid-haltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt, mehrfach invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Plasmide wurden dann in einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C gefällt. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol *abs.* gewaschen (10 min, max. Zentrifugationsgeschwindigkeit, 4°C), getrocknet, in 40 µl 0,1 x TE aufgenommen und innerhalb von 15 min bei 55°C im Heizblock (Fa. Eppendorff, Hamburg) rotierend gelöst.

Zur Gewinnung großer Mengen an reiner Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das *Endofree Plasmid Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet, das auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht. Die Plasmide werden hierbei so aufgereinigt, dass sie direkt für die Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendet werden können (Details siehe 2.2.5.3 und 2.2.5.4). Die Extraktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch bzw. unter Zuhilfenahme des *NanoDrops* (Fa. Peqlab, Erlangen) bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren. Die optische Dichte (OD) von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Protein-Verunreinigungen lassen sich bei 280 nm nachweisen. Zur Überprüfung der Reinheit der DNA/RNA-Lösung dient daher der Quotient aus 260 nm und 280 nm, welcher bei reinen Proben zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

Die DNA bzw. RNA wurde für die photometrische Bestimmung 1:100 in *A.bidest.* verdünnt und in Quarküvetten gegen *A.bidest* als Referenz quantifiziert. Die Messungen am *NanoDrop* wurden ebenfalls mit *A.bidest* als Referenz durchgeführt. Hier wurden 1,5 µl der Probe auf die Messstation des *NanoDrops* aufgebracht, eine Messelektrode in den Tropfen eingeführt und die Konzentration mit Hilfe des Computerprogramms ND-1000 V3.3.0 ermittelt.

2.2.1.5 Fällung von DNA

In der Regel wird DNA mit Ethanol gefällt, wobei DNA-Moleküle jeder Größe von der Fällung betroffen sind. Die DNA wurde mit 1/10 Vol 3 M NaOAc pH 5,3 und 3 Vol Ethanol *abs.* gemischt und 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und getrocknet. Die DNA wurde dann in einem geeigneten Volumen *A.bidest* oder 0,1x TE aufgenommen.

Um kleinere DNA-Fragmente (<80bp) wie z.B. *Primer* von hochmolekularen Nukleinsäuren abzutrennen, werden PCR-Produkte mit Isopropanol gefällt. Dafür wurden die PCR-Produkte mit 1

Vol 4 M Ammoniumacetat und 2 Vol Isopropanol versetzt, gut gemischt und 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 70% Ethanol aufgenommen und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in einem geeigneten Volumen *A.bidest.* gelöst.

2.2.1.6 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA durch *Endonukleasen* (Fa. NED, Frankfurt) wurde anhand der Angaben des Enzymlieferanten unter Verwendung der zugehörigen Puffer durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden in einem Endvolumen von 20 µl standardmäßig eine Menge von 200-1000 ng gefällter Plasmid-DNA verwendet, für präparative Verdauungen wurden hingegen 30-50 µg DNA in die Restriktion eingesetzt. Die Enzymmenge variierte aufgrund der Aktivität des jeweiligen Enzyms (ca. 1-5 U Enzym pro µg zu verdauender DNA). Der Verdau wurde über einen Zeitraum von 2 h bis über Nacht bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die vollständige Restriktion in einer Agarose-Gelelektrophorese (Details siehe 2.2.1.7) überprüft.

2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis 20 kb lassen sich in 0,8% - 2% Agarosegelen auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von dem Molekulargewicht und der Konformation der DNA, der Dichte der Gelmatrix und der Feldstärke.

Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Verfestigung des Gels in der Gelapparatur (Fa. Peqlab, Erlangen) wurden die DNA-Proben, die zuvor mit 1/5 Vol *Orange Dye* versetzt wurden, aufgetragen. Zur Abschätzung der Fragment-Größen wurden die Molekulargewichtsstandards 100 bp-Marker (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) oder 1kb-Marker (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Der Gellauf erfolgte in horizontalen Gelelektrophorese-Kammern (*Easy-Cast electrophoresis system*) bei 70 – 170 V für 20 – 60 min je nach Gelkonzentration und Fragmentgröße. Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht, welches sequenzunspezifisch zwischen benachbarte Basenpaare der DNA interkaliert und unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) fluoresziert. Zu diesem Zweck wurden die Gele 5-10 min im Ethidiumbromidbad gefärbt, dann 10-20 min im Wasserbad entfärbt, auf einem UV-Transilluminator (Fa. Peqlab, Erlangen) bei $\lambda = 312 \text{ nm}$ betrachtet und gegebenenfalls mit dem E.A.S.Y. System (Fa. Herolab, Wiesloch) fotografiert.

2.2.1.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion

Die gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde zunächst mit Ethidiumbromid angefärbt und auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht (Details siehe 2.2.1.7). Die gewünschten DNA-Banden wurden dann als Gelfragmente mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgelöst. Die Gelextraktion der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des *GFX DNA and Gel Band Purification-Kits* (Fa. Amersham, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers. Dafür wurden pro 10 mg Gelfragment

10 µl *Capture buffer* hinzugefügt, gut gemischt und bei 60°C inkubiert, bis sich das Agarosegel vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde auf eine GFX-Säule übertragen, 1 min inkubiert und anschließend 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 500 µl Waschpuffer versetzt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt wurde nach Verwerfen des aufgefangenen Waschpuffers nochmals wiederholt, um sämtliche Reste des Puffers von der Säule zu entfernen. Anschließend wurde die GFX-Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt und die DNA mit 30-50 µl *Elution buffer* eluiert.

2.2.1.9 DNA-Amplifikation

Die DNA-Amplifikation wurde mittels des „*illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kits*“ nach den Angaben des Herstellers *GE Healthcare* durchgeführt.

2.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der *Polymerase-Kettenreaktion* werden DNA-Moleküle enzymatisch amplifiziert (Higushi *et al.*, 1988). Dafür ist die Kenntnis der Rand-Sequenzen des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes zur Erstellung der Oligonukleotide (*Primer*) nötig. Das Prinzip der PCR besteht aus der regelmäßigen Wiederholung einer Abfolge von Reaktionen, die schließlich zu einer extremen Vermehrung des gewünschten (d.h. zwischen den *Primern* liegenden) Bereiches führen. Dabei ist entscheidend, dass neu gebildete Produkte im nächsten Amplifikationszyklus wieder als Vorlage zur Herstellung von neuem Produkt genutzt werden können (exponentielle Amplifikation). Die einzelnen Schritte eines Amplifikationszyklus umfassen dabei die Denaturierung der als Matrize (*template*) dienenden einzel- oder doppelsträngigen DNA, die anschließende Anlagerung der *Primer* an ihre komplementären Sequenzen (*annealing*) und die Kettenverlängerung (*extension*), die durch den Einbau der jeweiligen komplementären Nukleotide mittels einer DNA-*Polymerase* erfolgt. Durch die Verwendung einer hitzestabilen DNA-*Polymerase* (z.B. Taq-*Polymerase*, isoliert aus *Thermophilus aquaticus*) können oben genannte Denaturierungs-, *annealing*- und *extension*-Schritte häufig wiederholt werden, ohne dass dem Reaktionsansatz neue DNA-*Polymerase* zugesetzt werden muss.

Das in dieser Arbeit standardmäßig verwendete PCR-Programm bestand aus den folgenden Reaktionen:

4°C	5 min	} 20 – 40 Zyklen
94°C	1 min	
55-63°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
15°C	∞	

Hierbei variierten die Annealing-Temperatur entsprechend der verwendeten Oligonukleotide und die Zyklenzahl aufgrund der *template*-DNA. In der Regel wurden 50 µl Reaktionsansätze hergestellt:

1 µl	<i>template</i> -DNA (10-500 ng)
5 µl	10x PCR-Puffer
4 µl	dNTPs (je 1,25 mM)
1 µl	Taq-Polymerase (1 U/µl)
0,5 µl	5' <i>Primer</i> (20 µM)
0,5 µl	3' <i>Primer</i> (20 µM)
ad 50 µl	<i>A.bidest</i>

Im Anschluss an die PCR wurden 5-20 µl der amplifizierten DNA auf 0,8 – 2% Agarosegelen analysiert (Details siehe 2.2.1.7).

2.2.1.11 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Zur quantitativen Analyse der Genexpression wurde cDNA zunächst unter Verwendung des *Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kits* (Fa. Roche, Mannheim) im Light Cycler 1.5 (Fa. Roche, Mannheim) amplifiziert. *SYBR Green* wird bei 530 nm zur Fluoreszenz angeregt und bindet sequenzspezifisch an doppelsträngige DNA, wodurch es bei Anregung 100-fach stärker fluoresziert. Somit lässt sich die Menge der PCR-Produkte quantitativ bestimmen. Durch die Messung der entstehenden Fluoreszenz kann zu jedem Zeitpunkt der PCR die Menge des PCR-Produktes berechnet werden. Der Anstieg der Fluoreszenz mit jedem weiteren Zyklus ist direkt proportional zur Akkumulation des PCR-Produktes. Über die *Software* kann die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl dargestellt werden. Anhand einer Standardgerade kann die Ausgangskonzentration der unbekanntenen Proben ermittelt werden. Diese Standardgerade ergibt sich aus der Menge an PCR-Produkten einer Probe mit bekannter Konzentration, welche in unterschiedlichen Verdünnungen in der PCR mitgeführt wird. Innerhalb der PCR heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl, abhängig von der eingesetzten Menge an cDNA, die Fluoreszenzsignale des PCR-Produktes signifikant von denen des Hintergrundes ab. Diese Schwelle wird als *crossing point* bezeichnet. Zur Quantifizierung der unbekanntenen Proben werden deren *crossing point* mit den *crossing points* der bekannten Konzentrationen der Standardgerade verglichen und über die Gleichung der Standardgerade in die Ausgangskonzentration umgerechnet. Die Steigung der Standardgerade wird außerdem zur Berechnung der Effizienz der ablaufenden PCR-Reaktion verwendet.

$$\text{Effizienz} = 10^{-1 / \text{Steigung der Standardgeraden}}$$

Bei der optimalen Steigung von -3,32 ist die Effizienz gleich 2, was einer Verdopplung des PCR-Produktes in jedem durchlaufenen Zyklus entspricht.

Die *Primer* wurden so gewählt, dass sie aneinander grenzende Sequenzen zweier Exons enthielten und somit ein Intron umspannten. Dadurch wurde gewährleistet, dass mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA nicht zu Amplifikaten, welche die Analyse der cDNA stören, führten. Um die Daten der Expression verschiedener Gene miteinander vergleichen zu können, wurde außerdem darauf geachtet, dass die Amplikons zwischen 100 – 200 bp umfassten. Des Weiteren wurde die Spezifität und Qualität der *Primer* bei jeder Amplifikationsreaktion durch die Erstellung einer Schmelzkurve überprüft. Die cDNAs, welche durch Standard –RT-PCRs hergestellt wurden (Details siehe 2.2.3.6),

wurden in 50-facher Verdünnung als *template* in die *real-time* PCR eingesetzt, das Gesamt-Volumen eines Reaktionsansatzes bestand aus 10 μ l:

1 μ l	cDNA- <i>template</i> (ca. 2,5ng/ μ l)
1 – 1,3 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
0,25 μ l	Primer-Mix F/R (je 20 μ M)
1 μ l	Light Cycler Fast Start Reaction Mix
ad 10 μ l	<i>A.bidest</i>

MgCl₂, *A.bidest* und der *Light Cycler Fast Start Reaction Mix*, welcher bereits die *FastStart Taq DNA Polymerase*, den Reaktionspuffer, den dNTP-Mix, 10 mM MgCl₂ und *SYBR Green I Dye* enthält, wurden dem *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit* entnommen. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne cDNA-*template* (NTC-Probe) mitgeführt. Um mögliche Pipettierfehler überprüfen zu können, wurde jeder Ansatz stets als Duplikat aufgetragen und bei geringen Abweichungen später mit den Mittelwerten der Werte weitergerechnet. Die PCR-Reaktion wurde in Light Cycler-Kapillaren der Firma Roche durchgeführt. Das *real-time* PCR Programm bestand aus:

95°C	10 min	} 40 Zyklen
95°C	5 sec	
58-61°C	5 sec	
72°C	10 sec	
15°C	∞	

Die Quantifizierung der cDNA wurde mittels der *Roche Molecular Biochemicals Light Cycler Software* (Version 3.5) durchgeführt. Dafür wurde zunächst das Haushaltsgen *Pyruvat-Dehydrogenase* (PDH), das in allen untersuchten Zellen vergleichbar stark exprimiert wird, untersucht. Die nachfolgenden Analysen anderer Gene wurden direkt mit den Ergebnissen der PCR von PDH verglichen und die Daten in der Tabellenkalkulations-Software *Microsoft EXCEL* verrechnet.

Im Verlauf der Promotion wurde der Light Cycler 1.5 durch das *CFX383 real-time PCR detection system* (Fa. Biorad, München), welches bis zu 384 Amplifikationsreaktionen gleichzeitig durchführen kann, ersetzt. Hier wurde mit dem *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) gearbeitet. Der *real-time* PCR-Ansatz setzte sich zusammen aus:

2,5 μ l	cDNA- <i>template</i> (2,5 – 3,75ng/ μ l)
2,5 μ l	Primer-Mix F/R (1pmol/ μ l)
5 μ l	<i>QuantiTect SYBR Green PCR Mix</i>

Dafür wurde zunächst die cDNA unter Zuhilfenahme einer Mehrkanalpipette in die *wells* der 384 *well*-Platte vorgelegt. Der *QuantiTect SYBR Green PCR Mix* wurde mit *Yellow Sub* (1:333) angefärbt, mit dem *Primer-Mix* versetzt und zur cDNA pipettiert. Die 384 *well*-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen, für 10 min bei 1000rpm und 4°C zentrifugiert und schließlich im *CFX384 real-time PCR detection system* den PCR-Reaktionen unterzogen:

95°C	15 min	
95°C	15 sec	} 42 Zyklen
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
95°C	30sec	
60 to 95°C (Zunahme 0,5°C in 30 sec)		Schmelzkurve

Die Auswertung erfolgte mit der *Bio-Rad CFX manager software version 2.0* und *Microsoft EXCEL*.

2.2.1.12 Sequenzierung der DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der von Sanger *et al.* entwickelten enzymatischen Kettenabbruch-Reaktion durchgeführt, welche durch Einsatz von unterschiedlich farbig fluoreszierenden Didesoxynukleotiden (ddNTPs), erstmals durch Lee *et al.* angewandt, stark vereinfacht wurde (Sanger *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 1992). Dabei wird die DNA mit dem 5' *Primer* oder 3' *Primer*, einer hitzestabilen DNA-*Polymerase* und einem Gemisch aus dNTPs und fluoreszierenden ddNTPs versetzt. Die DNA-*Polymerase* verknüpft den bereits gebildeten DNA-Strang völlig zufällig mit einem dNTP oder ddNTP. Beim Einbau eines ddNTPs stoppt die Reaktion und es kommt zum Kettenabbruch. Das Fluoreszenzsignal lässt auf die Base an der entsprechenden Position der Sequenz schließen.

Die zu analysierende Sequenz wurde zunächst über eine Standard-PCR amplifiziert (Details siehe 2.2.1.10). Dafür wurde ein 25 µl Ansatz hergestellt.

12,5 µl	<i>Q-Load 2x MM Mastermix</i>
ggf. 5 µl	Betain
1 µl	5' <i>Primer</i> (10 µM)
1 µl	3' <i>Primer</i> (10 µM)
1 µl	DNA (ca. 100 ng)
ad 25 µl	<i>A.bidest</i>

Nach Ablauf der PCR wurden 5 µl auf einem Agarosegel überprüft (Details siehe 2.2.1.7). Das restliche PCR-Produkt wurde enzymatisch aufgereinigt, indem jeder Probe 3,5 µl H₂O (*Nuklease*-frei), 0,5 µl Exo I (Fa. Fermentas, St. Leon-Roth) und 1 µl Antarktische Phosphatase (Fa. NEB, Frankfurt) zugesetzt und über das folgende Programm bearbeitet wurde.

37°C	15 min
80°C	15 min
10°C	15 min
4°C	∞

Für die Sequenzierung wurde anschließend ein 10 µl Ansatz angefertigt.

1 µl	PCR-Produkt (aufgereinigt)
2 µl	<i>5x buffer for empliTaq FS</i>
0,5 - 1 µl	<i>Big Dye Terminator V3.1</i>
1 µl	5' oder 3' <i>Primer</i> (10 µM)
5,5 µl	H ₂ O (<i>Nuklease-frei</i>)

Dieser Ansatz wurde in folgende Sequenzierreaktion eingesetzt:

96°C	1 min	} 20 – 40 Zyklen
96°C	15 sec	
55°C	5 sec	
64°C	2 min	
12°C	∞	

Schließlich wurden 10 µl *Hi-Di Formamide* (Fa. Life Technologies, Weiterstadt) pro *well* in eine 96 *well PCR Detection Plate* (Fa. Thermo, Scientific, Rockford) vorgelegt und der gesamte Sequenzieransatz über eine Sephadex-Säule durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 3000 x g zugeführt. Die *PCR Detection Plate* wurde in das Sequenziergerät (Fa. ABI, Weiterstadt) eingeführt und über das Programm *Run 3130xl Data Collect* gestartet. Für die Auswertung wurden die Sequenzen zunächst in dem Programm *Sequencher Version 4.9* (Fa. Gene Codes Corporation, USA), umgeschrieben und letztendlich mit den Programmen *SeqPilot Version 3.5.2* (Fa. Jsi Medical Systems, Kippenheim) oder *Sequencing Analysis Version 5.4* (Fa. Applied Biosystems, USA) analysiert.

2.2.1.13 Luciferase-Assay

Das *Luciferase Assay* ist ein *in vitro*-Modell, indem analysiert werden kann, ob die Expression eines Gens durch bestimmte Faktoren beeinflusst wird. Dabei lässt sich sowohl ein aktivierender als auch inhibierender Einfluss bestimmen. Hier wurde das Vektorsystem *pGL3-Basic* verwendet, welches das Gen der *Firefly Luciferase* trägt. Die *Firefly Luciferase* katalysiert die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin, wobei es zu einer Lichtemission im Wellenlängenbereich von 530 nm (grün) bis 635 nm (rot) kommt. In die vom *Luciferae*-Gen *upstream* gelegene *Multiple Cloning Site* (MCS) des *pGL3*-Vektors wurde ein *DNA-Insert* ligiert, welches bestimmt, ob die *Luciferase* exprimiert wird. Dieses *Insert* entspricht meist einem Promotorfragment eines Gens, dessen Expression unter bestimmten Bedingungen analysiert werden soll. Das Plasmid wurde anschließend in *E.coli* DH5α vervielfältigt, in NIH-3T3 transfiziert (Details siehe 2.2.5.4) und diese für 48h auf 10cm-Schalen unter den zu analysierenden Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit 900µl 1x PLB-Reagenz lysiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt und kurz anzentrifugiert, um feste Zellbestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß übertragen. In die Luminometer-Röhrchen wurden jeweils 100 µl des *Luciferase Assay*-Reagenz (Fa. Promega, Mannheim) vorgelegt, welche das Substrat Luciferin enthält, und 20 µl des Zelllysats hinzugefügt. Die Aktivität der im Zelllysats enthaltenen *Luciferase* wurde unmittelbar durch die Ermittlung der Emission im Lichtspektrum 530 –

635 nm für eine Zeitdauer von 10 sec im Luminometer (Fa. Berthold, Wildbad) gemessen. Je häufiger die in *pGL3* inklonierte Sequenz die Expression von *Luciferase* induziert, desto mehr Enzym ist im Zelllysate enthalten und desto stärker ist die ermittelte Lichtreaktion.

2.2.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.2.1 Herstellung chemokompetenter Bakterien nach Hanahan

Chemokompetente Bakterien wurden nach einer von Douglas Hanahan modifizierten Methode hergestellt (Hanahan, 1985). Dafür wurden Bakterien des *E.coli*-Stammes DH5 α verwendet. Die Bakterien wurden zunächst in sterilem LB-Medium angeimpft und üN bei 37°C im Schüttelinkubator (Fa. Braun Biotech, Melsungen) herangezogen. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Bakteriensuspension entnommen und auf 1:100 mit LB-Medium verdünnt. Die Zellen wurden solange weiter schüttelnd bei 37°C inkubiert bis die Suspension einen OD_{550nm} -Wert von annähernd 0,5 erreicht hatte. Dann wurde sie in zwei 50 ml PP-Röhrchen überführt, für 10 min bei 1200 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in je 4 ml eiskaltem Tfb1-Puffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und erneut 10 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Schließlich wurde das Bakterienpellet in Tfb2-Puffer aufgenommen, 100 μ l *Aliquots* hergestellt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Um die Kompetenz der Bakterien zu überprüfen wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit 1 pg/ μ l des Testplasmids *pUC18* transformiert (Details siehe 2.2.2.4), auf einer Ampicillin-Agarplatte ausplattiert und üN bei 37°C im Brutschrank herangezogen (Details siehe 2.2.2.5). Für gute Transformationsbedingungen wurde eine Kompetenz der *E.coli* DH5 α von $>10^7$ angestrebt. Die Kompetenz wurde mittels folgender Formel errechnet:

$$\text{Cfu} = \text{Kolonienanzahl} \times (1\mu\text{g} / \text{Plasmidmasse in } \mu\text{g}) \times (\text{Gesamtvolumen} / \text{plattiertes Volumen})$$

2.2.2.2 Linearisierung und Dephosphorylierung des Vektors

Der Vektor wurde mit Hilfe eines geeigneten Restriktionsenzym (Fa. NEB, Frankfurt) innerhalb der „*multiple cloning site*“ geschnitten und so linearisiert. Gegebenenfalls wurde der Vektor anschließend dephosphoryliert, um eine Religation des Plasmids zu verhindern. Dafür wurden 20 μ l des linearisierten Vektors mit 1 μ l *alkalischer Phosphatase* (1U/ μ l; Fa. Roche, Mannheim) versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 70°C gestoppt. Die Plasmid-DNA wurde abschließend durch eine Ethanol-Fällung aufgereingt (Details siehe 2.2.1.5).

2.2.2.3 Ligation

Die Ligation ist der Prozess, bei dem ein DNA-Konstrukt (*Insert*) in einen Vektor integriert wird. Hierfür wurde der linearisierte Vektor im Verhältnis 1:3 zum *Insert* in einen 20 μ l-Ansatz bestehend aus 4 μ l Vektor-Fragment, 12 μ l *Insert*, 2 μ l *T4-DNA-Ligase* (5U/ μ l; Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und 2

µl 10x T4-Ligasepuffer eingesetzt. Die Ligation fand üN bei 16°C im Wasserbad (Fa. GFL, Eppelheim) statt. Anschließend wurden die ligierten Plasmide in Bakterien transformiert (Details siehe 2.2.2.4).

2.2.2.4 Transformation mittels Hitzeschock

Die bei -80°C gelagerten 100 µl *Aliquots* der chemokompetenten Bakterien des *E.coli*-Stammes DH5α (Details siehe 2.2.2.1) wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut, mit 20 µl einer Plasmid-DNA-Lösung (Details siehe 2.2.2.3) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Durch den folgenden Hitzeschock von 40 sec bei 42°C im Wasserbad (Fa. GFL, Eppelheim) wurden die Bakterien mit dem Plasmid transformiert und dann für 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien in 900 µl LB-Medium überführt und 30 – 45 min bei 37°C im Schüttelinkubator (Fa. Braun Biotech, Melsungen) vermehrt. 100 – 300 µl der Bakteriensuspension wurden dann auf selektiven LB-Agar-Platten (100 µg/ml Antibiotikum) ausplattiert und üN bei 37°C im Bakterieninkubator (Fa. Heraeus, Hanau) inkubiert.

2.2.2.5 Selektion transformierter Bakterien

Die Standardklonierungen wurden mit den Vektoren *pCDNA3 neo*, *pBABE puro*, *pSEAP2 basic* oder *pCR II TOPO* durchgeführt. Alle Plasmide enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen, welches den erfolgreich transformierten Bakterien bei der Ausplattierung auf Amp-Agarplatten einen Überlebensvorteil verschafft und somit eine Selektion ermöglicht. Der Vektor *pCR II TOPO* trägt zusätzlich das *lacZ*-Gen, das für eine blau/weiß-Selektion genutzt werden kann.

2.2.2.6 Analyse transformierter Bakterien

Nach Anwachsen der transformierten Bakterien auf selektiven LB-Agar-Platten wurden Klone gepickt und in LB-Medium vermehrt. Anschließend wurden die Plasmide nach *Birnboim* und *Doly* extrahiert (Details siehe 2.2.1.3). Um zu prüfen, ob das *Insert* in den Vektor integriert wurde, wurden die Plasmide restringiert (Details siehe 2.2.1.6) und durch eine Agarose-Gelelektrophorese (Details siehe 2.2.1.7) analysiert. Auch die Orientierung des *Inserts* im Vektor konnte so durch eine geeignete Wahl der Restriktionsenzyme bestimmt werden.

2.2.3 RNA Standardmethoden

2.2.3.1 RNA-Extraktion aus Zellen

Die Zellen wurden auf 10 cm Schalen ausplattiert und bis zum Erreichen einer 80% Konfluenz in DMEM-Vollmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturinkubator (Fa. Heraeus, Hanau) kultiviert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Trizol aufgenommen, 15 min auf dem Schüttler inkubiert und in ein 2 ml Eppendorffgefäß überführt. Diese Suspension kann

gegebenenfalls bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert werden. Der Suspension wurden dann 200 µl Chloroform zugeführt, 15 sec invertiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die RNA-haltige Oberphase wurde großzügig abgenommen und in ein neues 2 ml Eppendorffgefäß überführt. Anschließend wurde die RNA aus der Lösung gefällt, indem 500 µl Isopropanol hinzugefügt, 15 sec invertiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Das RNA-Pellet wurde einmal mit 1 ml 75% Ethanol für 15 min bei 13000 rpm und 4°C gewaschen und bei 37°C getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde die RNA in 70 – 140 µl *A.bidest* gelöst. Sie wurde dann bei – 80 °C gelagert oder direkt in den DNase I-Verdau eingesetzt (Details siehe 2.2.3.4).

2.2.3.2 RNA-Extraktion aus Gewebe

Nach der Präparation der Mäuse wurde das entnommene Gewebe unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für die RNA-Extraktion wurde zunächst 1 ml Trizol in ein 15 ml PP-Röhrchen vorgelegt, das unaufgetaute Gewebe (5 – 50 mg je nach Gewebe) hinzugefügt und mit Hilfe des Ultra-Turrax T125 (Fa. Janke und Kunkel, Stauffen) 1 min homogenisiert. Die Suspension wurde für 10 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein 2 ml Eppendorffgefäß überführt und 200 µl Chloroform zugegeben. Die RNA-Extraktion erfolgte weiterhin wie unter 2.2.3.1 beschrieben.

2.2.3.3 RNA-Amplifikation

Die RNA-Amplifikation wurde unter Zuhilfenahme des „*MessageAMPTM Premier RNA Amplification Kit*“ nach den Angaben des Herstellers Ambion durchgeführt.

2.2.3.4 Entfernung genomischer DNA und Aufreinigung

Genomische DNA wurde mit Hilfe eines *DNase I*-Verdau aus der RNA-Suspension entfernt. Dafür wurden 70 µl RNA-Lösung mit 10 µl 10x TE, 10 µl 10x *DNase*-Puffer, 2 µl *RNase*-Inhibitor (40 U/µl) und 4-8 µl *DNase I* (10 U/µl; Fa. Roche, Mannheim) versetzt und 2 – 4 h bei 25°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Lösung nach dem *RNA-Cleanup*-Protokoll des *Qiagen RNeasy Mini-Kits* (Fa. Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Dafür wurden dem 100 µl-Ansatz 350 µl RLT-Puffer, versetzt mit β-Mercaptoethanol (1:100), und 250 µl Ethanol abs. zugefügt. Nach gründlichem Vermischen durch Auf- und Abpipettieren wurde die Lösung auf eine *RNeasy*-Säule übertragen und für 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Die an die Säule gebundene RNA wurde im Anschluss einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer, mit jeweils anschließender Zentrifugation für 15 sec bei 10000 rpm, gewaschen. Die *RNeasy*-Säule wurde dann für 3-5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und bei RT getrocknet. Schließlich wurde ein gewünschtes Volumen *A.bidest* auf die *RNeasy*-Säule gegeben und für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert, wodurch die RNA von der Säule gelöst wurde.

2.2.3.5 Messung der RNA-Integrität

Die Integrität der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des *RNA 6000 Nano Kits* (Fa. Agilent Technologies, Böblingen) im 2100 Bioanalyser (Fa. Agilent Technologies, Böblingen) ermittelt. Dabei wird in einem *RNA Nano Chip* mittels Kapillarelektrophorese die Qualität und Konzentration von bis zu 12 RNA-Proben gleichzeitig gemessen. Die RNA wird in die *wells* des *RNA Nano Chips* aufgetragen und in Mikrokapillaren im elektrischen Feld aufgetrennt. Der Fluoreszenzdetektor misst dabei die Laufzeit und die Intensität der sich als Banden abzeichnenden 18S und 28S rRNA. Die *Software* des 2100 Bioanalysers berechnet anschließend selbständig die sogenannte *RNA Integrity Number* (RIN), welche sich durch den 28S/18S rRNA-Quotienten ergibt. Der RIN-Wert wird auf einer Skala von 1 bis 10 bestimmt, wobei die RNA bei RIN 1 vollständig degradiert ist und bei RIN 10 die maximale Integrität aufweist. Die Untersuchung der RNA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Von der RNA wurde im Allgemeinen 1 µl der Probe, maximal jedoch 500 ng in die Elektrophorese eingesetzt. Bei einem RIN > 8,5 wurde die RNA für weitere Untersuchungen verwendet.

2.2.3.6 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Nach der Quantifizierung (Details siehe 2.2.1.4) wurde die RNA über eine reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 4 µg *DNase I*-verdaute RNA eingesetzt, mit *RNase*-freiem *A.bidest.* auf 16 µl aufgefüllt und 10 min bei 70°C im Thermocycler denaturiert. Anschließend wurden die Proben für 1 min auf Eis gekühlt und mit 24 µl cDNA-Synthesemix versetzt:

5 µl	Oligo (dT)16 (50µM)
3,5 µl	dNTPs (je 10 mM)
8 µl	<i>5x first strand buffer</i>
4 µl	DTT (100 mM)
2 µl	<i>RNase</i> -Inhibitor (20 U/ µl)
1,5 µl	<i>M-MLV Reverse Transkriptase</i> (200 U/ml)

Für die Negativkontrollen wurden die Ansätze anstatt mit *M-MLV Reverser Transkriptase* (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) mit 1,5 µl *A.bidest.* versetzt, was der Kontrolle der nach dem *DNase I*-Verdau verbliebenen DNA-Verunreinigungen in der RNA-Präparation diene. Im weiteren Verlauf wurde die RNA der resultierenden 40 µl Ansätze im Thermocycler (Fa. Biometra, Göttingen) durch Inkubation für 90 min bei 37°C in cDNA umgeschrieben. Eine abschließende Inkubation für 10 min bei 94°C sorgte für die Inaktivierung der *Reversen Transkriptase*. Die cDNA wurde für weitere Analysen als *template* in verschiedene PCR-Reaktionen eingesetzt.

2.2.4 Biochemische Analysen

2.2.4.1 Protein-Extraktion aus Zellen

Die Zellen wurden auf 10cm Schalen ausplattiert und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen, zur Lyse mit 1ml RIPA-Puffer versetzt und mit einem Schaber vom Untergrund gelöst. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Eppendorffgefäße überführt und für ca. 15 min auf Eis inkubiert. Um die letzten Zellkompartimente aufzuspalten, wurde die Suspension unter Zuhilfenahme des Ultraschallstabs (Fa. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) für 5 Sekunden geschallt. Schließlich wurde die Lösung für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Protein enthaltende Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt und gegebenenfalls bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die Proteine konnten auch entsprechend mit Urea-SDS-Puffer extrahiert werden. Hier wurden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.4.2 Herstellung von Kernprotein-Extrakten

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Lysepuffer I pro Schale versetzt. Die Zellsuspension wurde mit einem Schaber vom Boden abgelöst, in 1,5 ml Eppendorffgefäße übertragen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min und 13000 rpm bei 4°C wurde der Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthielt, in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt und gegebenenfalls bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde mit 100 µl Lysepuffer II, welcher die Zellkerne aufspaltet, versetzt und 30 – 60 min auf Eis inkubiert. Um die unlöslichen Kernmembran-Reste zu entfernen, wurde das Proteinextrakt für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die Kernproteine enthielt, wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt und konnte ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

2.2.4.3 Protein-Extraktion aus Gewebe

Das Gewebe wurde bis zur Proteinextraktion bei -80°C gelagert. Dann wurde es unaufgetaut in 15 ml PP-Schnappdeckelgefäße überführt, mit 1 ml eiskaltem RIPA-Puffer bzw. Urea-SDS-Puffer überschichtet und mit Hilfe des Ultra Turrax T25 (Fa. Jahnke und Kunkel, Stauffen) zerkleinert. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit wurde die Suspension ultrageschallt, in 1,5 ml Eppendorffgefäße überführt und für 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Proteine und wurde gegebenenfalls bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.4.4 Quantifizierung von Proteinen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 1 µl Proteinextrakt mit 799 µl *A.bidest.* und 200 µl BioRad Protein Assay-Reagenz versetzt und gründlich gemischt. Das Biorad Protein Assay-

Reagenz enthält den Farbstoff *Coomassie*-Brilliantblau, welcher bei niedrigem pH-Wert an die Proteine bindet und dadurch sein Absorptionsverhalten ändert. Der Farbumschlag wurde nach einer 2-minütigen Inkubationszeit im Photometer bei 595 nm gemessen. Als Referenz wurde *A.bidest.* versetzt mit Assay-Reagenz gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anschließend anhand einer Eichgerade, welche zuvor durch definierte Konzentrationen verschiedener BSA-Lösungen ermittelt wurde, bestimmt.

2.2.4.5 Fällung von Proteinen

Die gewünschte Proteinmenge (100 - 800 µg) wurde mit 9 Vol eiskaltem Aceton innerhalb 1 h – üN bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die Protein-Lösung 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Für die Weiterbearbeitung innerhalb einer SDS-PAGE (Details siehe 2.2.4.7) wurde das Proteinpellet in einem definierten Volumen 2x Proteinladepuffer (13µl pro 100 µg Protein) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.6 Immunpräzipitation (IP)

Die Methode der Immunpräzipitation dient dem Nachweis der Protein-Protein-Interaktion. Hierbei wird mit Hilfe eines Antikörper-Agarose-Komplexes gezielt ein Protein und alle weiteren Moleküle, an die dieses Protein bindet, spezifisch aus einer Suspension gefällt. Die einzelnen Komponenten dieser Protein-Komplexe können anschließend nachgewiesen werden.

Die Proteinsuspension wurde auf eine Konzentration von 1 mg/ml und ein Volumen von 1 ml eingestellt. Anschließend wurden 0,2 – 0,5 mg/ml des Antikörpers hinzugefügt, welcher gegen das zu fällende Protein gerichtet war. Das Extrakt wurde üN bei 4°C im Rotator (Fa. Fa. Heidolph, Schwalbach) inkubiert. Am nächsten Tag wurden dem Proteinextrakt 20 µl Protein A/G PLUS-Agarose, die an die Immunglobuline IgA und IgG des Antikörper bindet, zugeführt und erneut 3 - 5h bei 4°C im Rotator inkubiert. Die Suspension wurde für 20 sec bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert, wodurch die Komplexe aus Protein, Antikörper und Agarose sanft pelletiert wurden. Das Pellet wurde nachfolgend zweimal mit TSA / 0,1% Triton X-100, einmal mit TSA und abschließend einmal mit Tris pH 6,8 gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde stets für 20 sec bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Schließlich wurde der letzte Waschpuffer vollständig abgezogen und das Pellet in 40 µl 2x Proteinladepuffer aufgenommen und 5 min aufgeköcht. Die dadurch von den Protein-Antikörper-Komplexen getrennte Agarose wurde durch eine Zentrifugation von 10 min bei 4°C und 13000 rpm pelletiert. Der Protein-Antikörper-Gemisch enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung zu -20°C gegeben oder direkt zur Proteinauftrennung in eine SDS-PAGE (Details siehe 2.2.4.7) eingesetzt.

2.2.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Für eine möglichst exakte Auftrennung der Proteine wurde eine

diskontinuierliche SDS-PAGE angewandt, bei der die Proteine zunächst in einem weitporigen Sammelgel an einer Lauffront geordnet werden und anschließend im engporigen Trenngel aufgrund der Größen-Unterschiede aufgetrennt werden. Das Trenngel bestand je nach Größe des gesuchten Proteins aus einem 7,5-15% Polyacrylamidgel:

Trenngel

	7,5%	10%	15%	
<i>A.bidest</i>	2,4	1,9	1,1	ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,3	1,3	1,3	ml
30% Acrylamid	1,2	1,7	2,5	ml
10% SDS	50	50	50	µl
10% APS	50	50	50	µl
Temed	3	2	2	µl

Sammelgel

	3 ml	5 ml	8 ml	
<i>A.bidest</i>	2,1	3,4	5,5	ml
1,5 M Tris pH 6,8	0,38	0,63	1,0	ml
30% Acrylamid	0,5	0,83	1,3	ml
10% SDS	30	50	80	µl
10% APS	30	50	80	µl
Temed	3	5	8	µl

Die Proteine, welche zuvor in 2x Ladepuffer aufgenommen wurden (Details siehe 2.2.4.5), wurden durch 5-minütiges Aufkochen denaturiert. Nach abgeschlossener Auspolymerisation der Gele wurden je 100 µg des Extraktes aufgetragen. Als Marker diente der *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fa. Fermentas, St.Leon-Rot). Die SDS-PAGE erfolgte bei 70-100 V in 1x Laufpuffer.

2.2.4.8 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden im *Western Blot* auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dafür wurde eine Tank-Blotting-Apparatur der Firma VWR verwendet. Die Trenngele wurden zunächst in 1x Transferpuffer überführt, die Nitrozellulosemembran in *A. bidest* equilibriert und das Whatman Papier und das Pad befeuchtet.

Aufbau des <i>Western Blots</i> :	Anode
	2x Whatman Papier
	Nitrozellulosemembran
	Trenngel
	2x Whatman Papier
	Pad
	Kathode

Nach dem Zusammenbau des *Western Blots* wurde die Kammer mit 1x Transferpuffer aufgefüllt und die Proteine üN bei 100 mA auf die Membran transferiert.

2.2.4.9 Immunologischer Proteinnachweis und autoradiographische Detektion

Nach Abbau des *Western Blots* wurde die Membran 1h in Blocklösung (5% Magermilchpulver / 0,05% Tween / PBS) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper, welcher mit Blocklösung i.d.R. 1:1000 verdünnt wurde, üN bei 4°C auf einem Taumeltisch (Fa. Biometra, Göttingen) inkubiert und daraufhin dreimal 10 min mit PBS / 0,05% Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper, zuvor 1:5000 in Blocklösung verdünnt, wurde hinzugefügt und die Membran 1h unter Schütteln inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde im Anschluss dreimal 15 min mit 0,05% Tween / PBS gewaschen. Bei einer Inkubation der Membran mit direkt HRP-gekoppelten Primärantikörpern, wurde nach der Abnahme desselben dreimal 15 min mit PBS / 0,05% Tween gewaschen und die Proteinbanden detektiert.

Die Detektion basiert auf der Umsetzung von Luminol durch HRP (*horse radish peroxidase*), welche meist an den Sekundärantikörper gekoppelt ist. Die durch Oxidation angeregte Form von Luminol fällt bei 428 nm unter Lichtemission (Chemilumineszenz) in ihren Grundzustand zurück. Diese Reaktion hat eine Halbwertszeit von 30 Minuten. Die Membran wurde zur Detektion mit 3 ml *ECL PLUS Western Blotting Detection-Lösung* (Fa. Amersham, Freiburg), welche zuvor nach Hersteller-Angaben angesetzt wurde, für 2 min inkubiert, anschließend von Flüssigkeit befreit und in eine Filmkassette übertragen. In der Dunkelkammer wurden die Proteinbanden durch unterschiedlich lange Exposition (20 sec bis 45 min) von Röntgenfilmen dargestellt.

Um weitere Nachweise auf einer Membran durchführen zu können, wurde diese nach der Detektion je 4 min in *A.bidest*, 0,2M NaOH und erneut *A.bidest* unter Schütteln inkubiert. Dadurch werden die noch gebundenen Antikörper größtenteils von der Membran entfernt. Nachdem die Membran 1h in Blocklösung geschüttelt wurde, war sie wieder bereit für die Inkubation mit einem neuen Antikörper.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden im Zellkulturinkubator (Fa. Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM (Fa. Gibco, Grand Island) verwendet, das zuvor mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS, Fa. PAA Laboratories, Pasching), 2mM L-Glutamin (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) und je 100 µg/ml der Antibiotika Penicillin und Streptomycin (Fa. Gibco, Grand Island) versetzt wurde (Vollmedium). Bei Erreichen einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden sie zunächst mit PBS (Fa. Gibco, Grand Island) gewaschen, mit Trypsin / EDTA (Fa. Gibco, Auckland) vom Untergrund abgelöst und vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen je nach Bedarf erneut in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:20 in frischem Vollmedium ausplattiert.

2.2.5.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mittels Trypsin / EDTA gelöst und bei 1300 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in FCS, versetzt mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), resuspendiert, in 1ml Kryoröhrchen überführt und zunächst einige Tage bei -80°C aufbewahrt. Die Endlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurde ein Zell-*Aliquot* für ca. 10 min bei 37°C inkubiert, in 10-fachem Volumen DMEM-Vollmedium (DMEM; 10% FCS; 2mM L-Glutamin; je 100 µg/ml Penicillin und Streptomycin) aufgenommen und für 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert, um DMSO-Reste aus der Zellsuspension zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen in DMEM-Vollmedium resuspendiert und in Zellkulturgefäßen ausplattiert.

2.2.5.3 Transiente Calciumphosphat-vermittelte Transfektion

Für die Transfektion mit Calciumphosphat-Präzipitaten wurden HEK293 und HEK293T Zellen verwendet. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion passagiert, die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und eine definierte Zellzahl in DMEM-Vollmedium auf 10 cm Schalen ausplattiert. Am nächsten Tag wurde eine 500 µl Lösung, bestehend aus 10 – 30 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA, 62,5 µl 2M CaCl₂ und *A.bidest*, angesetzt, gemischt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Plasmidlösung tropfenweise 500 µl 2x HBS-Puffer zugeführt, erneut gründlich gemischt, 10-15 min inkubiert und diese dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach 48h präpariert bzw. 24h nach der Transfektion erneut passagiert, 1:1 ausplattiert, weitere 24h bei Normoxie oder Hypoxie inkubiert und schließlich ebenfalls präpariert.

2.2.5.4 Stabile Transfektion mit *Lipofectamine LTX*

Die Transfektion von pC12-Zellen wurde mit *Lipofectamine LTX* (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion so auf 10 cm Schalen oder in 6 *wells* ausplattiert, dass sie am nächsten Tag eine 50-80% Konfluenz aufwiesen. Die Plasmid-DNA wurde in DMEM (ohne Zusätze) aufgenommen, mit PLUS Reagenz versetzt, ausgiebig gemischt und 5 min inkubiert. Anschließend wurde dem Gemisch die optimierte Menge an *Lipofectamine LTX* hinzugefügt, wieder gut gemischt, 30 min inkubiert und die Lösung dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 24 – 48 h wurden die Zellen präpariert.

	DNA	<i>Lipofectamine LTX</i>	PLUS Reagenz	DMEM
6 <i>well</i>	3 – 5 µg	10 – 15 µl	3 – 5 µl	500 µl
10 cm	10 – 20 µg	40 µl	10 – 20 µl	2 ml

2.2.5.5 Retrovirale Transduktion

Um Mischkulturen mit Wildtyp-Zellen und Zellen mit Überexpression bestimmter Gene zu umgehen, wurden die Krebszellen verschiedener Zelllinien retroviral mit diversen Konstrukten transduziert. Hierbei entsteht eine Zellpopulation, deren Zellen dieselben Eigenschaften zeigen. Als Vektorsystem diente *pBABE puro*, dem jedoch die Gene der Virus-Verpackungsproteine *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (RNA-abhängige DNA-Polymerase) und *env* (*envelope*-Glycoprotein), fehlen. Daher ist für die retrovirale Transduktion das Helferplasmid pCL-Eco nötig, welches die Verpackungsproteine zusteuert, selbst hingegen in der 5'LTR-Region deletiert ist (Naviaux et al., 1996). Das *pBABE puro*-Konstrukt, welchem bereits im Voraus das gewünschte Insert inkloniert wurde, wird dabei zunächst mit *pCL Eco* in die Helferzellen BOSC23 kotransfiziert. BOSC23 finden ihren Ursprung in HEK 293T-Zellen, welche mit *pCRIPenv*- und *pCRIPgag-2*-Konstrukten transient transfiziert wurden, was für ca. 14 Passagen zu einem erhöhten Expressionslevel von *gag* und *pol* führt (Pear et al., 1993). Die in BOSC23 gebildeten Viruspartikel lysieren die Zellen und können aus dem Überstand entnommen und auf die zu transduzierenden Zielzellen übertragen werden.

Zu Beginn wurden jeweils 4 Millionen BOSC23-Zellen auf 10 cm Schalen ausplattiert und ca. 24h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurden diese über Calciumphosphat-Präzipitation mit 20 µg des *pBABE puro*-Konstruktes und 5µg des Helferplasmids *pCL Eco* kotransfiziert (Details siehe 2.2.5.3). Am nächsten Tag wurden die Zielzellen auf 6 *wells* so plattiert, dass sie nach 24h zu 50% konfluent waren. 48h nach der Transfektion der BOSC23 wurde erstmals der Medienüberstand, welcher die Virionen enthielt, mit einer 20 ml Spritze abgenommen, durch einen 45 µm Filter in ein 15 ml PP-Röhrchen gepresst, um die restliche Zellbestandteile zu entfernen, und mit 4 µg/ml Polybren gemischt. Polybren ist ein Polykation, welches die Ladungen der Zellmembran überlagert und so das Eindringen von Virionen in die Zellen erleichtert. Das Medium der Zielzellen wurde entfernt und durch ein geeignetes Volumen des Virus-Überstandes ersetzt. Die BOSC23-Zellen wurden mit frischem Vollmedium versetzt. Nach weiteren 24h enthielt der Überstand wieder genügend Virionen, um den Vorgang zu wiederholen. Die BOSC23-Zellen wurden anschließend verworfen. Nach einer Inkubationsdauer von insgesamt 48h wurde der restliche Virus-Überstand von den Zielzellen entfernt und durch frisches Vollmedium ersetzt, dem 2 µg/ml Puromycin zugefügt wurden. Puromycin diente der Selektion der infizierten Zellen, da nur Zellen, die das *pBABE puro*-Konstrukt enthielten, welches ein Puromycin-Resistenzgen trägt, überleben konnten. Diese Selektion wurde die nächsten 4 Tage weiterhin durchgeführt. Bei Erreichen einer 80% Konfluenz wurden die Zellen in größere Zellkulturgefäße überführt und sobald möglich entsprechend der Fragestellung weiterverarbeitet.

Um die Effizienz der retroviralen Transduktion zu ermitteln und gleichzeitig einen Vergleich der Dichte der Virus-Partikel mit unterschiedlichen Konstrukten untereinander machen zu können, wurde eine Virustiterbestimmung durchgeführt. Dafür wurden Zellen einer verfügbaren Fibroblasten-Zelllinie entsprechend der Zielzellen auf 6 *wells* ausplattiert und zu denselben Zeitpunkten mit den Virus-Überständen im Verhältnis 1:100, 1:1000 und 1:10000 infiziert. Nach der anschließenden viertägigen Selektion mit Puromycin, wurden die verbleibenden Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl 4% PFA pro *well* für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Lösung wurde mit Leitungswasser entfernt, die Zellen mit Kristallviolett angefärbt und die sichtbaren Kolonien ausgezählt. Der Virustiter errechnet sich wie folgt:

$$\text{Virustiter (Partikel/ml)} = (\text{Anzahl der Zellkolonien/ausplattierte Zellen}) \times (1/\text{Verdünnungsstufe})$$

Aus dem Virustiter kann anschließend der M.O.I (Multiplizität der Infektion)-Wert berechnet werden, welcher angibt wieviele Virionen pro Zelle im Zellüberstand enthalten sind. Mit Hilfe des M.O.I-Wertes kann die nötige Menge an Virionen für eine mögliche Ausgleichstransduktion ermittelt werden:

$$\text{M.O.I} = \text{Virustiter} / \text{Zellzahl}$$

2.2.5.6 Zelladhäsionsassay

Die *wells* einer 96-*well*-Platte wurden mit verschiedenen Proteinen der Extrazellulärmatrix (ECM) beschichtet. Dafür wurden Fibronectin (50 µg/ml), Laminin (25 µg/ml), Vitronectin (2,5 µg/ml), Collagen I (50 µg/ml) und Collagen IV (25 µg/ml) und ein Gemisch der ECM-Proteine (Extrazellulärmatrix isoliert aus dem murinen *Engelbreth-Holm-Swarm*-Sarkom) verwendet. Am Tag vor dem Ausplattieren der Zellen wurden die *wells* mit 50 µl der entsprechenden Proteinlösung versetzt und 1h oder ÜN bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung verworfen, die *wells* mit 0,1% BSA / DMEM gewaschen und für 1 h bei 37°C mit 0,5% BSA / DMEM geblockt. Schließlich wurden die *wells* nach Entfernen der BSA-Lösung erneut mit PBS gewaschen, die Restflüssigkeit vollständig entfernt und dann die so vorbereiteten Platten entweder direkt für das Adhäsions-Experiment verwendet oder bis zum Beginn des Experimentes bis zu drei Tagen bei 4°C gelagert.

Für die Analyse des Adhäsions-Verhaltens der Zellen wurden Suspensionen mit 2×10^5 Zellen / ml in Serum-freiem DMEM hergestellt. Es wurden jeweils 100 µl Zellsuspension auf die beschichteten *wells* pipettiert (Triplikate-Ansätze) und 30 min – 1 h im Zellkultur-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Zellen mit dem Medium abgenommen und die *wells* dreimal mit 0,1% BSA / DMEM gewaschen. Die anhaftenden Zellen wurden schließlich für 10 min mit 4% PFA fixiert und einmal mit PBS gewaschen. Zur Bestimmung der relativen Anzahl adhärenter Zellen wurden die *wells* für 10 min mit Kristallviolett, welches sich an die DNA im Zellkern anlagert, inkubiert. Dann wurden die Zellen mit *A.bideest* gewaschen, getrocknet und innerhalb 30 min mit 2% SDS / PBS lysiert. Die Intensität der Färbung wurde bei 550 nm im *ELISA-Reader* (F. Tecan, Männedorf, Schweiz) ermittelt.

Für die Ermittlung des Überlebens der Zellen in Abhängigkeit des Adhäsionsverhaltens wurden fünf identische Ansätze angefertigt. Es wurden 5000 Zellen pro 96 *well* in Serum-freiem DMEM ausplattiert. Der erste Ansatz wurde direkt nach der Zugabe der Zellen analysiert und diente als Plattierungskontrolle. Die anderen Ansätze wurden nach 1, 2, 3 und 6 Tagen ausgewertet. Zur Bestimmung der relativen Anzahl lebender Zellen wurden jedem *well* 10 µl *WST-1 Assay* Reagenz hinzugefügt. WST-1 ist ein hellrot gefärbtes Tetrazoliumsalz, welches durch mitochondriale Dehydrogenasen in dunkelrotes Formazan umgesetzt wird. Die Farbintensität der Lösung ist somit proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in den untersuchten *wells*. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C im Zellkultur-Inkubator mit WST-1 inkubiert. Anschließend wurde der Farbumschlag bei 450/630 nm im *ELISA-Reader* (F. Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen.

2.2.5.7 Anoikis

Zur Analyse der Anoikis wurden 2×10^5 Zellen/ml in 10 ml DMEM-Vollmedium aufgenommen und bei 37°C rotierend in 15 ml PP-Röhrchen inkubiert, um die Adhäsion der Zellen zu vermeiden. Anschließend wurde das Überleben der Zellen nach 24h, 48h und 72h analysiert. Dafür wurden Triplikate der Zellsuspension in 96 *wells* fixiert und die Anzahl lebender Zellen mittels WST-1 bestimmt (Details siehe 2.2.5.6).

2.2.5.8 Chemotaxis-Versuch

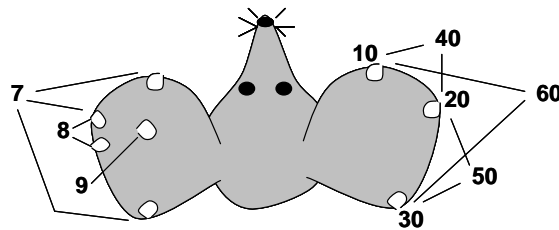
Mit Hilfe des Chemotaxis-Versuches kann die Migrationsfähigkeit von Zellen untersucht werden. Dabei werden die Zellen angeregt, durch eine poröse Polycarbonat-Membran in Richtung des Chemotaxins zu wandern. Die Zellen wurden 24 h vor Beginn des Experimentes in Serum-freiem Medium kultiviert, dann in der Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt und anschließend Zellsuspensionen mit 2×10^5 Zellen/ml hergestellt. Als Chemotaxine wurden Fibronectin und Vitronectin verwendet, deren Stocklösungen (50 µg/ml) zunächst mit Serum-freiem Medium auf 10 µg/ml Fibronectin und 5 µg/ml Vitronectin verdünnt wurden. Je 30 µl des Chemotaxins wurden daraufhin blasenfrei in die *wells* der Unterplatte einer Boyden-Kammer gegeben, die geladene Seite der Polycarbonat-Membran, die zuvor 1 h in einer Gelatine-Lösung eingelegt und anschließend 3 x mit PBS gewaschen wurde, aufgelegt und mit der Dichtung und Oberplatte versiegelt. Die *wells* der Oberplatte wurden mit je 50 µl Zellsuspension blasenfrei beschickt und die gesamte Boyden-Kammer im Anschluss für 16 h bei 37°C im Zellinkubator inkubiert. Danach wurden die Zellen, die durch die poröse Membran migriert waren fixiert, angefärbt und gezählt. Dafür wurde zunächst die verbliebene Zellsuspension vorsichtig aus den *wells* der Oberplatte entfernt und diese mit der Dichtung und der Membran von der Unterplatte mit den Chemotaxinen entfernt und umgestülpt. Die Membran wurde mit Hilfe von Filterklemmen abgenommen und die nicht migrierten Zellen an der Unterseite durch 2-fache Befeuchtung mit PBS und anschließendem Abstreifen am Filterwischer entfernt. Die Membran wurde für 10 min getrocknet, anschließend die auf der Oberseite befindlichen migrierten Zellen innerhalb 1 min in Methanol an der Membran fixiert und diese erneut für 10 min getrocknet. Dann wurden die Zellen angefärbt, indem sie 3 x mit Hemacolor-Lösung II und 6 x mit Hemcolor-Lösung III benetzt und anschließend überschüssige Färbelösung dreifach in frisch angesetztem Puffer von Weise abgewaschen wurde. Die Membran wurde abschließend erneut 10 min getrocknet, mit der Zellseite auf einen Objektträger aufgebracht, mit Immersionsöl und Deckgläschen blasenfrei abgedichtet und am Rand mit Nagellack versiegelt. Die Auszählung der Zellzahl wurde am Lichtmikroskop bei 400 x Vergrößerung vorgenommen.

2.2.6 Maus-Experimente

Alle Maus-Experimente wurden im Rahmen des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte unter eigener Aufsicht und der Verwaltung der Tierpfleger im ZVTE (zentrale Versuchstiereinrichtung der Univeristät Mainz).

2.2.6.1 Registrierung und Genotypisierung der Mäuse

Die jungen Mäuse wurden ca. 3 Wochen nach ihrer Geburt von ihrer Mutter abgesetzt, nach ihrem Geschlecht getrennt und fortan in separaten Mausekäfigen gehalten. Die Registrierung erfolgte auf zweierlei Wegen. Zunächst wurden die Mäuse mit einer Ohrmarke, welche eine zugeteilte Nummer aufwies, versehen. Da diese Marken jedoch leicht verloren gehen, wurden die Mäuse zusätzlich „getaggt“, wobei kleine Löcher mit Hilfe eines Ohrstanzers in die Ohren gestanzt wurden. Dabei wurde das rechte Ohr mit dem Zehner-Wert versehen und in das linke Ohr wurde der Einer-Wert der zugeordneten Mausnummer gestanzt. Das „Taggen“ wurde für beide Ohren nach folgendem Prinzip durchgeführt:



Für die Genotypisierung der Tiere wurden Schwanzbiopsien entnommen, indem ca. 0,5 cm der Schwanzspitze abgeschnitten und in 750 µl DNA-Lysepuffer überführt wurde. Aus den Schwanzbiopsien wurde anschließend DNA extrahiert (Details siehe 2.2.1.2) und mittels PCR (Details siehe 2.2.1.10) der Genotyp der Tiere ermittelt.

2.2.6.2 Präparation von Gewebe, Serum und Urin

Nach der Tötung der Maus mittels Genickbruch, wurde zunächst die Bauchhöhle geöffnet, die gewünschten Organe nacheinander frei präpariert und in separate mit PBS-gefüllte Petrischalen überführt. Hier wurden die Gewebe von Resten des Fettgewebes befreit, gegebenenfalls zerkleinert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Der Urin wurde durch Punktion der Harnblase gewonnen, in ein 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff gegeben. Zur Gewinnung des Serums wurde zügig der Brustkorb aufgeschnitten, die Rippen entfernt und das Herz freigelegt. Das Blut wurde dann aus dem noch schlagenden Herzen durch Punktion entnommen und für 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Serum-haltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.6.3 Altersbestimmung und Präparation pränataler Mausembryonen

Um Embryonen in einem bestimmten Entwicklungsstadium analysieren zu können, wurden sogenannte *timed mating* Experimente durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine zeitlich überwachte Kopulation der Mäuse, wobei man sich den Tag / Nacht-Rhythmus der Tiere zunutze macht und von einer Verpaarung gegen Mitternacht ausgeht. Das Männchen verschließt nach der Begattung die Vagina des Weibchens mit einem Koagulationssekret. Dieser so genannte *plug* löst sich

nach 7 – 10 h je nach Bewegungsdrang des Weibchens wieder. Innerhalb dieses Zeitrahmens wurde ein *plug check* vorgenommen, welcher Aufschluss über das Paarungsverhalten der Tiere gab. War dieser erfolgreich, so wurde das Entwicklungsstadium der heranwachsenden Embryonen auf 0,5 dpc (*days post coitum*) festgelegt. Weibchen der verwendeten Mausstämmen sind 21 Tage trächtig. Für weitere Analysen wurden Embryonen zu den Entwicklungsstadien von E9,5 bis E14,5 benötigt. Hierfür wurde die Mutter zum entsprechenden Zeitpunkt getötet, die Bauchhöhle geöffnet, der Uterus entnommen und in PBS überführt. Die Embryonen wurden frei präpariert, gegebenenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Gegebenenfalls wurde aus dem Amnion DNA zur Genotypisierung isoliert (Details siehe 2.2.1.2).

2.2.6.4 Überführung von Embryonen / Gewebe in die Zellkultur

Die Mausorgane bzw. Mausembryonen wurden unmittelbar nach der Präparation weiter verarbeitet. Das Gewebe wurde durch eine 1 ml Spritze (Kanüle 0,9 x 40 mm) gepresst oder mit einem Skalpell klein verarbeitet, in 1 ml *Collagenase* (0,25 mg/ml) / DMEM-Vollmedium aufgenommen und für 10 – 30 min bei 37°C im Zellkulturinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in 10 ml DMEM-Vollmedium überführt und durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1300 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 5 ml DMEM-Vollmedium für 5 min bei 1300 rpm gewaschen und schließlich in 3 ml Vollmedium aufgenommen, in 6 *well* Platten ausplattiert und bei 37°C kultiviert.

2.2.6.5 Metastasierungsexperiment

Um das metastatische Potential von Zellen zu analysieren, wurden diese in *in vivo*-Experimenten getestet. Hierfür wurden die humanen Zelllinien 786-O und KTCTL-26A, welche beide aus Gewebe von Nierenkarzinomen hervorgegangen sind, verwendet. Um zusätzlich den Effekt der Tumorsuppressoren VHL und PTEN und der E3-Ligase NEDD4-1 auf den Metastasierungsprozess zu überprüfen, wurden die Zellen zudem mit je einem dieser Gene transduziert (Details siehe 2.2.5.5), was zu einer verstärkten Expression dieser Moleküle in der Zelle führt.

Jeweils eine Million Zellen wurde in die Schwanzvene von 8 Wochen alten, immundefizienten NOD/SCID^{-/-} Weibchen injiziert. Um Messfehlern möglichst vorzubeugen, wurden pro Ansatz vier Mäuse behandelt. Zusätzlich wurden 20000 Zellen pro Ansatz ausplattiert und die Zellzahl mittels Kristallviolett (Details siehe 2.2.5.6) ermittelt, verglichen und zu den späteren Daten ins Verhältnis gesetzt. Die Mäuse wurden nach 5 Wochen präpariert und deren Lunge entnommen. Aus einem kleinen Teil der Lunge wurde DNA extrahiert (Details siehe 2.2.1.2) und das Verhältnis von humanen zu murinen Zellen ermittelt, indem in einer PCR ein Fragment der α -Satelliten-Region des humanen Chromosoms 17 innerhalb der murinen DNA nachgewiesen wurde (Details siehe 2.2.1.10).

2.2.7 Immunochemische Methoden

2.2.7.1 Einbetten und Schneiden von Organen in Paraffin (Paraffinschnitte)

Die Organe wurden nach ihrer Entnahme je nach Größe für 4 – 24 h bei 4°C in 4% PFA fixiert. Danach wurden sie in 70% Ethanol überführt und bei -20°C gelagert oder direkt in einer Alkoholreihe dehydriert (1 h 70% Isoprop → 2 x 1 h 96% Isoprop → 3 x 30 min 100% Isoprop → 3 x 30 min Xylol). Anschließend wurden die Organe in Küvetten übertragen, in Paraffin überführt und bei 65°C inkubiert (1 h Paraffin I → 45 min Paraffin II → üN Paraffin III). Am nächsten Tag wurden sie in Histosetten (Histosette II; Fa. Simport; Beloeil, Kanada) in Paraffin eingebettet, worin sie üN bei RT aushärteten. Nach Entfernung der Histosetten-Deckel wurden von den Paraffinblöcken 4 µm dicke Transversalschnitte der Organe am Mikrotom (Fa. Leica, Solms) angefertigt, in einem 42°C Wasserbad geglättet und auf beschichtete Objektträger (Super Frost + ; Fa. Menzel) gezogen.

2.2.7.2 Gefrierschnitte (Kryodünnschnitte)

Nach der Präparation der Organe wurden diese zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Organe wurden dann mittels Einbettmedium (*tissue tek*; Fa. Sakura, Heppenheim) auf zuvor auf -25°C abgekühlten Gefrierblöcken fixiert und bei -25°C im Kryostat (Fa. Leica, Wetzlar) geschnitten. Die so entstandenen 10 µm dicken Gefrierschnitte wurden auf beschichtete Objektträger (Super Frost + ; Fa. Menzel) aufgezogen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.7.3 H/E-Färbung

Die Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung wird verwendet, um Gewebestrukturen sichtbar und unterscheidbar zu machen. Das basische Hämatoxylin bzw. sein Wirkstoff Hämalaun färbt saure Bereiche wie z.B. die DNA-haltigen Zellkerne lila. Der saure Farbstoff Eosin färbt hingegen alle basischen Moleküle v.a. die Proteine des Zytoplasmas rot.

Die Gewebeschnitte wurden zunächst durch Inkubation in Xylol entparaffiniert (2 x 5 min Xylol) und durch eine absteigende Alkoholreihe (5 min Ethanol abs. → 5 min 96% Ethanol → 5 min 80% Ethanol) hydriert. Die Zellkerne wurden nun für 30 sec – 3 min in Hämatoxylin angefärbt. Durch die anschließende Inkubation der Schnitte für 10 min in Leitungswasser wurde der pH-Wert angehoben, was zu einem Farbumschlag aller Hämatoxylin-gefärbten Regionen führt (Bläuung). In einem zweiten Färbeschritt wurde das Bindegewebe für 1 – 5 min mit Eosin rot angefärbt, die Gewebeschnitte erneut kurz in Leitungswasser geschwenkt und schließlich einer Dehydrierung (2 min 80% Ethanol → 2 min 96% Ethanol → 2 min Ethanol abs. → 2 min Xylol) unterzogen. Unter Zuhilfenahme von Entellan wurden die gefärbten Schnitte fixiert und unter einem Deckglas haltbar gemacht.

2.2.7.4 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie entspricht einer Antikörper-Anfärbung spezifischer Proteine im Gewebe, die es möglich macht, die Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle darzustellen.

Das Paraffin der zugrunde liegenden Mikrotom-Schnitte wurde für 15 min bei 53°C im Backofen angeschmolzen und in der folgenden absteigenden Alkoholreihe (2 x 10 min Rotihistol → 2 x 5 min Ethanol abs. → 5 min 75% Ethanol → 5 min 50% Ethanol) vollständig entfernt. Die Schnitte wurden dann für 10 min in PBT (1% Tween / PBS) gewaschen und 2 x 10 min in Tris-EDTA-Puffer aufgekocht, um das Gewebe aufzuschließen. Nach Abkühlen des Puffers wurde das Gewebe erneut 2 x 5 min in PBT gewaschen und für 15 – 30 min in 2% Serum / PBT in einer feuchten Kammer geblockt. Das Serum entspricht dabei dem Serum des Tieres, in dem der Sekundärantikörper hergestellt wurde. Anschließend wurden die Schnitte in einer Antikörper-Lösung, bestehend aus einer 1:100 Verdünnung des Primärantikörpers in 2% Serum / PBT, in einer feuchten Kammer üN bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Schnitte 2 x 5 min in PBT gewaschen, um nicht gebundene Reste des Antikörpers zu entfernen und infolge für 1 h mit dem Sekundärantikörper, welcher zuvor 1:100 in PBT verdünnt wurde, in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Schnitte, die mit einem Sekundärantikörper versetzt wurden, welcher lediglich biotinyliert war, wurden zusätzlich einer Behandlung mit den Lösungen des *ABC Vectastain Kits* (Fa. Vector Laboratories, Burlingame) nach Angaben des Herstellers unterzogen. Dabei wird ein Antikörper-Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex erzeugt, wodurch der Farbnachweis der Proteine wie auch bei den direkt HRP (*horse radish peroxidase*)-gekoppelten Antikörpern möglich wird. Das Gewebe wurde erneut 2 x 5 min mit PBT gewaschen, um die restlichen Antikörper zu entfernen und schließlich mit dem Substrat 20 x DAB (3,3-Diaminobenzidin) versetzt, das bei Kontakt mit einer *Peroxidase* oxidiert und in ein braunes Endprodukt umgesetzt wird. Dafür wurde eine Lösung bestehend aus 5% 20x DAB (10µg/µl) / 0,1% H₂O₂ / PBT frisch angesetzt, auf die Schnitte gegeben und je nach gewünschter Färbeintensität 1 – 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde in Leitungswasser abgebrochen. Die Zellkerne wurden durch Inkubation der Schnitte in Hämatoxylin angefärbt und durch kurze Lagerung in Leitungswasser von überflüssigem Farbstoff entfernt. Schließlich wurden die Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 min 50% Ethanol → 1 min 70% Ethanol. → 2 x 1 min Ethanol abs → 1 min Xylol) unterzogen, mittels *DPX Mountant for histology*-Lösung fixiert und einem Deckglas abgedichtet. Die Analyse der Färbung wurde mikroskopisch durchgeführt.

2.2.7.5 Immunfluoreszenz (IF) auf Gewebeschnitten

Die Gewebeschnitte wurden zunächst für 5 min mit 4% PFA auf den Objektträgern fixiert. Anschließend wurden die Schnitte für 2 x 10 min in PBS gewaschen, 5 min getrocknet und 5 min in 1% BSA / 0,5% TritonX-100 / PBS geblockt. Dann wurde das Gewebe üN bei 4°C in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper (1:50 in PBS) bzw. Primärantikörper-Gemisch inkubiert. Die Schnitte wurden 3 x 10 min in PBS gewaschen und 1 h mit dem Sekundärantikörper bzw. Sekundärantikörper-Gemisch (1:100 in 0,5% BSA / 0,1% TritonX-100 / PBS) inkubiert. Nach weiteren drei 10-minütigen Waschschrritten wurden die Objektträger mit 3 Tropfen DAPI (1mg/ml) /

DPX Mountant for histology-Lösung versehen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Auswertung wurde am Fluroeszenzmikroskop (Fa. Leica, Wetzlar) vorgenommen.

2.2.7.6 Immunfluoreszenz (IF) auf Zellen

Die Immunfluoreszenz wurde zunächst auf HEK293T-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen (gegebenenfalls 24 h nach einer Transfektion) auf *Lab-Tek Chamber Slides* (Fa. Thermo Scientific, Rochester, NY, USA) ausplattiert und üN bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Aufsätze der Objektträger entfernt und die Zellen durch eine 10-minütige Inkubation in 4% PFA auf dem Untergrund fixiert. Nach einem kurzen Waschschrift in PBS wurden die Zellen 10 min in 0,2% Triton X-100 / PBS inkubiert, erneut mit PBS gewaschen und für 1h in 2,5% Magermilchpulver / PBS geblockt. Danach wurden gegebenenfalls einzelne Bereiche der Objektträger mit Hilfe eines Fettstiftes („*PAPpen*“, Fa.Sigma Aldrich, Steinheim) markiert. Die Zellen wurden wieder mit PBS gewaschen und üN bei 4°C mit dem Primärantikörper (1:50 – 1:100) / PBS oder einem Gemisch verschiedener Primärantikörper inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, welchem nur die Seren in entsprechender Konzentration zugefügt wurden, die den Tieren entstammten, in denen die Antikörper hergestellt wurden. Nach zwei weiteren Waschschriften wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (1:50) / PBS bzw. Sekundärantikörpergemischs versetzt und 1h bei RT inkubiert. Schließlich wurde eine DAPI (1mg/ml) / *DPX Mountant for histology*-Lösung hergestellt, nach weiteren zwei Waschschriften auf den Zellen verteilt und mit Deckgläschen fixiert. Nach mindestens 1h konnte die Immunfluoreszenz am Fluroeszenzmikroskop (Fa. Leica, Wetzlar) bewertet und analysiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 VHL reguliert PTEN durch unterschiedliche Mechanismen

VHL und PTEN sind zwei Tumorsuppressoren, die auf zahlreiche Zellprozesse gleichermaßen Einfluss nehmen. So bewirkt ihr Verlust oder ihre Funktionsverminderung in diversen Geweben die Transformation der Zellen zu Tumorzellen und somit die Initiation verschiedener Krebserkrankungen. Für weitere Tumorsuppressoren konnte bereits gezeigt werden, dass sie gegenseitig in ihre Regulation eingreifen und damit ihre Funktionen in wildtypischen Zellen verstärken können. So induziert beispielsweise p53 die Transkription von *PTEN*, während PTEN wiederum das p53-Protein stabilisiert (Stambolic *et al.*, 2001; Freeman *et al.*, 2003). Im Folgenden wurde erstmals der direkte Einfluss der beiden Tumorsuppressoren VHL und PTEN aufeinander überprüft und die Mechanismen der Regulation näher untersucht.

3.1.1 Auswahl und Generierung der Zelllinien

Um eine möglichst umfassende Abschätzung über das Ausmaß einer möglichen Einflussnahme von VHL und PTEN aufeinander machen zu können, wurden im Folgenden Untersuchungen in embryonalen Zelllinien, Karzinom-Zelllinien und Primärzellen durchgeführt. Für die Analysen von embryonalen Zellen wurden v.a. die humanen Linien HEK293 (*human embryonic kidney*) und HEK293T verwendet. Diese epithelialen Zellen wurden aus fötalen Nieren isoliert und in der Zellkultur mit der gescherten DNA des Adenovirus 5 transformiert (Graham *et al.*, 1977). Die Transformation bewirkt eine Immortalisierung, d.h. die Zellen zeigen morphologische Veränderungen, es kommt zum Verlust der Kontakt-Inhibierung und zur Aufhebung der wildtypisch begrenzten Anzahl möglicher Zellteilungen. Die HEK293T-Linie entstand durch eine zusätzliche Transformation mit dem *large T*-Gen des SV40-Viruses (Damania *et al.*, 1998). Des Weiteren wurde mit der murinen, embryonalen Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 gearbeitet, welche einer NIH-Swiss Embryo-Kultur entstammt, die durch das SV-Virus transformiert wurde (Jainchill *et al.*, 1969). Da im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Tumorinduktion der im VHL-Syndrom auftretenden klarzelligen Nierenkarzinome untersucht werden sollte, wurden v.a. die Nierenkarzinom-Zelllinien 786-O, KTCTL-26A, A498 und CAKI 1 verwendet. Die epitheliale Zelllinie 786-O entstammt einem primären Adenokarzinom der Niere. Die Zellen besitzen einen hypertriploiden Karyotyp (Williams *et al.*, 1976). Zusätzlich weisen sie eine Mutation im *VHL*-Gen auf, die dessen vollständigen Expressionsverlust bewirkt (Iliopoulos *et al.*, 1995). Die Zelllinie KTCTL-26A wurde von einem klarzelligen Nierenkarzinom abgeleitet. Der diploide Karyotyp der Zellen weist Aberrationen der Struktur und Anzahl der Chromosomen 2, 3, 5, 7, 9, 13, 16, 21, 22 und Y auf. Aufgrund des Verlustes des Chromosomenarms 3p zeigen auch KTCTL-26A keine VHL-Expression (Högemann *et al.*, 1994). Die epithelialen A498-Zellen entstammen ursprünglich den proximalen Tubuluszellen des klarzelligen Nierenkarzinoms. Der Karyotyp der Zellen ist diploid bis hypertriploid. Das *VHL*-Gen weist in A498-Zellen eine 4 bp große Deletion auf, die zum vollständigen *VHL*-Verlust führt (Chen *et al.*, 1995). Die Zelllinie CAKI 1 stammt ebenfalls aus den epithelialen, proximalen Tubuluszellen eines klarzelligen Nierenkarzinoms. Die Zellen besitzen einen hypopentaploiden bis hypohexaploiden Chromosomensatz. Im Gegensatz zu den voran beschriebenen Linien zeigen CAKI 1 eine erhaltene VHL-Expression (Maxwell *et al.*, 1999; Turcotte

et al., 2003). Um die Linien aus klarzelligen Nierentumoren besser charakterisieren zu können, wurde die Expression von VHL nochmals über *Western Blot*-Analysen (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9) überprüft. Auch die Proteinkonzentration von HIF1 und 2, PTEN und NEDD4-1 wurde semiquantitativ untersucht. Die Ergebnisse sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Charakterisierung der verwendeten Nierenkarzinom-Zelllinien. In den humanen Zelllinien 786-O, KTCTL-26A, CAKI 1 und A498 wurde die Expressionstärke von VHL, HIF1a, HIF2a, PTEN und NEDD4-1 in den Zellen über *Western Blot*-Analysen ermittelt. – : keine Expression, + : deutliche Expression, (+): schwache Expression, ++: starke Expression.

	VHL	HIF1a	HIF2a	PTEN	NEDD4-1
786-O	–	++	++	–	(+)
KTCTL-26A	–	++	++	++	+
CAKI 1	+	+	+	–	+
A498	–	++	++	++	+

Neben den Karzinom-Zelllinien der Niere wurden in Einzelfällen zusätzlich auch von anderen Karzinomen abgeleitete Zelllinien analysiert. So wurde die epitheliale Brustkrebs-Zelllinie T47D, die einem humanen, infiltrierenden *Carcinoma ductale in situ* (CDIS) entstammt, verwendet (Keydar *et al.*, 1979). Außerdem wurde die Zelllinie PC12 untersucht, die aus Zellen des Phäochromozytoms (PCCs) einer Ratte generiert wurde. PC12-Zellen bilden die Neurotransmitter Dopamin und Noradrenalin und verzweigen sich ähnlich wie sympathische Neurone. Sie sind daher besonders als Modellsystem für neurobiologische Untersuchungen geeignet (Greene *et al.*, 1976). Neben den bereits aufgelisteten Zelllinien wurden auch Primärzellkulturen analysiert (Reutzel, 2003). Diese sogenannten ST-Zellen stammten aus humanen Nierentumoren, welche nach operativer Entfernung von der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt wurden.

Um den Einfluss von VHL, PTEN und NEDD4-1 auf embryonale Zellen zu untersuchen, wurde in HEK293 bzw. HEK293T durch transiente Transfektion eine Überexpression dieser Gene erzeugt. Dafür wurden zunächst Expressionsplasmide hergestellt, denen die Vektoren pCDNA3.1- und pBABE puro zugrunde lagen (Details siehe 2.1.6). In pCDNA3.1- wurden die DNA-Fragmente des wildtypischen *VHL*-Gens, die V2B-Mutanten R167Q und G195X, die V2C-Mutanten R64P, V84L und L118V oder die 2. Isoform von *VHL*, ohne Exon 2, eingefügt. Die verwendeten *VHL*-Konstrukte wurden N-terminal mit einem FLAG-Tag versehen (FVHL). *PTEN* wurde ausschließlich unverändert verwendet und C-terminal mit einem V5-Tag ausgestattet (PTENV5). *NEDD4-1*-Konstrukte wurden generiert, indem *NEDD4-1* wildtypisch als auch mit der Punktmutation C894S im katalytischen Zentrum der *HECT*-Domäne in den Vektor inseriert wurde. Zusätzlich wurden auch einzelne Domänen von *NEDD4-1* in pCDNA3.1- inseriert. Dafür wurden die C2-Domäne (C2), der WW-Sequenzbereich (WW) und *NEDD4-1* mit einer deletierten *HECT*-Domäne (dHECT) ausgewählt. Außerdem wurde ein C2dK-Konstrukt verwendet, welches aus der C2-Domäne besteht, deren 9 Ubiquitylierungsstellen mutiert wurden (Rost *et al.*, 2008). Alle *NEDD4-1*-Konstrukte besaßen am N-Terminus ein FLAG-Tag (FNEDD4-1; Abb. 3.1). Die Plasmide wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation transient in HEK293 bzw. HEK293T transfiziert (Details siehe 2.2.5.3). Um die Auswirkung einer Restitution bzw. Überexpression von *VHL*, *PTEN* und *NEDD4-1* in NIH-3T3 und

den Karzinom-Zelllinien untersuchen zu können, wurden die Zellen retroviral transduziert. Neben den bereits beschriebenen DNA-Fragmenten FVHL und PTENV5 wurde hierfür ein NEDD4-1HA-Konstrukt hergestellt, das aus dem vollständigen *NEDD4-1*-Gen besteht, welches C-terminal mit einem HA-Tag versehen wurde (NEDD4-1HA; Abb. 3.1). Diese Konstrukte wurden in den Vektor pBABE puro kloniert. Anschließend wurden die Konstrukte mittels retroviraler Transduktion in die Zielzellen integriert (Details siehe 2.2.5.5).

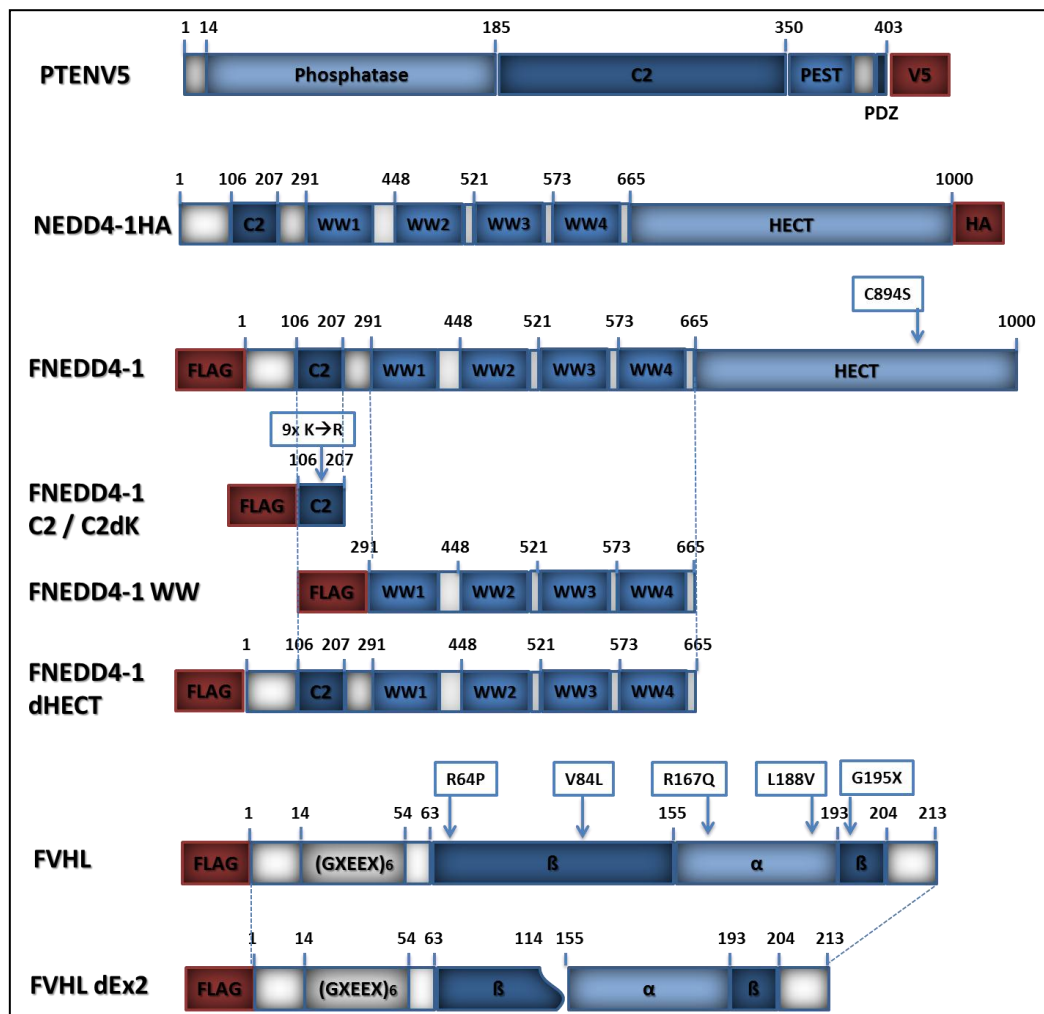


Abb. 3.1 Expressionskonstrukte. Schematische Darstellung der Gen-Fragmente, die in die Vektoren pCDNA3.1- bzw. pBABE puro inseriert, im Anschluss transfiziert bzw. transduziert und schließlich in den Zielzellen überexprimiert wurden. Alle Konstrukte wurden mit einem Tag (rot) versehen, um deren Expression in späteren Untersuchungen von der Expression der endogenen DNA zu unterscheiden. PTEN wurde lediglich unverändert verwendet, während für VHL und NEDD4-1 auch Konstrukte hergestellt wurden, die eine Punktmutation oder deletierte Bereiche enthielten.

3.1.2 VHL reguliert die intrazelluläre Proteinkonzentration von PTEN

3.1.2.1 VHL reguliert PTEN in embryonalen Zelllinien

Um den Einfluss der Tumorsuppressoren VHL und PTEN auf embryonale, wenig differenzierte Zellen zu erforschen, wurde eine Überexpression beider Gene in HEK293T-Zellen induziert. Um mögliche Interaktionen analysieren zu können, wurde in einem weiteren Ansatz die Expression von NEDD4-1, das als E3-Ligase von PTEN dessen proteasomalen Abbau bewirkt (Wang *et al.*, 2007),

betrachtet. Nach der Calciumphosphat-vermittelten Transfektion der HEK293T (Details siehe 2.2.5.3) wurden Proteinextrakte aus den Zellen hergestellt (Details siehe 2.2.4.1), welche anschließend im *Western Blot* (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9) untersucht wurden. Während VHL und NEDD4-1 aufgrund unspezifischer Antikörper-Bindung nur in den Proben mit induzierter Überexpression nachweisbar waren, war sowohl das endogene als auch das exogene PTEN bereits nach kurzer Detektionszeit sichtbar. Dabei zeigte sich, dass die Proteinmenge des endogenen PTEN in schwach VHL-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht vorlag. Dies deutet darauf hin, dass VHL in den embryonalen HEK293T-Zellen eine Rolle bei der Regulation von PTEN spielt. Wider Erwarten bewirkte die Überexpression von NEDD4-1 keine Verminderung der Proteinkonzentration von PTEN in den Zellen. PTEN zeigte ebenfalls keinen detektierbaren Einfluss auf VHL. PTEN konnte sowohl bei 54 kDa als auch bei ca. 56 kDa sichtbar gemacht werden. Die untere Bande stellt das endogene PTEN dar, die obere Bande zeigt das Transgen, welches ein erhöhtes Molekulargewicht aufgrund des His-Tags aufweist (Abb. 3.2).

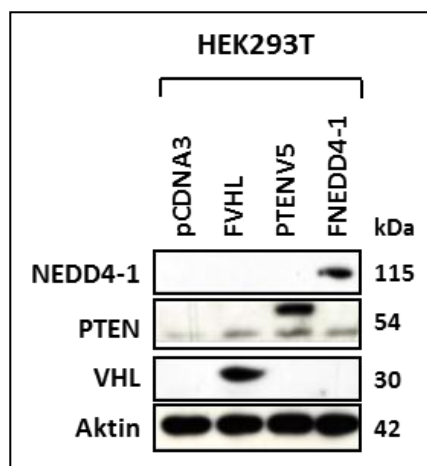


Abb. 3.2 VHL reguliert PTEN in HEK293T herauf. VHL, PTEN oder NEDD4-1 wurden in der embryonalen Nierenzelllinie HEK293T überexprimiert und deren Einfluss auf die Proteinmenge im *Western Blot* analysiert. Dabei wurde deutlich, dass PTEN durch VHL positiv reguliert wird.

Im Folgenden wurde überprüft, ob die erhöhte Konzentration von PTEN-Molekülen in VHL-überexprimierenden Zellen auch zu einer funktionellen Aktivierung von PTEN führt und somit VHL indirekt Einfluss auf die von PTEN regulierten Signalwege nimmt. Dafür wurden sowohl HEK293 als auch HEK293T mit FVHL, der VHL Typ 2 V2B Mutante R167Q, der V2C Mutation L188V, der VHL Typ 1 Mutation dEx2 und zur Kontrolle mit dem PTENV5 transfiziert (Details siehe 2.2.5.3). Anschließend wurden die Auswirkungen der Expression der VHL-Varianten auf den PI3K-Signalweg im *Western Blot* analysiert (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Der PI3K-Weg kontrolliert u.a. die Proliferation und Apoptose-Mechanismen der Zelle und wird von PTEN inhibiert. Um den Aktivierungszustand des PI3K-Signalweges einschätzen zu können, wurde das Verhältnis der aktiven (phosphorylierten) und inaktiven Form von AKT und die Expression von p27 untersucht. AKT ist ein Schlüsselmolekül des PI3K-Weges, dessen aktive Form alle folgenden Faktoren kontrolliert (Luo *et al.*, 2003). p27 reguliert den Zellzyklus und wird durch AKT inhibiert (Liang *et al.*, 2002). In den *Western Blot*-Analysen wurde deutlich, dass die Überexpression aller VHL-Varianten sowohl in HEK293 als auch in HEK293T zu einer verstärkten Phosphorylierung und somit Aktivierung von

AKT führten. Die einzige Ausnahme bildeten die HEK293T, welche mit FVHL L188V transfiziert wurden, deren P-AKT-Gehalt annähernd dem der Kontrollzellen entsprach, die jedoch auch eine verminderte Aktin-Konzentration aufwiesen. Die Expression von p27 war in allen Zellen ähnlich, es wurde sowohl das wildtypische als auch das phosphorylierte p27 detektiert. Lediglich die Zellen, die mit dem FVHL L188V-Konstrukt transfiziert wurden, zeigten eine verminderte p27-Expression. Dies war interessanterweise sowohl für HEK293 als auch für HEK293T nachweisbar. Diese V2C-Mutante scheint also einen verstärkten Einfluss auf den PI3K-Signalweg zu nehmen. Diese Untersuchungen zeigen, dass VHL in embryonalen Zelllinien einen Effekt auf den PI3K-Weg ausübt, welcher zwar nicht der vermuteten PTEN-vermittelten Wirkung entspricht, der jedoch möglicherweise durch die Aktivierung von PTEN beeinflusst wird (Abb. 3.3).

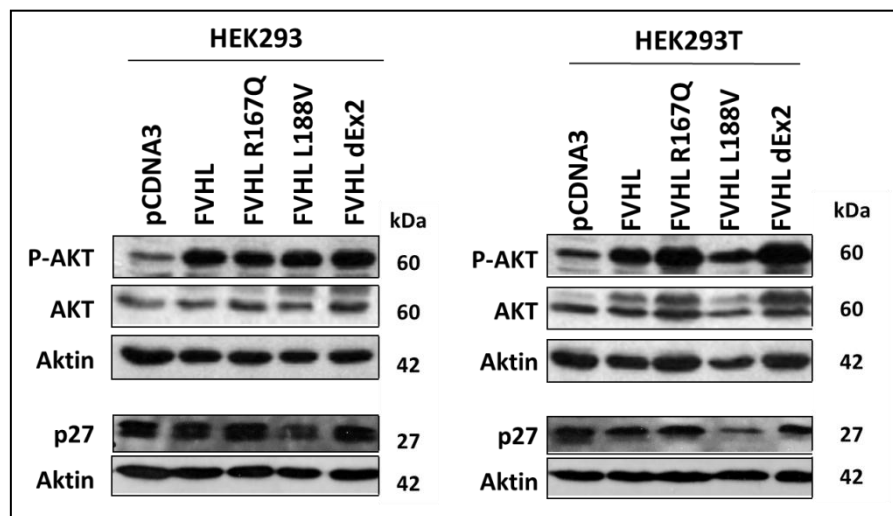


Abb. 3.3 Einfluss von VHL auf den PI3K-Signalweg. Der Effekt des wildtypischen VHL (FVHL), einer V2B-Mutante (FVHL R167Q), einer V2C-Mutante (FVHL L188V) und einer VHL Typ 1-Variante (FVHL dEx2) auf die Aktivierung von AKT und die Expression von p27 wurde in embryonalen Zelllinien mittels *Western Blot* untersucht. VHL bewirkt die Bildung von P-AKT, beeinflusst die p27-Konzentration aber nicht. Die Doppelbande zeigt sowohl Phospho-p27 als auch p27. Nur FVHL L188V vermindert die Expression von p27, nimmt aber keinen Einfluss auf den P-AKT-Gehalt in HEK293T. Diese Wirkung von VHL wird möglicherweise durch PTEN beeinflusst.

3.1.2.2 VHL reguliert PTEN in Tumorzellen

Keimbahnmutationen von *VHL* führen zum VHL-Syndrom, das durch die Prädisposition zu Hämangioblastomen, klarzelligem Nierenkrebs und Phäochromozytomen charakterisiert ist. Nachdem bereits in embryonalen Nieren-Zelllinien gezeigt werden konnte, dass eine VHL-Überexpression PTEN positiv reguliert (Details siehe 3.1.2.1), wurde nun überprüft, ob die Restitution von VHL in VHL-defizienten RCC-Zelllinien ebenfalls Einfluss auf die PTEN-Regulation nimmt. Dafür wurden die Nierenkarzinom-Zelllinien 786-O und KTCTL-26A mit VHL-, PTEN- und für KTCTL-26A zusätzlich mit NEDD4-1-Konstrukten transduziert (Details siehe 2.2.5.5) und im *Western Blot* analysiert (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Die zytoplasmatische und nukleäre Fraktion der 786-O-Zellen wurde getrennt präpariert (Details siehe 2.2.4.2) und im *Western Blot* verglichen. In den VHL-defizienten 786-O konnte VHL lediglich in der zytoplasmatischen Fraktion der VHL-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Restitution von VHL bewirkte hier verglichen mit den Kontrollzellen, in die nur der Leervektor pBABE puro integriert wurde, einen deutlichen

Anstieg der PTEN-Konzentration. Eine mögliche VHL-induzierte lokale Umverteilung von PTEN aus dem Zytoplasma in den Nukleus war nicht zu beobachten. VHL verursacht demnach keine subzelluläre Verteilung von PTEN. Auch in KTCTL-26A induzierte die Restitution von VHL eine eindeutige Erhöhung der Proteinmenge von PTEN. Außerdem konnte dem *Western Blot* auch entnommen werden, dass in KTCTL-26A die Überexpression von PTEN die verminderte Expression des endogenen PTENs zur Folge hat und dass die Überexpression von NEDD4-1 keinen entscheidenden Einfluss auf die Degradation von PTEN nimmt (Abb. 3.4). Das klarzellige Nierenkarzinom entsteht aus dem proximalen Tubulusepithel der Niere (Neumann und Zbar, 1997). Zwar können Tumorzellen wieder embryonale Eigenschaften annehmen, da hier jedoch die Induktion von PTEN durch VHL in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden konnte, kann vermutet werden, dass die VHL-vermittelte Induktion bzw. Stabilisierung von PTEN ein universeller Regulationsmechanismus sein könnte.

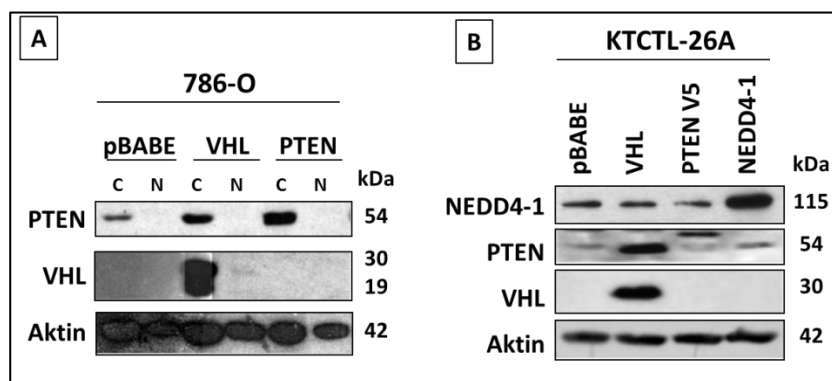


Abb. 3.4 Nachweis der VHL-vermittelten Erhöhung der PTEN-Konzentration in Nierenkarzinom-Zelllinien. 786-O- und KTCTL-26A-Zellen wurden mit VHL-, PTEN und im Falle von KTCTL-26A zusätzlich mit NEDD4-1-Konstrukten transduziert und die Überexpression dieser Gene im *Western Blot* untersucht. Die Restitution von VHL bewirkte in beiden Zelllinien einen Anstieg der Proteinmenge von PTEN und bestätigt den Nachweis der VHL-vermittelten PTEN-Regulation in embryonalen Zelllinien. C: zytoplasmatisch, N: nukleär

3.1.2.3 VHL reguliert die Proteinmenge von PTEN in primären Nierenkarzinomen

Um auszuschließen, dass es sich bei der VHL-vermittelten Regulation von PTEN um einen Effekt handelt, der nur in der Zellkultur auftritt, wurden weiterhin Protein-Extrakte aus Geweben analysiert. Dafür wurden 18 klarzellige Nierenkarzinome und benachbartes, gesundes Gewebe ausgewählt. Die Primärgewebe wurden von der Urologischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung des VHL-Verlustes wurde *VHL* stichprobenartig in sieben Tumorgeweben (2605 T, 2633 T, 2867 T, 2887 T, 2888 T, 2909 T, 2912 T) sequenziert (Details siehe 2.2.1.12). Zusätzliche Nierenkarzinome konnten leider nicht untersucht werden, da nicht ausreichend Material zur Verfügung stand. Tatsächlich konnten in vier Tumoren heterozygote Mutationen im Exon 1 gefunden werden, welche mittels des Computerprogrammes *Alamut* ausgewertet wurden. Die 2605 T-Probe wies die Mutationen 332G→T und 333C→A auf, welche zum Aminosäureaustausch S111I führen. Diese Mutation ist bereits beschrieben und wird mit Pankreaskarzinomen assoziiert (Bradley *et al.*, 2000). Die drei folgenden Mutationen sind ebenfalls bereits bekannt und werden im Programm *HGMD* dem VHL-Syndrom zugeordnet. 2867 T trägt eine 240T→A Mutation, die zum Aminosäureaustausch S80R führt. 2887 T enthält die Deletion 217delC, welche bewirkt, dass ein vorzeitiges Stopcodon (STOP AA 158) entsteht und die Translation von VHL frühzeitig abgebrochen

wird. Das Tumorgewebe 2912 T wies die Mutation $256C \rightarrow T$ auf, die zum Aminosäureaustausch P86S führt (Abb. 3.5). Die drei anderen Tumorgewebe zeigten keine Veränderungen der *VHL*-Sequenz. Möglicherweise ist der im Vorfeld diagnostizierte *VHL*-Defekt auf größere Deletionen oder eine epigenetische Herabregulation der Expression zurückzuführen. So konnten bereits in vielen klarzelligen Nierenkarzinomen Deletionen und Methylierungen des *VHL*-Promotors nachgewiesen werden (Patard *et al.*, 2009).

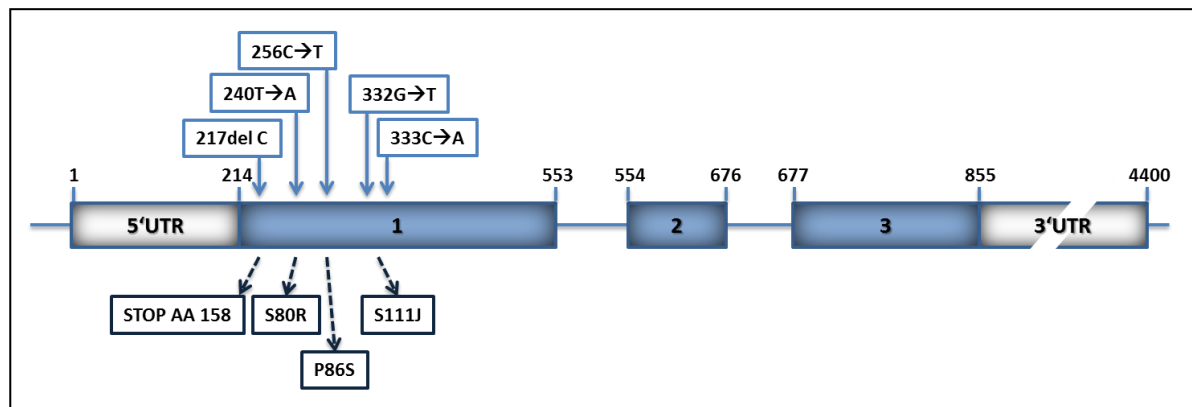


Abb. 3.5 Mutationsanalyse des *VHL*-Gens in humanen Nierenkarzinomen. In vier von sieben Tumoren konnten durch Sequenzierungen des *VHL*-Gens Mutationen im Exon 1 belegt werden. Das Schema zeigt diese Mutationen und die damit assoziierten Aminosäureaustausche.

Anschließend wurden aus allen Primärgeweben Protein-Extrakte (Details siehe 2.2.4.3) hergestellt und die PTEN-Expression im *Western Blot* analysiert (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Die PTEN-Konzentration der Tumorgewebe war verglichen mit den dazugehörigen Normalgeweben sehr inhomogen. So wiesen 8 von 18 Tumore keine veränderte PTEN-Expression (44,4%), 3 Tumore eine erhöhte Proteinmenge von PTEN (16,7%) und 7 Tumore eine verminderte PTEN-Konzentration (38,9%) verglichen mit dem Normalgewebe auf (Abb. 3.6). Die unterschiedlichen Ergebnisse können viele Gründe haben. So ist als erstes zu berücksichtigen, dass sich Organismen nie vollständig gleichen, was sich auch auf die Expression in bestimmten Geweben auswirken kann. Außerdem lässt sich nicht mit Gewissheit sagen, inwieweit auch die Zellen der Normalgewebe schon tumorös verändert waren und somit ähnliche Expressionsmuster wie die angrenzenden Tumore zeigten. Des Weiteren können sich die untersuchten Tumore in unterschiedlichen Stadien ihrer Entwicklung befunden haben, in denen wildtypische Regulationsmechanismen noch erhalten oder schon überwunden sein können. Schließlich konnte leider nicht in jedem Fall nachgeprüft werden, in welchem Umfang die *VHL*-Expression eingeschränkt war und ob das gegebenenfalls mutierte Protein trotzdem funktionell aktiv blieb. Für die bereits beschriebenen Tumorgewebe 2867 T, 2887 T und 2888 T konnte eine unveränderte PTEN-Expression ermittelt werden. Scheinbar spielte die Herabregulation von PTEN hier keine Rolle in der Entstehung des klarzelligen Nierenkarzinoms. 2605 T wies eine erhöhte PTEN-Konzentration auf. Neben 2912 T, welches eine nachgewiesene *Missense*-Mutation im *VHL*-Gen enthält, konnten auch für die sequenzierten Tumore von 2633 T und 2909 T, die ein unverändertes, endogenes *VHL* tragen, eine deutliche Herabregulation von PTEN verglichen mit dem Normalgewebe ermittelt werden. Insgesamt zeigten fast 40% der Tumore eine Verminderung des PTEN-Gehalts. Möglicherweise könnte dies auf den Verlust eines funktionellen *VHL*,

hervorgerufen durch Mutationen des Gens oder eine Fehlregulation der Expression bzw. Stabilität, zurückzuführen sein. In früheren Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von VHL zu einer erhöhten Proteinmenge von PTEN in embryonalen Zellen und Nierenkarzinom-Zelllinien führt (Details siehe 3.1.2). Somit könnte die Defizienz von VHL in den klarzelligen Nierenkarzinomen bewirken, dass PTEN nicht mehr ausreichend exprimiert bzw. stabilisiert wird, was den verminderten PTEN-Gehalt der Tumorzellen begründen würde.

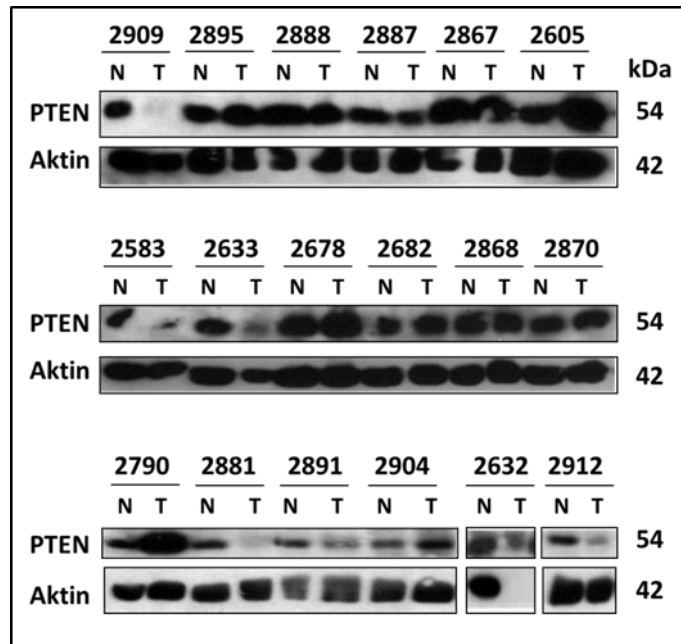


Abb. 3.6 PTEN-Expression in VHL-defizienten klarzelligen Nierenkarzinomen. Der Proteingehalt von PTEN wurde in 18 Tumorgeweben (T) und den entsprechend zugehörigen Normalgeweben (N) ermittelt und verglichen. 8 Tumore zeigten keine Unterschiede der PTEN-Expression verglichen mit den Normalgeweben und 3 Tumore wiesen eine Hochregulation von PTEN auf. Bei weiteren 7 Tumoren war hingegen eine Herabregulation von PTEN erkennbar, was möglicherweise durch den Verlust von VHL begründet werden kann.

In embryonalen Zellen konnte gezeigt werden, dass VHL einen positiven Einfluss auf den PTEN-Gehalt der Zellen nimmt und des Weiteren auch den durch PTEN inhibierten PI3K-Signalweg beeinflusst. Auch in Nierenkarzinom-Zelllinien war eine VHL-vermittelte PTEN-Überexpression bzw.-Stabilisierung nachweisbar. Schließlich konnte in fast 40% der untersuchten Primärgewebe aus klarzelligen Nierenkarzinomen mit möglichem VHL-Verlust eine Reduktion von PTEN gezeigt werden. Diese Ergebnisse aus unterschiedlichen Zellsystemen legen nahe, dass der positive Effekt von VHL auf PTEN einem generellen Prinzip folgt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daraufhin untersucht, durch welchen Mechanismus VHL PTEN reguliert.

3.1.3 Transkriptionelle Regulation der *PTEN*-Expression durch HIF

Neben der Organisation des Zytoskeletts und der Extrazellulärmatrix spielt VHL eine entscheidende Rolle in der Regulation der HIF-Transkriptionsfaktoren. So bewirkt VHL als E3-Ligase der HIF α -Untereinheiten deren proteasomalen Abbau. Dieser Effekt wird gleichermaßen durch den Verlust eines funktionellen VHL-Proteins wie auch durch die Einwirkung von Hypoxie (0,1% Sauerstoff)

verhindert. HIF1 und HIF2 regulieren über 200 Gene und beeinflussen damit maßgeblich die Eigenschaften der Zelle (Kaelin, 2008). In vorangegangenen Analysen wurde nachgewiesen, dass VHL in verschiedenen Zellsystemen Einfluss auf den Proteingehalt von PTEN nimmt (Details siehe 3.1.2). Im weiteren Verlauf wurde nun untersucht, ob diese Regulation indirekt über die VHL-vermittelte Inhibierung von HIF erfolgt. Dafür wurde zunächst der Einfluss von HIF auf die RNA-Konzentration von *PTEN* ermittelt (Details siehe 2.2.1.11), eine Analyse des *PTEN*-Promotors vorgenommen (Details siehe 2.2.1.13) und schließlich die Relevanz der vorliegenden Regulation auf Protein-Ebene untersucht (Details siehe 2.2.4).

3.1.3.1 HIF reguliert PTEN in primären Tumorzellen

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob HIF einen Einfluss auf die *PTEN*-Expression ausübt, wurde zunächst die *PTEN*-Expression in VHL-defizienten Tumorgeweben verglichen zu den korrespondierenden Normalgeweben untersucht. Dafür wurde RNA aus den Geweben extrahiert (Details siehe 2.2.3.2), in cDNA umgeschrieben (Details siehe 2.2.3.4-2.2.3.6) und mittels qPCR (Details siehe 2.2.1.11) analysiert. Um zu überprüfen, ob die VHL-Defizienz in klarzelligen Nierenkarzinomen (Gnarra *et al.*, 1994) tatsächlich zur Aktivierung von Signalwegen, die durch VHL gehemmt werden, führt, wurde zunächst die Transkription des HIF-Zielgens *VEGF* untersucht. Für alle acht analysierten Tumorgewebe wurde eine deutliche Erhöhung der *VEGF*-Expression gezeigt. Obwohl diese Heraufregulation der mRNA-Menge zwischen dem 4,4-fachen bis zum 31-fachen im Vergleich zum gesunden Nierengewebe variierte (Abb. 3.7A), demonstriert das Ergebnis doch eine relativ ähnliche Ausgangssituation innerhalb der Tumore für weitere Analysen. Anschließend wurde für diese acht Tumor- und Normalgewebe die Expression von *PTEN* näher untersucht. Auch die Transkription von *PTEN* war in allen Tumoren erhöht. Diese Heraufregulation war jedoch mit der 1,1-fachen bis zur 4,3-fachen Transkriptmenge gegenüber den gesunden Nierengeweben nicht mit dem Ausmaß der veränderten *VEGF*-Regulation zu vergleichen. So war im Einzelnen auch das Verhältnis der Erhöhung der *VEGF*- zur *PTEN*-Expression für die Tumorgewebe nicht korreliert (Abb. 3.7B). Da die ermittelten *PTEN*-mRNA-Konzentrationen bereits mit der *GAPDH*-Menge normalisiert wurden, ist die erhöhte Expression in Tumorgeweben verglichen mit den Normalgeweben nicht auf ein generell in Tumoren erhöhtes Expressionsniveau zurückzuführen. Dies deutet darauf hin, dass gegebenenfalls ein durch VHL inhibierter Mechanismus wie die Aktivierung der HIF-Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die mRNA-Konzentration von *PTEN* nimmt.

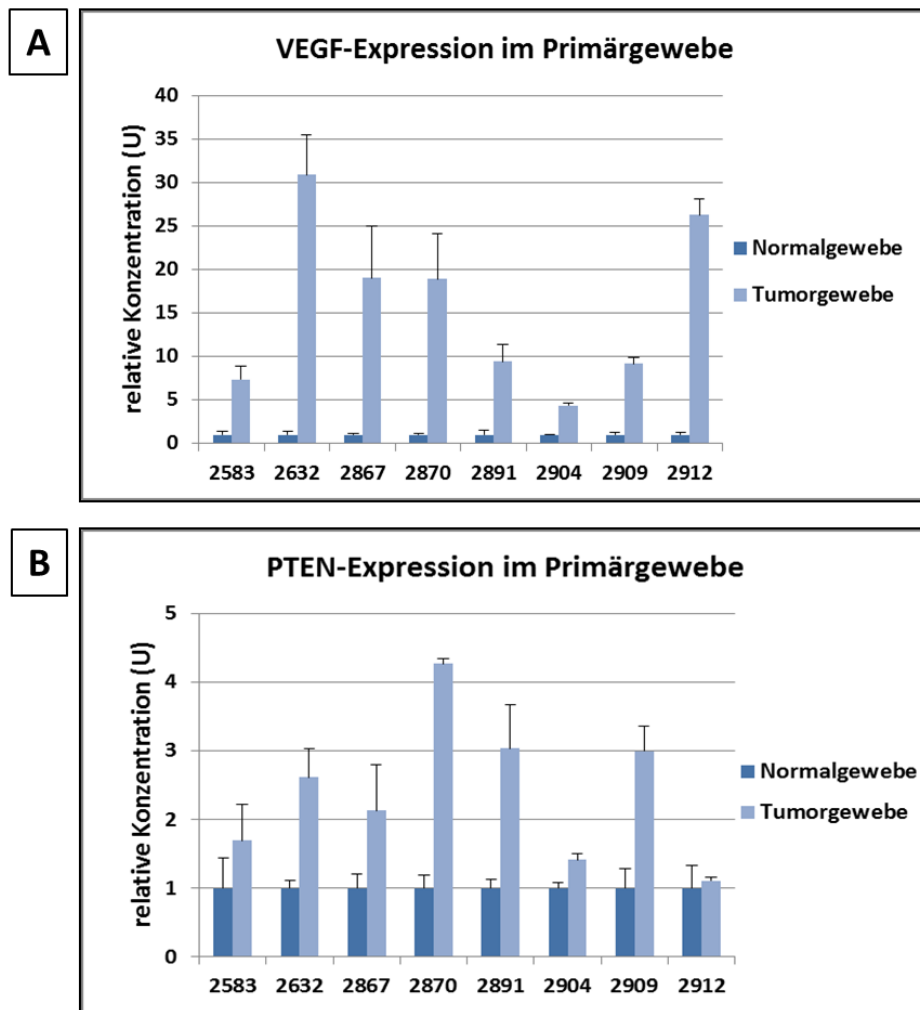


Abb. 3.7 Expressionsstudien von *VEGF* und *PTEN* in primären Tumorgeweben. Mittels qPCR wurden die mRNA-Konzentrationen von *VEGF* (A) und *PTEN* (B) in VHL-defizienten Tumorgeweben und dem korrespondierenden Normalgewebe ermittelt. Sowohl die mRNA-Menge von *VEGF* als auch von *PTEN* war in allen Tumoren deutlich, jedoch nicht gleichermaßen erhöht. Möglicherweise wird die Expression beider Gene durch die HIF-Aktivierung in den VHL-negativen Tumoren induziert. Die Werte der unbehandelten Zellen wurden stets auf 1 normiert und die Expression der Cobaltchlorid-behandelten Zellen darauf bezogen.

3.1.3.2 Promotor-Analyse von *PTEN*

Um weiter einzugrenzen, ob die HIF-Transkriptionsfaktoren an den *PTEN*-Promotor binden und daraufhin die Transkription des Gens aktivieren oder inhibieren, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt (Details siehe 2.2.1.13). Dafür wurde der Promotorbereich des humanen *PTEN*-Gens zunächst auf *HIF response elements* (HRE) untersucht, deren Sequenz 5'-CGTG-3' dem Bindemotiv von HIF entspricht. Anschließend wurde ein ca. 2000 bp großes Promotorfragment für eine nähere Analyse ausgewählt, welches im Bereich -2526 bis -427 *upstream* des Startcodons von *PTEN* zu finden ist und ein HRE enthält, das in unmittelbarer Nähe einer Enhancer-Box (5'-CANNTG-3') liegt. Das Promotorfragment wurde daraufhin vervielfältigt (Details siehe 2.2.1.10), direkt vor das Luciferase-Gen in den Vektor pGL2 *basic* eingefügt (Details siehe 2.2.2; Abb. 3.8A) und mittels Lipofectamin in NIH-3T3 transfiziert (Details siehe 2.2.5.4). Die Hälfte der transfizierten Zellen wurde 48h unter Normoxie kultiviert, die andere Hälfte wurde zunächst 24h unter Standardbedingungen und dann 24h bei 0,1% Sauerstoff gehalten. Schließlich wurde die *Luciferase*-

Aktivität gemessen (Details siehe 2.2.1.13). Die Analyse der Daten wies unter Hypoxie eine ca. 50%ige Verminderung der Luciferase-Aktivität auf (Abb. 3.8B) und weist somit im Gegensatz zu den qPCR-Untersuchungen der *PTEN*-Expression in Tumorgeweben auf eine HIF-vermittelte Inhibierung von *PTEN* hin. Möglicherweise ist dieses konträre Ergebnis des *Luciferase-Assays* darauf zurückzuführen, dass der *PTEN*-Promotor nicht in seiner genomischen Umgebung analysiert wurde. Es zeigt jedoch mit hoher Sicherheit, dass Hypoxie-induzierte Signalmoleküle die Expression von *PTEN* inhibieren können. Da die HIF-Transkriptionsfaktoren Schlüsselmoleküle in der Vermittlung der hypoxischen Signalwege darstellen, lässt sich vermuten, dass HIF die HRE-Sequenz des *PTEN*-Promotors binden kann und in der Lage ist die Expression von *PTEN* negativ zu regulieren. Der krankheitsassoziierte VHL-Verlust simuliert eine hypoxische Umgebung, indem HIF stabilisiert und aktiviert wird (Lando *et al.*, 2002), welches dann die *PTEN*-Expression herabregulieren und so den Krankheitsverlauf verschlechtern könnte.

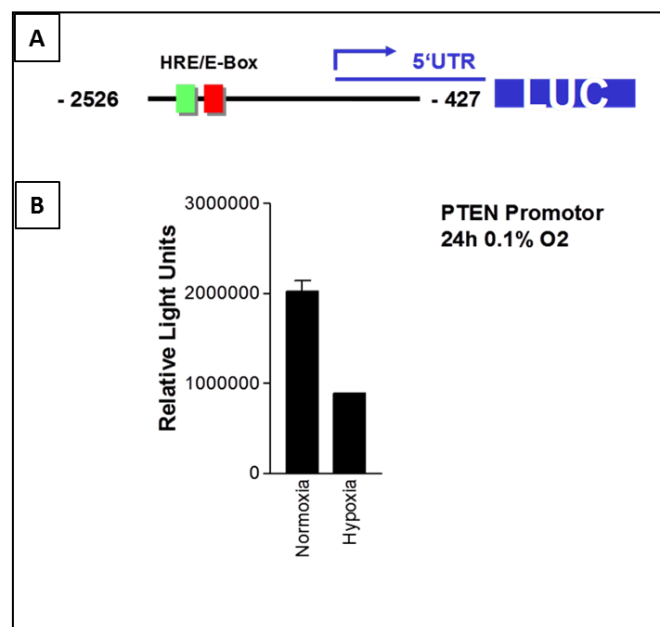


Abb. 3.8 Promotor-Analyse von *PTEN* im Luciferase-Assay. **A** Das HRE-enthaltende Promotorfragment -2526 bis -427 *upstream* des *PTEN*-Gens wurde in pGL2 unmittelbar vor das *Luciferase*-Gen (*LUC*) kloniert und in NIH-3T3 transfiziert. Die Zellen wurden bei Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert und anschließend im Luciferase-Assay analysiert. **B** Die Darstellung der Luciferase-Aktivität zeigt, dass in NIH-3T3 unter Hypoxie das dem *PTEN*-Promotor-nachgeschaltete Gen nur halb so oft transkribiert wird wie unter Normoxie. Demnach bindet vermutlich HIF die HRE-Sequenz des *PTEN*-Promotors und inhibiert die Expression von *PTEN*.

3.1.3.3 HIF reguliert *PTEN* in embryonalen Zelllinien und Tumorzelllinien

Die Promotor-Analyse wies zwar eine eindeutige Hypoxie-vermittelte Inhibierung der Transkription von *PTEN* auf, dennoch wurde dabei der Promotor nicht in seiner genomischen Umgebung analysiert, so dass mögliche weitere Regulationsmechanismen der *PTEN*-Transkription nicht berücksichtigt werden konnten. Um also zu prüfen, ob Hypoxie-induzierte Signalmoleküle wie HIF tatsächlich einen relevanten Einfluss auf *PTEN* nehmen, wurde im Folgenden die Proteinkonzentration von *PTEN* in unterschiedlichen Zellsystemen untersucht. Embryonale Zellen und Zellen verschiedener Karzinom-Zelllinien wurden für 48h unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert und die *PTEN*-Expression anschließend im *Western Blot* analysiert (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Die embryonalen HEK293-

Zellen wiesen eine eindeutige Herabregulation von PTEN unter Hypoxie auf. Auch bei den embryonalen murinen NIH-3T3 konnte ein schwach inhibierender Effekt der Hypoxie auf den PTEN-Gehalt der Zellen gezeigt werden. Des Weiteren konnte für die NIH-3T3-Zellen unter Normoxie eine Doppelbande detektiert werden, welche voraussichtlich neben PTEN auch das phosphorylierte PTEN zeigt. Unter Hypoxie ist hingegen nur eine PTEN-Bande sichtbar, was darauf hindeutet, dass die Regulation von PTEN in Abhängigkeit des Sauerstoff-Partialdrucks variiert (Abb. 3.9 A). Die Karzinom-Zelllinien zeigten hingegen keine einheitliche Regulation von PTEN. So war in den VHL-defizienten Nierenkarzinomzellen der Linie A498 unter Hypoxie eine deutlich verminderte Proteinmenge von PTEN nachzuweisen. Obwohl HIF in diesen Zellen stabilisiert vorliegen sollte, induzierte die Hypoxie hier einen inhibierenden Effekt auf PTEN. In der PTEN-defizienten Nierenkarzinom-Zelllinie CAK11 bewirkte die Hypoxie keine Änderung der PTEN-Konzentration, PTEN war sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie nicht nachweisbar. Auch die Brustkrebs-Zelllinie T47D, die normalerweise eine intakte VHL-vermittelte HIF-Regulation zeigt (Hodges *et al.*, 2004), wies keine Hypoxie-induzierte Veränderung der Proteinmenge von PTEN auf. Hier blieb die Expression von PTEN wie unter Normoxie gleichermaßen hoch. Eventuell geht der Regulationsmechanismus im Verlauf der Brustkrebs-Entwicklung verloren (Abb. 3.9B). Diese Analysen belegen für embryonale Zellen eine eindeutige, Hypoxie-vermittelte Abnahme der PTEN-Konzentration, die wahrscheinlich durch HIF induziert wird und möglicherweise ubiquitär vorliegt. In einigen Tumorzelllinien scheint der Regulationsmechanismus jedoch gestört zu sein. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Hypoxie-induzierte Reduktion der PTEN-Menge in ausdifferenzierten Vorläuferzellen der Tumorzellen keine Rolle mehr spielt oder dass die Zellen im Verlauf der Tumorgenese oder der Kultivierung die Fähigkeit zu dieser Regulation verlieren. Um allerdings eine gesicherte Aussage machen zu können, müssten weitere Tumor-Zelllinien analysiert werden.

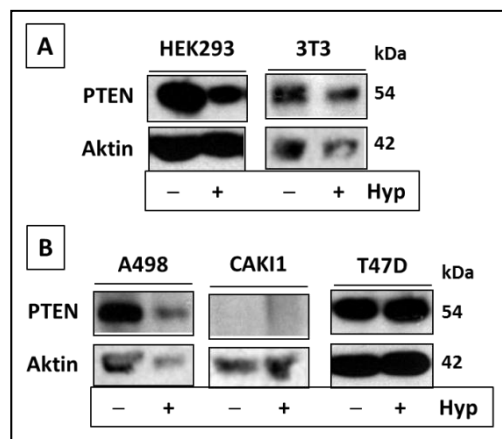


Abb. 3.9 Expression von PTEN unter Hypoxie. **A** Die embryonalen Zelllinien HEK293 und NIH-3T3 zeigten unter Hypoxie eine verminderte PTEN-Expression. **B** Die Nierenkarzinom-Zelllinie A498 wies ebenfalls eine Hypoxie-vermittelte Reduktion der PTEN-Konzentration auf. Der PTEN-Gehalt der Nierenkarzinom-Zelllinie CAK11 und der Brustkrebs-Zelllinie T47D blieb von der Hypoxie unbeeinflusst. Hypoxie-induzierte Signalwege, die v.a. durch HIF gesteuert werden, nehmen demnach in verschiedenen Zellsystemen negativ Einfluss auf die PTEN-Expression.

Nachdem gezeigt wurde, dass die PTEN-Expression durch Hypoxie-induzierte Signalmoleküle inhibiert wird, wurde daraufhin die Kinetik dieser Regulation untersucht. Dafür wurden HEK293 und HEK293T für 0, 24, 48 und 72 h bei 0,1% Sauerstoff-Partialdruck kultiviert. Anschließend wurden

RNA (Details siehe 2.2.3.1) und Proteine (Details siehe 2.2.4.1) extrahiert und mittels qPCR (Details siehe 2.2.1.11) bzw. *Western Blot* (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9) analysiert. Auf RNA-Ebene konnte ungleich der PTEN-Expression in primären ccRCC-Tumoren (Abb. 3.7) für HEK293 mit zunehmender Dauer der Hypoxie eine zwar langsam aber stetig abnehmende *PTEN*-Expression ermittelt werden (Abb. 3.10A). Dies konnte auch im *Western Blot* bestätigt werden. Mit anhaltendem Sauerstoff-Mangel wurde HIF1 α zunehmend stabilisiert. Auch die Expression des HIF-Zielgens VEGF nahm stetig zu, was verdeutlicht, dass HIF1 α nicht nur angereichert wird, sondern auch funktionell war. Erstaunlicherweise wurde die Protein-Konzentration von HIF2 α nur wenig durch die Hypoxie beeinflusst. Demnach scheint die Expression von PTEN in HEK293 verstärkt durch HIF1 inhibiert zu werden. Neben der Regulation von PTEN wurde im *Western Blot* auch deutlich, dass ebenso NEDD4-1, das den proteasomalen Abbau von PTEN fördert, durch Hypoxie-induzierte Mechanismen beeinflusst wird. Es wurde nachgewiesen, dass die Proteinmenge von NEDD4-1 bis zu einer Inkubation von 48 Stunden in Hypoxie anstieg, bei länger anhaltendem Sauerstoff-Mangel jedoch wieder abnahm. Die Regulation von PTEN wird somit wahrscheinlich auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene durch die Hypoxie verändert (Abb. 3.10B). Die HEK293T-Zellen zeigten hingegen eine völlig andere Kinetik. Dies demonstriert, dass die zusätzliche Transformation der HEK293 mit *large T* der Zelllinie neue Eigenschaften verleiht. So wurde auf RNA-Ebene mit zunehmend anhaltender Hypoxie auch eine stetige Erhöhung der *PTEN*-mRNA-Konzentration nachgewiesen. Erst nach 48 Stunden Sauerstoff-Mangel nahm die Menge der mRNA langsam wieder ab. In HEK293T wird also zunächst eine verstärkte *PTEN*-Expression als schnelle Antwort auf die Hypoxie induziert, welche bei Gewöhnung der Zellen an einen länger anhaltenden Sauerstoff-Mangel jedoch rückläufig ist (Abb. 3.10A). Im *Western Blot* konnte diese Regulation bestätigt werden, auch auf Protein-Ebene wurde zunächst bis zur Hypoxie-Dauer von 48 Stunden eine Erhöhung des Proteingehalts von PTEN nachgewiesen, welcher anschließend wieder absank. Neben der Stabilisierung von HIF1 α bewirkte die Hypoxie in HEK293T-Zellen auch die zunehmende Stabilisierung von HIF2 α , die jedoch nach 48-stündiger Hypoxie wieder abnahm. Damit zeigt HIF2 α eine ähnliche Kinetik wie PTEN und auch VEGF. Dies lässt vermuten, dass HIF2 α in HEK293T eine wichtigere Rolle als HIF1 α in der Transkriptionskontrolle vieler Gene spielt und möglicherweise auch die Expression von PTEN moduliert. Da HEK293T durch zwei Onkogene transformiert wurde, besitzt die Zelllinie wahrscheinlich viele Eigenschaften von Tumorzellen. So konnte bereits in mehreren Krebs-Erkrankungen ein erheblicher Einfluss von HIF2 auf die Entwicklung der Tumore nachgewiesen werden (Rankin *et al.*, 2008). Auch NEDD4-1 wird in HEK293T durch die Hypoxie beeinflusst, die Proteinmenge in der Zelle nimmt stetig ab. Somit scheint die veränderte Regulation von NEDD4-1 unter Sauerstoff-Mangel ein häufiger und vielleicht grundlegender Mechanismus zu sein, der die Stabilisierung des PTEN-Proteins unter Hypoxie beeinflusst (Abb. 3.10B).

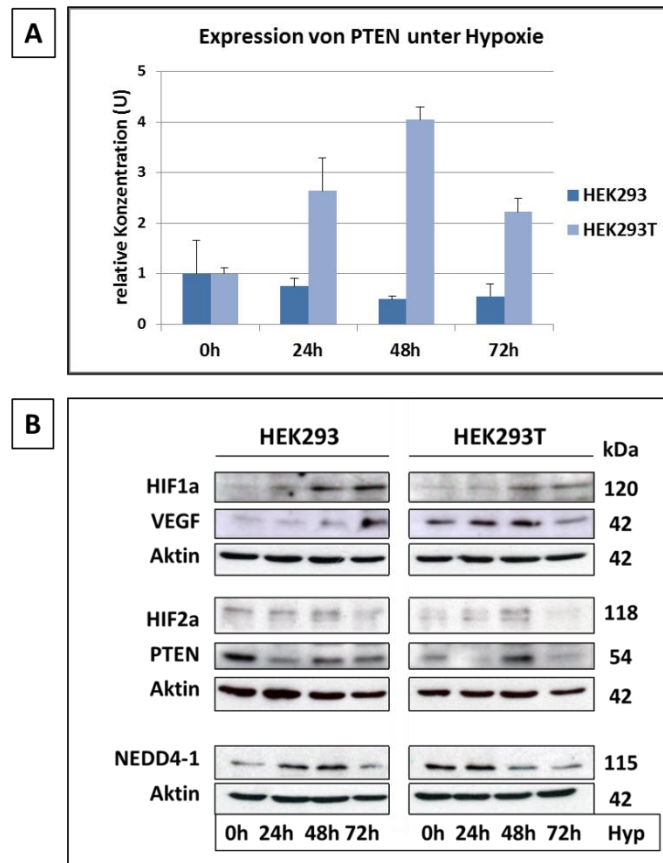


Abb. 3.10 Kinetik der Hypoxie-vermittelten Regulation von PTEN. **A** *PTEN*-Expression in HEK293 und HEK293T bei einer Hypoxie-Dauer von 0, 24, 48 und 72 Stunden. Die Normalisierung erfolgte mittels *Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)*. Der Wert der unter Normoxie kultivierten Zellen (0h) wurde auf 1 normiert und alle folgenden Werte darauf bezogen. Für beide Zelllinien lässt sich eine Hypoxie-induzierte und damit vermutlich HIF-vermittelte Regulation von *PTEN* nachweisen. **B** Auf Protein-Ebene konnten die auf RNA-Ebene gezeigten Effekte ebenfalls nachgewiesen werden. Neben der Konzentration von HIF1 und 2, VEGF und PTEN wird auch die Proteinmenge von NEDD4-1 durch Hypoxie beeinflusst. Die Regulation von PTEN wird also unter Sauerstoffmangel vermutlich transkriptionell und posttranslationell kontrolliert.

Neben den Analysen in Zelllinien wurden außerdem auch Untersuchungen nicht immortalisierter Zellen aus primären ccRCC-Geweben in der Zellkultur vorgenommen. Dafür wurden Gewebestücke von humanen, klarzelligen Nierenkarzinomen in die Zellkultur überführt (Details siehe 2.2.6.4). Nach der ersten Passagierung wurden die Tumorzellen für 24 Stunden mit bzw. ohne Cobaltchlorid inkubiert. Anschließend wurden RNA (Details siehe 2.2.3.1) und Proteine (Details siehe 2.2.4.1) extrahiert und in der qPCR (Details siehe 2.2.1.11) bzw. im *Western Blot* (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9) analysiert. Cobaltchlorid wird verwendet, um in Zellen einen hypoxischen Zustand zu simulieren. Es inhibiert die Aktivität der Prolylhydroxylasen (PHDs), welche daraufhin HIF α nicht mehr hydroxylieren können. Diese Hydroxylgruppen sind jedoch entscheidend für die Bindung von VHL und den dadurch initiierten Abbau von HIF α . Cobaltchlorid bewirkt also eine Stabilisierung der HIF-Transkriptionsfaktoren, so dass deren Auswirkung auf die Expression von Genen analysiert werden kann (Haase, 2006). Die Stabilisierung von HIF wurde zunächst in der qPCR über die Ermittlung der Expression von *VEGF*, einem direkten Zielgen von HIF, bestätigt. Die Tumorzellen des Karzinoms ST2028 wiesen außerdem eine durch CoCl₂ induzierte Herabregulation der *PTEN*-Konzentration auf, welche möglicherweise auf eine HIF-vermittelte Inhibierung zurückzuführen ist

(Daten nicht gezeigt). Diese Zellen wurden im Anschluss auch auf Protein-Ebene näher untersucht. Im *Western Blot* konnte zunächst nochmals gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit Cobaltchlorid zu einer Hypoxie-ähnlichen Stabilisierung von HIF führt. Sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus wurde ein erhöhter Proteingehalt von HIF1 α in Cobaltchlorid-behandelten Zellen verglichen mit unbehandelten Tumorzellen nachgewiesen. Auch eine schwache Verminderung der Proteinmenge von PTEN in HIF-stabilisierten Zellen konnte gezeigt werden. Interessanterweise bewirkte die CoCl₂-Behandlung darüber hinaus eine subzelluläre Umverteilung von PTEN. So war in unbehandelten Tumorzellen die größere Menge von PTEN im Nukleus zu finden, während sich in Cobaltchlorid-behandelten Tumorzellen eine deutliche Verlagerung von PTEN ins Zytoplasma nachweisen ließ. Dies ist möglicherweise auf weitere HIF-regulierte Moleküle zurückzuführen, die durch eine veränderte Expression direkt oder indirekt die subzelluläre Verteilung von PTEN fördern könnten. Die Protein-Menge von NEDD4-1, welches neben dem proteasomalen Abbau von PTEN auch dessen Transport in den Kern reguliert (Trotman *et al.*, 2007), wird durch die Cobaltchlorid-Behandlung nur wenig verringert. Dies bestätigt die vorangegangenen RNA-Analysen, in denen eine schwache Reduktion der mRNA-Konzentration von NEDD4-1 gezeigt werden konnte. Auch die Lokalisierung von NEDD4-1 im Zytoplasma wird durch CoCl₂ nur wenig beeinflusst (Abb. 3.11).

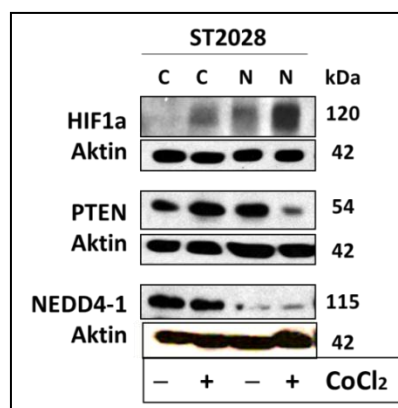


Abb. 3.11 Subzelluläre Umverteilung von PTEN in Cobaltchlorid-behandelten ST2028-Tumorzellen. Cobaltchlorid (CoCl₂) induziert eine Stabilisierung von HIF1 α und eine schwache Verminderung der PTEN-Konzentration in der Zelle. Zusätzlich bewirkt CoCl₂ eine Umverteilung von PTEN vom Kern in das Zytoplasma. NEDD4-1 wird durch die CoCl₂-Behandlung in seiner Protein-Konzentration nur wenig beeinflusst. Es ist weiterhin v.a. im Zytoplasma lokalisiert. C: zytoplasmatische Proteine, N: nukleäre Proteine.

Anhand der Promotor-Analysen von *PTEN* konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PTEN* unter Hypoxie inhibiert wird, was wahrscheinlich durch eine HIF-induzierte Hemmung der *PTEN*-Transkription vermittelt wird. Dieser Effekt ist auch in embryonalen Zelllinien nachweisbar, in denen eine Hypoxie-Einwirkung zu einer verminderten Protein-Konzentration von PTEN auf Protein-Ebene führt. HEK293T, Tumorzelllinien und primäre ccRCCs zeigen hingegen Abweichungen von dieser Regulation, was möglicherweise auf eine Fehlregulation der HIF-vermittelten Reduktion der PTEN-Konzentration während der Transformation zur Tumorzelle schließen lässt. Die Hypoxie-vermittelte Regulation von NEDD4-1 und die subzelluläre Umverteilung von PTEN in den Zellkompartimenten deuten darauf hin, dass die Regulation von PTEN v.a. auf Protein-Ebene stattfindet und dort möglicherweise VHL auch HIF-unabhängig auf die PTEN-Konzentration Einfluss nimmt.

3.1.4 Interaktionen von VHL und NEDD4-1

In vorangegangenen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass VHL durch die Degradation von HIF α indirekt die Expression von *PTEN* fördert, da diese durch HIF inhibiert wird (Details siehe 3.1.2). Die Analysen zeigten auch, dass die Expression von NEDD4-1, welches als E3-Ligase von PTEN dessen Abbau induziert, durch Sauerstoffmangel beeinflusst wird. So scheint VHL über HIF auch die Transkription von *NEDD4-1* zu regulieren und möglicherweise dadurch auch auf Proteinebene Einfluss auf die Stabilisierung von PTEN zu nehmen. Da VHL im Zytoplasma in einem Ubiquitinligasekomplex vorliegt, wäre es denkbar, dass es neben HIF α auch andere Moleküle für eine proteasomale Degradation vorbereitet (Roe *et al.*, 2006; Okuda *et al.*, 2001). Dies wäre auch eine weitere Möglichkeit, wie VHL direkt auf Protein-Ebene den Proteingehalt von PTEN verändern könnte. So könnte VHL den Abbau eines Regulators von PTEN fördern. Für NEDD4-1 ist bekannt, dass es die Ubiquitylierung und somit die Stabilität von PTEN verringert. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob VHL möglicherweise direkt mit NEDD4-1 interagiert, dieses eventuell inaktiviert und dadurch PTEN über einen weiteren Mechanismus stabilisiert.

3.1.4.1 VHL reguliert NEDD4-1 in embryonalen Zelllinien und Tumorzellen

Zunächst wurde untersucht, ob VHL Einfluss auf die Proteinmenge von NEDD4-1 nimmt. Dafür wurde eine Überexpression von VHL in der embryonalen Zelllinie HEK293T (Details siehe 2.2.5.3), der murinen Phäochromozytom-Zelllinie PC12 (Details siehe 2.2.5.4) und den Nierenkarzinom-Zelllinien A498, CAKI1, KTCTL-26A und 786-O (Details siehe 2.2.5.5) induziert. Anschließend wurden die Proteine der Zellen extrahiert (Details siehe 2.2.4.1) und im *Western Blot* analysiert (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). In den humanen HEK293T-Zellen bewirkte die Überexpression von VHL eine Erhöhung des Proteingehalts von NEDD4-1. Die VHL-positiven PC12-Zellen, die einem Ratten-Phäochromozytom entstammen, neuronale Eigenschaften besitzen und somit ein VHL-Syndrom relevantes Zellsystem darstellen, wiesen ebenfalls einen VHL-vermittelten Anstieg der Proteinmenge von NEDD4-1 auf. Auch die RCC-Zelllinie CAKI1, in der die endogene VHL-Expression erhalten ist, zeigte eine erhöhte NEDD4-1-Konzentration in VHL-überexprimierenden Zellen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass VHL NEDD4-1 Zellsystem-übergreifend reguliert. In VHL-negativen RCC-Zellsystemen bewirkt die Restitution von VHL hingegen keine Erhöhung der NEDD4-1-Konzentration. In den Zelllinien A498 und 786-O induziert die Expression von VHL sogar eine deutliche Verminderung der NEDD4-1-Menge in der Zelle. So scheint die Wiederherstellung der VHL-Expression in Tumorzellen der Niere, die die Fähigkeit zur VHL-Expression während der Kanzerogenese verloren haben, dazu zu führen, dass andere Mechanismen aktiviert werden, die sich inhibierend auf NEDD4-1 auswirken (Abb. 3.12).

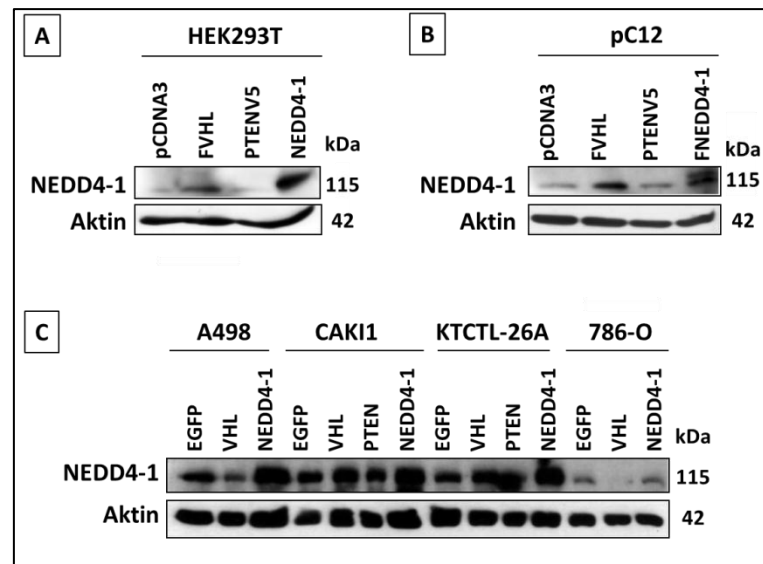


Abb. 3.12 Einfluss einer VHL-Überexpression auf NEDD4-1 in embryonalen und differenzierten Tumorzellen. Die Auswirkung der Heraufregulation von VHL auf den Proteingehalt von NEDD4-1 wurde für die embryonalen HEK293T (A), die Phäochromozytom-Zelllinie PC12 (B) und die Nierenkarzinom-Zelllinien A498, CAKI1, KTCTL-26A und 786-O (C) im *Western Blot* dargestellt.

3.1.4.2 NEDD4-1-Expression in primären Normal- und Tumorgeweben

Nachdem bereits in Zelllinien unterschiedlicher Differenzierung gezeigt wurde, dass VHL Einfluss auf die Proteinmenge von NEDD4-1 in der Zelle nimmt, wurde nun humanes Primärgewebe aus klarzelligem Nierenkarzinom und assoziiertem gesundem Nierengewebe bezüglich ihrer NEDD4-1-Expression untersucht und verglichen. Dafür wurden aus den Organen RNA (Details siehe 2.2.3.2) und Proteine (Details siehe 2.2.4.3) extrahiert und diese in der qPCR (Details siehe 2.2.1.11) bzw. im *Western Blot* (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9) analysiert. Außerdem wurden Paraffinschnitte der Organe angefertigt (Details siehe 2.2.7.1) und die Verteilung von PTEN und NEDD4-1 im Gewebe ermittelt (Details siehe 2.2.7.4). Zunächst wurde die Konzentration der NEDD4-1-mRNA in denselben acht Tumor- und Normalgewebe-Paaren untersucht, in denen bereits die Expression von VEGF und PTEN analysiert wurde (siehe Abb. 3.7). Wie schon für VEGF und PTEN konnte auch für NEDD4-1 in allen Tumorgeweben eine verstärkte *NEDD4-1*-Expression nachgewiesen werden. Die Expression wurde dort, verglichen mit den *NEDD4-1*-Transkriptmengen in korrespondierenden Normalgeweben, um Faktor 1,2 bis Faktor 6 verstärkt (Abb. 3.13). Das Ausmaß ähnelte jedoch nicht der Erhöhung der Expression von *VEGF* oder *PTEN*.

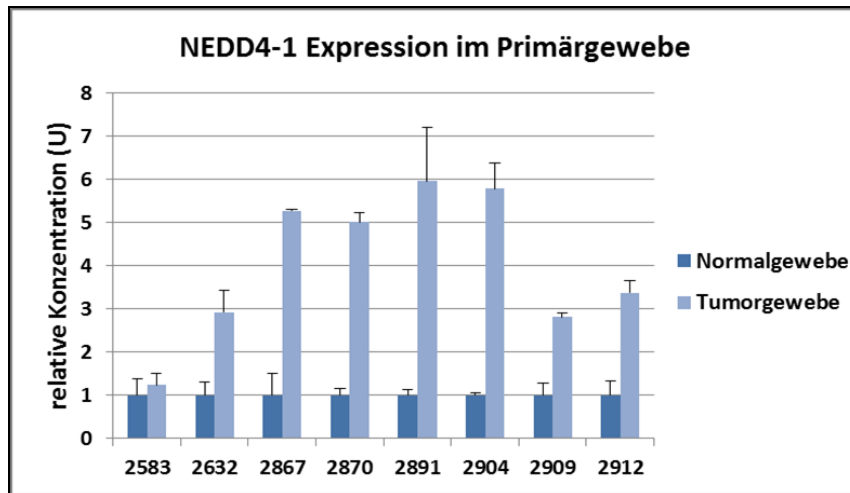


Abb. 3.13 NEDD4-1-Expressionsanalyse humaner ccRCCs im Vergleich zum gesunden Nierengewebe. Alle VHL-defizienten Tumorgewebe wiesen verglichen mit den korrespondierenden Normalgeweben eine erhöhte mRNA-Konzentration von NEDD4-1 auf. Zur Normalisierung wurden die Daten mit den Ergebnissen der *Pyruvat-Dehydrogenase* (PDH)-qPCR verrechnet. Das Normalgewebe wurde auf 1 normiert und die mRNA-Konzentration der Tumorgewebe darauf bezogen.

Die Expressionsanalyse für NEDD4-1 zeigte in den VHL-defizienten Tumoren auf RNA-Ebene ein gegensätzliches Ergebnis verglichen zur NEDD4-1-Protein-Menge in embryonalen Zellen, die ähnlichen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden. Um zu klären, ob NEDD4-1 gegebenenfalls auf der Protein-Ebene in den Primärgeweben weiteren Regulationsmechanismen ausgesetzt ist, wurde daher im Anschluss die Expression von PTEN und NEDD4-1 in je 18 Primärgeweben der ccRCCs und der zugehörigen gesunden Nierengewebe im *Western Blot* korreliert. Interessanterweise zeigten fünf der acht bereits mittels quantitativer PCR analysierter Tumore eine deutliche Herabregulation von PTEN auf Protein-Ebene, die aufgrund der nachgewiesenen, erhöhten mRNA-Menge (siehe Abb. 3.7) nicht der Erwartung entsprach. Es muss daher ein Mechanismus vorliegen, der PTEN posttranskriptionell herabreguliert. NEDD4-1, die E3-Ligase von PTEN, könnte daran beteiligt sein. Dagegen blieb die bereits auf mRNA-Ebene nachgewiesene Steigerung der Expression in fünf von acht Tumoren auf Protein-Ebene erhalten. Die vollständige Auswertung der *Western Blot*-Analysen von PTEN und NEDD4-1 sind in Abb. 3.14B tabellarisch zusammengefasst (Abb. 3.14B). Insgesamt waren zehn Tumore PTEN-positiv, von denen vier Gewebe sogar eine Heraufregulation von PTEN zeigten. In sieben Tumoren wurde eine verminderte Proteinmenge von PTEN verglichen mit dem zugehörigen gesunden Normalgewebe nachgewiesen. NEDD4-1 war in 11 Tumorgeweben auch noch auf Protein-Ebene heraufreguliert, in einem Tumor herabreguliert und in fünf ccRCCs ähnlich wie in gesundem Gewebe exprimiert. Von den 18 untersuchten Gewebe-Pärchen wiesen sechs Tumore sowohl einen verminderten Proteingehalt von PTEN als auch eine erhöhte Proteinmenge von NEDD4-1 auf (Abb. 3.14A). Die Analyse der Daten zeigte, dass, wenn PTEN in den Tumoren herabreguliert wurde, NEDD4-1 zu 85,7% überexprimiert vorlag (Abb. 3.14C). Die Annahme, dass NEDD4-1 PTEN in klarzelligen Nierenkarzinomen negativ reguliert, wird somit durch die Korrelation unterstützt. Da bereits nachgewiesen wurde, dass VHL PTEN stabilisiert (Details siehe 3.1), ist hier möglicherweise ein regulatorischer Effekt erkennbar. So könnte VHL NEDD4-1 in seiner Funktion als E3-Ligase hemmen oder PTEN vor der NEDD4-1-vermittelten Degradation schützen, so dass die Abnahme der PTEN-Konzentration im VHL-defizienten Tumorgewebe durch NEDD4-1 induziert sein könnte.

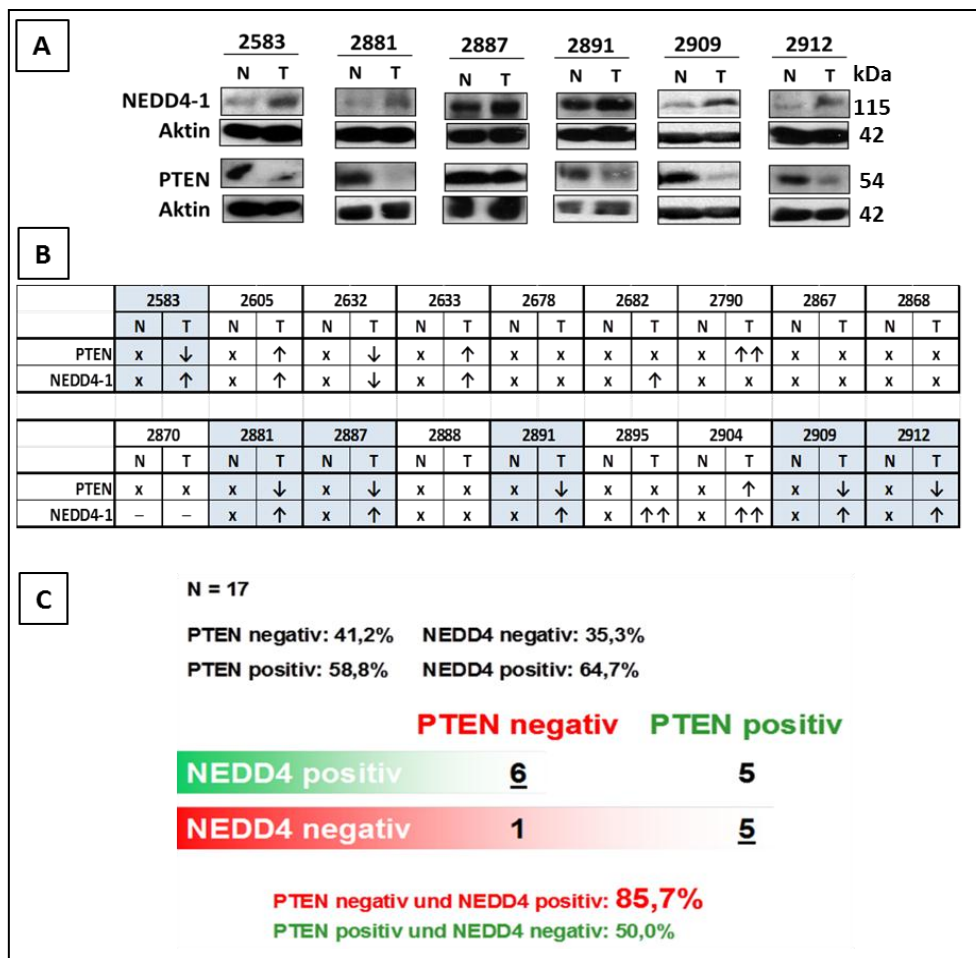


Abb. 3.14 Analyse der Expression von PTEN und NEDD4-1 im Tumor und korrespondierendem Normalgewebe. A Western Blot der sechs Tumore, die verglichen mit dem Normalgewebe derselben Patienten eine verminderte Proteinmenge von PTEN und einen erhöhten NEDD4-1-Gehalt aufwiesen. **B** Tabellarische Zusammenfassung der Western Blot-Ergebnisse der ermittelten PTEN- und NEDD4-1-Expression. Die blau unterlegten Felder entsprechen den unter A aufgeführten Normal- und Tumorgeweben. **C** Die Expression der 17 Tumore, von denen sowohl eine PTEN- als auch NEDD4-1-Analyse möglich waren, wurde hier ins Verhältnis gesetzt. So wurde ermittelt, dass in 85,7% der Tumore mit PTEN-Verlust gleichzeitig NEDD4-1 heraufreguliert vorliegt. N: gesundes Normalgewebe, T: ccRCC, x: Expression vorhanden, ↑: Expression erhöht, ↓: Expression herabreguliert, —: kein Nachweis.

Die Expression von PTEN und NEDD4-1 variierte für die im *Western Blot* analysierten Primärtumore erheblich. Dies kann auf unterschiedliche Entwicklungsstadien der Tumorgewebe zurückzuführen sein. Da die Tumore vor der Präparation nicht mikroskopisch genau untersucht werden konnten, ist jedoch möglich, dass unterschiedlich große Anteile von Normalgewebe, die in den Tumoren noch enthalten sein können, mit extrahiert wurden. Diese würden die Analysen der Expression des Tumorgewebes verfälschen. Um das zu überprüfen, wurden Paraffinschnitte von zehn Tumoren angefertigt und die Expression von PTEN und NEDD4-1 mittels Immunhistochemie (Details siehe 2.2.7.4) untersucht. Abgesehen von den Tumoren 2583T und 2891T konnte in allen untersuchten Geweben neben tumorös veränderten Regionen auch gesundes Normalgewebe dargestellt werden. Dies ist somit eine Ursache für die starke Variabilität der *Western Blot*-Ergebnisse bezüglich der PTEN- und NEDD4-1-Expression. Die Tumorgewebe 2583T und 2891T zeigten im *Western Blot* beide eine Herabregulation von PTEN und eine Überexpression von NEDD4-1 verglichen mit den

assoziierten Normalgeweben. Dies bestärkt die Vermutung, dass eine NEDD4-1-vermittelte Degradation von PTEN in VHL-defizienten, klarzelligem Nierenkarzinomen ein grundlegender Mechanismus sein könnte, der zur ccRCC-Entstehung beiträgt. Des Weiteren wurde in den immunhistochemischen Untersuchungen deutlich, dass im gesunden Gewebe, welches die Tumore durchzog, sowohl PTEN als auch NEDD4-1 wildtypisch im Zytoplasma der Tubuluszellen nachweisbar war. In Bereichen der vollständig entwickelten ccRCCs, die in allen Tumoren zu finden waren, war jedoch keine Expression von PTEN oder NEDD4-1 mehr nachweisbar. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunhistochemie ist tabellarisch in Abb. 3.15A zu finden. Abb. 3.15B zeigt exemplarisch die Expression von PTEN und NEDD4-1 im Normalgewebe und im Tumor 2678 T (Abb. 3.15).

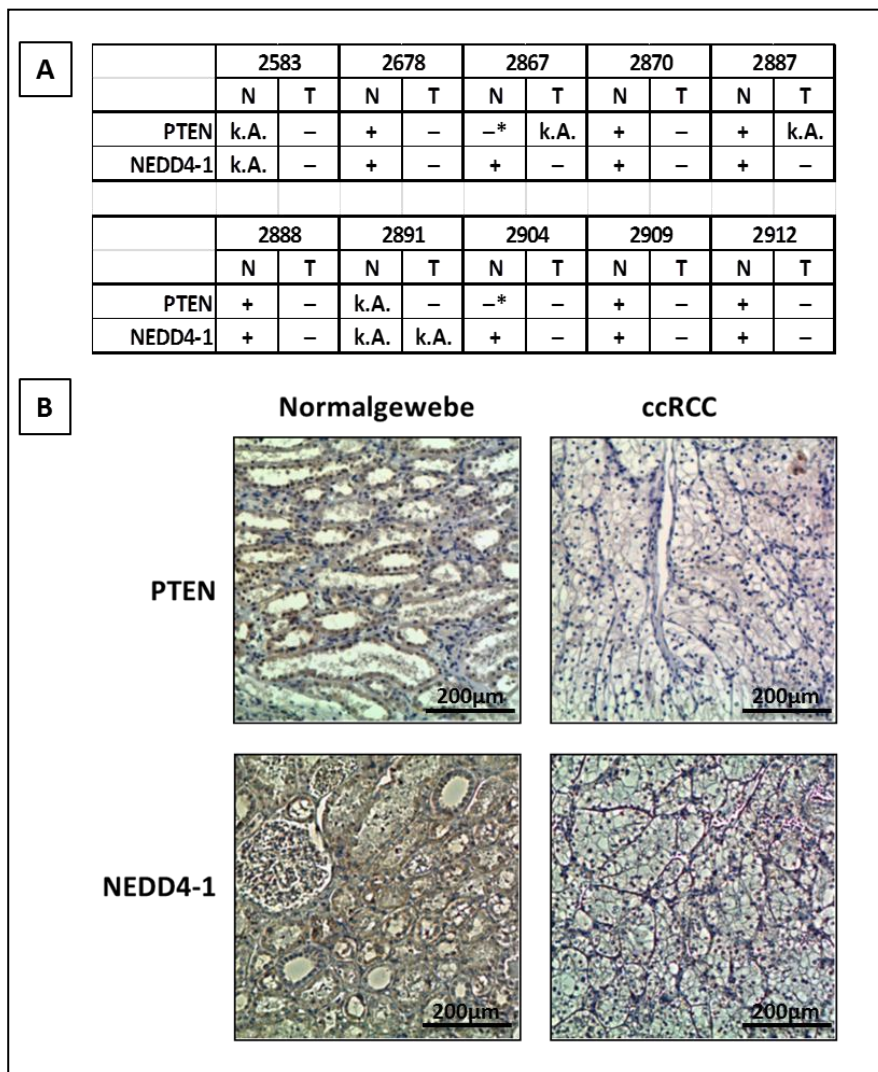


Abb. 3.15 Immunhistochemische Expressionsanalysen der ccRCCs. Mittels Immunhistochemie wurde die Verteilung von PTEN und NEDD4-1 im Gewebe analysiert. **A** Tabellarische Zusammenfassung der Lokalisation von PTEN und NEDD4-1 **B** Exemplarische Darstellung der Expression von PTEN und NEDD4-1 in den Geweben des Tumors 2678T. N: gesundes Normalgewebe der Niere, T: Tumorgewebe, +: Expression vorhanden, -: keine Expression, *: Markgewebe, k.A.: nicht vorhanden

3.1.4.3 Interaktion von PTEN und NEDD4-1

In den vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass VHL unter bestimmten Bedingungen PTEN positiv reguliert und dass häufig die Überexpression von NEDD4-1 mit der Abnahme der Proteinmenge von PTEN korreliert ist. Um den vorliegenden Regulationsmechanismus genauer zu verstehen, wurde zunächst genauer analysiert, inwieweit eine direkte Interaktion zwischen PTEN und NEDD4-1 besteht. Dafür wurden HEK293T-Zellen mit unterschiedlichen Kombinationen der Konstrukte FVHL, PTENV5 und FNEDD4-1 transfiziert (Details siehe 2.2.5.3) und unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert. Aus den Zellen wurden Proteinextrakte hergestellt (Details siehe 2.2.4.1), diese einer Immunpräzipitation (IP) mit einem gegen PTEN gerichteten Antikörper unterzogen (Details siehe 2.2.4.6) und die Präzipitate im *Western Blot* (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9) analysiert. Der Nachweis des V5-Tags des PTENV5-Proteins zeigte die Spezifität des präzipitierenden Antikörpers. So konnte für alle Ansätze, bei denen HEK293T mit PTENV5 transfiziert wurde, V5 auf der Höhe von 54 kDa dokumentiert werden. Interessanterweise variierte die Menge des nachweisbaren PTENV5 in den einzelnen Ansätzen trotz gleicher IP-Bedingungen. Die Zellen, welche nur mit PTENV5 transfiziert wurden, enthielten die größte Proteinmenge von PTEN. Mit zunehmend erhöhter Konzentration von zusätzlich transfiziertem FVHL nahm das Signal des präzipitierten PTEN jedoch stetig ab. Auch die zusätzliche Transfektion von FNEDD4-1 änderte daran nichts. Diese Ergebnisse sind gut vereinbar mit der bereits gezeigten VHL-vermittelten NEDD4-1-Stabilisierung in HEK293T (Details siehe 3.1.4.1). So könnte mit zunehmender Überexpression von VHL auch eine erhöhte Stabilisierung von NEDD4-1 einhergehen, welches, wie in der IP zu sehen, funktionell PTEN für den proteasomalen Abbau vorbereiten könnte. Dies erklärt jedoch nicht die VHL-vermittelte PTEN-Stabilisierung (Details siehe 3.1.2). Das Experiment wurde sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Sauerstoffgehalt keinen Einfluss auf das rekombinante PTEN nimmt (Abb. 3.16A). Als nächstes wurde für dieselben Lysate ein FLAG-Nachweis im *Western Blot* durchgeführt. Sollte PTEN mit VHL oder NEDD4-1 eine Bindung eingehen, so sollten die FLAG-gekoppelten Moleküle FVHL und FNEDD4-1 kopräzipitiert worden sein. Tatsächlich konnte in den Ansätzen, in denen sowohl PTEN als auch NEDD4-1 überexprimiert wurden, FNEDD4-1 nachgewiesen werden. Diese Interaktion wurde in den Lysaten der Zellen noch verstärkt, die unter Hypoxie kultiviert wurden. FVHL konnte jedoch in keinem der Ansätze dokumentiert werden. Demnach interagieren PTEN und NEDD4-1 miteinander, wie bereits von Wang *et al.* beschrieben wurde (Wang et al., 2007). PTEN und VHL scheinen hingegen keine direkten Interaktionspartner zu sein. Die VHL-vermittelte Regulation von PTEN verläuft also möglicherweise indirekt (Abb. 3.16B).

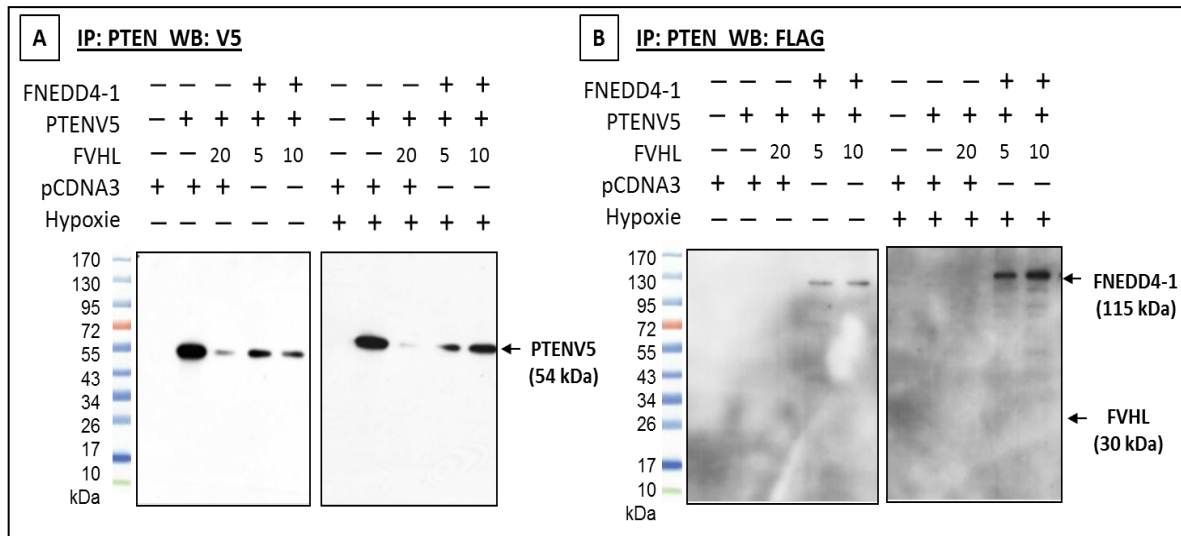


Abb. 3.16 Nachweis der Interaktion von PTEN und NEDD4-1. HEK293T wurden zunächst wie angegeben transfiziert und unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert. Die Proteine wurden extrahiert und einer Immunpräzipitation (IP) mit PTEN-Antikörper unterzogen. Anschließend wurde die PTENV5-Menge mittels V5-Nachweis im *Western Blot* (WB) ermittelt (**A**). Der FLAG-Nachweis machte alle FLAG-gekoppelten Proteine, die mit PTEN interagieren, sichtbar. Es wurde eine Bindung von PTENV5 und FNEDD4-1, jedoch keine Interaktion von PTENV5 und FVHL, nachgewiesen (**B**). 5, 10, 20: Menge (μ g) des in die Transfektion eingesetzten FVHL-Konstruktes.

3.1.4.4 Interaktion von VHL und NEDD4-1

Da keine direkte Bindung von VHL und PTEN ermittelt werden konnte, VHL jedoch auch NEDD4-1 beeinflusst, wurde in nachfolgenden Untersuchungen überprüft, ob VHL und NEDD4-1 miteinander interagieren. Dafür wurden HEK293T mit Kombinationen der Konstrukte *FVHL*, *PTENV5* und *FNEDD4-1* kotransfiziert (Details siehe 2.2.5.3), die Proteinlysate der Zellen in eine IP mit einem gegen VHL gerichteten Antikörper eingesetzt (Details siehe 2.2.4.6) und anschließend alle präzipitierten, FLAG-gekoppelten Proteine im *Western Blot* nachgewiesen (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Für alle mit *FVHL* transfizierten Zellen wurde ein FLAG-Nachweis auf der Höhe von ca. 30 kDa, der Größe der 1. Isoform von VHL, ermittelt. Weiterhin konnte FLAG für den Ansatz mit *FVHL*- und *FNEDD4-1*-Überexpression auch auf der Höhe von 115 kDa detektiert werden. Dies entspricht der Größe von NEDD4-1. Sogar für den Ansatz PTENV5 + FNEDD4-1 war FNEDD4-1 sichtbar. Der Nachweis war hier allerdings schwächer, was auf eine geringere Konzentration von VHL zurückzuführen ist. Da nur Proteine im *Western Blot* dokumentiert werden konnten, die in der IP präzipitiert und somit an VHL gebunden vorlagen, konnte hier gezeigt werden, dass VHL und NEDD4-1 miteinander interagieren (Abb. 3.17A). Daraufhin sollte nun geklärt werden, welche Domänen von VHL und NEDD4-1 tatsächlich für die Bindung der Proteine entscheidend sind. Hierzu wurde in Folge die Bindungsfähigkeit von verschiedenen Domänen des VHL-Proteins und NEDD4-1 überprüft. HEK293T wurden dafür mit den Konstrukten FNEDD4-1 und VHL 1.ATG, VHL 2.ATG oder VHL 1-89 kotransfiziert und wie bereits beschrieben weiter untersucht. Die Analyse der IP mit VHL-Antikörper, der in der Aminosäuren-Sequenz 54 bis 95 von VHL bindet, zeigte im *Western Blot* die stärkste Bindung von FNEDD4-1 und VHL 1.ATG, welches der 213 Aminosäuren-langen, vollständigen 1. Isoform von VHL, entspricht. Eine deutlich schwächere, aber noch nachweisbare Bindung war für FNEDD4-1 und VHL 2.ATG zu verzeichnen. VHL 2.ATG ist die 3. Isoform von VHL, welcher die ersten 53 Aminosäuren des Proteins fehlen. Dieser N-terminale Bereich enthält 8

Repeats der Aminosäuresequenz GXEEX, denen bisher keine Funktion zugeschrieben wird (Woodward *et al.*, 2000). Möglicherweise spielen sie jedoch eine Rolle in der Faltung des Proteins, wodurch die Bindung zu NEDD4-1 stabilisiert werden könnte. Die Variante VHL 1-89 enthält neben den 8 *Repeats* den N-terminalen Teil der β -Domäne von 26 Aminosäuren. Da die Bindung von NEDD4-1 und VHL 1-89 stärker als die mit der 3. Isoform war, scheint besonders der N-terminale Bereich der β -Domäne für die Interaktion mit NEDD4-1 ausschlaggebend zu sein (Abb. 3.17B).

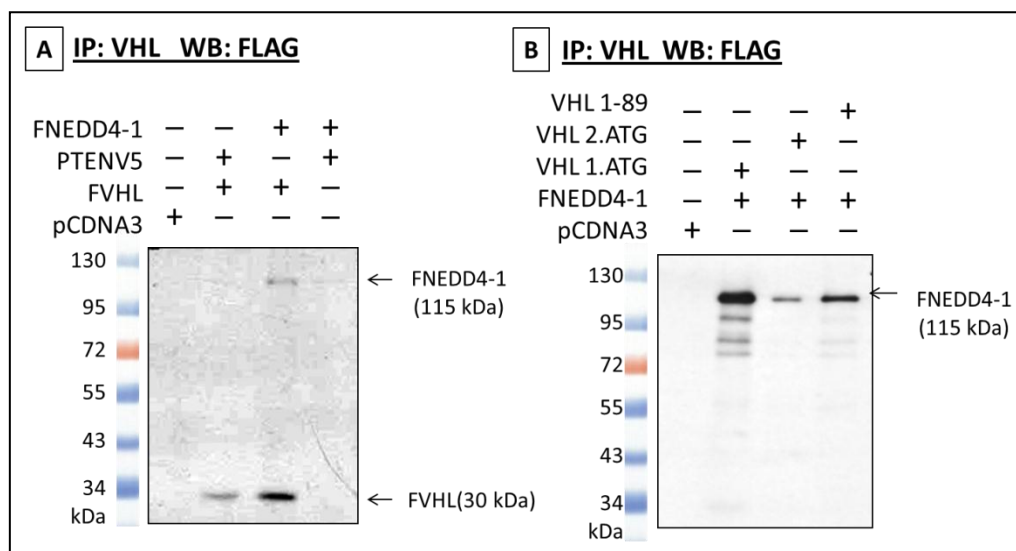


Abb. 3.17 Nachweis der Interaktion von VHL und NEDD4-1. Mittels Immunpräzipitation (IP) wurden die Bindungspartner von VHL in Protein-Extrakten von HEK293T mit unterschiedlichen Kombinationen einer Überexpression von verschiedenen VHL-Varianten, PTENV5 und NEDD4-1 untersucht. **A** Der FLAG-Nachweis im *Western Blot* (WB) dokumentiert, dass FNEEDD4-1 im Präzipitat von VHL enthalten blieb und dieses somit bindet. **B** FNEEDD4-1 zeigte die stärkste Bindung an die 1. Isoform von VHL (VHL 1.ATG). Die Interaktion von FNEEDD4-1 und der 3. Isoform von VHL (VHL 2.ATG) war deutlich geringer, während die ersten 89 Aminosäuren von VHL (VHL 1-89) bereits ausreichten, um die Bindungsfähigkeit zu erhöhen. Der N-terminale Bereich von VHL scheint also eine wichtige Rolle für die Bindung an NEDD4-1 zu spielen.

Um die für die Interaktion mit NEDD4-1 essentiellen Sequenz-Abschnitte von VHL weiter eingrenzen zu können, wurde zudem der Einfluss der V2B-Mutationen R167Q und G195X, der V2C-Varianten R64P, V84L und L188V sowie der Typ 1-Mutation dEx2 (2. Isoform von VHL) auf die Interaktion von VHL und NEDD4-1 analysiert. Dazu wurde in HEK293T eine Überexpression von FNEEDD4-1 und einer der FVHL-Konstrukte induziert. Des Weiteren wurde ein Ansatz mit den Konstrukten FVHL und FNEEDD4-1 C894S, eine NEDD4-1-Punktmutante mit inaktiviertem katalytischen Zentrum, transfiziert (Details siehe 2.2.5.3). Die Zellen wurden unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert und wie bereits beschrieben weiter untersucht. Nach der IP mit dem gegen VHL gerichteten Antikörper wurden im *Western Blot* wiederum alle im Präzipitat enthaltenen FLAG-gekoppelten Proteine nachgewiesen. Während die Nachweise der verschiedenen FVHL-Mutanten gleichermaßen stark vorlagen, variierte die Intensität der detektierten FNEEDD4-1-Banden in den einzelnen Ansätzen. Dies deutet auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten der FVHL-Varianten mit FNEEDD4-1 hin. So konnte für die unter Normoxie kultivierten HEK293T gezeigt werden, dass die Punktmutation R64P im N-Terminus der β -Domäne von VHL keinen Einfluss auf die Interaktion mit NEDD4-1 nimmt. Die im C-Terminus der β -Domäne gelegene Mutation V84L schwächt die VHL-NEDD4-1-Bindung ab. Die mittlere Region der β -Domäne beeinflusst die Interaktion wiederum nicht,

wie der NEDD4-1-Nachweis für FVHL dEx2, der 2. Isoform von VHL ohne Exon 2, zeigt. Der C-Terminus der β -Domäne hat vermutlich die größte Bedeutung, die Punktmutation G195X verhindert die Bindung von NEDD4-1 vollständig. Schließlich scheint auch die α -Domäne involviert zu sein. Während die C-terminal gelegene Mutation L188V keinen Effekt zeigt, bewirkt jedoch die N-terminal lokalisierte Mutation R167Q einen fast vollständigen Verlust der Interaktion von VHL und NEDD4-1, was möglicherweise auf Faltungseffekte von VHL oder andere Interaktionen zurückzuführen sein könnte. NEDD4-1 bindet daher voraussichtlich an den C-terminal gelegenen Bereich der β -Domäne, der mit Substraten von VHL interagiert, bindet jedoch möglicherweise auch an Bereiche der α -Domäne, die für die Interaktion mit Elongin B und C zuständig ist. Die NEDD4-1 C894S-Mutante zeigte ebenfalls eine leicht verminderte Bindung von VHL. Für die Zellen, die unter Hypoxie kultiviert wurden, konnte generell eine stärkere Interaktion mit FNEDD4-1 verzeichnet werden. Besonders auffällig war die Verstärkung des FNEDD4-1-Nachweises für FVHL dEx2. Dies deutet daraufhin, dass die Interaktion von VHL und NEDD4-1 erleichtert wird, sobald unter Hypoxie das Substrat HIF α nicht mehr an die β -Domäne von VHL gebunden wird. Daher scheinen HIF α und NEDD4-1 um die Bindung zu konkurrieren. Auch die Interaktion von FVHL L188V und NEDD4-1 wird unter Hypoxie deutlich verstärkt (Abb. 3.18).

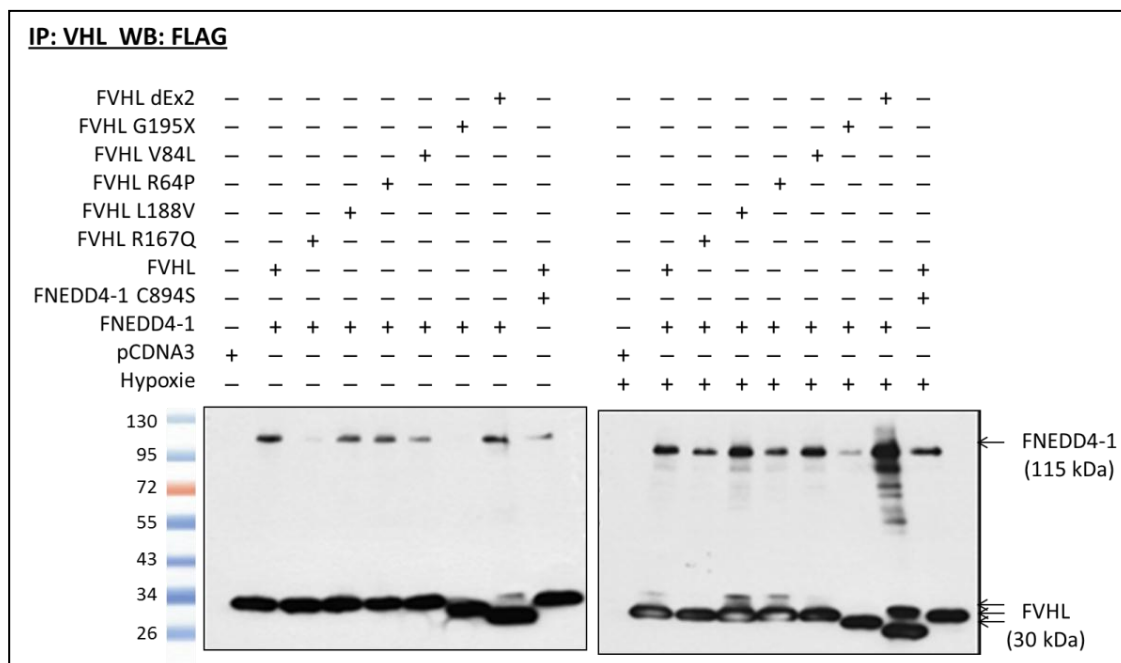


Abb. 3.18 Identifizierung der NEDD4-1 interagierenden VHL-Domänen. Für die Ermittlung der VHL-Domänen, die für die NEDD4-1-Bindung essentiell sind, wurde mittels Immunpräzipitation (IP) der Einfluss verschiedener V2B-, V2C- und Typ 1-Mutationen auf die Interaktion von FVHL und FNEDD4-1 untersucht und im *Western Blot* (WB) sichtbar gemacht. So konnte gezeigt werden, dass die V2B-Mutationen R167Q und G195X die Bindung an NEDD4-1 entscheidend inhibieren. Auch FVHL V84L vermindert die Interaktion schwach. Unter Hypoxie wird die VHL-NEDD4-1-Bindung verstärkt. Besonders die Bindung von FNEDD4-1 und FVHL L188V, FVHL V84L oder FVHL dEx2 wurde stabilisiert. Demnach interagiert NEDD4-1 vermutlich mit dem mittleren und C-terminalen Bereich der β -Domäne, aber auch die N-terminale Region der α -Domäne könnte beteiligt sein. Außerdem konkurriert NEDD4-1 wahrscheinlich mit anderen Substraten wie HIF α , die unter Hypoxie nicht binden können, um die Interaktion mit VHL.

Schließlich sollte auch eingegrenzt werden, welche NEDD4-1-Domänen entscheidend für die Interaktion mit VHL sind. Dafür wurden HEK293T mit FVHL und einer FNEDD4-1-Domäne bzw.

der Punktmutation FNEDD4-1 C894S transfiziert und wie bereits erörtert weiter untersucht. Auch hier wurde wieder eine gegen VHL gerichtete IP durchgeführt und alle FLAG-gekoppelten Proteine im *Western Blot* nachgewiesen. Neben FVHL konnte in jedem Ansatz auch die entsprechende FNEDD4-1-Variante detektiert werden. Zwar waren FNEDD4-1 und FNEDD4-1 C894S nur schwach erkennbar, jedoch konnte deren Interaktionen mit FVHL bereits in vorangegangenen Experimenten deutlicher gezeigt werden (Abb. 3.18). Die mangelhafte Detektion von FNEDD4-1 und C894S war auf die Laufeigenschaften des SDS-PAGE-Gels und der daraufhin schlechteren Übertragung auf die Membran zurückzuführen. Darüber hinaus interagieren scheinbar auch die C2- und die WW-Domänen, die für Interaktionen mit anderen Proteinen und die Substrat-Bindung verantwortlich sind, mit VHL. Interessanterweise war der C2dK-Nachweis deutlich stärker als der von C2. Die Mutation der Ubiquitinylierungsstellen führt scheinbar zur Stabilisierung der C2-Domäne. Die Ubiquitinylierung der C2-Domäne und den darauffolgenden Abbau von NEDD4-1 könnte demnach von VHL vermittelt werden. Die HECT-Domäne, welche als Ubiquitin-Ligase fungiert, scheint hingegen nicht für die Bindung mit VHL nötig zu sein (Abb. 3.19).

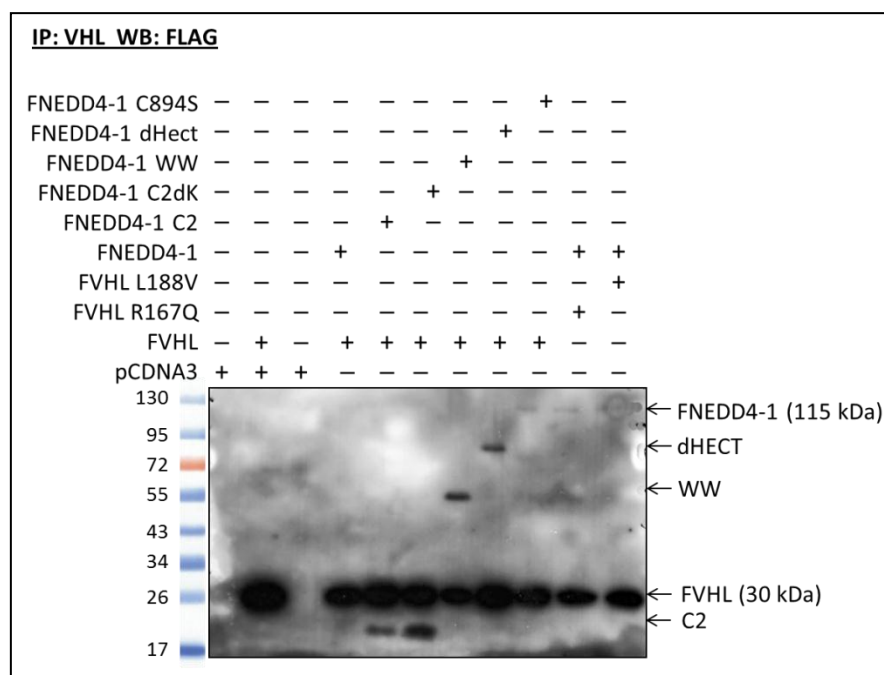


Abb. 3.19 Analyse der für die VHL-Bindung essentiellen NEDD4-1-Domänen. Anhand einer gegen VHL gerichteten Immunpräzipitation (IP) wurden die VHL-interagierenden FNEDD4-1-Domänen isoliert und im *Western Blot* (WB) über ihr FLAG-Tag sichtbar gemacht. Neben den bereits früher deutlicher nachgewiesenen Interaktionen von VHL und den wildtypischen FNEDD4-1 und FNEDD4-1 C894S wurden auch alle anderen FNEDD4-1-Domänen detektiert. Demnach sind die C2-Domäne, unabhängig von den Lysin-Ubiquitinylierungsstellen, und die WW-Domäne für die Bindung von VHL nötig. Die HECT-Domäne scheint nicht entscheidend zu sein.

3.1.4.5 Funktion der Interaktion von VHL und NEDD4-1

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass VHL und NEDD4-1 miteinander interagieren, wurde nun eingehend untersucht, welche Funktion diese Interaktion hat, und wie sich die beiden Bindungspartner möglicherweise gegenseitig beeinflussen. Sowohl für VHL als auch für NEDD4-1 ist bekannt, dass sie die Poly-Ubiquitinylierung der *RNA-Polymerase II* (RNA-PoL II) induzieren, welche zur proteasomalen Degradation des Enzyms führt (Kuznetsova *et al.*, 2003; Anindya *et al.*, 2007). Hier

sollte nun getestet werden, ob VHL und NEDD4-1 in einem Komplex mit RNA-POL II vorliegen und ob die mögliche Interaktion Einfluss auf die Bindung der RNA-POL II nimmt. Dafür wurden HEK293T mit *FVHL* und *FNEDD4-1* allein und verschiedenen Mutanten der beiden Gene kotransfiziert (Details siehe 2.2.5.3). Die Proteine wurden aus den Zellen extrahiert (Details siehe 2.2.4.1) und einer gegen RNA-POL II gerichteten IP unterzogen (Details siehe 2.2.4.6). Anschließend wurden alle im Präzipitat enthaltenen FLAG-gekoppelten Proteine im *Western Blot* sichtbar gemacht (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Sowohl FVHL als auch FNEDD4-1 konnte detektiert werden, was die Interaktion beider E3-Ligasen mit RNA-POL II bestätigt. Der FVHL-Nachweis war jedoch deutlich schwächer als der von FNEDD4-1, was impliziert, dass die Bindung mit VHL eher zum Abbau der RNA-POL II führt als die Bindung mit NEDD4-1. Außerdem könnte dieses Ergebnis bedeuten, dass FNEDD4-1 in einer höheren Konzentration an RNA-Pol II bindet als FVHL. Während die Proteinmenge von FNEDD4-1 relativ konstant für alle Ansätze war, variierte der Proteingehalt von FVHL deutlich. So wiesen die Ansätze FVHL+FNEDD4-1 und FVHL L188V+FNEDD4-1 eine höhere Menge an FVHL im Präzipitat auf als FVHL allein. FVHL R167Q war hingegen gar nicht nachweisbar, somit ist der N-Terminus der α -Domäne von VHL entweder für die Bindung der RNA-POL II essentiell oder aber diese Bindung von VHL und RNA-POL II wird direkt von FNEDD4-1 vermittelt, welches die V2B-Mutante nicht binden kann. Auch die Punktmutante FNEDD4-1 C894S scheint die Interaktion von VHL und RNA-POL II zu inhibieren. Möglicherweise bewirkt das defekte katalytische Zentrum, dass die RNA-POL II zwar gebunden wird, jedoch nicht ubiquitinyliert und somit nicht mehr freigesetzt werden kann, wodurch die Interaktion mit VHL gehemmt werden könnte (Abb. 3.20).

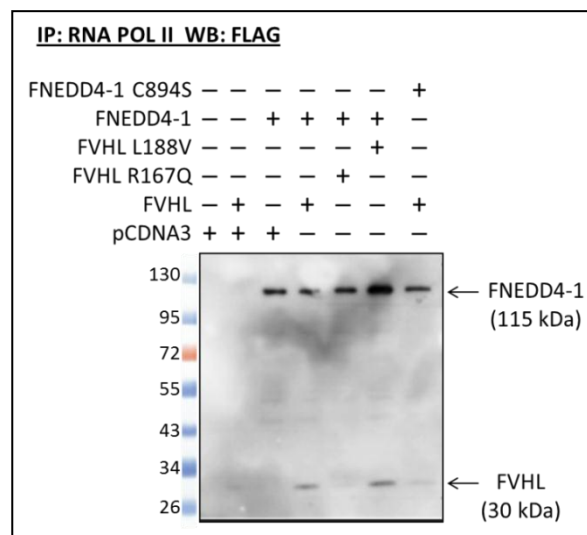


Abb. 3.20 RNA-POL II interagiert mit VHL und NEDD4-1. Die Zelllysate von HEK293T mit Überexpression verschiedener FVHL- und / oder FNEDD4-1-Varianten wurden einer gegen RNA-POL II gerichteten Immunpräzipitation (IP) unterzogen und die FLAG-gekoppelten Proteine des Präzipitats im *Western Blot* (WB) dargestellt. Sowohl FVHL als auch FNEDD4-1 konnte nachgewiesen werden und interagieren demnach mit RNA-POL II. Die Stärke der Bindung von FVHL und RNA-POL II variiert in Abhängigkeit der Bindungsfähigkeit von FVHL und FNEDD4-1 und wird also scheinbar durch FNEDD4-1 beeinflusst.

Da jedoch bereits gezeigt wurde, dass zumindest VHL auf die Regulation von NEDD4-1 Einfluss nimmt und NEDD4-1 mit den Substrat-Bindestellen von VHL interagiert, wurde anschließend

untersucht, ob nicht neben der wahrscheinlich gemeinsam vermittelten Ubiquitylierung der RNA-POL II VHL und NEDD4-1 eine direkte Auswirkung auf die Stabilität des anderen nehmen. So wurde der Ubiquitylierungsstatus von FVHL und FNEDD4-1 ermittelt, um zunächst die Funktionalität der Konstrukte zu demonstrieren und den möglichen Effekt der Proteine auf den jeweiligen Bindungspartner detaillierter zu untersuchen. Dafür wurden HEK293T-Zellen neben den verschiedenen VHL- und NEDD4-1-Varianten und PTENV5 zusätzlich mit einem HA-gekoppelten Ubiquitin-Konstrukt kotransfiziert (Details siehe 2.2.5.3). Die Zellen wurden dann wie bereits beschrieben weiter untersucht und eine gegen VHL gerichtete IP durchgeführt (Details siehe 2.2.4.6). Anschließend wurden über einen HA-Nachweis im *Western Blot* die ubiquitylierten, im Präzipitat befindlichen Proteine ermittelt (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Für FVHL überexprimierende Zellen konnte sowohl auf der Höhe von VHL als auch auf der Höhe des VHL-Dimers eine HA-Bande gezeigt werden. Des Weiteren war aber auch eine Ubiquitylierung in den Regionen größerer Proteine wie beispielweise NEDD4-1 und HIF α belegbar. Die Ubiquitin-Bande erstreckte sich aufgrund unterschiedlicher poly-ubiquitylierter Proteine in einem weiten molekularen Bereich von ca. 40 kDa bis 130 kDa. So konnte zunächst die Funktionalität von FVHL bewiesen werden. Der Ansatz mit zusätzlicher FNEDD4-1-Überexpression zeigte ein vergleichbares Ubiquitylierungsmuster. FVHL scheint hier also den Abbau von FNEDD4-1 nicht zu beeinflussen. Die V2B-Variante R167Q bewirkt eine Verminderung der nachweisbaren Ubiquitylierung der Substrate. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass diese VHL-Mutante die Fähigkeit verloren hat, Elongin C zu binden und dadurch der VBC-Ubiquitylierungskomplex destabilisiert wird. Außerdem könnte auch der bereits gezeigte Verlust der NEDD4-1-Bindung zu diesem Ergebnis beitragen. Die V2C-Mutation L188V und der Verlust des Exons 2 von FVHL nehmen keinen Einfluss auf die Fähigkeit der NEDD4-1-Bindung und die VHL-Funktion der E3-Ligase, so dass das Ubiquitylierungsmuster wiederum nicht verändert wurde (Abb. 3.21A). Um zu kontrollieren, ob auch FNEDD4-1 funktionsfähig ist und Ubiquitylierungen vermittelt, wurde mit denselben Protein-Extrakten eine gegen NEDD4-1 gerichtete IP durchgeführt. Auch hier wurde anschließend wieder Ubiquitin mittels HA-Nachweis im *Western Blot* detektiert. Der Ansatz der Zellen mit FNEDD4-1-Überexpression wies eine deutliche Bande in der Höhe von NEDD4-1 auf. FNEDD4-1 ist demnach funktional und dient der Vermittlung der proteasomalen Degradation. Interessanterweise zeigte in diesem Experiment die zusätzliche Heraufregulation von FVHL eine enorme Verstärkung der Ubiquitylierung. Dieses Ergebnis belegt, dass sowohl VHL als auch NEDD4-1 Ubiquitylierungen von Substrat-Proteinen vermitteln und dass deren Interaktion wahrscheinlich auch die Ubiquitylierung des einen oder anderen Bindungspartners fördert. Da bereits in früheren Experimenten gezeigt werden konnte, dass NEDD4-1 in Anwesenheit von VHL häufig destabilisiert vorliegt, wird vermutlich eine FVHL-vermittelte FNEDD4-1-Ubiquitylierung induziert. Die Ansätze, die mit FNEDD4-1 und einer der drei VHL-Mutanten R167Q, L188V oder dEx2 transfiziert wurden, zeigten keinen HA-Nachweis, was wahrscheinlich auf den Verlust der Proteinkomplexe bei den Waschschritten nach der IP zurückzuführen ist. Hingegen konnte für die Zellen mit PTENV5-Hochregulation auch eine Ubiquitylierung nachgewiesen werden. Demnach scheint auch der bereits beschriebene NEDD4-1-vermittelte PTEN-Abbau durch FNEDD4-1 bestätigt. Interessanterweise zeigt auch FNEDD4-1 C894S hier dasselbe Ubiquitylierungsmuster für PTENV5. Diese Ubiquitylierung von PTEN wird möglicherweise durch das endogene NEDD4-1 oder weitere Ubiquitin-Ligasen katalysiert (Abb. 3.21B).

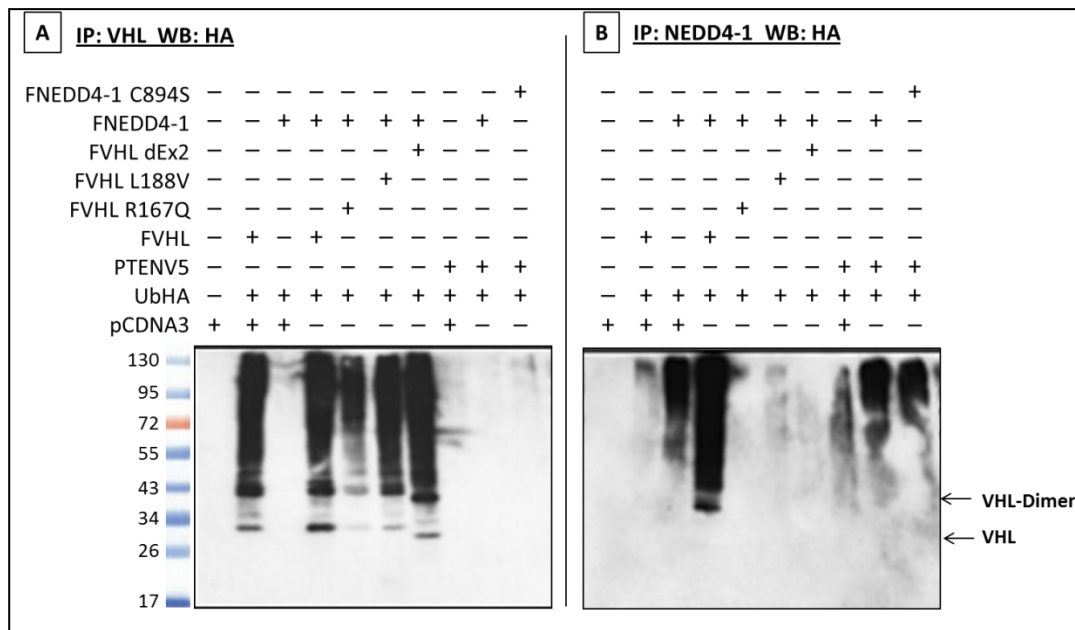


Abb. 3.21 Analysen der FVHL- und FNEDD4-1-vermittelten Ubiquitinylierung. In HEK293T wurde die Überexpression von verschiedenen FVHL-, FNEDD4-1-Varianten, PTEN und einem HA-gekoppelten Ubiquitin induziert. Die Protein-Extrakte wurden einer gegen VHL gerichteten (A) bzw. gegen NEDD4-1 gerichteten (B) Immunpräzipitation (IP) unterzogen und die Menge an Ubiquitin über einen HA-Nachweis im *Western Blot* (WB) ermittelt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl FVHL als auch FNEDD4-1 ihre Funktion als E3-Ligase ausüben und so die Ubiquitinylierung von Proteinen vermitteln. Während die V2B-Mutation R167Q diese Fähigkeit von FVHL verminderte, zeigten die Mutationen L188V und dEx2 keinen Einfluss auf die Ubiquitinylierung. Im mit NEDD4-1 gefällten Präzipitat konnte weiter gezeigt werden, dass die Koexpression von FVHL und FNEDD4-1 die Ubiquitinylierung erheblich verstärkt, was möglicherweise auch darauf zurückgeführt werden kann, dass einer der beiden Bindungspartner den Abbau des anderen induzieren könnte. Des Weiteren wurde auch die NEDD4-1-vermittelte Ubiquitinylierung von PTENV5 nachgewiesen.

Anschließend wurde die Auswirkung distinkter FNEDD4-1-Domänen auf die Ubiquitinylierung untersucht. HEK293T wurden dafür mit den entsprechenden FNEDD4-1-Konstrukten, FVHL und dem HA-gekoppelten Ubiquitin-Konstrukt kotransfiziert (Details siehe 2.2.5.3). Die extrahierten Proteinlysate (Details siehe 2.2.4.1) wurden dann mit einem VHL-Antikörper in der IP gefällt (Details siehe 2.2.4.6) und die im Präzipitat enthaltenen, ubiquitinylierten Proteine über einen HA-Nachweis im *Western Blot* analysiert (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Auch hier konnte wieder nachgewiesen werden, dass FVHL seine Funktion als E3-Ligase ausübt, die zusätzliche Expression von FNEDD4-1 bewirkte in diesem Experiment allerdings eine verminderte Ubiquitinylierung. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die FNEDD4-1-Domänen C2, C2dK und WW ebenfalls die Ubiquitinylierung verringern jedoch nicht vollständig verhindern. Da keine Unterschiede zwischen diesen Domänen zu erkennen war, ist das detektierte HA wahrscheinlich auf die basale VHL-vermittelte Ubiquitinylierung anderer Proteine zurückzuführen. Dies zeigt, dass für die Ubiquitinylierung von NEDD4-1 vermutlich mehr als nur die C2-oder die WW-Domäne nötig ist. Im Gegensatz dazu wurde für die Ansätze mit Überexpression von FVHL und FNEDD4-1 dHECT bzw. FNEDD4-1 C894S wiederum eine deutlich intensivere Ubiquitinylierung nachgewiesen. Da in beiden Fällen die Ligase-Aktivität von NEDD4-1 verloren ist, implizieren diese Ergebnisse, dass das intakte FVHL die Ubiquitinylierung von FNEDD4-1 vermittelt (Abb. 3.22).

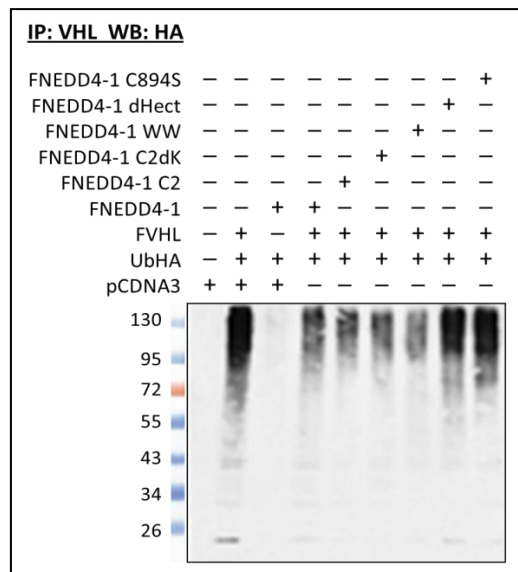


Abb. 3.22 Einfluss der NEDD4-1-Domänen auf die Ubiquitinylierung. HEK293T wurden mit FVHL, einer NEDD4-1-Variante und HA-gekoppelten Ubiquitin-Konstrukten kotransfiziert. Nach der gegen VHL gerichteten Immunpräzipitation (IP) wurde die Ubiquitinylierung im Präzipitat im *Western Blot* (WB) analysiert. Die Überexpression von FVHL und FNEDD4-1 bewirkte hier eine schwächere Ubiquitinylierung als FVHL allein. Auch die Ansätze mit einer Überexpression von FVHL und FNEDD4-1 C2, C2dK oder WW zeigten eine verminderte Ubiquitinylierung. Die C2- oder WW-Domäne scheint nicht ausreichend für die Ubiquitinylierung zu sein. FNEDD4-1 dHECT bzw. C894S bewirkten eine Verstärkung der Ubiquitinylierung in FVHL-überexprimierenden Zellen. Da diese FNEDD4-1-Mutanten keine Ligase-Aktivität besitzen, scheint hier FVHL die Ubiquitinylierung von FNEDD4-1 zu vermitteln.

Abschließend sollte nun ermittelt werden, ob die mögliche VHL-induzierte Ubiquitinylierung von NEDD4-1 zum Abbau des Proteins führt. Daher wurden wiederum verschiedene FVHL- und FNEDD4-1-Varianten in HEK293T kotransfiziert (Details siehe 2.2.5.3) und jeweils die Hälfte der Ansätze mit MG132 behandelt. MG132 ist ein Inhibitor des 26S Proteasoms und bewirkt somit, dass der Abbau ubiquitinylierter Moleküle verhindert wird. Die Proteinextrakte der Zellen wurden mit einem gegen VHL gerichteten Antikörper immunpräzipitiert (Details siehe 2.2.4.6) und die FLAG-gekoppelten Proteine FVHL und FNEDD4-1 im *Western Blot* detektiert (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Die Bandenstärke der FVHL-Varianten zwischen MG132-behandelten und unbehandelten Ansätzen unterschied sich hier nicht deutlich, so dass FVHL vermutlich nicht von FNEDD4-1 für eine folgende Degradation ubiquitinyliert wird. Auch die Konzentrationen von FNEDD4-1 im Präzipitat der Ansätze FVHL+FNEDD4-1 und FVHL+FNEDD4-1 C894S waren unabhängig von der Inkubation der Zellen mit MG132 vergleichbar. Lediglich die Ansätze, welche neben FNEDD4-1 die VHL-Mutanten R167Q, L188V oder dEx2 enthielten, wiesen eine leichte aber nicht signifikante Verstärkung der FNEDD4-1-Banden im *Western Blot* auf. Daher scheint NEDD4-1 keinen Einfluss auf den Abbau von VHL zu nehmen. VHL scheint zwar die Ubiquitinylierung jedoch nicht die Proteolyse von NEDD4-1 zu beeinflussen (Abb. 3.23).

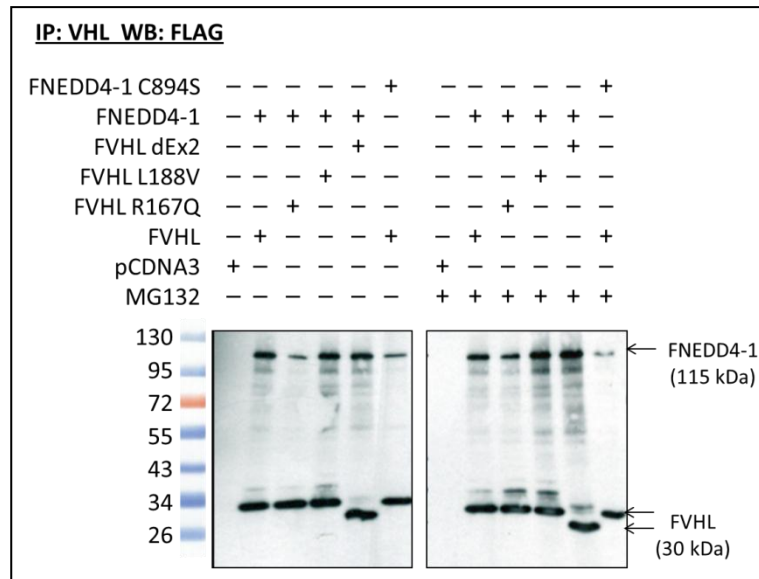


Abb. 3.23 Einfluss der Interaktion von VHL und NEDD4-1 auf die Degradation der Bindungspartner. HEK293T wurden nach der Transfektion mit verschiedenen FVHL- und NEDD4-1-Konstrukten mit und ohne 26S Proteasom-Inhibitor MG132 kultiviert. Die Protein-Extrakte wurden einer Immunpräzipitation (IP) mit VHL-Antikörper unterzogen und anschließend wieder die FLAG-gekoppelten Proteine des Präzipitats im *Western Blot* (WB) gezeigt. Der FVHL-Nachweis veränderte sich unabhängig der MG132-Inkubation nicht. Der Nachweis von FNEDD4-1 war jedoch für die Ansätze mit MG132 verglichen mit unbehandelten Ansätzen etwas stärker. Die Interaktion von FVHL und FNEDD4-1 nimmt also keinen Einfluss auf den Abbau von VHL, destabilisiert jedoch auch NEDD4-1 nicht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass PTEN von VHL reguliert wird. Dabei kommt es jedoch nicht zu einer direkten Interaktion. Zunächst wurde nachgewiesen, dass PTEN unter Hypoxie herabreguliert wird. Dieser Mechanismus scheint jedoch teilweise in Tumorzellen oft aufgehoben zu werden. Da die von VHL regulierten HIF-Transkriptionsfaktoren Schlüsselmoleküle in der Vermittlung Hypoxie-induzierter Signalwege darstellen, kann VHL wahrscheinlich indirekt über die Destabilisierung von HIF α die Transkription von *PTEN* beeinflussen. Des Weiteren ist vermutlich auch ein indirekter Regulationsmechanismus auf Protein-Ebene an der VHL-vermittelten PTEN-Regulation beteiligt. So konnte eine Interaktion von VHL und NEDD4-1, das den proteasomalen Abbau von PTEN fördert, nachgewiesen werden. NEDD4-1 interagiert dabei direkt mit der β -Domäne von VHL, die verschiedene Substrate für die nachfolgende Ubiquitylierung bindet. Bei Sauerstoffmangel wird die Interaktion von VHL und NEDD4-1 noch verstärkt. Vermutlich bleibt hier die Konkurrenz mit HIF α aus, so dass NEDD4-1 einfacher oder stärker interagieren kann. Die wahrscheinlich von VHL induzierte Ubiquitylierung von NEDD4-1 wird auch dadurch belegt, dass durch die Inhibierung des 26S Proteasoms mehr NEDD4-1-Moleküle an VHL gebunden vorliegen. Ebenso ist eine verstärkte Ubiquitylierung bei einer Überexpression von FVHL und der Mutante FNEDD4-1 C894S, die keine E3-Ligase-Funktion besitzt, nachweisbar. Diese Ubiquitylierung wird also v.a. durch VHL vermittelt, was darauf hindeutet, dass VHL den Abbau von NEDD4-1 induziert und nicht umgekehrt. Der negative Einfluss von VHL auf NEDD4-1 lässt sich auch in verschiedenen Zellsystemen nachweisen. So konnte in einigen Zelllinien bei Überexpression von VHL eine Herabregulation von NEDD4-1 beobachtet werden. In VHL-defizienten Tumorgeweben wurde außerdem häufig eine erhöhte Proteinmenge von NEDD4-1 ermittelt. In einigen Zelllinien führte die Überexpression von VHL jedoch zu einer erhöhten NEDD4-1-Konzentration. Demnach liegt hier kein allgemeingültiger Regulationsmechanismus vor, die VHL-vermittelte NEDD4-1-Regulation ist

vermutlich nur in Zellen bestimmter Gewebe oder Entwicklungs- bzw. Erkrankungsstadien vorzufinden.

3.2 VHL und PTEN beeinflussen das Zellverhalten

Bereits während früher Entwicklungsphasen sezernieren embryonale Zellen eine Vielzahl verschiedener Molekülarten in ihre unmittelbare Umgebung. Diese Moleküle bilden die extrazelluläre Matrix (ECM), welche neu entstehendes oder sich umordnendes Gewebe mitgestaltet, indem Bestandteile der ECM an Zelloberflächen-Rezeptoren binden und diverse Signalwege der Zelle regulieren. Diese wechselseitigen Beziehungen zwischen Zell-bestimmter Zusammensetzung der ECM und rückläufigem Einfluss der ECM auf das Zellverhalten koordinieren auch die Fähigkeit der Zelle zur Adhäsion, Proliferation, Migration und zum Überleben. Im folgenden Ergebnisteil sollte nun der Einfluss von VHL und PTEN auf diese Prozesse ermittelt werden, um so Rückschlüsse auf ihre Funktion als Tumorsuppressor ziehen zu können. Dazu wurden *in vitro*-Analysen zur Adhäsion, Migration und zur Überlebensfähigkeit in Abhängigkeit von VHL bzw. PTEN durchgeführt. Anschließend wurde die Auswirkung von VHL und PTEN auf den Metastasierungsprozess in immunsupprimierten NOD/SCID^{-/-} Mäusen analysiert.

3.2.1 Auswahl der Zelllinien

Für die folgenden Untersuchungen wurden die humanen, epithelialen Nierenkarzinom-Zelllinien 786-O und KTCTL-26A ausgewählt. 786-O-Zellen enthalten eine *VHL*-Mutation, welche zum Verlust der Expression des VHL-Proteins führt (Iliopoulos *et al.*, 1995). Des Weiteren konnte in eigenen *Western Blot*-Analysen gezeigt werden, dass 786-O-Zellen im Vergleich zu anderen Zelllinien einen geringeren endogenen PTEN-Gehalt besitzt (siehe Tab. 3.1). Auch die Zelllinie KTCTL-26A zeigt keine *VHL*-Expression. Dies ist auf einen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 (Högermann *et al.*, 1994), auf welchem der *VHL*-Lokus (3p25-26) liegt, zurückzuführen. Die PTEN-Expression ist in KTCTL-26A-Zellen hingegen deutlich nachweisbar (siehe Tab. 3.1). Mittels retroviraler Transduktion (Details siehe 2.2.5.5) wurden in beide Zelllinien die Plasmide pBABE puro, pBABE EGFP, pBABE VHL, pBABE PTENV5, pBABE PTENV5 C124S oder pBABE NEDD4-1 inseriert. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Expression von EGFP, VHL, PTEN oder NEDD4-1 in den Zellen.

3.2.2 Adhäsion

Die Adhäsionsfähigkeit der beiden Karzinom-Zelllinien 786-O und KTCTL-26A wurde hier im Einzelnen für spezifische Bestandteile der ECM untersucht. Dafür wurde Collagen I (Col I) ausgewählt, welches sich zu fibrillären Homopolymeren zusammenlagert und damit die Gerüststruktur der interstitiellen Matrix bildet. Des Weiteren wurde die Bindung an Laminin (La) und Collagen IV (Col IV) untersucht, die v.a. in der Basallamina organisiert sind. Und schließlich wurde die Adhäsion an Fibronectin (Fn), welches v.a. in die Collagenfasern eingelagert ist, und Vitronectin (Vi) getestet, die mannigfaltig mit der Zelle interagieren. Die Zellen wurden als Triplets auf den unterschiedlichen

Beschichtungen ausplattiert, 1 Stunde bei 37°C inkubiert, angefärbt, lysiert und schließlich die Intensitäten der Färbung in Relation gesetzt (Details siehe 2.2.5.6). Die unterschiedlich transduzierten 786-O Zellen zeigten bereits auf unbeschichtetem Boden einen Effekt. So wiesen 786-O VHL und 786-O PTEN eine stärkere Bodenhaftung als die Kontrolle 786-O EGFP auf, während eine erhöhte NEDD4-1 Expression nur wenig an dem Adhäsionsverhalten der Zellen änderte. Diese Tendenz war auch für alle Beschichtungen sichtbar. 786-O VHL Zellen zeigten dabei eine besonders starke Adhäsionsaffinität. Es hafteten auf jedem ECM-Bestandteil ca. doppelt so viele Zellen wie bei der Kontrolle 786-O EGFP (für Fn und Vi $p \leq 0,01$; für La, Col I und Col IV $p \leq 0,001$). Diese signifikante Verstärkung der Adhäsion ist mit großer Wahrscheinlichkeit v.a. auf die VHL-regulierte Organisation des Zytoskeletts (Hergovich *et al.*, 2003) und Beeinflussung der Fn-Matrix (Ohh *et al.*, 1998) zurückzuführen. Neben VHL zeigte aber auch PTEN einen deutlich positiven Effekt auf die Adhäsionsfähigkeit von 786-O (für Fn und Col IV $p \leq 0,05$; für Vi $p \leq 0,01$). Auch PTEN greift in die Organisation des Aktin-Zytoskeletts ein und verstärkt die Ausbildung fokaler Kontakte (Gu *et al.*, 1999). Die Restitution von VHL bzw. PTEN bewirkte in der Karzinom-Zelllinie 786-O bezüglich der Adhäsion demnach wieder die Rückkehr zu einem Phänotyp, der dem Wildtyp einer renalen Epithelzelle ähnelt. Zudem wird deutlich, dass 786-O Zellen unabhängig von der Überexpression der Transgene eine hohe Bindungsaffinität für die beiden Adhäsionsproteine Fibronectin und Vitronectin aufwiesen, mit denen Zellen häufig interagieren. Außerdem banden 786-O ebenso oft an das Collagen I-Grundgerüst der ECM. Lediglich die Adhäsion an die Basallamina-Bestandteile Laminin und Collagen IV blieb der unbeschichteten Kontrolle vergleichbar (Abb. 3.24).

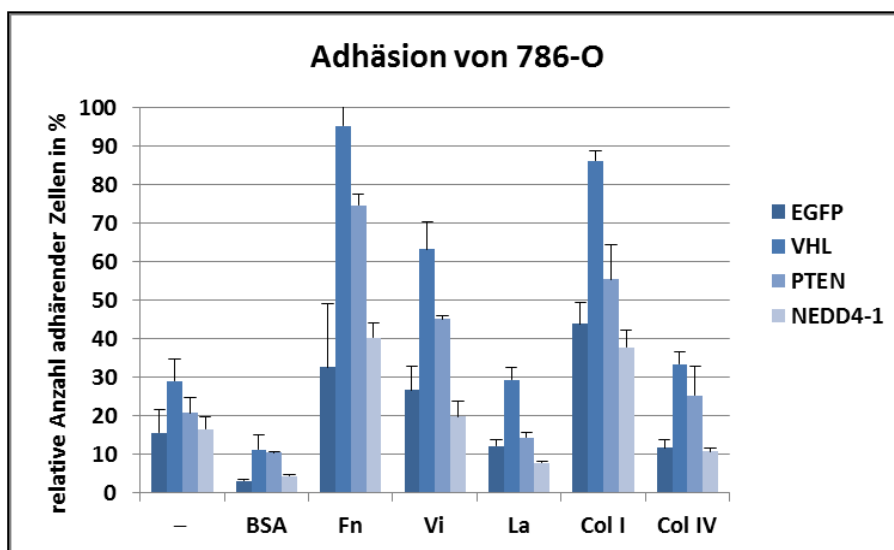


Abb. 3.24 Adhäsion von 786-O Zellen auf verschiedenen ECM-Bestandteilen. Triplets von 786-O Zellen wurden auf unterschiedlichen Untergründen ausplattiert und ihr Adhärenzverhalten in Abhängigkeit von einer erhöhten EGFP-, VHL-, PTEN- oder NEDD4-1-Expression ermittelt. Die Anzahl der adhärenenten Zellen wurde ins Verhältnis zur Plattierungskontrolle gesetzt und in % aufgetragen. — : unbehandelter Zellkulturboden; BSA: *bovine serum albumine*; Fn: Fibronectin; Vi: Vitronectin; La: Laminin; Col I: Collagen I; Col IV: Collagen IV.

Die KTCTL-26A Zelllinie zeigte weniger deutliche Effekte bezüglich des Adhäsionsverhaltens verglichen mit den 786-O-Zellen. Während die KTCTL-26A VHL-Zellen auf unbeschichteten Böden und Laminin deutlich stärker als die Kontrolle KTCTL-26A EGFP adhärten ($p \leq 0,001$), hafteten auf Vitronectin, Collagen I und IV nur wenig mehr VHL-restituierte Zellen verglichen mit den

Kontrollzellen. Die Bindung an Fibronectin und Laminin war sogar seltener als bei KTCTL-26A EGFP. Die VHL-Induktion scheint also in KTCTL-26A keinen eindeutigen Einfluss auf die Adhäsion zu besitzen. Auch für PTEN ergab sich kein eindeutiges Ergebnis. KTCTL-26A PTEN-Zellen wiesen auf unbeschichteten Böden eine verminderte Adhärenz auf ($p \leq 0,05$), während die Bindung an Collagen I ein wenig durch PTEN verstärkt wurde. An die weiteren ECM-Bestandteile Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Collagen IV war die Bindungsaffinität nahezu mit der Kontrolle KTCTL-26A EGFP vergleichbar. Daher scheint die Expression von PTEN in KTCTL-26A keine große Rolle im Prozess der Adhäsion zu spielen. Dies liegt möglicherweise daran, dass die Zellen bereits endogenes PTEN exprimieren und gegebenenfalls Mechanismen verfolgen, die die Menge oder die Funktionalität von PTEN auf einem niedrigen, basalen Level halten. Interessanterweise bewirkt die Überexpression von NEDD4-1 in KTCTL-26A-Zellen auf unbeschichteten Böden, Fibronectin, Laminin und Collagen I eine verminderte Adhäsion. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass verstärkt gebildetes NEDD4-1 als Ubiquitin-Ligase von PTEN den Abbau von endogenem PTEN beschleunigt und so indirekt Einfluss auf die Adhärenz der Zellen nimmt. Die Haftung von KTCTL-26A NEDD4-1 an Vitronectin und Collagen IV war hingegen mit der Kontrolle vergleichbar. Die Bindungsaffinität an die einzelnen ECM-Bestandteile war der von 786-O mit Ausnahme von Vitronectin, welches deutlich schwächer gebunden wurde, ähnlich. Obwohl insgesamt deutlich weniger KTCTL-26A als 786-O-Zellen adhärten, wurde auch hier Fibronectin und Collagen I wesentlich stärker gebunden, wohingegen KTCTL-26A an Vitronectin, Laminin und Collagen I ähnlich schwach wie an die Negativkontrolle BSA anhafteten (Abb. 3.25).

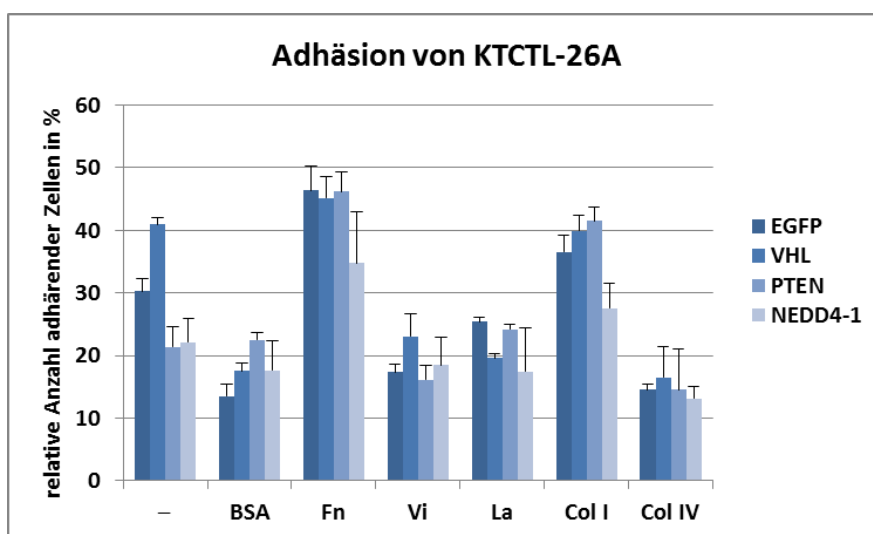


Abb. 3.25 Adhäsion von KTCTL-26A Zellen auf unterschiedlich beschichteten ECM-Untergründen. Es wurden Triplets von KTCTL-26A Zellen auf verschiedenen Beschichtungen plattiert. Die Adhärenz wurde abhängig von einer verstärkten Expression von EGFP, VHL, PTEN oder NEDD4-1 auf dem jeweiligen Untergrund ermittelt, zur Plattierungskontrolle ins Verhältnis gesetzt und in % abgebildet. — : unbeschichteter Zellkulturboden; BSA: *bovine serum albumine*; Fn: Fibronectin; Vi: Vitronectin; La: Laminin; Col I: Collagen I; Col IV: Collagen IV.

3.2.3 Überlebensfähigkeit

Die Überlebensfähigkeit epithelialer Zellen ist unmittelbar von ihrer Interaktion mit ihrer Umwelt abhängig. Verlieren die Zellen den Kontakt zur ECM, sterben sie oft. Diese Abhängigkeit von der Umwelt bewirkt, dass Zellen nur dann überleben und proliferieren können, wenn sie sich in einer

geeigneten Umgebung befinden. Vor der Durchführung des Experiments wurden auch hier die 786-O-Zellen zunächst transduziert. Dafür wurden die Konstrukte pBABE puro als Leerkontrolle, pBABE VHL, pBABE PTEN und pBABE PTEN C124S verwendet. PTEN C124S enthält eine Punktmutation, die sich auf Proteinebene durch einen Aminosäureaustausch von Serin zu Cystein an Position 124 manifestiert. Diese Mutation führt zum vollständigen Verlust der Phosphatase-Aktivität von PTEN. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium auf unbeschichtetem Untergrund, Fibronectin-, Vitronectin- oder Collagen IV-beschichteten Böden ausplattiert und die überlebenden Zellen nach 1 Stunde (Referenzwert) und nach 1, 2, 3 und 6 Tagen ermittelt (Details siehe 2.2.5.6). Auf allen Untergründen hatten 24 Stunden nach der Ausplattierung nur 20-40% der Zellen der unterschiedlichen 786-O-Populationen überlebt. Diese vermehrten sich allerdings bis zum dritten Tag der Untersuchung. An Tag 6 hatte die Lebendzellzahl hingegen wieder deutlich abgenommen. Des Weiteren waren auf allen beschichteten und unbeschichteten Böden zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zu 786-O pBABE, VHL und PTEN C124S am wenigsten lebende 786-O PTEN-Zellen ($p \leq 0,001$ für Tag 1-3 vergl. mit 786-O pBABE) nachweisbar. Da sich die 786-O PTEN C124S-Zellen ähnlich der Kontrolle 786-O pBABE verhielten, kann die PTEN-induzierte Verminderung der Überlebensfähigkeit wahrscheinlich größtenteils auf die PTEN-vermittelte Inhibierung des PI3K- und MAPK/ERK-Signalweges zurückgeführt werden. Die Restitution von VHL in 786-O zeigte im Gegensatz zur erhöhten PTEN-Expression höchstens einen schwach negativen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen. VHL scheint also keine entscheidende Rolle für den Lebenserhalt zu spielen. Interessanterweise waren die Zellpopulationen mit Ausnahme von 786-O PTEN an Tag 3 auf den unbeschichteten Böden (52-56% lebende Zellen) verglichen mit allen beschichteten Untergründen (Fn: 34-42%; Vi: 48-52%; Col IV: 29-33%) am größten. Auch an Tag 6 war die Lebendzellzahl hier deutlich weniger gesunken (45-55%) als auf Fibronectin (23-28%), Vitronectin (31-37%) oder Collagen IV (23-26%). Daher scheint der Karzinom-Zelllinie 786-O die unmittelbare Umgebung, die sie selbst kreiert, zum Überleben zu genügen. Der Kontakt mit Fibronectin, Vitronectin und besonders Collagen IV wirkte sich eher hinderlich auf die Lebendzellzahl aus (Abb. 3.26).

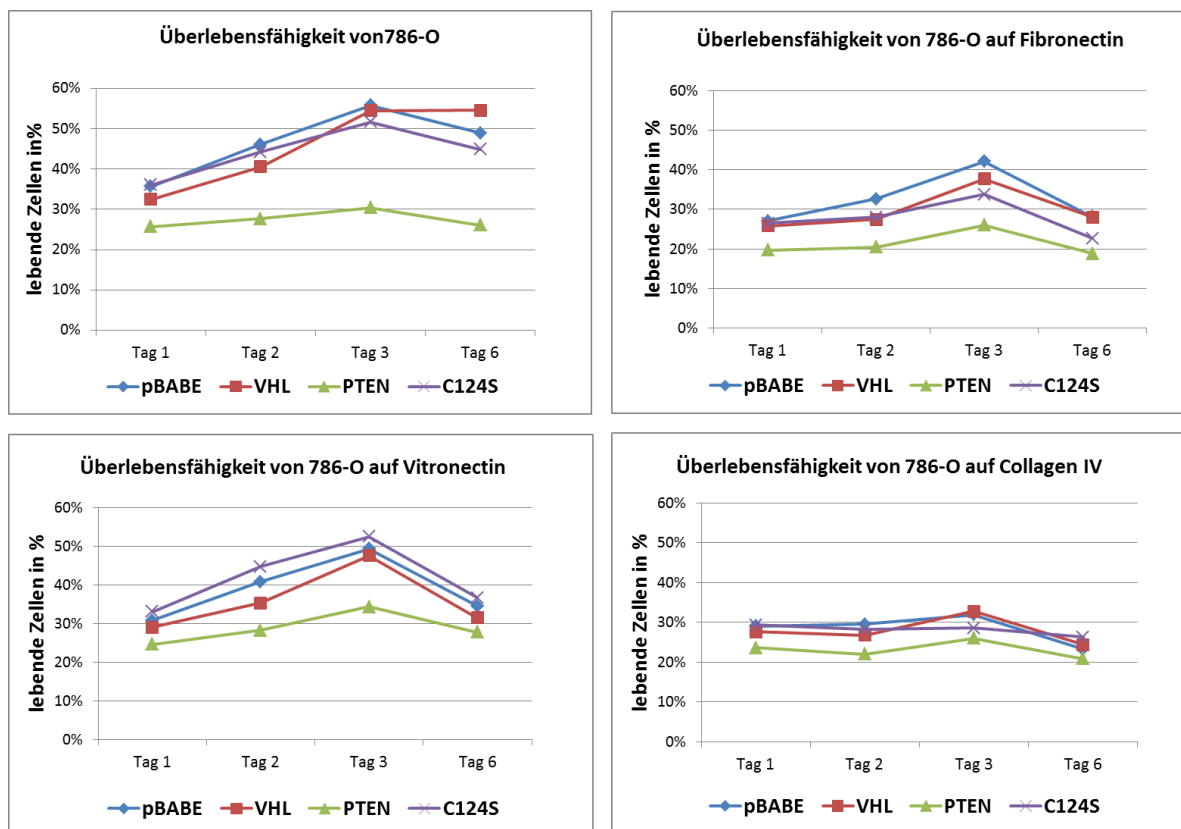


Abb. 3.26 Überlebensfähigkeit von 786-O. 786-O Zellen mit pBABE (Leervektor), VHL, PTEN oder PTEN C124S-Überexpression wurden für jeweils 6 Tage ohne Beschichtung, auf Fibronectin, auf Vitronectin und auf Collagen IV kultiviert. An Tag 1, 2, 3 und 6 wurde die Lebendzellzahl ermittelt, ins Verhältnis zur ursprünglich ausplattierten Zellzahl gesetzt und hier in % aufgetragen.

Um herauszufinden wie essentiell eine Anheftung an einen Untergrund für die Zellen ist, wurde die Anoikis für 786-O und KTCTL-26A ermittelt. Dafür wurden die verschiedenen transduzierten 786-O rotierend in Vollmedium für 12 Tage inkubiert und an Tag 2, 6 und 12 analysiert (Details siehe 2.2.5.7). Bereits nach 2 Tagen waren bei allen 786-O-Populationen fast die Hälfte der Zellen abgestorben (EGFP: 62%; VHL: 55%; PTEN: 52% und PTEN C124S: 56% lebende Zellen). Erstaunlicherweise änderte sich bis zu Tag 12 die Lebendzellzahl von allen Populationen nur noch geringfügig. Die Restitution von VHL oder PTEN bzw. PTEN C124S hatte demnach in 786-O keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen bei Adhäsionsverlust (Abb. 3.27).

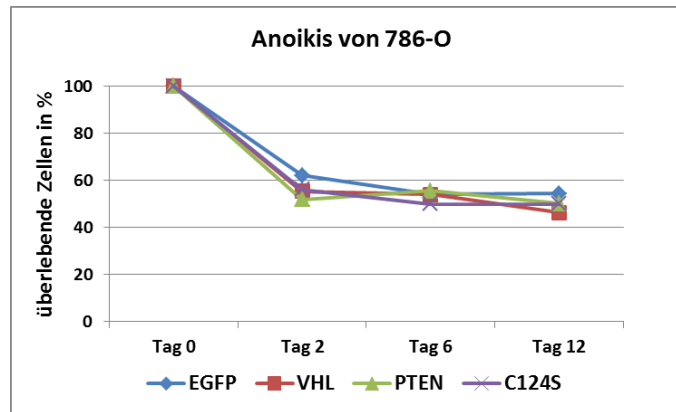


Abb. 3.27 Anoikis von 786-O Zellen. Die Zellen wurden 12 Tage ohne Anheftungsmöglichkeiten in DMEM-Vollmedium inkubiert. Die Anoikis wurde in Abhängigkeit von einer verstärkten Expression von EGFP, VHL, PTEN oder NEDD4-1 ermittelt, zur zu Beginn eingesetzten Zellzahl (Tag 0) ins Verhältnis gesetzt und in % aufgetragen.

Um die Anoikis für KTCTL-26A zu untersuchen, wurden auch hier die Zellen zunächst mit pBABE EGFP, pBABE VHL, pBABE PTEN oder pBABE PTEN C124S transduziert und im Anschluss rotierend, um einer Anheftung der Zellen vorzubeugen, in Vollmedium für 8 Tage inkubiert (Details siehe 2.2.5.7). Die Analyse der Lebendzellzahl fand an Tag 2, 6 und 8 statt. Die KTCTL-26A EGFP-Zellen hielten den erschwerten Lebensbedingungen im Vergleich zu den 786-O Kontrollzellen deutlich besser stand. So waren nach 2 und 6 Tagen noch ca. 65% der Zellen am Leben. Erst an Tag 8 war die Lebendzellzahl auf 48% gesunken. Die Restitution von VHL und die verstärkte Expression von PTEN zeigte in KTCTL-26A eine Wirkung auf die Anoikis. So waren an Tag 2 verglichen mit KTCTL-26A EGFP bereits 25% mehr KTCTL-26A VHL und 14% mehr KTCTL-26A PTEN-Zellen apoptotisch. Der geringere Effekt von PTEN lässt sich möglicherweise auf Kompensationsmechanismen zur PTEN-Überexpression in der bereits ursprünglich PTEN-positiven KTCTL-26A-Zelllinie zurückführen. Erstaunlicherweise zeigte auch PTEN C124S einen negativen Effekt auf das Überleben, denn auch hier hatten bereits an Tag 2 nur 41% der Zellen überlebt. Die Lebendzellzahlen der KTCTL-26A VHL, PTEN und PTEN C124S-Population änderten sich bis Tag 8 nicht mehr gravierend (Abb. 3.28).

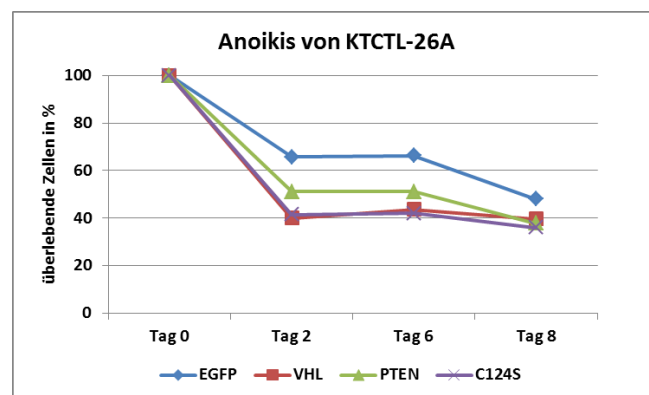


Abb. 3.28 Anoikis von KTCTL-26A. Die Zellen wurden 8 Tage lang ohne die Möglichkeit der Anheftung und des Kontaktes zueinander in DMEM-Vollmedium inkubiert. Die KTCTL-26A Zellen wurden zuvor mit EGFP, VHL, PTEN oder NEDD4-1 transfiziert und die Anoikis in Abhängigkeit zu der erhöhten Expression analysiert. Die ermittelte Zellzahl wurde ins Verhältnis zur ursprünglich eingesetzten Zellzahl gesetzt und in % abgebildet.

3.2.4 Migration

Die Migration wird wie auch die Adhäsion unmittelbar von Zell-Matrix-Interaktionen bestimmt. ECM-Bestandteile induzieren die Kontraktion der Zelle und die Ausbildung von Filopodien (Worthylake und Burridge, 2001). Die Zelle sezerniert Enzyme, u.a. Matrix-Metalloproteasen (MMPs), welche die Bindung an die Matrix reduzieren (Collier *et al.*, 2011). Die Fähigkeit der 786-O-Zellen zur Migration und die Auswirkung der Restitution von VHL und PTEN wurden in einem Chemotaxis-Versuch analysiert. Dieses Experiment wurde von Frau Dipl.-Biol. Elke Schneider durchgeführt. Die Zellen wurden dabei durch eine poröse Polycarbonat-Membran von dem Chemotaxin, hier Fibronectin und Vitronectin, getrennt. Nach einer Inkubation von 16 Stunden wurde ermittelt, wieviele Zellen durch die engen Aussparungen der Membran in die Richtung des Chemotaxins gewandert waren (Details siehe 2.2.5.8). Für beide Chemotaxine war die Tendenz der Bereitschaft zur Migration der verschiedenen transduzierten 786-O-Zellen ähnlich. So wanderten 786-O VHL und 786-O PTEN höchstens halb so viel wie die Kontrollzellen 786-O EGFP oder 786-O NEDD4-1. Es wird also deutlich, dass die Tumorsuppressoren VHL und PTEN die Migration hemmen. Die 786-O NEDD4-1-Zellen migrierten auch im Vergleich zur Kontrolle 786-O EGFP am bereitwilligsten. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass überexprimiertes NEDD4-1 die ohnehin schon geringe basale PTEN-Konzentration weiter erniedrigt und so die PTEN-vermittelte Migrationshemmung vermindert. Schließlich konnte bei der Auszählung ungehemmter Zellen (786-O EGFP und NEDD4-1) beobachtet werden, dass die chemotaktische Wirkung von Vitronectin die von Fibronectin für 786-O noch übersteigt, da 786-O zahlreicher in Richtung Vitronectin als in Richtung Fibronectin wanderten (Abb. 3.29).

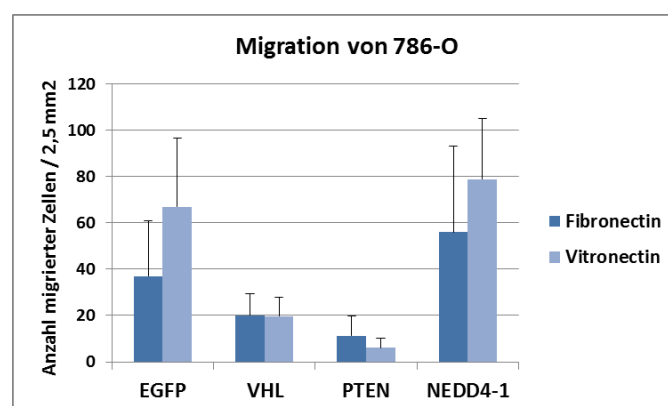


Abb. 3.29 Migration von 786-O Zellen. Die Migrationfähigkeit der EGFP, VHL, PTEN oder NEDD4-1 überexprimierenden 786-O Zellen wurde auf Fibronectin und Vitronectin ausgetestet. Die Anzahl migrierender Zellen pro 2,5 mm² Feld wurde hier abgebildet.

3.2.5 Metastasierung im *in vivo*-Experiment

Die verminderte Adhäsion, verstärkte Migration und erhöhte Überlebensfähigkeit, wie sie hier im Vorfeld für 786-O und KTCTL-26A gezeigt werden konnten, charakterisieren kanzerogen veränderte Zellen. Diese im Lauf der Tumorentstehung erworbenen Eigenschaften bilden neben weiterer Faktoren die Voraussetzung für den Metastasierungsprozess. Für die Nierenkarzinom-Zelllinien 786-O und KTCTL-26A wurde jedoch auch bewiesen, dass die Restitution von VHL bzw. eine verstärkte PTEN-Expression in den Zellen wieder eine höhere Tendenz zur Ausprägung des ursprünglicheren,

epithelialen Phänotyps bewirkte. Im Folgenden sollte nun die Fähigkeit von 786-O und KTCTL-26A zur Metastasierung *in vivo* untersucht werden und die Frage geklärt werden, ob auch im Organismus die erhöhte VHL- bzw. PTEN-Expression die Zellen in der Gesamtheit ihrer Eigenschaften so verändert, dass der Metastasierungsprozess unterbunden werden kann. Zu diesem Zweck wurden 8 Wochen alte, immunsupprimierte NOD/ SCID^{-/-} Mäuse gezüchtet und diesen anschließend 786-O oder KTCTL-26A-Zellen, die zuvor mit EGFP, VHL, PTEN oder NEDD4-1 transduziert wurden, in die Schwanzvene injiziert. Pro Ansatz wurden 4 Mäuse in den Versuch genommen. Nach 5 Wochen wurden die Lungen der Tiere präpariert und analysiert (Details siehe 2.2.6.5).

3.2.5.1 Makroskopische Beobachtungen

Zum Zeitpunkt der Präparation wiesen die Mäuse keinerlei morphologische oder Verhaltens-Auffälligkeiten auf. Auch die Organe der Bauchhöhle wirkten gesund und funktionsfähig. Bei der Entnahme der Lungen wurden hingegen größere Unterschiede bezüglich des Erhaltungszustandes deutlich. Zwei von 4 Lungen der Mäuse, denen 786-O EGFP injiziert wurde, zeigten deutliche Verfärbungen und Oberflächen-Unebenheiten. Auch die Lungen einer 786-O VHL-Maus und von zwei 786-O NEDD4-1-Mäusen wiesen leichte Verfärbungen auf, während bei den Lungen der Mäuse, die 786-O PTEN ins Blut gespritzt bekamen, keinerlei Schädigungen erkennbar waren. Die Lungen der Tiere, die mit KTCTL-26A VHL bzw. PTEN vorbehandelt wurden, zeigten keine Auffälligkeiten. Zwei Lungen wiesen deutliche Verfärbungen (1x KTCTL-26A EGFP, 1x KTCTL-26A NEDD4-1) und die Lunge einer Maus, der KTCTL-26A NEDD4-1 injiziert wurde, war sehr stark betroffen. Ihre Oberfläche war stark zerfurcht und gräulich verfärbt (Abb. 3.30).

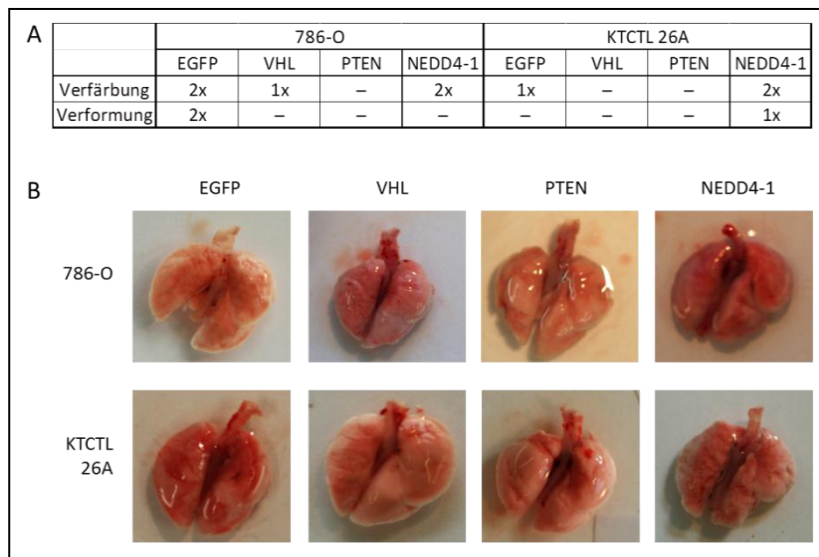


Abb. 3.30 Makroskopisch sichtbare Veränderungen frisch präparierter Lungen von NOD/SCID^{-/-}-Mäusen. Den Mäusen wurde 8 Wochen vor der Präparation 1 Million 786-O bzw. KTCTL-26A-Zellen, die zuvor mit den Plasmiden pBABE puro, pBABE VHL, pBABE PTEN oder pBABE NEDD4-1 retroviral transfiziert wurden, in die Schwanzvene injiziert. Es wurden je Transgen 4 Mäuse in den Versuch genommen. Makroskopisch waren tendenziell strukturelle und farbliche Veränderungen der Lungenoberfläche der Mäuse sichtbar, die wildtypisch oder mit pBABE NEDD4-1 beider Zelllinien behandelt wurden. Die Beobachtungen wurden tabellarisch zusammengefasst (A) und exemplarisch fotografisch dargestellt (B).

3.2.5.2 Mikrosatelliten-Analyse

Um eine genauere Abschätzung der Anzahl der 786-O und KTCTL26A Metastasen vornehmen zu können, wurde die Menge an humanen Zellen im murinen Lungengewebe analysiert. Dafür wurde jeweils aus einem 3 x 3 mm großen Gewebestück DNA isoliert (Details siehe 2.2.1.2) und eine spezifische qPCR auf ein 226 bp großes Fragment der α -Satelliten-Region des humanen Chromosoms 17 durchgeführt (Details siehe 2.2.1.11). Die Daten wurden anschließend mit einer Standardkurve, welche durch eine Verdünnungsreihe von humanen Zellen in NIH3T3-Mausfibroblasten generiert wurde, verglichen, quantifiziert und so das relative Metastasierungspotential ermittelt.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Restitution von VHL bzw. die Überexpression sowohl in 786-O als auch in KTCTL-26A einen deutlich inhibierenden Effekt auf den Metastasierungsprozess hat. Es wurden deutlich weniger 786-O VHL und 786-O PTEN-Zellen verglichen mit 786-O EGFP im Lungengewebe nachgewiesen. PTEN scheint sogar einen noch deutlicheren Einfluss auf die Metastasierung als VHL zu haben, da für 786-O PTEN die wenigsten humanen Zellen ermittelt wurden. Die Analyse von 786-O NEDD4-1 ergab hingegen ähnliche Werte wie für die Kontrolle 786-O EGFP. Auch in KTCTL-26A senkte die erhöhte Expression von VHL bzw. PTEN das Metastasierungspotential der Zellen sichtbar. PTEN hatte jedoch hier einen weniger starken Effekt als VHL, was womöglich daran liegt, dass KTCTL-26A die basale PTEN-Expression und gegebenenfalls die Menge an aktivem PTEN herabregulieren könnte. Das größte Metastasierungspotential zeigten die KTCTL-26A NEDD4-1 Zellen, von denen noch deutlich mehr im Gewebe nachgewiesen werden konnten als von den Kontrollzellen. Nedd4-1 bewirkt also möglicherweise eine Erniedrigung des basalen PTEN-Levels in der Zelle (Abb. 3.31).

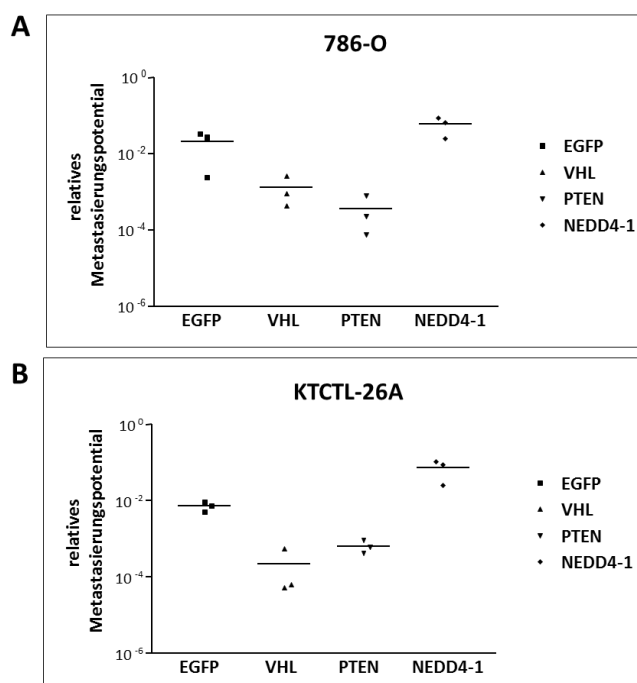


Abb. 3.31 Relatives Metastasierungspotential von 786-O (A) und KTCTL-26A (B). Die Karzinomzellen wurden durch eine Mikrosatelliten-Analyse auffindig gemacht, bei der die relative Menge humaner Zellen im Lungengewebe der NOD / SCID^{-/-} Mäuse ermittelt wurde. Hier wurde das relative Metastasierungspotential von je 3 Ansätzen der mit pBAGE EGFP, VHL, PTEN oder NEDD4-1 transduzierten Tumorzellen gegeneinander aufgetragen.

3.3 VHL und PTEN wirken in der Tumorentstehung und -progression zusammen

In vorangegangenen Analysen wurde gezeigt, dass VHL auf die Expression bzw. die Stabilisierung von PTEN einwirkt (Details siehe 3.1). Dies führte zu der Hypothese, dass die Inaktivierung von VHL und PTEN auch *in vivo* bei der Tumorentstehung interagieren könnten. Bekanntermaßen ist der Verlust der VHL-Funktion mit der Entstehung von klarzelligem Nierenkarzinom und Phäochromozytomen assoziiert (Maher *et al.*, 1997). Bisher konnte jedoch noch kein *Vhl*-defizientes *in vivo*-Modell generiert werden, welches die Entstehung von Nierenkrebs zur Folge hatte, so dass vermutlich mindestens eine weitere Mutation für die Tumorentstehung benötigt wird. Des Weiteren wurde bereits nachgewiesen, dass Phäochromozytome nicht nur bei einer VHL-Defizienz auftreten, sondern auch zum Spektrum der PTEN-defizienten Tumore zählen (Nederveen *et al.*, 2006). Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurden in der vorliegenden Arbeit diverse *Vhl*- und *Pten*-defiziente *in vivo*-Mausmodelle generiert, um das Zusammenwirken des Verlustes beider Tumorsuppressoren in der Tumorentstehung und -progression zu untersuchen. Hierfür wurde zunächst die Inzidenz verschiedener Tumorerkrankungen ermittelt und schließlich der Fokus auf die Analyse von Nierenzysten und Phäochromozytomen gelegt.

3.3.1 Generierung von *compound Vhl/Pten*-defizienten Mausmodellen

Für die Generierung von Mäusen mit verminderter *Vhl*- und *Pten*-Expression wurde das *Cre LoxP*-System zur Hilfe genommen (Details siehe 2.1.11). Um das *Cre LoxP*-System kontrolliert einsetzen zu können, wird die Expression der *Cre*-Rekombinase zunächst strikt von dem zu exzidierenden, mit *loxP*-Stellen flankierten Genbereich getrennt. Daher werden Effektorstämme gezüchtet, welche lediglich das *Cre*-Transgen tragen und exprimieren. Die sogenannten Responderstämme tragen hingegen ein oder mehrere endogene DNA-Abschnitte, die durch *loxP*-Stellen begrenzt werden. Die Verkreuzung eines Effektorstammes mit Responderstämmen führt in der F1-Generation zu Tieren, welche sowohl *Cre* als auch die *loxP*-flankierten DNA-Sequenzen tragen, die bei einer Expression von *Cre* deletiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein *Pten*-Responderstamm und drei verschiedene *Vhl*-Responderstämme verwendet. Der *Pten*-knockout (PT)-Stamm weist im gesamten Genom das Exon 3 bis 5 des *Pten*-Gens mit *loxP sites* flankiert auf (Suzuki *et al.*, 2001). Die Excision dieses Bereiches bewirkt die Expression eines funktionsunfähigen Proteins und somit den *Knockout* von *Pten*. Die Responderstämme mit *Vhl*-Mutationen wurden so gewählt, dass sowohl das *Vhl*-Syndrom des *Vhl*-Typs 1 als auch des *Vhl*-Typs 2 (V2B und V2C) simuliert werden konnte. Als *Vhl* Typ 1-Modell wurde ein *VHLh* (*von Hippel-Lindau syndrome homolog*)-*Knockout* (V1KO)-Stamm verwendet, bei dem der Promotorbereich und das Exon 1 des *Vhl*-Gens durch *loxP*-Stellen flankiert ist (Haase *et al.*, 2001). Die *Cre*-vermittelte Deletion dieses Bereiches macht die Expression von *Vhl* unmöglich und führt zum vollständigen Funktionsverlust (ko) von *Vhl*. Als Typ 2-Stämme wurden zwei *VHLh-Knockin*-Stämme verwendet, die ubiquitär Punktmutationen im Exon 3 des *Vhl*-Gens tragen. Die *Vhl*-2B (V2B)-Mauslinie ist 398G→A (713G→A) mutiert, der *Vhl*-2C (V2C)-Stamm enthält die Mutationen 460T→G (775T→G) und 462G→C (777G→C). Die Typ 2 *Vhlh-Knockin*-Linien unterscheiden sich somit vom konditionalen, *Cre-Rekombinase* induzierten V1KO Responderstamm, da sie direkt exprimierbare, pathophysiologisch relevante *Vhlh*-Varianten im Tier repräsentieren. Als Effektorstamm diente die Linie *Actin-Cre* (AC), die ubiquitär das Transgen *Cre*

unter der Kontrolle des Aktin-Promotors trägt (Lewandowsky *et al.*, 1997), welcher die Expression von *Cre* in allen Zellen ab dem Blastozystenstadium und späteren Geweben induziert (Abb. 3.32).

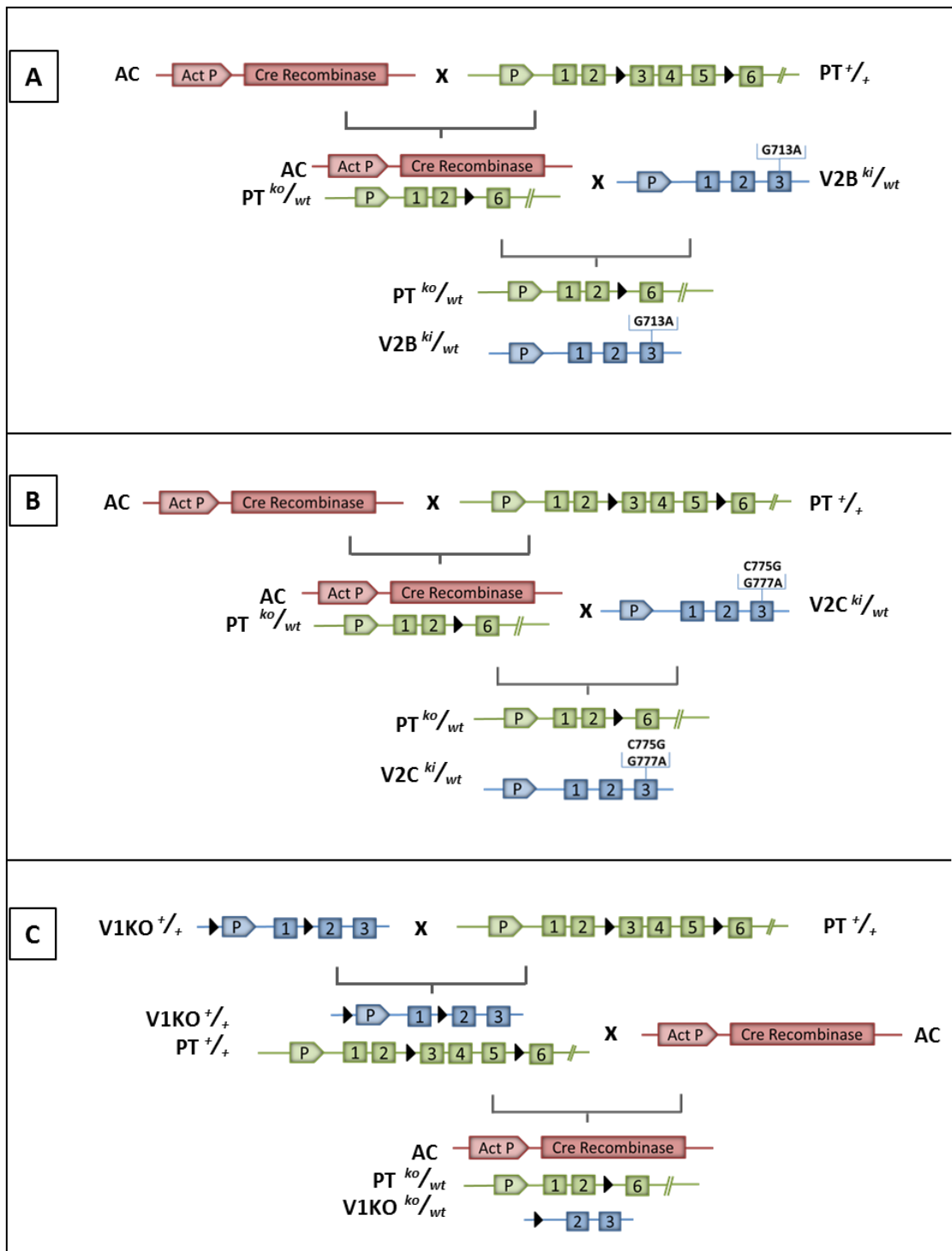


Abb. 3.32 Verpaarungsstrategien. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei *Pten* / *Vhl*-defiziente Mauslinien generiert. Dafür wurde zunächst der Effektorstamm Actin-Cre (AC) mit der PT-Linie verpaart. Die Tiere der F1-Generation, die einen AC-induzierten *Pten* *Knockout* (*ko*) trugen, wurden im Anschluss mit V2B- oder V2C-*Knockin* (*ki*)-Tieren verkreuzt (A, B). In einem dritten Ansatz wurden Tiere des PT und V1KO-Stammes verpaart. Die doppeltransgenen Nachkommen wurden dann mit der AC-Linie verkreuzt, so dass schließlich Mäuse mit heterozygotem V1KO / PT-*Knockout* entstanden (C). Die Verpaarungen wurden so angesetzt, dass auch alle Varianten von *single*-transgenen Mäusen generiert wurden, welche zur Kontrolle dienten.

Für die Cre-vermittelte Inaktivierung von *Pten* und *Vhl* wurden zunächst Responder-Mäuse des Genotyps $PT^{+/-}V1KO^{+/-}$ mit Effektor-Mäusen der AC-Linie verkreuzt (Abb. 3.32C). Zusätzlich wurden $PT^{+/-}$ Tiere separat mit AC-Tieren verpaart und anschließend die *Pten*-defizienten Nachkommen mit Mäusen einer der beiden *Vhl*-Typ 2 V2B- bzw. V2C-Stämme gekreuzt (Abb. 3.32A+B). Dadurch konnten Mäuse der Genotypen AC $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$, (AC) $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und (AC) $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ generiert werden. Die Verpaarungen wurden außerdem so gewählt, dass neben den *compound* Linien auch Tiere mit den Genotypen (AC) $PT^{ko/wt}$, $V2B^{ki/wt}$, $V2C^{ki/wt}$ in der F1-Generation nachzuweisen waren. Diese wurden entsprechend der *compound* Tiere analysiert, um Rückschlüsse auf den Anteil der einzelnen Tumorsuppressoren auf die Ausbildung des Phänotyps ziehen zu können.

3.3.2 Phänotyp-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten

Um die gewünschten Genotypen zu erzielen, wurden heterozygote Mäuse für $PT^{ko/wt}$, $V2B^{ki/wt}$ und $V2C^{ki/wt}$ miteinander verpaart. Dies sollte gewährleisten, dass in der F1-Generation alle möglichen Genotypen nach der 2. Mendelschen Regel (Spaltungsregel) in einem 1:2:1 Verhältnis auftraten. Die Mäuse, die nach Mendel einen AC-induzierten vollständigen ubiquitären *Pten*-Verlust besaßen, waren jedoch nicht nachweisbar und somit homozygot nicht lebensfähig. Die Letalität von homozygoten Mausembryonen, hervorgerufen durch eine vollständige Inaktivierung von *Pten*, wurde bereits für mehrere *Pten*-Mausmodelle beschrieben (Di Cristofano *et al.*, 1998; Podsypanina *et al.*, 1999). Von 180 analysierten Tieren wiesen 120 Mäuse einen heterozygoten *Pten* *Lox-out* auf und 60 Mäuse zeigten den Wildtyp von *Pten* (0:2:1 Verhältnis). Auch die Verpaarung von heterozygoten V2B-Mäusen brachte keine homozygoten Nachkommen hervor. Von 89 Tieren in der F1-Generation zeigten 79 Mäuse den $V2B^{ki/wt}$ -Genotyp und 10 Mäuse besaßen zwei wildtypische *Vhl*-Allele. Interessanterweise scheint hier eine Verschiebung des Mendelschen Verhältnis in Richtung des heterozygoten Genotyps stattzufinden (0:8:1 Verhältnis). Einzig der V2C-Phänotyp ist homozygot lebensfähig. Von 116 analysierten Tieren waren 5 Tiere V2C-homozygot, 75 Tiere heterozygot für V2C und 36 Tiere besaßen den *Vhl*-Wildtyp. Obwohl die $V2C^{ko/ko}$ Tiere phänotypisch unauffällig waren, waren deutlich weniger homozygote Mäuse in der F1-Generation zu finden als nach den Mendelschen Gesetzen zu erwarten gewesen wäre. Das Verhältnis von heterozygoten V2C-Mäusen und *Vhl*-Wildtyp-Nachkommen war hingegen ausgewogen (1:15:7 Verhältnis). Für den Genotyp V1KO war bereits in Vorversuchen ausgeschlossen worden, dass homozygote $V1KO^{ko/ko}$ -Tiere, bei denen durch eine Verkreuzung mit AC die *Vhl*-Expression vollständig inhibiert wird, lebensfähig sind. Bereits 1997 zeigten J.R. Gnarra und seine Mitarbeiter, dass *Vhl*-defiziente Mausembryonen zwischen Tag 10.5 und 12.5 letal sind (Gnarra *et al.*, 1997). Aus diesem Grund wurden die V1KO-Tiere im vorliegenden Experiment anderweitig verpaart, um den gewünschten heterozygoten Genotyp zügiger zu generieren (AC $PT^{ko/wt} \times V1KO^{+/-}$). Die in der F1-Generation auftretenden Genotypen wirkten sich nicht auf das Geschlechterverhältnis der Mäuse aus.

Die Mäuse wurden im Alter von 3 bis 12 Monaten präpariert. Dabei wurden zunächst zu jedem Zeitpunkt ca. gleich viele Mäuse analysiert, um die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen vergleichen zu können. Da jedoch phänotypische Veränderungen erst ab einem Lebensalter von 9 Monaten auftraten, wurden anschließend doppelt so viele Tiere im Alter von 9-12 Monaten wie in den früheren Lebensabschnitten untersucht. Eine Ausnahme bildeten dabei jedoch die Gruppen der Tiere

des Genotyps $V1KO^{ko/wt}$ und $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$. Hier konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige Mäuse untersucht werden, da aufgrund der Verpaarungsstrategien in der F1-Generation nur selten Mäuse mit den gewünschten Genotypen auftraten. Nachdem die Tiere getötet wurden, wurde die Bauchhöhle geöffnet und die Organe untersucht. Anschließend wurden die Nieren und Nebennieren entnommen, gewogen und konserviert. Die Mäuse der Genotypen $V2B^{ki/wt}$, $V2C^{ki/wt}$ und $V1KO^{ko/wt}$ wiesen wie auch wildtypische Mäuse nur sehr selten Organveränderungen auf, so dass man hier von altersbedingt zufälligen und Genotyp-unabhängigen Tumorerkrankungen ausgehen kann. Demzufolge ist eine heterozygote Veränderung des *Vhl*-Gens wahrscheinlich nicht ausreichend, um Tumore zu induzieren (Abb. 3.33). Im Gegensatz dazu zeigten die $PT^{ko/wt}$ -Mäuse eine große Variation der Tumore. So wurden neben Lymphomen, Ovarialkarzinomen und Nierenzysten in einem Drittel der Tiere Phäochromozytome (PCCs) nachgewiesen. Dieses Tumorspektrum war auch in allen *compound Knockout/Knockin*-Tieren, welche neben einem heterozygoten *Pten* *Lox-out* eine Mutation in einem *Vhl*-Allel trugen, vertreten. Die einzige Ausnahme bildeten die $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$ -Tiere, die zumindest in den bereits analysierten frühen Lebensstadien keine Tumore in den Nebennieren aufwiesen. Im Vergleich zu den *single*-transgenen $PT^{ko/wt}$ -Tieren wurde bei den Mäusen mit den Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ eine etwas höhere Inzidenz zur Ausprägung von Nierenzysten und PCCs deutlich (Abb. 3.33).

A

	Niere Zyste	PCC	Lymphom	Ovar Tu	Leber Tu
$PT^{ko/wt} V2B^{ki/wt}$ (n=43)	3	19	2	1	0
$PT^{ko/wt} V2C^{ki/wt}$ (n=55)	1	20	2	1	0
$PT^{ko/wt} V1KO^{ko/wt}$ (n=8)	1	0	2	1	1
$PT^{ko/wt}$ (n=67)	2	22	4	3	0
$V2B^{ki/wt}$ (n=53)	0	0	0	0	0
$V2C^{ki/wt}$ (n=55)	1	1	0	0	1
$V1KO^{ko/wt}$ (n=19)	0	0	0	0	0
wt (n=63)	0	0	0	0	1

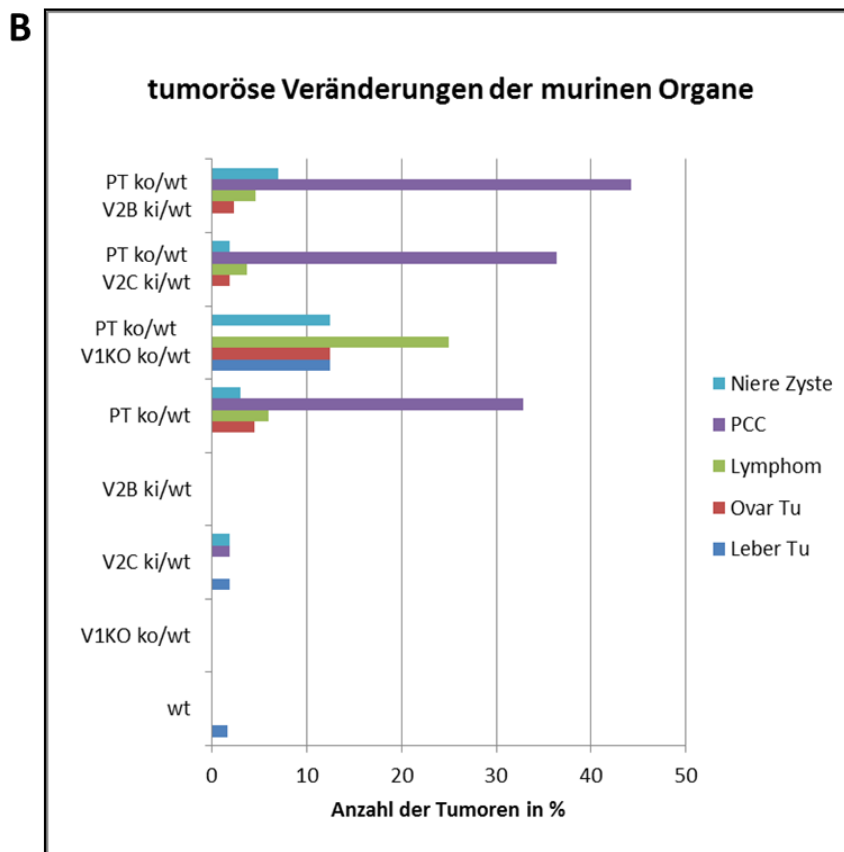


Abb. 3.33 Tumoröse Veränderungen der Mausorgane. Die analysierten Mäuse wiesen ein Tumorspektrum von renalen Zysten und Phäochromozytomen über Lymphome und Ovarialkarzinome bis hin zu Lebertumoren auf. Während Mäuse mit heterozygoter *Vhl*-Mutation allein nur sehr sporadisch Tumore entwickelten, zeigten Mäuse mit heterozygotem *Pten* *Lox-out* eine erhöhte Prävalenz für Nierenzysten, PCCs, Lymphome und Ovarialkarzinome. Eine zusätzliche *V2B*- oder *V2C*-Mutation erhöhte die Anzahl der PCCs und der Zysten in der Niere. Die Lebertumore traten eher zufällig auf. **A** zeigt die Häufigkeit der verschiedenen Tumore für jeden untersuchten Genotyp tabellarisch. **B** verdeutlicht die Daten durch eine prozentuale Darstellung der Tumoranzahl in Abhängigkeit zur Menge der präparierten Mäuse für jeden Genotyp. PCC: Phäochromozytom, Ovar Tu: Ovarialkarzinom, Leber Tu: Lebertumor, n: Anzahl der analysierten Tiere.

Da Lymphome und Ovarialkarzinome als Folge von *Pten*-Mutationen bereits hinreichend beschrieben wurden und die Lebertumore eher zufällig entstanden, wurden im weiteren Verlauf lediglich die Nieren und Nebennieren der Mäuse weiter analysiert. Innerhalb der ersten 9 Monate entwickelten sich keine makroskopisch erkennbaren Nierentumore. Zwischen dem 9. und 12. Lebensmonat konnten jedoch vereinzelt Nierenzysten dokumentiert werden. Dabei entstanden diese immer nur in einer der beiden Nieren, während die zweite Niere unauffällig war. Auch das Geschlecht der Tiere hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Entwicklung der Zysten. Der genaue Zeitpunkt der Entstehung der zystischen Nieren in Abhängigkeit vom Genotyp der Mäuse kann Abbildung 3.34 entnommen werden. Auch die Nebennieren wiesen bei allen untersuchten Mäusen bis zum 9. Lebensmonat keinerlei Veränderungen auf. Zwischen dem 9. und 12. Monat konnten in Mäusen der Genotypen $PT^{ko/wt}$, $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ zunehmend Nebennieren-Tumore nachgewiesen werden. Die PCCs traten meist bilateral auf. Während für die $PT^{ko/wt}$ -Mäuse eine annähernd gleichbleibende Entstehungsrate der PCCs über die Monate verzeichnet werden konnte, zeigten die $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Tiere eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Ausprägung eines Nebennierentumors je älter die Mäuse wurden. Besonders für den Genotyp $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ konnte dokumentiert werden, dass die Tiere zwar erst mit 11 Monaten die ersten Tumore in den Nebennieren entwickelten, jedoch dann die höchste Inzidenz für PCCs aufwiesen (Abb. 3.34).

A zystische Nieren

	0-9 Mo	9 Mo	10 Mo	11 Mo	12 Mo
$PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$	0	2	0	0	1
$PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$	0	0	0	1	0
$PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$	0	0	0	0	1
$PT^{ko/wt}$	0	1	1	0	0

B Phäochromozytome (PCCs)

	0-9 Mo	9 Mo	10 Mo	11 Mo	12 Mo
$PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$	0	0	0	4	12
$PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$	0	2	3	4	7
$PT^{ko/wt}$	0	5	2	1	7

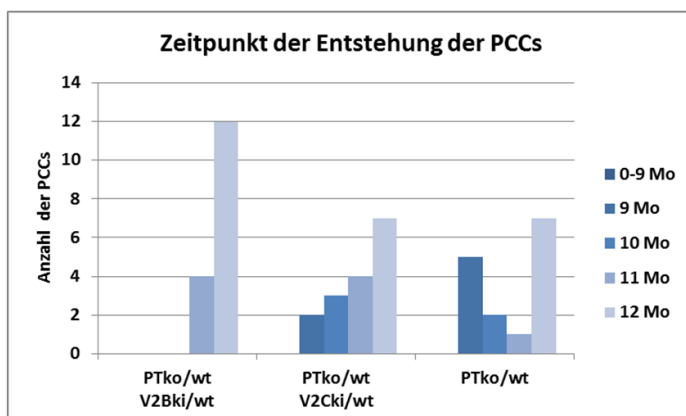


Abb. 3.34 Zeitpunkt der Entstehung der zystischen Nieren und PCCs. **A** Die Ausprägung der Nieren war unabhängig vom Genotyp bis zum 9. Lebensmonat unauffällig. Innerhalb des 9. bis 12. Monats waren sporadisch zystische Nieren bei Tieren der Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$, $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$, $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$ und $PT^{ko/wt}$ nachweisbar. **B** Die Nebennieren der Mäuse zeigten ebenfalls erst ab dem 9. Lebensmonat Auffälligkeiten. Obwohl $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ -Mäuse erst mit 11 Monaten die ersten PCCs entwickelten, wiesen diese die höchste Inzidenz auf. Tiere mit $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Hintergrund zeigten ab 9 Monaten eine stetig ansteigende PCC-Rate. $PT^{ko/wt}$ -Mäuse bildeten verglichen mit den anderen Genotypen in der Altersgruppe von 9 Monaten die meisten PCCs. Dennoch erhöhte sich die Anzahl der PCCs in den folgenden Monaten nicht so stark wie in den *compound Knockout/Knockin*-Linien.

Weiterhin wurden die Größe und Morphologie der Nieren bzw. Nebennieren verglichen. Unabhängig vom Genotyp wurde deutlich, dass die Größe bzw. das Gewicht der Nieren je nach Größe, Alter und Geschlecht der Mäuse variierten. Des Weiteren waren die Nieren der Männchen im Durchschnitt größer und mit 30% höherem Gewicht signifikant schwerer als die der Weibchen (MW ♀ 207,5 mg; MW ♂ 297,0 mg; $p \leq 0,001$). Außerdem wurde sichtbar, dass alle Tiere, die einen heterozygoten *Pten* *Lox-out* besaßen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich größere Nieren besaßen. So waren die Nieren der $PT^{ko/wt}$ -Mäuse auch durchschnittlich 16% schwerer als die Nieren der Wildtyp-Tiere (MW $PT^{ko/wt}$ 270,9 mg; MW $PT^{wt/wt}$ 228,1 mg; $p \leq 0,12$). Die Form und Farbe der Nieren war relativ einheitlich mit Ausnahme der einzelnen zystischen Nieren. Diese Nieren wirkten aufgebläht und durch die flüssigkeitsgefüllten Zysten durchscheinend. Exemplarisch ist in Abbildung 3.35 A fotografisch jeweils ein Nierenpaar pro Genotyp dargestellt. Auch die Größe der Nebennieren nahm mit höherem Alter und der Größe der Tiere leicht zu. Im Gegensatz zu den Nieren war hier zu beobachten, dass die Nebennieren der gesunden Weibchen größer und durchschnittlich 35% schwerer als die der Männchen waren (MW ♀ 4,8 mg; MW ♂ 3,1 mg; $p \leq 0,57$). Die Form und Farbe der gesunden Nebennieren variierte kaum. Die Farbe der PCCs hingegen war meist dunkler und rötlicher, teilweise waren auch hellere und dunklere Bereiche in einem Organ sichtbar. Je größer die PCCs waren, desto eher nahmen sie eine kugelige Form an (Abb. 3.35 A). Die PCCs, welche $PT^{ko/wt}$ -Mäusen entnommen wurden, waren meist zwischen 20 und 50 mg schwer, während die Tiere mit *Pten* *Lox-out* und einer $V2B^{ki/wt}$ -bzw. $V2C^{ki/wt}$ -Mutation auch deutlich größere und schwerere PCCs ausbildeten. Die zusätzliche VHL-Punktmutation scheint also einen zusätzlichen fördernden Effekt auf die Entstehung von PCCs zu haben (Abb. 3.35B+C).

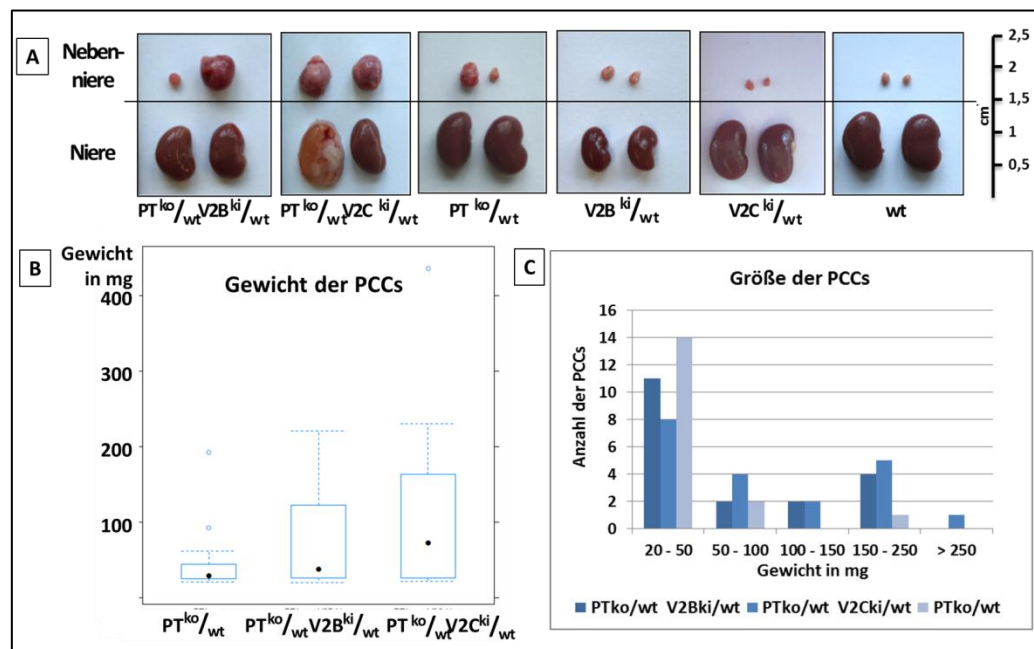


Abb. 3.35 Morphologie der Nieren und Nebennieren. A Fotos der entnommenen Organe. Hier wurden exemplarisch die Nieren und Nebennieren einer Maus jeden Genotyps aufgeführt. Die Tiere wurden mit Ausnahme der $PT^{ko/wt}$ -Maus, welche bereits nach 9 Monaten analysiert wurde, nach 11 bzw. 12 Monaten präpariert. Die Nebennieren der Mäuse der Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$, $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}$ weisen PCCs unterschiedlicher Entwicklungsstadien auf. Die $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Maus entwickelte zusätzlich eine Zyste, die fast die gesamte Niere umfasste. B Varianz der Größe der PCCs von Mäusen der Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$, $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}$. C Korrelation der Häufigkeit der entstehenden PCCs und ihrer Größe für Mäuse der Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$, $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}$. Es wird deutlich, dass ein heterozygoter *Pten*-Verlust ausreicht, um einen Nebennierentumor zu induzieren. Eine zusätzliche *Knockin*-Mutation in VHL bewirkt jedoch die Ausprägung größerer PCCs und scheint somit das Tumorwachstum zu verstärken.

3.3.3 Untersuchung der Nieren

Im weiteren Verlauf wurden die murinen Nieren näher analysiert. Dafür wurde zunächst der Genotyp der Nieren überprüft, um sicherzustellen, dass die bereits in der Schwanzspitze nachgewiesenen genetischen Veränderungen auch in den Zielorganen stattgefunden hatten. Anschließend wurden H/E-Färbungen der Nieren durchgeführt, um gegebenenfalls entwickelte Zysten oder Tumorgewebe zu dokumentieren. Mit Hilfe der Sequenzierung, Immunhistochemie und *Western Blot*-Analysen sollte dann die Expression der veränderten Gene und der nachgeschalteten Signalwege untersucht werden.

3.3.3.1 Genotypisierung

Um herauszufinden, ob der durch Actin-Cre (AC) vermittelte Gen-*Lox-out* in PT- und V1KO-Linien wie vermutet ubiquitär ist, wurde DNA aus einem 2 x 2 mm großen Gewebestücks der Niere isoliert (Details siehe 2.2.1.2) und als *template* in die folgenden Genotypisierungs-PCRs (Details siehe 2.2.1.10) eingesetzt. Dabei wurde zunächst AC der Effektorlinie nachgewiesen (Abb. 3.36A), die neben der Positivbande keine Wildtyp-Bande erzeugt, da die Cre-Rekombinase ein bakterielles Protein ist und somit in murinen Geweben nicht endogen gebildet wird. Anschließend wurde der *Lox-out* von *Pten* und *Vhl* überprüft. Dafür wurde zuerst eine *Lox-out*-PCR durchgeführt, welche nur dann ein Produkt bildete, wenn der *Lox-out* stattgefunden hatte, jedoch keine Aussage über eine homo- oder heterozygote Expression zuließ. Deshalb wurde anschließend eine weitere PCR mit PT bzw. V1KO als Zielgen durchgeführt, bei der das Wildtyp-Gen bzw. die *flox*-Variante des Gens nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.36B,C). Wie schon bei der Genotypisierung der Mäuse mittels DNA aus der Schwanzspitze wurde hier nochmals bestätigt, dass nur Tiere mit dem Verlust eines der beiden Allele für *Pten* bzw. *Vhl* lebensfähig sind. Ein zusätzlicher spontaner Verlust des zweiten Allels konnte auch lokal in der Niere nie festgestellt werden, wohingegen der heterozygote *Lox-out* immer vollständig stattgefunden hatte. Schließlich wurde auch die korrekte VHL Typ 2-Mutation nochmals überprüft. Dafür wurde das *Vhl*-Gen mittels einer PCR amplifiziert (Details siehe 2.2.1.10), das Produkt gefällt (Details siehe 2.2.1.5) und restringiert (Details siehe 2.2.1.6). Durch die Integration der V2B-Punktmutation ergab sich eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bsg* I, die V2C-Variante enthielt eine zusätzliche Schnittstelle für *Bsa*HI. Demzufolge gab die erfolgte Restriktion Auskunft über das Vorhandenseins der *Vhl*-Punktmutationen im Genom und deren homo- oder heterozygote Ausprägung. Auch hier bestätigten sich stets die Ergebnisse der Genotypisierung des Schwanzgewebes (Abb. 3.36D).

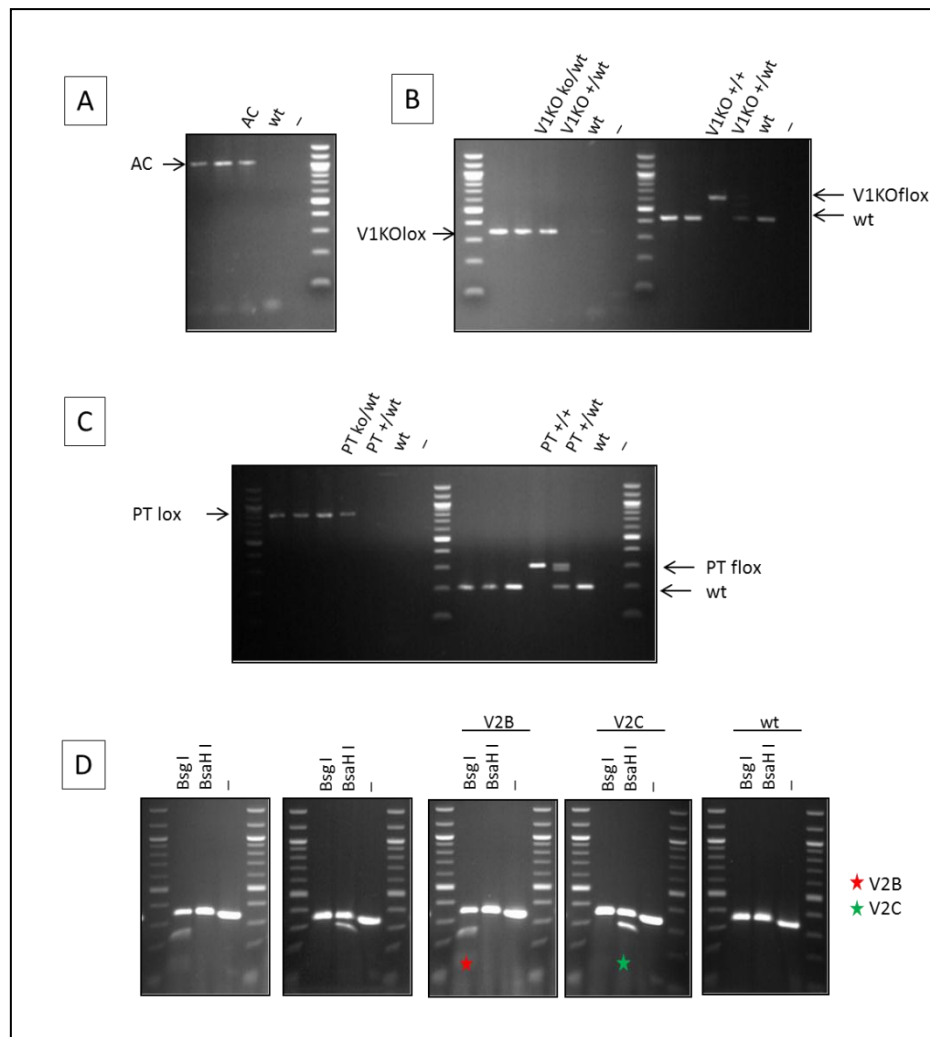


Abb. 3.36 Genotypisierung der Nieren. Die Genotypisierung wurde mittels PCR mit der aus den Nieren isolierten DNA als *template* durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass das Transgen Actin-Cre (AC) spezifisch nachgewiesen werden konnte (A). Der heterozygote Verlust von *Vhl* und *Pten* wurde zunächst durch eine PCR überprüft, bei der nur ein Produkt entsteht, wenn der *Lox-out* (*Knockout*, ko) stattgefunden hat. Anschließend wurde die Vollständigkeit des *Lox-outs* untersucht, indem eine PCR durchgeführt wurde, welche sowohl das wildtypische (wt) als auch das *flox* (+)-Allel detektiert (B, C). Für die Genotypisierung der *Vhl*-*Knockin*-mutationen V2B und V2C wurde *Vhl* amplifiziert und das PCR-Produkt anschließend mit *BsgI* und *BsaHI*, die innerhalb einer der Punktmutationen schneiden, restringiert und mittels Gelelektrophorese analysiert (D).

3.3.3.2 Histologische Untersuchungen

Mit Hilfe der H/E-Färbung (Details siehe 2.2.7.3) wurden die Gewebestrukturen von 20 Nieren von Mäusen im Alter von 9-12 Monaten angefärbt. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass bei den ausgewählten Organen keine zystischen oder soliden Neoplasien aufgrund der veränderten *Pten*- und / oder *Vhl*-Expression auftraten. Die zuvor entdeckten Hohlräume und Unebenheiten waren auf eine deutlich zu kurze Fixierung zurückzuführen, wodurch die Paraffinschnitte oft Risse zeigten. Die Nieren wiesen unabhängig vom Genotyp die typischen Strukturen der Rinde und des Markgewebes auf (Abb. 3.37 A). Eine Ausnahme bildeten dabei die bereits makroskopisch als Zysten identifizierte Nieren. Hier wurden die zystischen Nieren eines 9 Monate alten Weibchens des Genotyps $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ (z8509) und eines 11 Monate alten $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Weibchens (z8377) näher betrachtet. Die Niere des $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ -Weibchens bestand zu 60% aus einer Zyste, welche aus zwei

einzelnen Zysten hervorgegangen war. Die beiden ursprünglichen Zysten vergrößerten sich wahrscheinlich vom Epithel ausgehend ins Zentrum der Niere bis sie schließlich zusammen wuchsen und das Mark fast vollständig verdrängten. Im derzeitigen Zustand war die Doppelzyste fast ausschließlich von einem mehrschichtigen Rindengewebe umgeben, welches verglichen mit wildtypischen Nieren deutlich verbreitert war. Die Niere des $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Weibchens zeigte eine einzelne Zyste, welche jedoch das gesamte Lumen der Niere einnahm. Lediglich eine dünne Epithelschicht grenzte den Hohlraum ein. Bei beiden Organen zeigten sich neben den Zysten keine weiteren strukturellen Veränderungen, die gegebenenfalls zur Ausbildung von Tumorgewebe hätten führen können (Abb. 3.37 B).

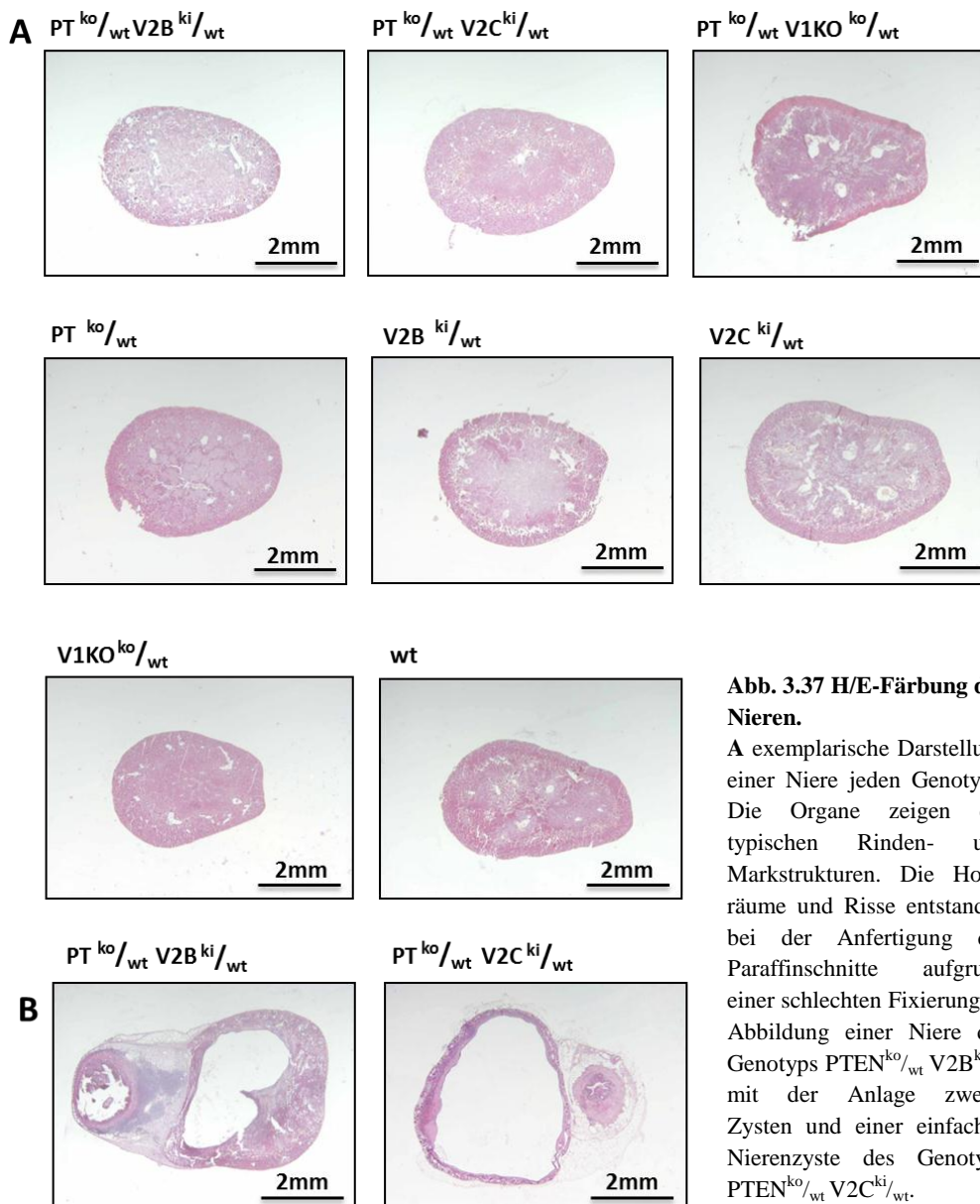


Abb. 3.37 H/E-Färbung der Nieren.

A exemplarische Darstellung einer Niere jeden Genotyps. Die Organe zeigen die typischen Rinden- und Markstrukturen. Die Hohlräume und Risse entstanden bei der Anfertigung der Paraffinschnitte aufgrund einer schlechten Fixierung. **B** Abbildung einer Niere des Genotyps $PTEN^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ mit der Anlage zweier Zysten und einer einfachen Nierenzyste des Genotyps $PTEN^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$.

Die H/E-Färbung lässt weiterhin Rückschlüsse auf Genotyp-vermittelte Veränderungen der Zellzahl, -größe und -form zu. Während die Nieren mit einer *Vhl*-Mutation keine Veränderungen bezüglich der Anzahl und Größe der Zellen zeigten, wiesen die Nieren mit *Pten* *Lox-out* die Tendenz zu dichterem Gewebe sowohl im Rindensbereich als auch im Mark auf. Da die Anzahl der Zellkerne im *Pten*-defizienten Gewebe im Vergleich zu Nieren mit wildtypischer *Pten*-Expression nicht wesentlich variierten, scheint dieser Effekt durch eine durch den *Pten*-Verlust vermittelte Proliferation und damit einhergehende Vergrößerung der Zellen erklärbar. Zusätzliche V2B- oder V2C-Mutationen nahmen keinen weiteren Einfluss auf den Phänotyp. Die Form der Zellen war unabhängig vom Genotyp zu jedem analysierten Zeitpunkt wildtypisch (Abb. 3.38).

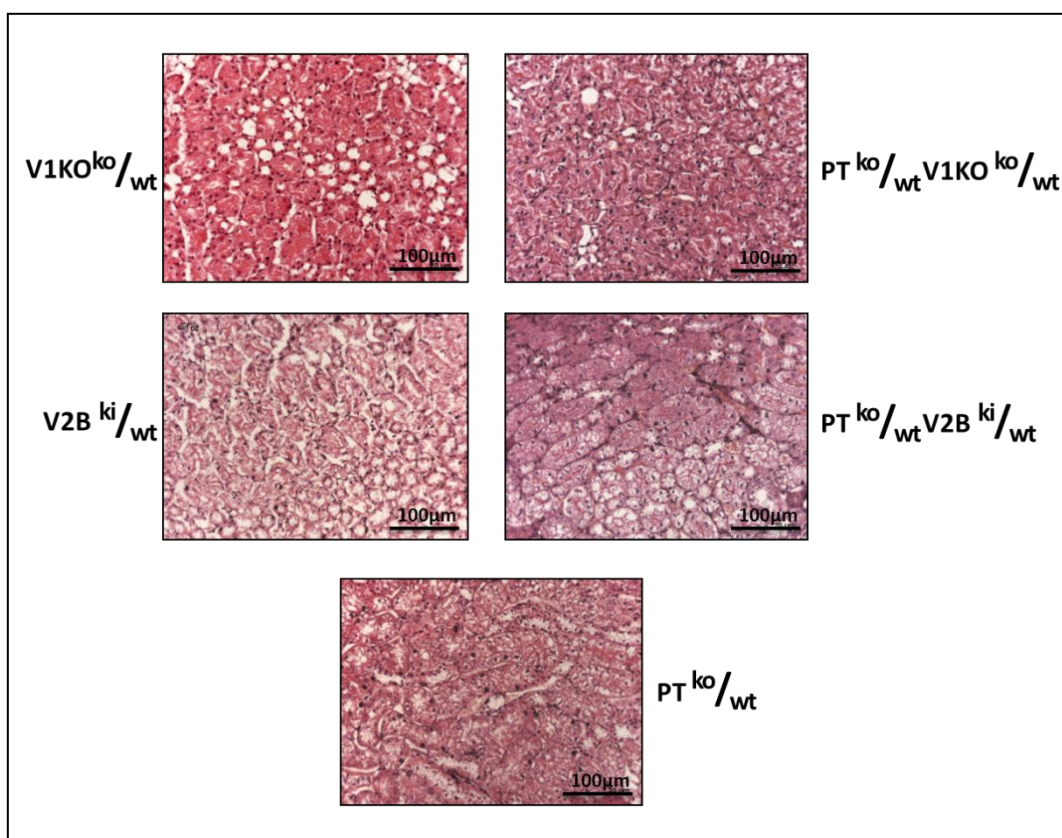


Abb. 3.38 Einfluss von *Pten* auf die Zellzahl. Die exemplarische Gegenüberstellung der Nieren ohne und mit heterozygotem *Pten*-Verlust zeigt jeweils im $PT^{ko/wt}$ -Gewebe tendenziell mehr Zellen auf engerem Raum. Dies lässt vermuten, dass der *Pten*-Verlust zu einer gesteigerten Proliferation bzw. zu vermindertem Zelltod und dadurch erhöhter Zellzahl führt.

3.3.3.3 Untersuchungen der Expression

Für die Überprüfung der Genexpression der *Vhl*-Punktmutanten V2B und V2C wurde zunächst die DNA (Details siehe 2.2.1.2) und RNA (Details siehe 2.2.3.2) aus murinen Nieren und Nebennieren extrahiert, die RNA in cDNA umgeschrieben (Details siehe 2.2.3.4-2.2.3.6) und sowohl das *Vhl*-Gen als auch die *Vhl*-cDNA sequenziert (Details siehe 2.2.1.12). Auf DNA-Ebene konnten dabei die Genotypen, die durch die Genotypisierungs-PCRs ermittelt wurden (Details siehe 3.3.3.1), bestätigt werden. Obwohl Mäuse mit einer homozygoten $V2B^{ki/ki}$ -Punktmutation nicht lebensfähig waren, konnte jedoch mittels der Sequenzierung von *Vhl* in der cDNA nachgewiesen werden, dass in den

Nieren und Nebennieren heterozygoter $V2B^{ki/wt}$ -Mäuse lediglich das mutierte $V2B$ -Allel transkribiert wurde (Abb. 3.39). Diese Stilllegung des gesunden Vhl -Allels bewirkt auf RNA- und Proteinebene einen homozygoten Effekt der $V2B$ -Mutation. Für $V2C^{ki/wt}$ konnte hingegen wie erwartet eine gleichermaßen ausgeprägte Expression des gesunden Vhl -Allels und der $V2C$ -Mutante auf der RNA-Ebene nachgewiesen werden.

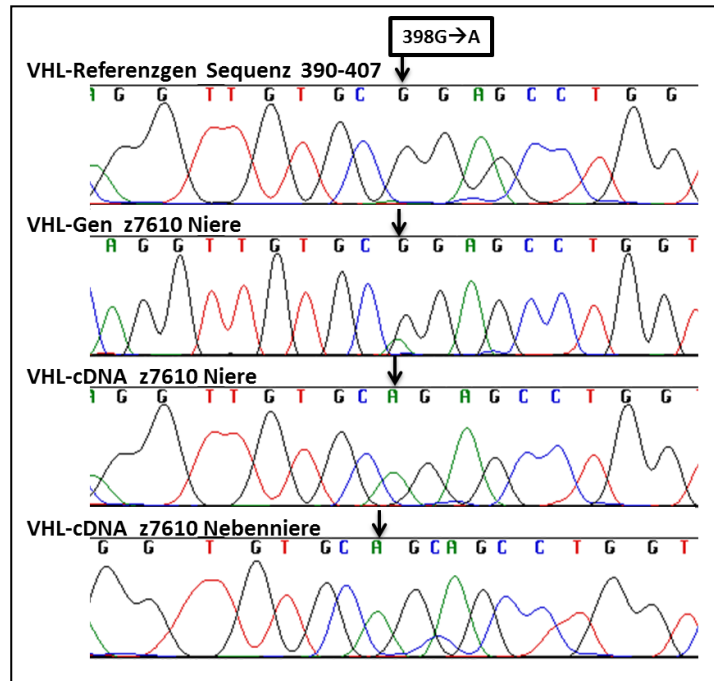


Abb. 3.39 Expressionsanalyse der V2B-Punktmutante auf RNA-Ebene. Exemplarisch wurde hier die Sequenzanalyse der $V2B^{ki/wt}$ -Maus z7610 abgebildet. Die genomische DNA wurde der cDNA aus Niere und Nebenniere gegenübergestellt und mit dem Sequenzbereich 390-407 des Vhl -Wildtypgens verglichen. Die DNA-Analyse bestätigte die heterozygote $V2B$ -Mutation $398G \rightarrow A$. In der cDNA aus Niere und Nebenniere konnte jedoch nur die $V2B$ -Mutante nachgewiesen werden. Demnach wird das gesunde Vhl -Allel stillgelegt und nur das $V2B$ -Allel exprimiert.

Anschließend wurden Gesamtproteinextrakte aus einem 5 x 5 mm großen Gewebestück der Nieren hergestellt (Details siehe 2.2.4.3) und im *Western Blot* analysiert (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9). Dabei konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einem heterozygoten *Pten-Lox-out* ($PT^{ko/wt}$) in der Niere meist eine etwas schwächere Expression von *Pten* aufwiesen. Ein heterozygoter *Vhl*-Verlust ($V1KO^{ko/wt}$) bewirkte ebenfalls eine schwache Tendenz zu einer verminderten *Vhl*-Konzentration. Allerdings variierte die *Vhl*-Expression auch innerhalb eines Genotyps relativ stark. Auch die Häufigkeit der Ausbildung der verschiedenen Spleißvarianten von 19 und 30 kDa wurde durch die *Vhl*-Punktmutationen $V2B$ und $V2C$ nicht zugunsten der einen oder anderen verschoben (Abb. 3.40). Neben den makroskopisch normal erscheinenden Nieren wurde von den Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$, $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}$ jeweils eine zystische Niere im *Western Blot* analysiert (in Abb. 3.40 mit einem Stern gekennzeichnete Proben). Interessanterweise wurde für die Zyste des Genotyps $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ eine stark erhöhte Protein-Konzentration von *Vhl* nachgewiesen. Da voraussichtlich wie bereits beschrieben lediglich das $V2B$ -Allel exprimiert wird, scheint dieses mutierte *Vhl*-Protein relativ stabil in der Zelle vorzuliegen. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Nieren, bei denen die *Nedd4-1*-Expression nur wenig variierte, war hier weiterhin eine deutlich verringerte Proteinmenge von *Nedd4-1* zu beobachten. Die *Pten*-Proteinmenge war in dieser Gewebeprobe verglichen mit

anderen Nierenextrakten desselben Genotyps etwas erhöht. Da Nedd4-1 eine Ubiquitin-Ligase für Pten ist und dessen Abbau induziert (Wang *et al.*, 2007), ist die erhöhte Pten-Menge vermutlich eine Folge der geringeren Nedd4-1-Konzentration. Die zystische Niere des Genotyps $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ zeigte keine deutlichen Veränderungen in der Expression von Pten, Vhl und Nedd4-1. Für das zystische Gewebe der $PT^{ko/wt}$ -Probe konnte ebenfalls eine erhöhte Vhl-Konzentration nachgewiesen werden, wenngleich diese nicht so hoch ausfiel wie in der $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ -Nierenzyste. So war hier auch keine Veränderung der Nedd4-1-Menge zu verzeichnen. Diese Unterschiede in der Genexpression bzw. Regulation lassen die Annahme zu, dass kein generalisierter Ablauf einer Fehlregulation stattfindet, welcher zur Ausprägung einer Zyste führt. Obwohl die hier analysierte Nierenzyste der $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ -Maus im Vergleich am kleinsten war, zeigt sie doch die größten Abweichungen von einer wildtypischen Expression. Eventuell bewirkt der Genotyp $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ eine verstärkte Tumorphorprogression der Zyste oder die Weiterentwicklung zu Tumoren. Da nur aus einem Teil der Nieren Proteine analysiert wurden, könnten die voneinander abweichenden Ergebnisse aber auch darauf zurückgeführt werden, dass bei der einen oder anderen Zyste mehr oder weniger umgebendes Normalgewebe mit präpariert wurde.

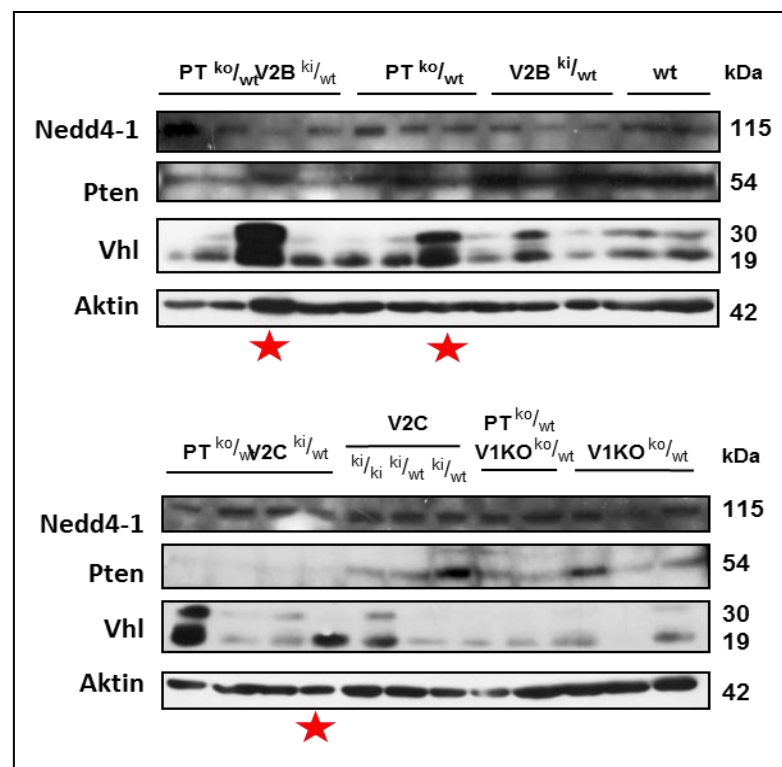


Abb. 3.40 Expressionsanalysen der Nieren im Western Blot. Die exemplarische Darstellung der Nieren unterschiedlichen Genotyps verdeutlicht, dass die Ausprägung von Vhl nur sehr geringfügig durch den Genotyp beeinflusst und die Pten-Expression in den Nieren mit heterozygotem Pten-Verlust leicht vermindert wird. Die Expression von Nedd4-1 bleibt unabhängig vom Genotyp relativ konstant. Die mit Sternen gekennzeichneten Protein-Proben entstammen aus bereits makroskopisch identifizierten Nierenzysten. Aufgrund der geringen Anzahl an ausgeprägten Zysten kann keine generelle Aussage über die Veränderung der Genexpression in zystischem Gewebe getroffen werden.

Um zu prüfen, in welchen Gewebestrukturen der Niere die Tumorsuppressoren Vhl und Pten exprimiert werden und ob der veränderte Genotyp der Tiere Einfluss auf die Lokalisation der Proteine nimmt, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden die Nieren einer

12 Monate alten Maus jeden Genotyps präpariert, fixiert, dehydriert und in Paraffin eingebettet (Details siehe 2.2.7.1). Anschließend wurden 4 µm dicke Querschnitte der Nieren angefertigt (Details siehe 2.2.7.1) und Vhl, Pten oder Nedd4-1 mittels Immunhistochemie gewebespezifisch angefärbt (Details siehe 2.2.7.4). Dabei wurde deutlich, dass der Genotyp der Tiere, welcher für jede Niere vor detaillierteren Analysen nochmals überprüft wurde, keinerlei Einfluss auf die Expression und die lokale Verteilung der untersuchten Proteine besaß. So konnte wie auch schon im *Western Blot* keine deutliche Abschwächung der Pten-bzw. Vhl-Expression in Tieren mit heterozygotem Genverlust nachgewiesen werden. Auch die Vhl-Punktmutationen V2B und V2C bewirkten weder eine Veränderung der Vhl-Konzentration noch der subzellulären Verteilung. Demnach sind Vhl, Pten und Nedd4-1 stets zytoplasmatisch und nicht nukleär lokalisiert. Die somit Genotyp-unabhängigen Ergebnisse der Immunhistochemie sind exemplarisch in Abbildung 3.41 dargestellt (Abb. 3.41). Eine intensive Vhl-Färbung war einzig in den Glomeruli nachweisbar (Abb. 3.41 C.). Weder in den Zellen der proximalen und distalen Tubuli, noch in den Tubuluszellen der im Nierenmark verlaufenden Henle-Schleife konnte eine spezifische Vhl-Färbung gezeigt werden (Abb. 3.41 A+B). Auch in den Sammelrohren des Marks war keine Expression von Vhl erkennbar (Abb. 3.41 A). Eine spezifischere Analyse, in welchen Zellen der Glomeruli eine Vhl-Expression erfolgt, war aufgrund der Qualität der Gewebeschnitte nicht möglich. Für Pten konnte eine deutliche Färbung der Glomeruli und der Zellen der proximalen und distalen Tubuli im Rindenbereich gezeigt werden (Abb. 3.41 E+F). Die Pten-Expression war in den Regionen der intermediären Tubuli im Nierenmark etwas schwächer, jedoch immer noch gut erkennbar (Abb. 3.41 D). Lediglich die Sammelrohre wiesen keine Pten-Färbung auf. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit eine sehr intensive Nedd4-1-Expression in den proximalen Tubuluszellen nachgewiesen werden (Abb. 3.41 H+I). Die Glomeruli und die distalen Abschnitte der Tubuli in der Rinde zeigten hingegen fast keine Färbung (Abb. 3.41 I). Auch im Mark wiesen die Tubuluszellen der Henle-Schleife nur eine schwache Nedd4-1-Färbung auf, die Sammelrohre zeigten keine Expression von Nedd4-1 (Abb. 3.41 G).

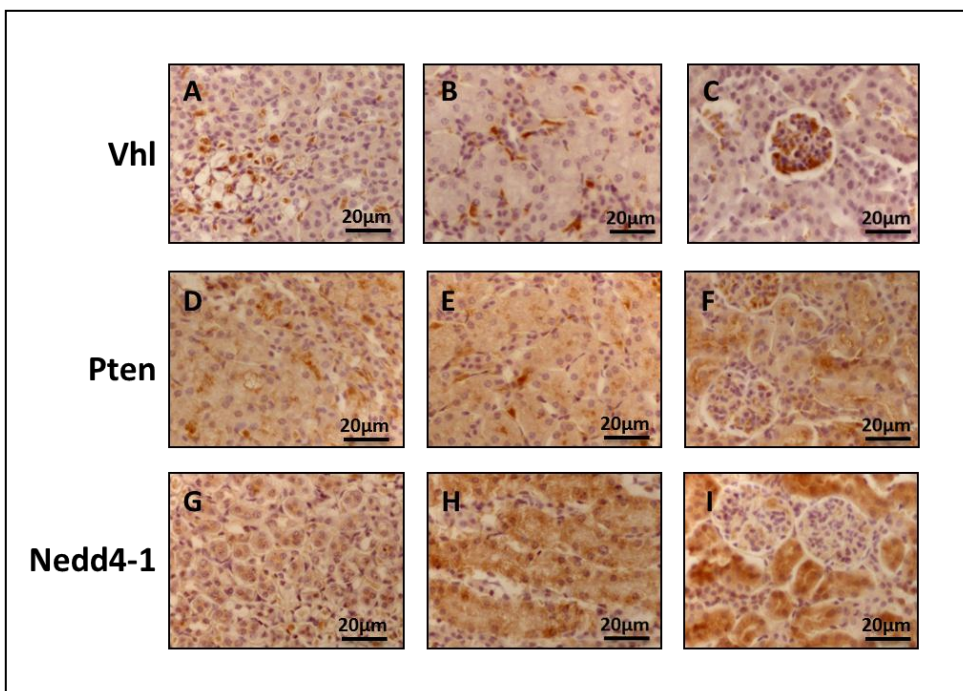


Abb. 3.41
Lokalisierung von Vhl, Pten und Nedd4-1 im Nierengewebe mittels Immunhistochemie.
 Die Verteilung der Moleküle wurde von den Mutationen in *Vhl* und *Pten* nicht beeinflusst. Hier ist exemplarisch die Vhl-, Pten- und Nedd4-1-Färbung des Nierenmarks (A,D,G) und der Tubuli und Glomeruli der Rinde (B+C, E+F, H+I) einer Maus des Genotyps $PT^{ko/wt}$ $V2C^{ki/wt}$ dargestellt.

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Analysen der phänotypisch unauffälligen Nieren wurde die Expression von Vhl, Pten und Nedd4-1 auch im Gewebe der beiden zystischen Nieren, die bereits unter 3.3.3.2 abgebildet wurden, untersucht. Während das an die Zyste angrenzende Gewebe der Niere mit dem Genotyp AC $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ keine typische Rindenstruktur mehr aufwies, bestand die Umgebung der Zyste der $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Niere aus einem noch vergleichsweise kompakten und geordneten Epithel. Beide Nieren zeigten in unmittelbarer Nähe zur Zyste eine deutliche Vhl-Färbung, die nicht nur die Glomeruli sondern auch alle anderen Rindenstrukturen betrafen. Dies bestätigt zum einen die bereits in voran gegangenen *Western Blot*-Analysen gezeigte Expressionssteigerung von Vhl (Abb. 3.40), macht aber zusätzlich auch deutlich, dass in zystischen Nieren die Vhl-Expression in Epithelzellen neu induziert bzw. der Abbau des Proteins gehemmt wird (Abb. 3.42 A+D). In der epithelialen Umgebung der Zyste des Genotyps $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ konnte zusätzlich zu einer zytoplasmatischen Expression eine nukleäre Lokalisation von Vhl in den Zellkernen der Glomeruli und vereinzelter Tubuluszellen gezeigt werden. Die Expression von Pten wirkte in den zystischen Organen unverändert. Wie auch im gesunden Nierengewebe war das Zytoplasma der Glomeruli nur schwach und das der Tubuli deutlich angefärbt (Abb. 3.42 B+E). Die Ausbildung der Zysten vollzieht sich demnach möglicherweise unabhängig von der Anwesenheit von Pten. Auch die Verteilung von Nedd4-1 entsprach für alle untersuchten Gewebe dem Wildtyp. Die Glomeruli waren fast nicht gefärbt, während die anderen Rindenstrukturen eine deutliche zytoplasmatische Nedd4-1-Expression zeigten (Abb. 3.42 C+F). Das epitheliale Gewebe in der zystischen Umgebung der $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Niere wies jedoch eine schwächere Nedd4-1-Färbung in den Tubuluszellen auf (Abb. 3.42 F).

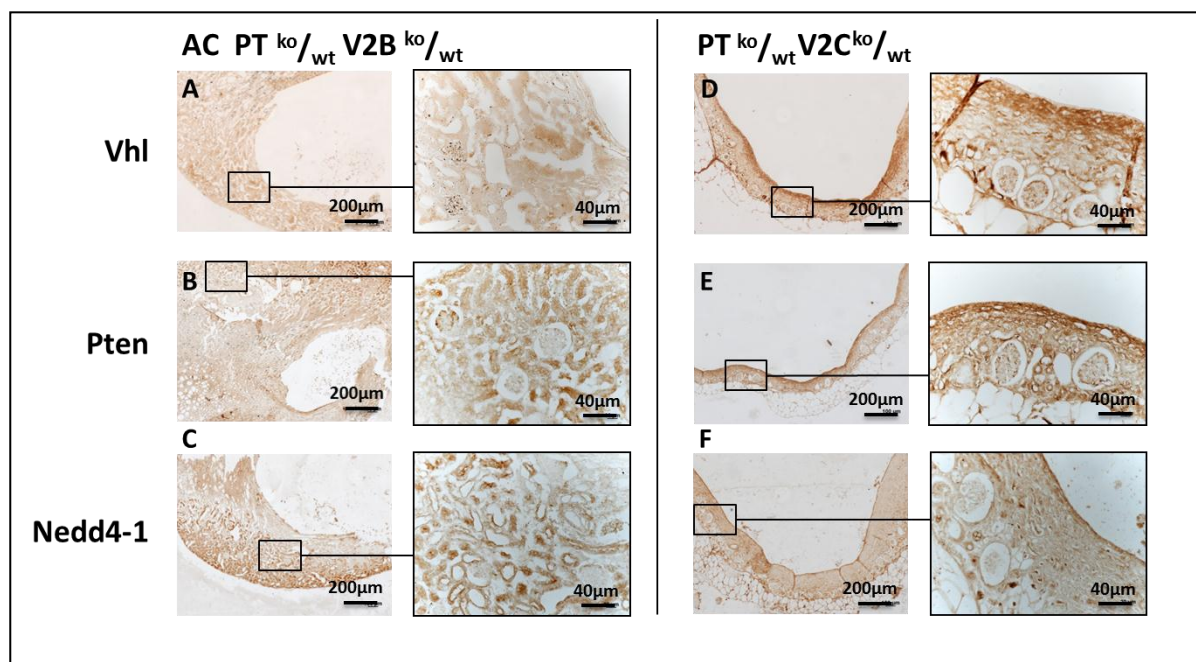


Abb. 3.42 Immunhistochemische Expressionsstudien im zystischen Nierengewebe. Hier ist die Vhl-, Pten- und Nedd4-1-Färbung zweier Nierenzysten der Genotypen AC $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ abgebildet. Die Zysten waren von Epithelzellen umgeben. Die Expression von Vhl (A, D) war in allen Epithelzellen deutlich erhöht, während die Ausprägung von Pten (B, E) und Nedd4-1 (C, F) wildtypisch war.

In einem zweiten Schritt wurde per Immunhistochemie die Existenz und Verteilung von Molekülen in den beiden Zysten der Genotypen AC $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ und einer wildtypischen

Niere ermittelt, deren Expression oder Stabilität indirekt von Vhl bzw. Pten beeinflusst wird. Hierfür wurde das Signalmolekül Vegf und die aktive und inaktive Form von Akt ausgewählt. Die Expression von Vegf wird durch den Transkriptionsfaktor Hif induziert, dessen proteasomaler Abbau von Vhl vermittelt wird (Maxwell *et al.*, 1999). Akt wird nur durch eine Phosphorylierung aktiviert (P-Akt), wenn Pten den PI3K-Signalweg nicht bereits *upstream* inhibiert (Manning und Cantley, 2007). Alle drei untersuchten Moleküle konnten unabhängig vom Zelltyp immer nur zytoplasmatisch nachgewiesen werden. Vegf konnte sowohl in der epithelialen Umgebung beider Zysten als auch in den Rindenstrukturen der wildtypischen Niere belegt werden. Während bei dem Wildtyp-Gewebe eine schwache aber kontinuierliche Färbung der Tubuluszellen und der Glomeruli auftrat, zeigte sich bei beiden Zysten eine erhöhte Vegf-Expression in den Glomeruli, Sammelrohren und proximalen Tubuli. Dies deckt sich deutlich mit der bereits nachgewiesenen Vhl-Expression in diesem Gewebe (siehe Abb. 3.42). Demnach scheint Vhl einen verminderten Einfluss auf die Expression von Vegf zu nehmen, so dass es sich vermutlich zu einem Großteil um funktional eingeschränkte Vhl-Moleküle wie V2B handelt, die in der Immunhistochemie nachgewiesen wurden. P-Akt wurde in allen untersuchten Geweben gleichermaßen deutlich in den Glomeruli und vereinzelt an den Rändern von Tubuluszellen angefärbt. Lediglich die Glomeruli der PT^{ko}/wt V2C^{ki}/_{wt}-Zyste wiesen eine verstärkte P-Akt-Expression in den Glomeruli auf. Dies bestätigt die bereits vorgenommenen Analysen der Pten-Färbung (Abb. 3.42), welche trotz des Pten-defizienten Genotyps der Zysten ebenfalls eine wildtypische Intensität und Verteilung zeigt. Der heterozygote *Pten-Lox-out* im Genom scheint sich daher weder auf die Expression von funktionalem Pten noch auf diesem nachgeschaltete Signalwege auszuwirken. Da die Phosphorylierung von Akt relativ instabil ist, könnte die schwache P-Akt-Färbung auch auf methodische Fehler zurückgeführt werden. Tatsächlich konnten jedoch auch andere Arbeitsgruppen nachweisen, dass P-Akt nur schwach im Nierengewebe angefärbt und somit auch nur selten gebildet wird (Jun *et al.*, 2011). Eine Färbung der inaktiven Form von Akt war sowohl in den Glomeruli als auch in den Tubuluszellen deutlich erkennbar. Besonders intensiv war die Akt-Expression jedoch bei allen untersuchten Geweben in den Sammelrohren. Generell war in den zystischen Nieren eine wesentlich höhere Menge an Akt als im Wildtyp zu finden. Mit großer Wahrscheinlichkeit werden daher in den Geweben mit heterozygoten *Pten*-Verlust weniger Akt-Moleküle durch Phosphorylierung aktiviert, so dass der Genotyp wohl doch Einfluss auf die Expression von *Pten* und damit auch auf die von Pten regulierten Signalwege nehmen könnte (Abb. 3.43).

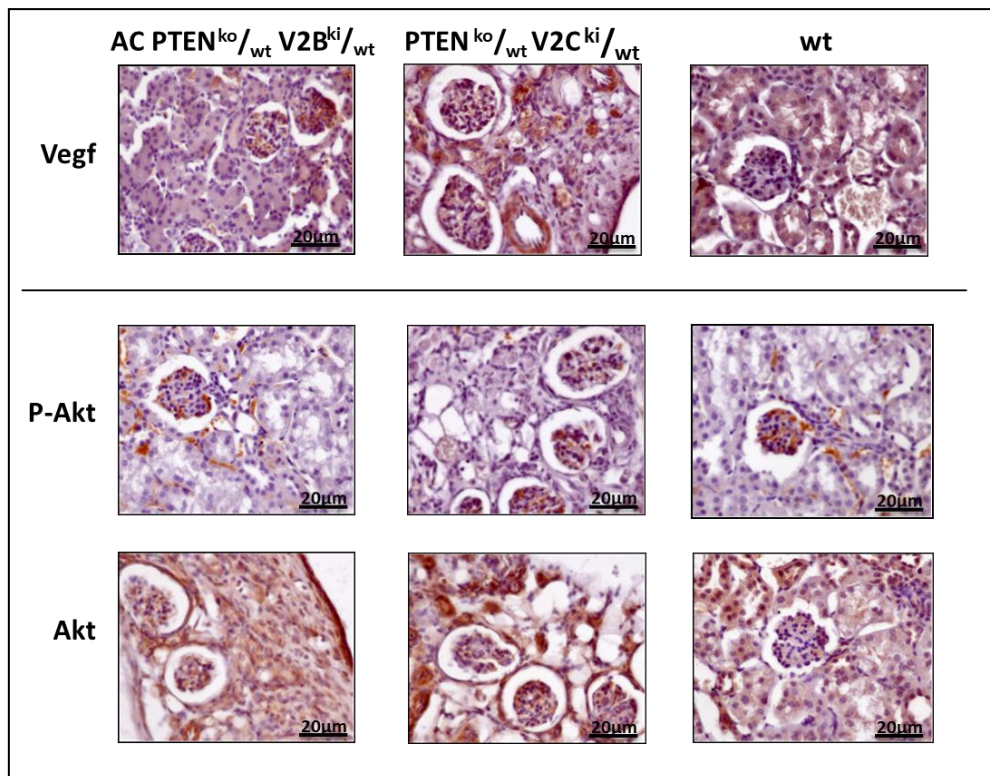


Abb. 3.43 Immunhistochemische Analyse von Zielmolekülen von Vhl und Pten. Die Expression von Vegf, P-Akt und Akt wurde in den beiden Nierenzysten der Genotypen AC PT^{ko}/wt $V2B^{ki}/wt$ und PT^{ko}/wt $V2C^{ki}/wt$ im Vergleich zu einer Wildtyp-Niere untersucht. Die Vegf-Expression war in den *compound* Nieren etwas stärker, konnte aber auch im Wildtyp in den Tubuluszellen, Glomeruli und Sammelrohren gezeigt werden. Die P-Akt-Färbung war in allen Geweben lediglich innerhalb der Glomeruli sichtbar, während Akt wiederum in den Tubuluszellen, Glomeruli und Sammelrohren nachweisbar waren. Die Akt-Färbung war in den zystischen Geweben deutlich stärker.

Aufgrund der Tatsache, dass nur sehr wenige Tiere zystische Veränderungen in den Nieren entwickelten und dadurch nur wenige exemplarische Analysen durchgeführt werden konnten, kann hier keine statistisch signifikante Aussage darüber gemacht werden, inwieweit sich die Genexpression im betroffenen Gewebe ändert und welchen Einfluss sie auf die Tumorentwicklung nimmt.

3.3.4 Untersuchung der Nebennieren

Nachdem bei der Präparation der transgenen Mäuse deutliche Veränderungen der Nebennieren erkennbar waren, wurden auch diese näher analysiert. Dafür wurde zunächst exemplarisch bei einigen Nebennieren unterschiedlichen Genotyps die Sequenz von Vhl und Pten überprüft. Anschließend folgten *Western Blot*- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen, um die Auswirkung des Genotyps auf den Phänotyp zu ermitteln und die Expression der veränderten Gene innerhalb des Gewebes zu lokalisieren. Schließlich wurde mittels H/E-Färbung die Morphologie der Nebennieren-Tumore untersucht.

3.3.4.1 Überprüfung des Genotyps

Aufgrund der geringen Größe der murinen Nebennieren war sehr wenig Gewebe für Untersuchungen verfügbar. Daher wurde von der Genotypisierung zur Überprüfung des *Pten* *Lox-outs* und der *Vhl*-Punktmutationen mittels PCR abgesehen. Da der Genotyp aller untersuchten Mäuse bereits in der Schwanzspitze und in den Nieren nachgewiesen werden konnte, wurde hier vorausgesetzt, dass sowohl die *Vhl*-Mutationen als auch der heterozygote *Pten*-Verlust ubiquitär in allen Zellen des Organismus also auch in den Nebennieren vorlag. Stattdessen wurde exemplarisch von ein bis vier Nebennieren jeden Genotyps die genomische DNA präpariert (Details siehe 2.2.1.2) und *Vhl* und *Pten* sequenziert (Details siehe 2.2.1.12), um herauszufinden, ob gegebenenfalls entsprechend des *Two-hit*-Modells (Knudson, 1996) zusätzliche Mutationen in diesen Genen auftraten, die Einfluss auf die Tumorgenese in der Nebenniere nehmen konnten. So ist bereits bekannt, dass bei Patienten mit VHL-Syndrom eine zusätzliche somatische Mutation des zweiten *VHL*-Allels, welche schließlich zum Verlust von phänotypischem VHL führt, zur Bildung von Zysten und Tumoren führt (Kaelin, 2002; Kim *et al.*, 2004). Auch für PTEN wurde bereits gezeigt, dass in einigen Geweben erst die Inaktivierung beider Allele zur Tumorentstehung führt (Kurose *et al.*, 1998; Dahia *et al.*, 1997). Mit Hilfe der Sequenzierungen konnten zunächst die spezifischen *Vhl*-Punktmutationen nachgewiesen werden. Die 398G→A Mutation in Exon 3 führt zu einer 133R→Q -Veränderung in der Aminosäuresequenz und somit zur Ausprägung des V2B-Phänotyps. Die nachgewiesene V2C-Mutation 154L→V im Protein beruht auf dem Basenaustausch 460T→G im Exon 3. Daneben konnten in allen V2C-positiven Nebennieren die Punktmutationen 459T→C und 462G→A gezeigt werden, die zusätzlich generiert wurden, um eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bsa*HI zur Genotypisierung der V2C-Variante zu erzeugen. Der Locus der Punktmutationen ist in Abbildung 3.44 zu sehen (Abb. 3.44).

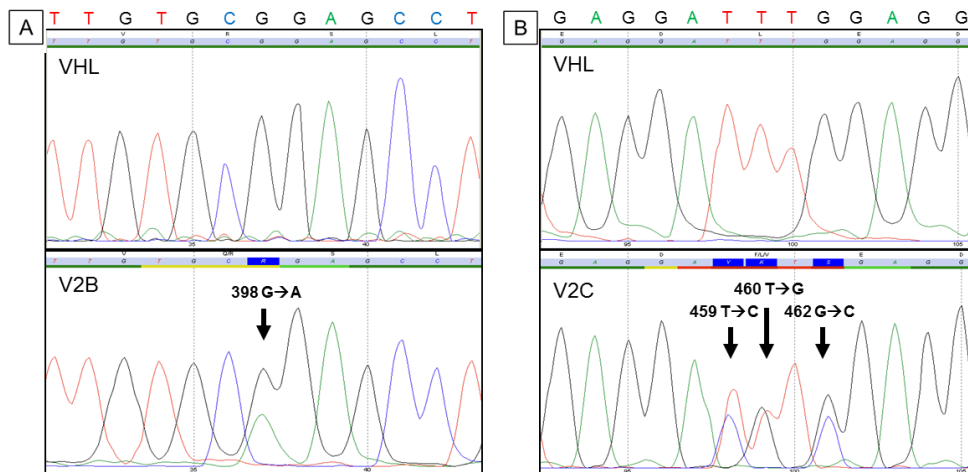


Abb. 3.44 Basensequenz der V2B- und V2C-Punktmutation. Die analysierte DNA entstammt den murinen Nebennieren. In allen untersuchten Nebennieren konnte ausnahmslos der bereits in der Schwanzspitze der Maus nachgewiesene *Vhl*-Genotyp bestätigt werden. Hier ist jeweils die Sequenz einer Wildtyp-Maus (oben) der mutierten Basenabfolge einer *Vhl* Typ 2-Maus (unten) gegenübergestellt. **A** Der abgebildete Sequenzabschnitt 391-404 aus Exon 3 enthält die V2B-Punktmutation an Position 398 G→A. Diese ist exemplarisch für eine heterozygot positive V2B-Maus gezeigt und führt in der Aminosäuresequenz zu einem 133R→Q Austausch. **B** Die in Exon 3 gelegene Basenabfolge 454-466 beinhaltet die für den Aminosäureaustausch 154L→V nötigen V2C-Punktmutationen 460T→G und 462G→C in der DNA-Sequenz. Zusätzlich wurde bei jedem V2C-positiven Tier auch die Punktmutation 459T→C nachgewiesen, welche für die *Bsa*HI-Schnittstelle benötigt wird. Auch hier ist die Sequenz einer V2C-heterozygoten Maus gegen die des Wildtyps aufgetragen.

Im Einzelnen wurden von den $PT^{ko/wt}$ -Mäusen und den *compound* Mäusen mit heterozygotem *Pten*-Verlust und einer der beiden VHL Typ 2-Mutationen jeweils eine morphologisch unauffällige (2-10 mg), eine vergrößerte (10-50 mg) und ein bis zwei tumoröse (50-200 mg) Nebennieren zur Sequenzierung ausgewählt. Da die Nebennieren aller Mäuse mit dem Genotyp $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$ phänotypisch unauffällig waren, wurde hier nur eine Nebenniere untersucht. Die *Vhl-Knockin*-Nebennieren wurden für dieses Experiment außer Acht gelassen, da sie keine Veränderungen aufwiesen. Stattdessen wurde eine Wildtyp-Nebenniere als Kontrolle mit analysiert. Für die Nebennieren des Genotyps $PT^{ko/wt}$ konnten keine Mutationen in *Vhl* nachgewiesen werden. Leider ließ sich bei allen drei Proben das Exon 1 nicht sequenzieren. Dies ist aber mit großer Wahrscheinlichkeit auf die schlechte DNA-Qualität der Extrakte und nicht auf genetische Effekte zurückzuführen. Die Sequenzierung des *Pten*-Gens wies lediglich in der kleinsten und phänotypisch unauffälligen Nebenniere eine heterozygote Punktmutation im Exon 6 (543G→A) auf. Diese führt jedoch nicht zu einem Aminosäureaustausch (181L→L). Außerdem wies die Vorhersage des Programms *Alamut* auch keinen Einfluss der Mutation auf die umliegenden Spleißstellen auf. Die Mutation 543G→A führt somit zu keinem Effekt und entspricht eventuell einem bislang noch nicht beschriebenen Polymorphismus. Die Nebennieren, deren DNA einen *Pten-Lox-out* und eine *Vhl*-Punktmutation enthielten, wiesen neben den bereits beschriebenen V2B- bzw. V2C-Mutationen weder in *Vhl* noch in *Pten* weitere Genveränderungen auf. Auch die DNA der Nebenniere des Genotyps $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$ zeigte keine Sequenz-Veränderungen der beiden Gene. Die Nebenniere ohne Mutationen wies wie vermutet ebenso eine vollständig wildtypische *Vhl*- und *Pten*-Sequenz auf. Zwar lassen diese Sequenzierungen keine Rückschlüsse auf mögliche Mutationen in den Intronbereichen und damit einhergehenden Auswirkung auf die Expression zu, dennoch ist die Wahrscheinlichkeit eher gering, dass bei allen tumorös veränderten Nebennieren relevante Mutationen innerhalb der Introns stattgefunden haben. Das zweite Allel beider Gene war für alle untersuchten Nebennieren wildtypisch. So lassen diese exemplarischen Sequenzierungen erwarten, dass die phänotypischen Veränderungen der Nebennieren tatsächlich auf den heterozygot durch Mutationen veränderten Genotyp und nicht auf zusätzliche spontane Mutationen innerhalb des bereits mutierten oder Wildtyp-Allels des *Vhl*- und *Pten*-Gens zurückzuführen sind. Für die V2B-Mutation konnte jedoch auch in Nebennieren bereits gezeigt werden, dass das verbleibende unmutierte *Vhl*-Allel nicht exprimiert wird (Details siehe 3.3.3.3). Die Resultate der hier durchgeführten Sequenzierungen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst (Tab. 3.2).

Tab. 3.2 Überblick über die durchgeführten Sequenzierungen. Es wurden jeweils 3-4 Nebennieren unterschiedlicher Größe der Genotypen $PT^{ko/wt}$, $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ sequenziert. Da die Mäuse des Genotyps $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$ keine Veränderungen der Nebennieren aufwiesen, wurde hier nur eine Nebenniere exemplarisch analysiert. Als Kontrolle wurde ebenfalls eine Wildtyp-Nebenniere untersucht. **A** Die Sequenzierung von *Vhl* wies in keiner Nebenniere unabhängig vom Genotyp neben den erwarteten V2B- bzw. V2C-Punktmutationen weitere Mutationen in den Exons 1-3 auf. **B** Auch die Sequenzierung von *Pten* zeigte für keinen Genotyp und keinen Tumorgrad der Nebennieren spontane Mutationen in den Exons 1-9. Lediglich in der makroskopisch wildtypischen Nebenniere (+) einer $PT^{ko/wt}$ -Maus konnte eine Punktmutation 543G→A in Exon 6 nachgewiesen werden, welche jedoch im Protein nicht zu einem Aminosäureaustausch führt. + : 2-10 mg, ++ : 10-50 mg, +++ : 50-150 mg, ++++ : >150 mg, n.A.: keine Angaben, √: DNA-Sequenz nicht mutiert, – : keine Veränderungen im Protein.

A

Genotyp	Größe der NN	<i>Vhl</i>			p <i>Vhl</i>
		Exon 1	Exon 2	Exon 3	
$PT^{ko/wt}$	+	n.A.	√	√	–
	++	n.A.	√	√	–
	+++	n.A.	√	√	–
$PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$	+	√	√	398 (G►A)	133 (R►Q)
	+++	√	√	398 (G►A)	133 (R►Q)
	++++	√	√	398 (G►A)	133 (R►Q)
$PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$	+	√	√	459 (T►C) ; 460 (T►G) ; 462 (G►A)	153 (D►D) ; 154 (L►V) ; 154 (L►V)
	++	√	√	459 (T►C) ; 460 (T►G) ; 462 (G►A)	153 (D►D) ; 154 (L►V) ; 154 (L►V)
	+++	√	√	459 (T►C) ; 460 (T►G) ; 462 (G►A)	153 (D►D) ; 154 (L►V) ; 154 (L►V)
	++++	√	√	459 (T►C) ; 460 (T►G) ; 462 (G►A)	153 (D►D) ; 154 (L►V) ; 154 (L►V)
$PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$	+	√	√	-21 (c►g)	–
wt	+	√	√	√	–

B

Genotyp	Größe der NN	<i>Pten</i>									p <i>Pten</i>
		Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9	
$PT^{ko/wt}$	+	√	√	√	√	√	543 (G►A)	√	√	√	181(L►L)
	++	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
	+++	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
$PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$	+	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
	+++	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
	++++	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
$PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$	+	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
	++	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
	+++	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
	++++	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
$PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$	+	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–
wt	+	√	√	√	√	√	√	√	√	√	–

3.3.4.2 Histologische Untersuchungen

Um eine erste Abschätzung machen zu können, ob die stark vergrößerten Nebennieren der *compound Knockout/Knockin*-Genotypen den Charakter von Phäochromozytomen besitzen, wurde zunächst eine H/E-Färbung (Details siehe 2.2.7.3) durchgeführt. Hierfür wurde jeweils eine der größten präparierten Nebennieren eines 12 Monate alten Weibchens jeden Genotyps ausgewählt und näher analysiert. Das Größenverhältnis ist der Übersichts-Abbildung 3.45 zu entnehmen (Abb. 3.45). Die Nebenniere des $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ -Genotyps wies nur noch einseitig alle Rindenstrukturen auf, daher war sie auf der anderen Seite sehr instabil und platzte bereits bei der Präparation auf. Die noch vorhandenen Rindenbereiche zeigten die für Nebennieren typischen Zonen mit der äußeren *Zona glomerulosa*, der mittleren *Zona fasciculata* und der inneren *Zona reticularis*. Aufgrund einer zu langen Fixierdauer waren jedoch besonders die Zellen der *Zona fasciculata* stark geschädigt. Fast das gesamte Volumen der Nebenniere wurde von den chromaffinen Zellen des Marks dominiert. Dies ist charakteristisch für Phäochromozytome, welche ihren Ursprung in den chromaffinen Zellen finden und als meist benigne Tumore des Nebennierenmarks definiert werden. Die Nebenniere der

$PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Maus war zwar noch vollständig durch eine Rinde nach außen begrenzt, diese war jedoch vom Nebennieren-Mark deutlich zurückgedrängt, so dass die einzelnen Zonen nicht mehr zu unterscheiden waren. Das Mark bestand auch hier aus dicht gepackten chromaffinen Zellen, so dass auch diese Nebenniere eine starke Ähnlichkeit zu Phäochromozytomen aufwies. Die leicht vergrößerte Nebenniere des Genotyps $PT^{ko/wt}$ wies die stärkste Destrukturierung auf. Weder Rinde noch Mark waren voneinander abzugrenzen und auch hier dominierten die chromaffinen Zellen. Die heterozygoten *Vhl Knockin*-Nebennieren zeigten wie auch die Nebenniere mit unverändertem Genotyp alle wildtypischen Strukturen der Rinde und des Marks. V2B- und V2C-Mutationen sind daher nicht ausreichend, um ein Phäochromozytom zu induzieren (Abb. 3.45).

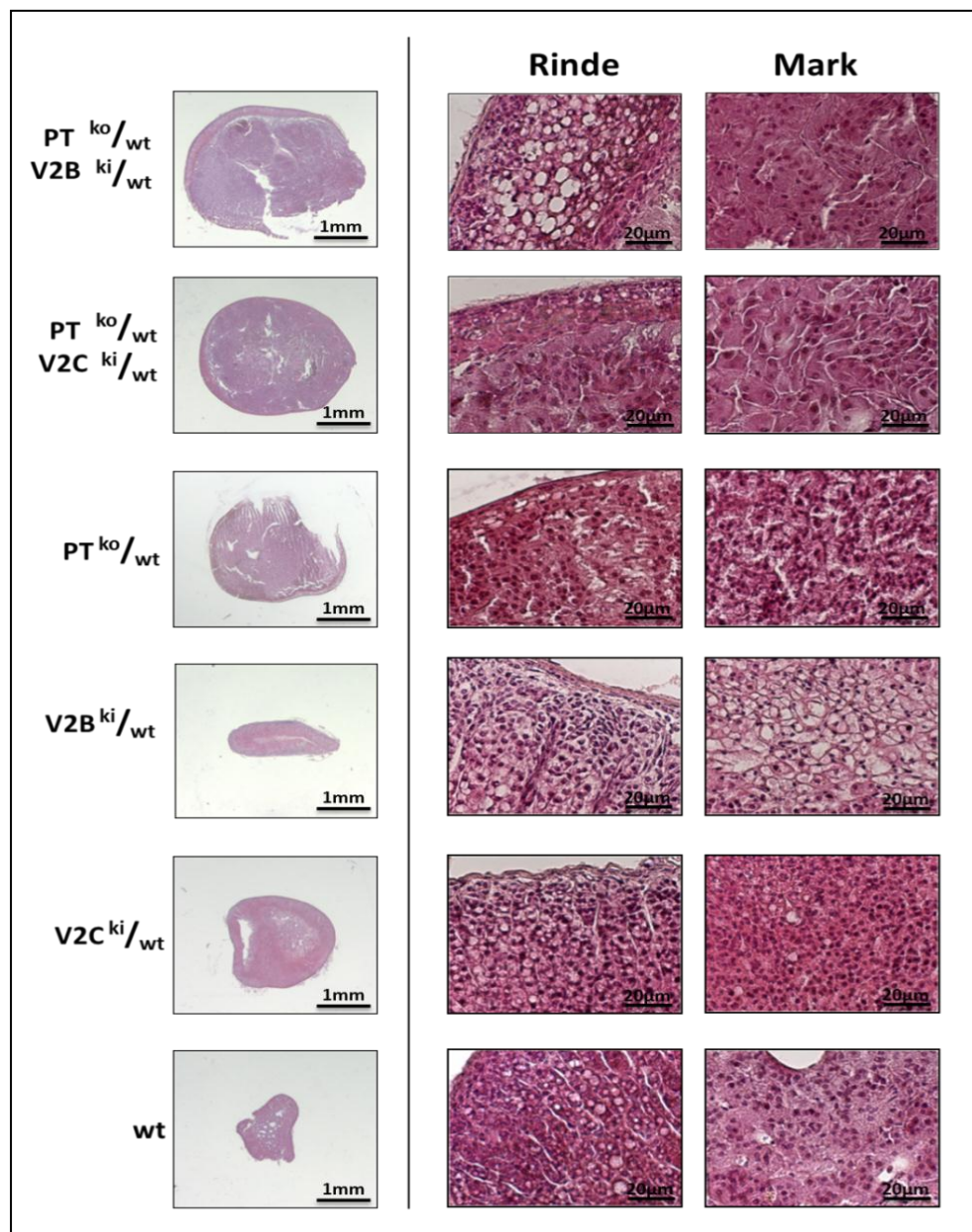


Abb. 3.45 Exemplarische H/E-Färbung einer Nebenniere jeden Genotyps. Für die Abschätzung der Tumorentwicklung wurden die morphologisch am stärksten veränderten Nebennieren von 12 Monate alten Weibchen analysiert. Während die stark vergrößerten Nebennieren der *compound Knockout/Knockin*-Tiere deutliche Ähnlichkeiten zu Phäochromozytomen aufwiesen, war die $PT^{ko/wt}$ -Nebenniere sehr stark destrukturiert. Die Nebennieren mit *Vhl Knockin*-Mutation zeigten alle typischen Strukturen der Rinde und des Marks einer gesunden Nebenniere.

3.3.4.3 Expressionsanalysen

Für die Expressionsanalysen wurden zunächst Gesamtproteinextrakte aus 5 x 5 mm großen Gewebestücken bzw. ganzen Nebennieren hergestellt (Details siehe 2.2.4.3) und im *Western Blot* (Details siehe 2.2.4.7-2.2.4.9) untersucht. Sowohl für Vhl als auch für Pten konnte ein schwacher Einfluss des Genotyps der Tiere auf die Expression nachgewiesen werden. Die basale Vhl-Expression war unabhängig vom Genotyp sehr gering, der fehlende Vhl-Nachweis in den wildtypischen Nebennieren ist jedoch eher durch eine schlechte lokale Übertragung der Proteine auf die Membran begründet. In vergrößerten oder tumorösen Nebennieren zeigte sich unabhängig vom Genotyp eine deutlich erhöhte Vhl-Expression. Während V2B stabil exprimiert wurde, war für die Mäuse, welche eine V2C-Mutation im Genom trugen, eine verminderte Vhl-Proteinmenge nachweisbar. Demnach scheint die V2C-Variante weniger häufig exprimiert oder ausreichend stabilisiert zu werden. So war auch die Expressionssteigerung von Vhl in tumorösen Nebennieren des Genotyps $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ deutlich geringer als in stark veränderten $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ -Nebennieren. Auch die basale Pten-Expression aller analysierten Organe war relativ gering. Gesunde Nebennieren mit heterozygotem Pten-Verlust zeigten eine leicht verminderte Pten-Expression, wohingegen in tumorös veränderten Nebennieren jeden Genotyps deutlich mehr Pten-Protein nachzuweisen war. Das Expressionmuster von Vhl und Pten ähnelt sich demnach in wildtypischen und pathologisch veränderten Nebennieren stark. Dies könnte möglicherweise auf eine generell erhöhte Genexpression in Tumoren oder aber auf eine sich gegenseitig stabilisierende Wirkung der Tumorsuppressoren Vhl hindeuten. Die E3-Ligase Nedd4-1, welche den proteasomalen Abbau von Pten vermittelt, wies ein relativ konstantes Expressionmuster auf. Weder der Genotyp der Nebennieren noch die tumorösen Veränderungen zeigten Wirkung auf die Nedd4-1-Expression (Abb. 3.46).

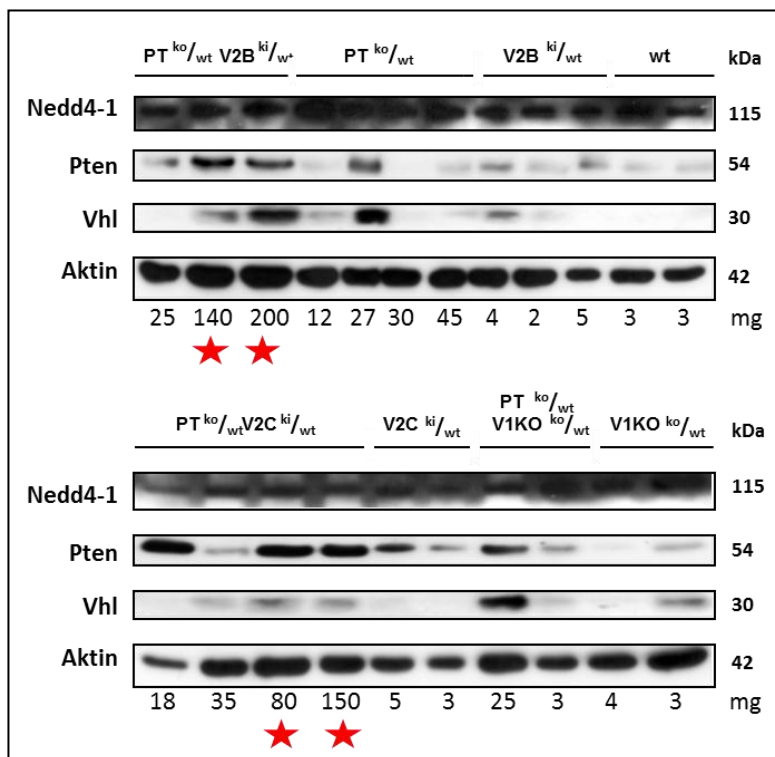


Abb. 3.46 Expressionsanalysen der Nebennieren im Western Blot. Die hier exemplarisch aufgetragenen Proben zeigen in gesunden Nebennieren mit heterozygotem Pten-Verlust eine leichte Tendenz zur verminderten Pten-Expression. Die deutlich vergrößerten Nebennieren weisen unabhängig vom Genotyp eine meist verstärkte Expression von Pten auf. Die Expression von Vhl in Nebennieren mit heterozygoter V2B^{ki/wt}-Mutation oder heterozygotem V1KO^{ko/wt}-*Lox-out* ist der Expression der Wildtyp-Nebenniere vergleichbar, wohingegen Nebennieren mit heterozygoter V2C^{ki/wt}-Mutation eine leicht verminderte Vhl-Expression zeigt. Dies ist vermutlich auf eine V2C-vermittelte Destabilisierung des Proteins zurückzuführen. Unabhängig vom Vhl-Genotyp weisen auch hier die vergrößerten Nebennieren eine verstärkte Expression von Vhl auf, die dem Bandenmuster von Pten gleicht. Die

Expression von Nedd4-1 wurde durch die diversen Genotypen und die verschiedenen Tumorgrade der Organe nicht beeinflusst. Die mit Sternen gekennzeichneten Nebennieren zeigen eine ≥ 20 -fache Masse verglichen mit wildtypischen Nebennieren und stellen mit großer Wahrscheinlichkeit Phäochromozytome dar.

Nachdem die Expression von Vhl, Pten und Nedd4-1 in wildtypischen und tumorös veränderten Nebennieren im *Western Blot* analysiert wurde, wurde im Anschluss auch die subzelluläre Verteilung der Proteine im Gewebe überprüft. Dafür wurden zunächst Kryodünnschnitte von Nebennieren aller Genotypen mit unterschiedlicher Größe und Tumorgrad angefertigt (Details siehe 2.2.7.2). Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung auf den Gewebeschnitten durchgeführt (Details siehe 2.2.7.6). Unabhängig vom Genotyp der Maus und des Tumorgrades zeigte sich in allen Nebennieren das gleiche Expressionsmuster. So ist die Expression von Vhl, Pten und Nedd4-1 in allen Rindenschichten nachweisbar. Obwohl die Färbungen bereits in der *Zona glomerulosa* deutlich erkennbar waren, konnte in der *Zona fasciculata* und *Zona reticularis* eine noch höhere Proteinmenge gezeigt werden. Während Vhl hier besonders in den Gerüststrukturen der Zellen exprimiert vorzuliegen schien, war das Expressionsmuster von Pten und Nedd4-1 in allen Zellen der Rinde gleich. Im Gegensatz zu den Rindenstrukturen war im Mark der Nebennieren fast kein Pten und Nedd4-1 nachweisbar. Lediglich eine sehr niedrige Vhl-Expression konnte gezeigt werden. In Abbildung 3.47 ist exemplarisch die Immunfluoreszenz-Färbung einer vergrößerten $PT^{ko/wt}$ -Nebenniere im Vergleich zu einer unveränderten wildtypischen Nebenniere abgetragen. Die Rindenstrukturen des transgenen Gewebes zeigen v.a. die *Zona glomerulosa*, während die Wildtyp-Gewebeschnitte v.a. die *Zona fasciculata* abbilden. Dieses Experiment demonstriert, dass die Genotyp-spezifischen Veränderungen der Nebennieren keine Verminderung der Expression und keine Modifikation der Lokalisation im Gewebe von Vhl, Pten und Nedd4-1 zur Folge haben. Unabhängig vom Grad der Tumorentwicklung der Organe blieb die Expression auch weiter auf die Rinde beschränkt und war im Mark nicht nachweisbar (Abb. 3.47).

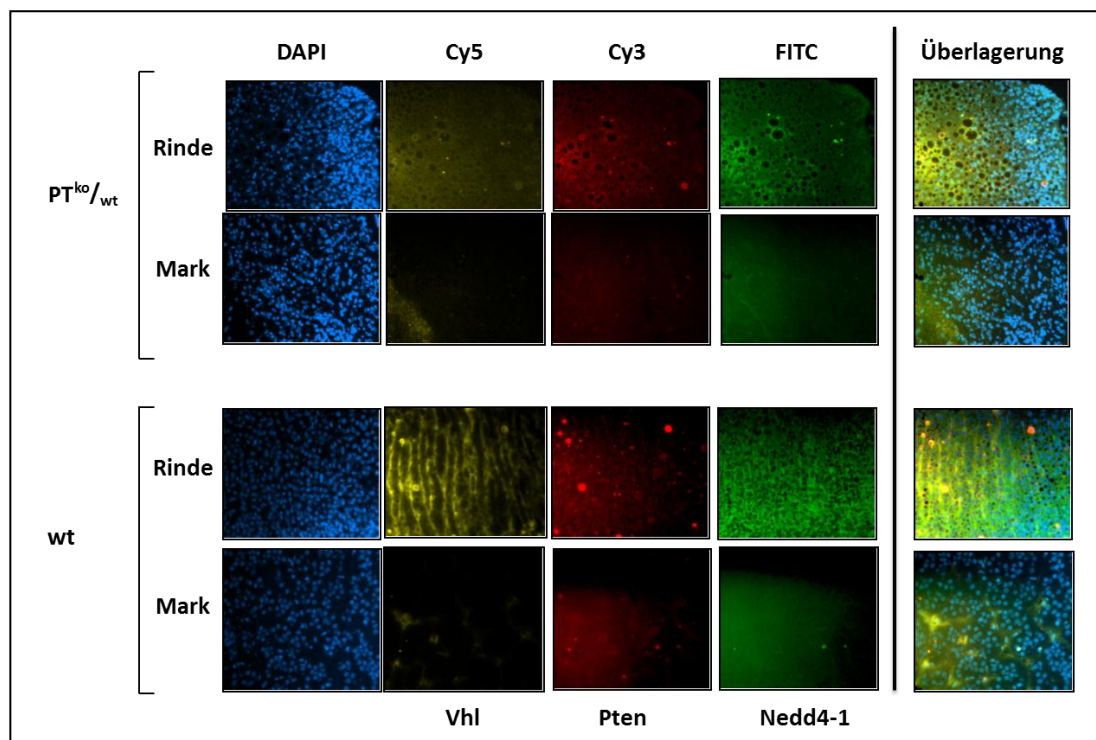


Abb. 3.47 Nachweis der Vhl-, Pten- und Nedd4-1-Expression im Nebennieren-Gewebe durch Immunfluoreszenzfärbungen. Da unabhängig vom Genotyp und des Tumorgrades alle Färbungen dem Immunfluoreszenz-Muster der wildtypischen Nebennieren entsprachen, ist hier exemplarisch nur eine Nebenniere einer $PT^{ko/wt}$ -Maus einer wildtypischen Nebenniere gegenübergestellt. Die Überlagerung zeigt eine weitestgehend identische Expression von Vhl, Pten und Nedd4-1. So sind diese Proteine in der Rinde detektierbar, im Mark hingegen fast nicht nachweisbar. Besonders die spezifische Vhl-Expression in den Gerüststrukturen des Gewebes wird deutlich. Cy5: Vhl; Cy3: Pten; FITC: Nedd4-1.

Um besser eingrenzen zu können, ob die vergrößerten Nebennieren der Mäuse tatsächlich den Charakter von PCCs besaßen, wurde im Anschluss die Expression von Adrenomedullin (ADM), die in PCCs verstärkt wird (Zeng *et al.*, 2006), in den Nebennieren untersucht. Dafür wurde die RNA aus Gewebestücken der Nebennieren extrahiert (Details siehe 2.2.3.2), in cDNA umgeschrieben (Details siehe 2.2.3.4-2.2.3.6) und die *Adm*-Expression in der qPCR analysiert (Details siehe 2.2.1.11). Für alle vergrößerten Nebennieren der Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$, $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$, $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$ und $PT^{ko/wt}$ konnte auch eine erhöhte Expression des murinen Adrenomedullins verglichen mit morphologisch unauffälligen Nebennieren nachgewiesen werden. Diese stieg jedoch nicht proportional zum Gewicht der Nebenniere an. Da selbst in Nebennieren des Genotyps $PT^{ko/wt}$ ein deutlicher Anstieg der *Adm*-Expression gemessen werden konnte, wird deutlich, dass bereits ein heterozygoter *Pten*-Verlust ausreicht, um *Adm* fehlzuregulieren. Dies bestätigte auch die erhöhte *Adm*-Expression in der $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$ -Nebenniere. Die Überexpression von Adrenomedullin ist ein Hinweis darauf, dass der heterozygote *Pten*-Verlust in den Nebennieren der Mäuse die Bildung eines PCCs induziert. Die heterozygoten *Vhl*-Punktmutationen V2B und V2C verändern die *Adm*-Expression nicht, verstärken aber vermutlich die Progression des $PT^{ko/wt}$ -induzierten Tumors (Abb. 3.48).

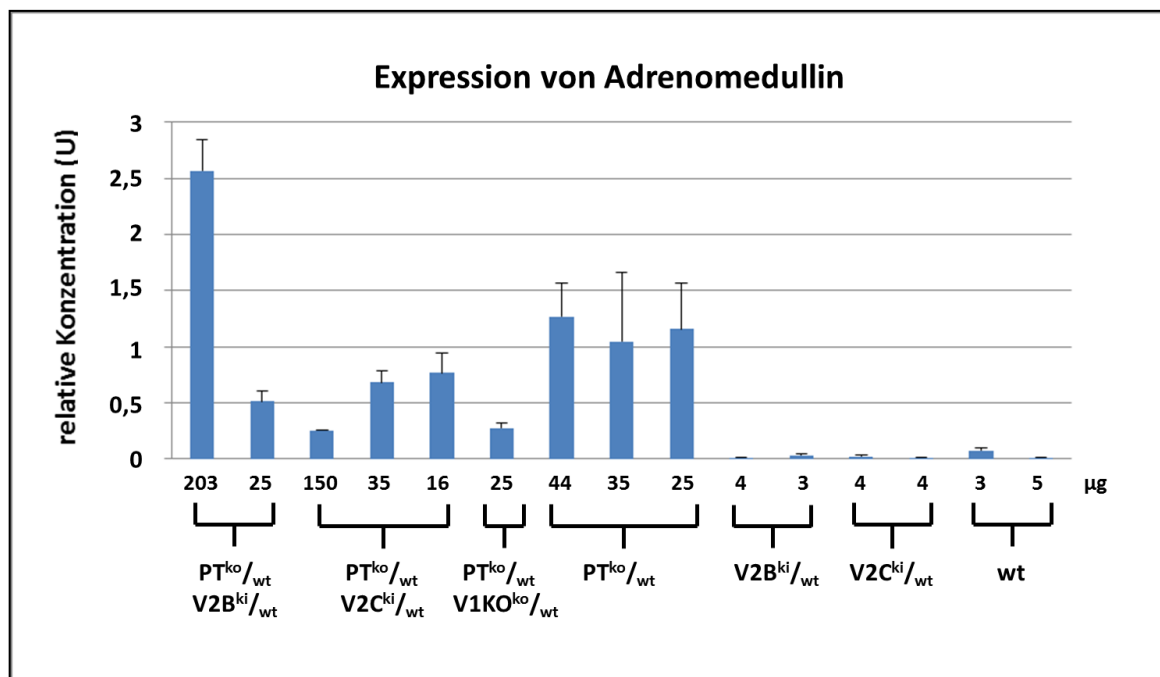


Abb. 3.48 Expressionsanalyse von Adrenomedullin in morphologisch veränderten Nebennieren. Adrenomedullin wurde in allen vergrößerten Nebennieren unabhängig vom Genotyp überexprimiert. Die *Adm*-Expression war jedoch nicht proportional zum Gewicht (angegeben in µg) der Nebennieren. Der heterozygote *Pten*-Verlust scheint die Fehlregulation der *Adm*-Expression zu bewirken und gegebenenfalls die Tumorgenese der PCCs zu induzieren. Eine heterozygote V2B- oder V2C-Mutation beeinflusst die Expression von *Adm* hingegen nicht.

4 Diskussion

Das von Hippel Lindau (VHL)-Syndrom ist eine autosomal dominante Erkrankung, die zu benignen und malignen Neoplasien in einer Vielzahl von Organen führen kann. Abhängig vom Phänotyp wird die VHL-Erkrankung in den VHL Typ 1 und 2 eingeteilt. Der VHL Typ 1 ist mit einem vollständigen *VHL*-Funktionsverlust assoziiert und führt zur Bildung von Hämangioblastomen (Hbs) im Auge und Hirn sowie klarzelliger Nierenkarzinomen (ccRCCs). Der teilweise Funktionsverlust von *VHL* induziert den VHL Typ 2A-C, der die Tumorgenese von Phäochromozytomen (PCCs) bewirkt. VHL Typ 2A (V2A)-Patienten entwickeln außerdem Hbs, wohingegen der VHL Typ 2B (V2B) zusätzlich zur Ausbildung von renalen Zysten und ccRCCs führen kann (Nordstrom-O'Brien *et al.*, 2010). Das *VHL*-Gen wird im Organismus ubiquitär exprimiert und nimmt in der Zelle viele Funktionen wahr (Richards *et al.*, 1996). Die Tumorsuppression bewirkt VHL vermutlich v.a. als E3-Ligase des VCB-Ubiquitinierungskomplexes mit verschiedenen Substraten und durch die Stabilisierung von intra- und extrazellulären Gerüststrukturen (Kaelin, 2008). Um die Auswirkungen eines VHL-Verlustes besser verstehen zu können, wurde bereits eine Vielzahl von VHL-defizienten Tiermodellen generiert und untersucht. Dabei ist auffällig, dass v.a. die Induktion von ccRCCs trotz vielfacher Anstrengungen nicht durch den alleinigen VHL-Verlust in Mäusen nachvollzogen werden kann. Auch die Ausbildung von PCCs konnte bis jetzt in VHL-defizienten Mausmodellen nicht gezeigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass neben den Mutationen in VHL ein zweites Gen fehlreguliert sein muss, um die Tumorgenese in der Niere oder der Nebenniere zu aktivieren. Tatsächlich ist bereits für andere Gewebetumore bekannt, dass erst die Interaktion verschiedener, fehlregulierter Tumorsuppressoren oder Onkogene zur Ausbildung von Karzinomen führt (Chen *et al.*, 2005). Ein besonders oft an der Tumorentwicklung beteiligter Defekt ist der hemi- oder homozygote Verlust des Tumorsuppressors PTEN (Yamada und Araki, 2001). So konnte auch in ccRCCs und PCCs bereits eine deutliche Herabregulation von PTEN nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher analysiert, inwieweit die Fehlregulation der beiden Tumorsuppressoren VHL und PTEN in der Tumorgenese zusammenwirken. Zunächst wurde mittels *in vitro*-Analysen untersucht, ob eine gegenseitige Regulation von VHL und PTEN in Zellen verschiedener Entwicklungsstufen vorherrscht und auf welchem Mechanismus diese Regulation beruht. Des Weiteren wurde der Einfluss der beiden Tumorsuppressoren auf das Verhalten von Tumorzellen ermittelt. Schließlich wurden verschiedene Mausmodelle mit heterozygotem PTEN-Verlust und unterschiedlichen VHL-Mutationen generiert und *in vivo* die Interaktion von fehlreguliertem VHL und PTEN bei der Tumorgenese überprüft. Dabei wurde der Fokus der Analysen v.a. auf die Untersuchung der Nieren und Nebennieren gelegt, um Rückschlüsse auf die mit dem VHL-Syndrom-assoziierte Entstehung von ccRCCs und PCCs ziehen zu können.

4.1 Die VHL-vermittelte Regulation von PTEN

Nachdem in der Vergangenheit viele Krebserkrankungen mit Mutationen oder Fehlregulationen von einem oder mehreren Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen assoziiert werden konnten, wurden in den letzten 10 Jahren zunehmend auch Interaktionen und Regulationsmechanismen innerhalb dieser Proteinklassen identifiziert. So wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass HIF2 α in VHL-defizienten

Nierenzellen die Aktivierung von c-myc fördert und damit zur Entwicklung von Nierenkarzinomen beiträgt (Gordan *et al.*, 2007). Neben den Onkogenen gibt es auch bei den Tumorsuppressoren Beispiele der gegenseitigen Stabilisierung. So verhindern z.B. sowohl VHL als auch PTEN die Destabilisierung von p53 (Roe *et al.*, 2006; Stambolic *et al.*, 2001). Solche Mechanismen führen zu einer Intensivierung der eigenen Funktionen, die durch die Aktivierung der Onkogene bzw. Inhibierung der Tumorsuppressoren eine verstärkte Tumorgenese induzieren können. Da in VHL-negativen Tumoren unterschiedlicher Gewebe ebenfalls eine PTEN-Defizienz nachgewiesen werden konnte, wurde hier überprüft, ob auch VHL und PTEN einen wechselseitigen Einfluss aufeinander nehmen. Da ein Fokus dieser Arbeit auf der Analyse grundlegender Mechanismen der Entstehung von ccRCCs lag, wurden hier zunächst vermehrt Zelllinien renalen Ursprungs für die folgenden Untersuchungen verwendet. Um eine Aussage treffen zu können, inwieweit der mögliche Regulationsmechanismus von VHL und PTEN in allen Zellarten während der Zellentwicklung stattfindet, wurde die Interaktion der beiden Tumorsuppressoren außerdem in Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades untersucht. So wurden für die Analysen zuerst embryonale Zellen mit einem möglichst ursprünglichen Expressionsmuster von VHL und PTEN der humanen Nierenzelllinien HEK293 und HEK293T und teilweise der murinen Zelllinie NIH-3T3 verwendet (Graham *et al.*, 1977; Jainchill *et al.*, 1969). In einem zweiten Schritt wurden Zellen analysiert, die wahrscheinlich die Differenzierung bereits durchlaufen hatten und anschließend zu Tumorzellen transformierten. Hier wurden v.a. die Zelllinien 786-O, KTCTL-26A, CAKI1 und A498 ausgewählt, die alle aus Nierenkarzinomen generiert wurden und ein deutlich verändertes Expressionsmuster aufwiesen (Williams *et al.*, 1976; Högemann *et al.*, 1994; Maxwell *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1995; Tab. 3.1). In diesen Zelllinien wurde eine Überexpression von VHL bzw. PTEN induziert und deren Einfluss auf die Proteinmenge des mutmaßlichen Bindungspartners überprüft. In einem dritten Schritt wurden primäre Gewebe aus ccRCCs, die keine intakte VHL-Expression mehr aufwiesen, hinsichtlich ihrer PTEN-Expression analysiert. Um im Anschluss den Mechanismus der Regulation zu identifizieren, wurden Promotoranalysen, Untersuchungen der Expression auf RNA- und Protein-Ebene bei unterschiedlichen Sauerstoff-Partialdrücken und Immunpräzipitationen zur Analyse direkter Interaktionen durchgeführt.

4.1.1 VHL reguliert PTEN positiv

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig ein Einfluss von VHL auf die endogene Protein-Konzentration von PTEN nachgewiesen werden (Abb. 3.2). So bewirkt FVHL entweder selbst die Stabilisierung von PTEN oder vermindert als neues, überexprimiertes Substrat von VHL-inhibierenden Regulatoren den Abbau des endogenen VHL-Proteins, das anschließend direkt oder indirekt mit PTEN interagieren könnte. FVHL unterscheidet sich lediglich durch das N-terminale FLAG-Tag vom endogenen VHL, welches aus der Aminosäuren-Sequenz DYKDDDDK besteht und die Struktur und biologische Aktivität des fusionierten Proteins nicht beeinflusst (Hopp *et al.*, 1988). Daher können wahrscheinlich beide VHL-Varianten PTEN positiv regulieren. Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss der Überexpression eines V5-gekoppelten PTEN auf die Expression bzw. Stabilität von VHL dokumentiert werden. Stattdessen wurde durch die Expression von PTENV5 ebenfalls die Menge des endogenen PTEN erhöht, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die hohe Konzentration von PTENV5 diverse Regulationsmechanismen von PTEN abfängt. Erstaunlicherweise zeigten auch Zellen mit einer erhöhten Expression des FLAG-gekoppelten

NEDD4-1 eine deutliche PTEN-Konzentration, so dass die NEDD4-1-vermittelte Degradation von PTEN (Wang *et al.*, 2007) hier vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die nur schwache VHL-induzierte PTEN-Stabilisierung ist gegebenenfalls dadurch erklärbar, dass HEK293T-Zellen bereits eine basale VHL-Expression besitzen, so dass die erhöhte Expression von VHL im zellulären Kontext nicht so stark ins Gewicht fällt. Da jedoch durch die Überexpression von VHL kein unbekanntes Molekül in die Zellen eingeschleust wurde, kann geschlossen werden, dass der beobachtete Regulationsmechanismus auch in unveränderten HEK293T abläuft und aufgrund des überexprimierten FVHLs lediglich verstärkt wird. Diese VHL-PTEN-Interaktion spielt somit möglicherweise in allen embryonalen Zellen, zumindest aber der Entwicklung der embryonalen Nierenzellen eine Rolle. Um abschätzen zu können, inwieweit die VHL-vermittelte PTEN-Stabilisierung auch in weiter entwickelten Zellen nachzuweisen ist, wurde eine VHL-Überexpression in den VHL-defizienten Nierenkarzinom-Zelllinien 786-O und KTCTL-26A induziert (Abb. 3.4). Zwar weisen Tumorzellen embryonale Eigenschaften auf, dennoch sind diese Zellen aus bereits ausdifferenzierten Tubulusepithel-Zellen hervorgegangen (Mandriota *et al.*, 2002). Sowohl für 786-O als auch für KTCTL-26A vermittelte die VHL-Restitution eine eindeutige Erhöhung der PTEN-Konzentration. Diese PTEN-Stabilisierung erscheint wesentlich intensiver als bei den embryonalen Zelllinien, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die Restitution von VHL verglichen mit einer VHL-Überexpression die betroffenen Zellen wesentlich stärker verändert. Die Tumorzellen beider Zelllinien aktivieren anscheinend einen ursprünglichen Regulationsmechanismus neu. Das deutet darauf hin, dass auch in den epithelialen Tubuluszellen, aus denen die Tumore entstanden sind, die VHL-PTEN-Interaktion stattfindet. Es ist jedoch nicht außer Acht zu lassen, dass die Tumorzellen auch aufgrund neu erlangter embryonaler Eigenschaften wieder zu der VHL-induzierten PTEN-Regulation befähigt werden könnten.

Um zu überprüfen, inwieweit das VHL-stabilisierte PTEN biologisch aktiv ist, wurde hier anschließend in HEK293- und HEK293T-Zellen die Aktivität bzw. Stabilität der Signalmoleküle AKT und p27 des PTEN-regulierten PI3K-Weges analysiert (Abb. 3.3). Neben dem funktionell wildtypischen FVHL wurde hier auch der Einfluss der VHL Typ 1-Mutation dEx2 (Isoform II), der V2B-Variante R167Q und der V2C-Mutante L188V auf die Expression untersucht. Die Überexpression aller FVHL-Varianten bewirkte sowohl in HEK293 als auch in HEK293T eine im Vergleich zu den Kontrollzellen verstärkte Phosphorylierung und somit Aktivierung von AKT. AKT ist ein Schlüsselmolekül des PI3K-Signalweges, der von PTEN gehemmt wird. Die PI3K-induzierte Phosphorylierung aktiviert die Serin/Threonin-Kinase AKT, welche daraufhin eine Vielzahl von Molekülen reguliert, die das Zellwachstum, die Proliferation, das Überleben der Zelle, die Angiogenese und Migrationsprozesse fördern (Manning und Cantley, 2007). Da in FVHL-überexprimierenden HEK293 und HEK293T-Zellen eine PTEN-Stabilisierung vorliegen sollte, wodurch der PI3K-Weg und somit auch die Phosphorylierung von AKT deutlich inhibiert werden sollte, ist dieses gegenteilige Ergebnis überraschend. Dies lässt vermuten, dass entweder das durch VHL-stabilisierte PTEN nicht funktionsfähig ist oder der PI3K-Weg in den embryonalen Zellen so oft aktiviert wird, dass die geringfügig erhöhte PTEN-Konzentration keinen sichtbaren Einfluss nimmt. Erstaunlich bleibt jedoch, dass alle FVHL-Konstrukte gleichermaßen die Phosphorylierung von AKT zu fördern scheinen. Da dies jedoch völlig unabhängig von der Funktionalität des VHL-Moleküls zu sein scheint, liegen hier gegebenenfalls sekundäre, noch unbekannte Effekte der Zellen vor. Die Protein-Konzentration von p27 wurde durch die FVHL-Expression mit Ausnahme der FVHL L188V-

Mutation nicht beeinflusst. In HEK293-Zellen wurde p27 als Doppelbande detektiert, was darauf hinweist, dass p27 hier vermehrt phosphoryliert oder acetyliert vorliegt. p27 wird v.a. in der G0-Phase des Zellzyklus exprimiert und stabilisiert, in der es Cyclin E-Cdk2 inaktiviert und so den Eintritt in die G1-Phase verhindert (Polyak *et al.*, 1994). In der G1-Phase bewirkt p27 hingegen die Zusammenlagerung und den Kernimport von D-Typ Cyclin-Cdks und fördert somit die weitere Durchführung des Zellzyklus (Larrea *et al.*, 2009). p27 wird AKT- und FOXO1-abhängig, durch den PI3K-Weg inhibiert (Shin *et al.*, 2002; Kamura *et al.*, 2004; Medema *et al.*, 2000). Die unterschiedlichen Detektionsmuster von P-AKT und p27 in den untersuchten embryonalen Zelllinien deuten darauf hin, dass der PI3K-Weg keinen essentiellen Einfluss auf p27 besitzt, welches wahrscheinlich stärker durch andere Mechanismen wie z.B. die Phosphorylierung der Aminosäure S10 reguliert wird (Boehm *et al.*, 2002). Interessanterweise verringert die VHL-Mutante L188V die Stabilität von p27. Bekanntermaßen nimmt VHL auch selbst Einfluss auf die Stabilität von p27. So bewirkt ein VHL-Verlust über p400 die Inhibierung der Expression von Skp2, welches Teil der Ubiquitin-Ligase für p27 ist (Young *et al.*, 2008). Möglicherweise bewirkt die Unfähigkeit der VHL L188V-Mutante einzelne Substrate wie Fibronectin zu binden (Hoffman *et al.*, 2001), eine erleichterte Interaktion mit p400 und dadurch einen verstärkten Abbau von p27. Die Untersuchung der Aktivität des PI3K-Weges zeigte deutlich, dass das VHL-stabilisierte PTEN entweder biologisch nicht aktiv oder zu schwach konzentriert war, um den in den embryonalen Zellen hochfrequentierten Signalweg zu inhibieren. Die Detektion von P-AKT und p27 lässt jedoch auch die Schlussfolgerung zu, dass der PI3K-Signalweg in HEK293 und HEK293T-Zellen fehlreguliert sein könnte.

Untersuchungen in der Zellkultur haben den Vorteil, dass Zellen sehr schnell kultiviert werden können und so innerhalb kurzer Zeit mit stets gleichem Entwicklungsstand für Experimente zur Verfügung stehen. Des Weiteren können Zellen relativ einfach genetisch verändert oder verschiedenen Umweltbedingungen ausgesetzt und das resultierende Zellverhalten analysiert werden. Nachteilig ist hingegen, dass Zellen durch die Immortalisierung ihre natürlichen Eigenschaften verlieren können und die Auswirkungen bestimmter Manipulationen nicht im Zellverband des *in vivo*-Gewebes betrachtet werden können. Daher wurden zur Ergänzung der Ergebnisse aus Zelllinien zusätzlich sporadische und familiäre ccRCCs und primäres Nierengewebe derselben Patienten bezüglich ihres Expressionsmusters untersucht, um Rückschlüsse ziehen zu können, inwieweit die VHL-vermittelte Stabilisierung von PTEN *in vivo* eine Rolle spielt. Nierenkarzinome werden aufgrund ihrer histologischen und genetischen Merkmale in fünf Klassen eingeteilt. Diese sind klarzellige Nierenkarzinome (ccRCCs), papilläre (chromophile) Nierentumore, Onkozytome, chromophobe Nierenkarzinome und Sammelrohr-Tumore (Thoenes *et al.*, 1990). 70–75% aller Nierentumore können dem ccRCC zugeordnet werden, welche sehr häufig mit Deletionen, Mutationen oder epigenetischen Veränderungen des *VHL*-Gens assoziiert sind, die zum Funktionsverlust von VHL führen. So ist in 100% der familiären ccRCCs und in über 50% der sporadisch auftretenden ccRCCs ein vollständiger VHL-Verlust zu verzeichnen (Cheng *et al.*, 2009). In den hier untersuchten Primärgeweben wurde daher für die ccRCCs eine VHL-Defizienz vorausgesetzt und aufgrund von Material-Knappheit weitgehend davon abgesehen den VHL-Status zu überprüfen. Lediglich in einem Drittel der Tumore konnte das VHL-Gen durch Sequenzierung auf Mutationen untersucht werden. Vier von sieben ccRCCs wiesen Mutationen im *VHL* Exon 1 auf (Abb. 3.5). Möglicherweise liegt in den anderen Tumoren VHL deletiert oder methyliert vor, was nicht mit der Methode der Sequenzierung ermittelt werden konnte. Interessant wäre daher gewesen, die von VHL auf Protein-

Ebene regulierten Signalmoleküle wie z.B. HIF zu untersuchen, um Rückschlüsse auf die Funktionalität des gegebenenfalls exprimierten, mutierten VHL-Proteins zu ziehen. Hier wurde nun in fast 40% der 18 ccRCCs eine Herabregulation von PTEN verglichen mit dem dazugehörigen gesunden Gewebe ermittelt (Abb. 3.6). Da in gesundem Nierengewebe VHL zumindest heterozygot noch aktiv ist, dies jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit in den ccRCCs nicht mehr zutrifft, ist hier der VHL-Verlust möglicherweise an der Destabilisierung des PTEN-Proteins beteiligt, was zu einer verminderten PTEN-Konzentration führen könnte. Der PTEN-Verlust wurde bereits mehrfach für einen Teil der ccRCCs beschrieben und auch mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf assoziiert (Petrella *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde jedoch erstmalig ein möglicher Zusammenhang zwischen dem VHL-Verlust und der PTEN-Defizienz hergestellt. Im Anschluss wurde nun näher analysiert, über welchen Mechanismus VHL PTEN reguliert.

4.1.2 Die Hypoxie-vermittelte Inhibierung der PTEN-Transkription

Eine bereits viel beschriebene und für das Zellverhalten sehr relevante Funktion von VHL ist die Regulation des proteasomalen Abbaus der α -Untereinheiten der HIF-Transkriptionsfaktoren. Unter Normoxie vermittelt VHL als E3-Ligase die Ubiquitinylierung von HIF α , die der Erkennung durch das 26S Proteasom dient, welches das Molekül anschließend degradiert (Maxwell *et al.*, 1999; Semenza, 2011). Ein geringer Sauerstoff-Partialdruck führt wie auch der Funktionsverlust von VHL dazu, dass HIF α stabilisiert wird, in den Zellkern transloziert und nach Fusion mit der Untereinheit ARNT die Transkription von über 200 Genen reguliert, die die Eigenschaften der Zelle maßgeblich bestimmen (Kaelin, 2008). Dabei werden Prozesse aktiviert, die die Proliferation verstärken, die Apoptose hemmen, die Angiogenese aktivieren, den Energie-Metabolismus beeinflussen und die Migration der Zelle fördern (Schofield und Ratcliffe, 2004). All diese Mechanismen tragen zur Transformation einer gesunden Zelle zur Tumorzelle bei. So wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die VHL-regulierte Stabilisierung von PTEN mit der Destabilisierung von HIF einhergeht und HIF möglicherweise die PTEN-Transkription negativ beeinflusst. Dafür wurde zu Beginn die Transkription von *PTEN* in VHL-defizienten ccRCC-Geweben verglichen mit dem korrespondierenden Normalgewebe analysiert (Abb. 3.7). Zunächst konnte anhand der erhöhten mRNA-Konzentration von *VEGF*, einem Zielgen von HIF (Gothié *et al.*, 2000), gezeigt werden, dass HIF tatsächlich in den VHL-negativen ccRCCs stabilisiert und funktional vorlag. Dies konnte auch bereits in anderen Studien sowohl für HIF1 als auch HIF2 in ccRCCs bestätigt werden (Dorevic *et al.*, 2009; Gordan *et al.*, 2008). Unerwartet konnte ebenfalls in allen acht untersuchten ccRCCs eine deutlich erhöhte mRNA-Konzentration von *PTEN* ermittelt werden. Das ist umso erstaunlicher, da für dieselben ccRCCs auf Proteinebene für fünf Tumore eine verminderte Protein-Menge, für zwei Tumore eine unveränderte Konzentration und lediglich für einen Tumor eine erhöhte Menge von PTEN verglichen mit dem Normalgewebe nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.6). Dies deutet darauf hin, dass die Regulation von PTEN auf mehreren Ebenen stattfindet und möglicherweise auch die Stabilisierung durch VHL über unterschiedliche Mechanismen ablaufen könnte. Hier konnte zunächst eine deutliche Heraufregulation von *PTEN* auf RNA-Ebene in ccRCCs gezeigt werden, was mit dem VHL-Verlust in diesem Gewebe einhergehen könnte. Bekanntermaßen reguliert VHL mehrere Transkriptionsfaktoren, die gegebenenfalls auf die Expression von PTEN einwirken könnten. So stabilisiert VHL u.a. p53 durch die Ubiquitinylierung von Mdm2 (Roe *et al.*, 2006). Da jedoch bereits bekannt ist, dass p53 die

Transkription von *PTEN* induziert (Stambolic *et al.*, 2001) und der VHL-Verlust in den ccRCCs aber zu einem verstärkten Abbau von p53 führen sollte, scheint es weniger wahrscheinlich, dass hier p53 für die erhöhte mRNA-Konzentration von *PTEN* verantwortlich ist. Des Weiteren inhibiert VHL den Transkriptionsfaktor NFκB (Yang *et al.*, 2007), der bereits sowohl mit der Aktivierung von *PTEN* u.a. in Leukämie-Zelllinien (Lee *et al.*, 2005) als auch mit der Suppression der Expression von *PTEN* u.a. in Lungen- und Schilddrüsenkarzinomen (Vasudevan *et al.*, 2004) in Verbindung gebracht wurde. Da jedoch besonders die HIF-Transkriptionsfaktoren aufgrund ihrer zahlreichen Zielgene die Antwort der Zelle auf den VHL-Verlust vermitteln, liegt die Vermutung nahe, dass HIF auch die Expression von *PTEN* reguliert. Um diese Hypothese abzusichern, wurde im Anschluss eine Analyse des *PTEN*-Promotors vorgenommen.

Um herauszufinden, ob HIF die Transkription von *PTEN* beeinflusst, wurde innerhalb eines *Luciferase-Assays* die Beeinflussung des nachfolgenden Gens durch ein Fragment des *PTEN*-Promotors, das eine Bindestelle für die HIF-Transkriptionsfaktoren enthält (*HIF responsible element*, HRE; Caro, 2001), unter Normoxie und Hypoxie ermittelt. Interessanterweise bewirkte die Hypoxie, dass das *Luciferase*-Gen nur halb so oft exprimiert wurde wie unter Normoxie (Abb. 3.8). Demnach wird die Expression des dem *PTEN*-Promotor nachgeschalteten Gens, normalerweise *PTEN*, durch Mechanismen, die unter Hypoxie aktiviert werden, inhibiert. Dieses Ergebnis ist zunächst schwer mit der erhöhten mRNA-Konzentration von *PTEN* in VHL-defizienten ccRCCs vereinbar. Möglicherweise sind diese gegensätzlichen Resultate auf methodische Schwächen des *Luciferase-Assays* zurückzuführen. So wurde nur ein Teil des Promotors analysiert, der sich zudem auch nicht in seinem wildtypischen, genomischen Kontext befand. Daher wurden Regulationsmechanismen, die an diversen *cis*- oder *trans*-Elementen der DNA ansetzen, um auf die Transkriptionsrate von *PTEN* einzuwirken, vernachlässigt. Tatsächlich ist es jedoch wesentlich wahrscheinlicher, dass die hier verwendete embryonale NIH-3T3-Zelllinie einen anderen Differenzierungsgrad als die primären Tumorgewebe aufweist und so gegebenenfalls noch Regulationsmechanismen intakt sind, die die Tumorzellen bereits verloren haben. So spiegelt sich der im *Luciferase-Assay* ermittelte Effekt der Hypoxie auf die Expression von *PTEN* auch noch auf der Protein-Ebene in NIH-3T3 sowie HEK293 wider (Abb. 3.9). Dies lässt vermuten, dass dieser negative Einfluss der Hypoxie auf *PTEN* ein allgemeingültiger Mechanismus in nicht ausdifferenzierten Zellen sein könnte. Aufgrund der HRE-Bindestelle im untersuchten Promotorfragment ist es sehr wahrscheinlich, dass der Hypoxie-induzierte Effekt durch die Bindung und anschließende Inhibierung der *PTEN*-Expression durch einen oder mehrere HIF-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Dennoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass auch andere Signalmoleküle während der Hypoxie heraufreguliert werden und so gegebenenfalls Einfluss auf die *PTEN*-Inhibierung nehmen könnten. So führt beispielsweise der Anstieg des Stickstoffmonoxid-Gehaltes unter Hypoxie zur Aktivierung der MAP Kinasen p38, JNK (*c-jun N-terminal kinases*) und ERK (*extracellular signal regulated kinase*), welches auch den Transkriptionsfaktor NFκB induziert (Maulik *et al.*, 2008; Koong *et al.*, 1994).

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass während der Ausdifferenzierung von embryonalen Nierenzellen die Regulation von *PTEN* variiert wird. Zudem scheint in der Tumorgenese eine Adaption an einen niedrigen Sauerstoff-Partialdruck stattzufinden, die dazu führt, dass inhibierende Regulationsmechanismen selbst bei der Überschreitung von Reizschwellen nicht mehr aktiviert werden. Um eine Tendenz zu erhalten, ob und inwieweit Anpassungsprozesse in der Regulation von *PTEN* eine Rolle spielen, wurde daher die Kinetik der *PTEN*-Expression innerhalb von 72 Stunden in

HEK293 und HEK293T unter Hypoxie analysiert. Erstaunlicherweise unterschied sich die Kinetik von HIF1 und HIF2 in beiden Zelllinien voneinander. Während die nachweisbare Protein-Menge von HIF1 innerhalb der 72 Stunden stetig anstieg, war für HIF2 nach 72 Stunden bereits wieder ein deutlicher Abfall der Konzentration zu verzeichnen. So bewirkt die Hypoxie anscheinend einen schnellen, intensiven Anstieg der HIF2-Konzentration, die jedoch anschließend schnell wieder abnimmt, wohingegen HIF1 langsamer aber dafür kontinuierlich stabilisiert wird. Dies ist vermutlich auf eine unterschiedliche Sensitivität für die Stabilisierungsmechanismen für HIF α -Untereinheiten zurückzuführen. So ist bekannt, dass HIF1 α noch länger als HIF2 α in VHL-negativen Zellen degradiert wird (Kim *et al.*, 2006). HIF2 α ist außerdem weniger sensitiv für die FIH-vermittelte Inhibierung. Dies bewirkt, dass HIF2 bereits bei höheren Sauerstoff-Partialdrücken funktional wird (Bracken *et al.*, 2006). Diese Feinabstimmung der Regulation ist insofern sinnvoll, da die HIF-Transkriptionsfaktoren nicht identisch für ihre Zielgene sind (Kaelin und Ratcliffe, 2008). Dies erklärt auch, warum die Entstehung verschiedener Karzinome oft nur mit HIF1 oder HIF2 assoziiert werden kann. So scheint HIF1 α in Endometrium- und Brusttumoren eine größere Rolle zu spielen (Sowter *et al.*, 2003). In ccRCCs scheint sogar im Verlauf der Entstehung ein Wechsel der Aktivität von HIF1 auf HIF2 nötig zu sein (Shen und Kaelin, 2012). Im Gegensatz zu HIF variierte die Konzentration von PTEN hier in den HEK293 und HEK293T. So konnte in HEK293 gezeigt werden, dass die PTEN-Menge sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene mit anhaltender Hypoxie proportional zur HIF1 α -Konzentration zunimmt. Dies bestätigt die Promotor-Analyse von PTEN erneut (Abb. 3.8 und Abb. 3.10) und stärkt die These, dass HIF die transkriptionelle Regulation in embryonalen Zellen unter Hypoxie bewirkt. In HEK293T-Zellen scheint an der PTEN-Regulation auch HIF2 beteiligt zu sein. So kommt es proportional zur HIF2-Stabilisierung zu einer Erhöhung der PTEN-Konzentration sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene. Dies ist allerdings überraschend, da HIF2 mit der Entstehung verschiedener Tumore wie Kolonkarzinome, Neuroblastome und ccRCCs assoziiert wird. Möglicherweise ist jedoch die schnelle, kurze Heraufregulation von Tumorsuppressoren wie PTEN die erste Zellantwort auf sich ändernde Umweltbedingungen. So kommt es gegebenenfalls erst nach dem Überleben und der Überwindung dieses Impulses zu einer Anpassung an die neuen Umweltbedingungen und zu einer Transformation in eine Tumorzelle. Interessant ist weiterhin, dass die Kinetik der PTEN-Regulation in den HEK293 und HEK293T verschieden war (Abb. 3.10). Diese Zelllinien unterscheiden sich lediglich dadurch, dass HEK293T eine zusätzliche Transformation mit *large T* durchlaufen hat. Tatsächlich nimmt *large T* jedoch auf essentielle Zellmechanismen Einfluss. *Large T* ist ein frühes Genprodukt des SV40-Virus und aktiviert die Transkription zahlreicher viraler und zellulärer Gene (Damania *et al.*, 1998). Es wirkt als TFIID-assoziierter Faktor (TAF) in der Transkriptionsinitiation für alle drei RNA-Polymerasen (Damania *et al.*, 1996). Weiterhin hemmt *large T* die p53-Bindung an die DNA (Levine *et al.*, 1997) und fördert die Auflösung der E2F1-Rb1-Interaktion, was die Zellzyklus-Progression einleitet (Zalvide *et al.*, 1998). Diese Funktionen verdeutlichen den erheblichen Einfluss von *large T* auf die Zelle und erklären die unterschiedliche Kinetik der Regulation in HEK293 und HEK293T, obwohl beide Zelllinien denselben Ursprung besitzen. Die Transformation durch zwei virale Onkogene verleiht den HEK293T-Zellen vermutlich Eigenschaften von Tumorzellen. So ist die veränderte Regulation von PTEN in HEK293T gut mit der Dysregulation in ccRCC-Gewebe vereinbar (Abb. 3.6) und bestärkt die Vermutung, dass es in Tumoren zu einer Fehlregulation von PTEN kommt, die nach vollständiger Transformation der Zelle zur Tumorzelle häufig zum Verlust des Proteins führt. Interessanterweise wurde unter Hypoxie in

beiden Zelllinien auch NEDD4-1 fehlreguliert. Dies lässt vermuten, dass VHL möglicherweise auch indirekt über Regulationsmechanismen auf der Protein-Ebene Einfluss auf die PTEN-Stabilität nimmt (Details siehe 4.1.3).

Abschließend wurden die Zellen eines ccRCCs für eine Passage in der Zellkultur kultiviert, mittels Cobaltchlorid einer Hypoxie-Simulation ausgesetzt und die PTEN-Konzentration mit der unbehandelten Zellen verglichen. Mit Hilfe des Cobaltchlorids lassen sich Prolylhydroxylasen hemmen. Die Cobalt-Ionen konkurrieren mit den Eisen-Ionen des katalytischen Zentrums und inaktivieren das Enzym (Salnikow *et al.*, 2004). Im aktiven Zustand hydroxyliert PHD die HIF α -Untereinheiten und bildet so die Bindestelle für VHL. Die Inaktivierung der PHDs bewirkt die Stabilisierung der HIF-Transkriptionsfaktoren, wodurch die Zellantwort für Hypoxie eingeleitet wird (Jaakkola *et al.*, 2001; Berra *et al.*, 2003). Die chemische Behandlung der Zellen mit Cobaltchlorid wird daher häufig verwendet, um die Auswirkungen von HIF zu untersuchen. Das Cobaltchlorid selbst hat dabei anscheinend keinen Einfluss auf die Entwicklung und die Überlebensfähigkeit der Zellen (Prangere *et al.*, 1997). Überraschend veränderte sich die PTEN-Konzentration in CoCl₂-behandelten Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen nicht. Interessanterweise zeigten jedoch die Zellen des ccRCCs mit kaum veränderter PTEN-Konzentration auf Protein-Ebene mit zunehmender Stabilisierung von HIF1 eine subzelluläre Umverteilung, die zum Kernexport von PTEN führte (Abb. 3.11). Neben der freien Diffusion in den Kern (Liu *et al.*, 2005), welche hier wahrscheinlich keine Rolle spielt, sind bereits mehrere Mechanismen bekannt, die zur Translokation von PTEN in den Kern führen und hier gegebenenfalls fehlreguliert sein könnten. So konnte eine Interaktion von PTEN und MVP, einem unspezifischen Carrier des Transports zwischen Kern und Zytoplasma, nachgewiesen werden (Mossink *et al.*, 2003). Außerdem konnten Gil *et al.* zeigen, dass RAN den Kernimport von PTEN vermittelt und dass die Phosphorylierungsstelle S37 essentiell für den Transport in den Kern ist, hingegen S380, T383 und S385 den Export von PTEN ins Zytoplasma koordinieren (Gil *et al.*, 2006). Schließlich wiesen Trotman *et al.* nach, dass auch die NEDD4-1-vermittelte Mono-Ubiquitinylierung von PTEN den Kernimport induziert (Trotman *et al.*, 2007). Da für NEDD4-1 bereits eine veränderte Regulation unter Hypoxie gezeigt werden konnte (Abb. 3.10), wäre es möglich, dass NEDD4-1 für die hier nachgewiesene Umverteilung von PTEN verantwortlich ist. Obwohl in dem untersuchten ccRCC keine eindeutige Veränderung der NEDD4-1-Konzentration festgestellt werden konnte, könnte gegebenenfalls eine Fehlregulation der Aktivität von NEDD4-1 vorliegen. Deutlich wird in jedem Falle, dass nicht nur die Transkription von PTEN durch hypoxische Signalmoleküle wie HIF, das durch VHL inhibiert wird, verändert wird, sondern dass auch auf Protein-Ebene eine Regulation von PTEN stattfindet, die möglicherweise durch VHL beeinflusst werden könnte.

4.1.3 Die VHL-NEDD4-1-Interaktion

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass in VHL-defizienten Geweben die PTEN-Konzentration auf Protein-Ebene verglichen mit der RNA-Ebene stark vermindert vorlag und eine Umverteilung des PTEN-Proteins in der Zelle aufgrund der durch VHL-Defizienz vermittelten HIF-Stabilisierung stattfand. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob diese Regulationsmechanismen auf Protein-Ebene möglicherweise durch VHL modifiziert werden. NEDD4-1 gehört zur NEDD4-like Familie und ist eine Hect-E3-Ligase, die innerhalb eines Ubiquitinylierungskomplexes spezifisch die Ubiquitinylierung verschiedener Substrate vermittelt, die dadurch entweder proteasomal abgebaut, in

ein anderes Zellkompartiment transportiert oder vor Endozytose geschützt werden (Yang und Kumar, 2010). Wang *et al.* konnten zeigen, dass PTEN eine direkte Bindung mit NEDD4-1 eingeht und ein Substrat des Ubiquitynylierungskomplexes ist. So vermittelt NEDD4-1 die Poly-Ubiquitynylierung von PTEN, die die Proteolyse des Tumorsuppressors einleitet (Wang *et al.*, 2007). Des Weiteren induziert jedoch eine NEDD4-1-vermittelte Mono-Ubiquitynylierung von PTEN an Lys13 und Lys289 seinen Transport in den Kern, wo es wichtige Tumorsuppressor-Funktionen wahrnimmt (Wang *et al.*, 2007; Trotman *et al.*, 2007). Demnach reguliert NEDD4-1 PTEN sowohl negativ als auch positiv. Da bereits in dieser Arbeit sowohl ein Konzentrationsabfall als auch eine Translokation des PTEN-Proteins in Zellen mit vollständigem bzw. simuliertem teilweisen VHL-Funktionsverlust beobachtet werden konnten, wurde nun geprüft, ob VHL gegebenenfalls über NEDD4-1 auf PTEN einwirkt. Dafür wurde zunächst untersucht, ob sich die NEDD4-1-Menge in verschiedenen Zelllinien durch die Überexpression von VHL verändert (Abb. 3.12). In der embryonalen Zelllinie HEK293T induzierte die verstärkte VHL-Expression eine Erhöhung der NEDD4-1-Konzentration. Dies zeigt zwar, dass VHL tatsächlich Einfluss auf NEDD4-1 zu nehmen scheint, ist aber dennoch verwunderlich, da in VHL-überexprimierenden HEK293T auch das NEDD4-1-Substrat PTEN heraufreguliert wird. So könnte VHL eine Stabilisierung von NEDD4-1 bewirken, die aber mit einer Inaktivierung einhergeht. Auch in der VHL-positiven Phäochromozytom-Zelllinie PC12 (Bauer *et al.*, 2002) wurde eine deutliche VHL-induzierte Erhöhung der NEDD4-1-Menge nachgewiesen. PC12-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie aufgrund ihres Ursprungs aus dem Nebennierenmark Katecholamine produzieren und Calcium-abhängig freisetzen (Greene *et al.*, 1976; Schubert und Klier, 1977) und Spannungs-abhängig elektrische Impulse weiterleiten (Laque und Huttner, 1980). Die Behandlung mit NGF führt zu einer erhöhten PTEN-Konzentration und zur Ausbildung von Neuriten und macht die Zelllinie PC12 somit zu einem gelungenen Zellmodell zur Untersuchung der Neuronen-Entwicklung (Lachyankar *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 1989). Der PTEN-Verlust verhindert im Gegensatz zu echten Neuronen die Neuriten-Entwicklung (Jia *et al.*, 2010). Die in VHL überexprimierenden PC12-Zellen beobachtete erhöhte NEDD4-1-Konzentration könnte hier, die Funktionalität von NEDD4-1 vorausgesetzt, ebenfalls zu einer PTEN-Defizienz und zu Beeinträchtigungen des Neuriten-Wachstums führen. Die Morphologie der PC12-Zellen wie auch die PTEN-Expression wurde hier nicht näher analysiert. Da die Zellen jedoch auch in Standardmedium ohne NGF-Zugabe kultiviert wurden, besteht kein Hinweis auf Differenzierungsprozesse. Schließlich wurde die NEDD4-1-Konzentration auch in Nierenkarzinom-Zelllinien bestimmt, in denen vorher eine VHL-Überexpression induziert wurde. So zeigten die VHL-positiven CAKI1, HEK293T und PC12 eine VHL-vermittelte Erhöhung der NEDD4-1-Menge. Die VHL-negativen Tumor-Zelllinien A498, KTCTL-26A und 786-O wiesen hingegen keine Veränderung bzw. sogar eine Verminderung der NEDD4-1-Konzentration in VHL-überexprimierenden Zellen auf. Dies deutet darauf hin, dass VHL tatsächlich die Expression oder Stabilität von NEDD4-1 verstärkt. Dieser Mechanismus scheint jedoch in VHL-defizienten Zellen mit höherem Tumorgrad verloren zu gehen und kann auch durch eine VHL-Restitution nicht wieder hergestellt werden.

Schließlich wurde die NEDD4-1-Expression in VHL-defizienten ccRCCs überprüft. Auf RNA-Ebene konnte in allen acht ccRCCs, in denen bereits auch schon die VEGF- und PTEN-Expression analysiert wurden (Abb. 3.7), verglichen mit dem korrespondierenden, gesunden Gewebe eine deutlich erhöhte mRNA-Konzentration von NEDD4-1 nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Diese Heraufregulation von NEDD4-1 könnte die Diskrepanz zwischen der erhöhten mRNA-Konzentration

und verminderten Proteinmenge in diesen ccRCCs erklären, da NEDD4-1 die Proteolyse von PTEN fördert (Wang *et al.*, 2007). Tatsächlich konnte für fünf der acht untersuchten ccRCCs auch eine erhöhte NEDD4-1-Protein-Menge nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten 11 der 18 Tumore eine gesteigerte Protein-Konzentration von NEDD4-1 (Abb. 3.14). 85,7% der ccRCCs wiesen außerdem bei einem gesteigerten NEDD4-1-Gehalt auch eine verminderte PTEN-Konzentration auf. Dies verdeutlicht, dass das überexprimierte NEDD4-1 auch funktionell aktiv ist und kein Artefakt darstellt. Die Relevanz von NEDD4-1 als potentiell Onkogen wird auch bereits für andere Tumortypen diskutiert. So zeigten Wang *et al.*, dass die erhöhte Expression von NEDD4-1 die onkogenen Funktionen von K-RAS verstärkt, was zu vermehrtem Wachstum und besseren Überlebenschancen für die Zelle führt. Außerdem führt die Überexpression von NEDD4-1 in Blasen- und Prostatakarzinomen zu einer PTEN-Defizienz (Wang *et al.*, 2007). Auch in NSC (*non small cell*)-Lungenkarzinomen, Magen- und Kolontumoren wurde eine Heraufregulation des NEDD4-1-Proteins nachgewiesen, die meist mit einem PTEN-Verlust einhergeht (Amodio *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008). Obwohl die NEDD4-1-Überexpression eine Rolle in der Tumorgenese zu spielen scheint, konnte in den untersuchten ccRCCs keine signifikante Heraufregulation von NEDD4-1 beobachtet werden, dafür müssten deutlich mehr ccRCCs untersucht werden. So waren die ermittelten Proteinkonzentrationen von PTEN und NEDD4-1 relativ heterogen, was möglicherweise an der Auswahl des Gewebes lag, bei dessen Protein-Extraktion nicht gewährleistet werden konnte, dass alle Tumore und assoziierten gesunden Gewebe den gleichen Entwicklungsstand bzw. denselben Tumorgrad besaßen. Aus diesem Grund wurde die NEDD4-1-Expression für zehn der 18 Paare aus ccRCC und Normalgewebe in der Immunhistochemie näher betrachtet. Tatsächlich waren selbst in den vermeintlich gesunden Geweben immer wieder tumoröse Strukturen zu finden, wohingegen die ccRCCs in bestimmten Regionen mit Normalgewebe durchzogen waren. Die immunhistochemischen Analysen machten aber deutlich, dass in gesunden Epithelgeweben sowohl PTEN als auch NEDD4-1 exprimiert wurden. Hingegen in fortgeschrittenen ccRCC-Geweben, deren Morphologie durch ein klares Zytoplasma aufgrund von Lipid- und Glykogen-Einlagerungen gekennzeichnet ist, konnte weder PTEN noch NEDD4-1 nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Dies lässt vermuten, dass während der Tumorentstehung eine Fehlregulation von NEDD4-1 induziert werden kann, die PTEN-abhängig die Entwicklung zum ccRCC fördert, jedoch bei Erreichen des progressiven ccRCC-Stadiums zu einem vollständigen NEDD4-1-Verlust führt. Im Gegensatz zu den VHL-defizienten Tumor-Zelllinien wiesen die ccRCCs eine meist erhöhte NEDD4-1-Expression auf, was darauf hindeutet, dass sich primäre Tumorgewebe möglicherweise bezüglich ihres Expressionsmuster von immortalisierten Tumorzellen unterscheiden.

Anschließend wurde analysiert, ob VHL und NEDD4-1 miteinander interagieren und welcher Art diese Interaktion ist. Dafür wurden HEK293T mit VHL-, NEDD4-1- und PTEN-Konstrukten in verschiedenen Kombinationen transfiziert, nach 48 Stunden die Proteine der Zellen extrahiert und diverse Immunpräzipitationen (IPs) durchgeführt, die dann im *Western Blot* untersucht wurden. Die Methode der Immunpräzipitation erlaubt die Untersuchung von Protein-Interaktionen innerhalb jener Zellkompartimente, die ihren natürlichen Umweltbedingungen und Orten ihrer biologischen Wirkung entsprechen. Allerdings birgt diese Methode auch Nachteile. So kann nicht gewährleistet werden, dass während der Protein-Extraktion schwache Interaktionen gelöst werden, die dadurch nicht nachweisbar sind. Unspezifische Proteinbindungen des Antikörpers bzw. spontane Interaktionen der Proteine mit den *beads* können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Zudem können durch die vielen Waschschriffe und die Elution Proteine durch Verdünnungseffekte verloren gehen. Schließlich ist mit

der IP nicht bestimmbar, ob eine Protein-Interaktion direkt oder über weitere Proteine in Proteinkomplexen vermittelt wird. Hier wurden zunächst die Interaktionen von PTEN untersucht. Da VHL und PTEN sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert sind, ist eine Interaktion zumindest theoretisch möglich (Iliopoulos *et al.*, 1998; Das *et al.*, 2003; Ginn-Pease *et al.*, 2003). NEDD4-1 ist im Zytoplasma v.a. an der Peripherie, wo auch PTEN verstärkt zu finden ist, lokalisiert (Anan *et al.*, 1998), so dass auch eine Bindung von PTEN und NEDD4-1 denkbar wäre. Mit Hilfe der IP konnte bestätigt werden, dass PTEN mit NEDD4-1 interagiert (Abb. 3.16). Dies widerlegt die Forschungsergebnisse von Fouladkou *et al.*, die weder in Zellen noch in murinen Geweben eine Interaktion und NEDD4-1-induzierte Proteolyse von PTEN nachweisen konnten (Fouladkou *et al.*, 2008). Zwar kann mittels der IP keine Aussage über die Funktion der PTEN-NEDD4-1-Bindung gemacht werden, dennoch stärkt sie die Erkenntnisse von Wang *et al.*, die ebenfalls eine Interaktion und außerdem eine NEDD4-1-vermittelte Ubiquitylierung von PTEN nachweisen konnten (Wang *et al.*, 2007). Ahn *et al.* wiesen darüber hinaus nach, dass PTEN auch NEDD4-1 negativ reguliert und somit ein negativer Feedback-Mechanismus besteht (Ahn *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu NEDD4-1 konnte mittels der IP keine Bindung von PTEN und VHL nachgewiesen werden (Abb. 3.16). Dies verdeutlicht, dass VHL nicht direkt mit PTEN interagiert, um es zu stabilisieren. Demnach können mögliche VHL-induzierte PTEN-stabilisierende Mechanismen auf Protein-Ebene nur über Vermittler-Moleküle bewirkt werden. Daraufhin wurden in einer weiteren IP mögliche Interaktionen von VHL analysiert. Auch hier konnte kein PTEN nachgewiesen werden, was die Annahme stärkt, dass VHL nicht direkt mit PTEN interagiert. Stattdessen konnte erstmals gezeigt werden, dass VHL eine Interaktion mit NEDD4-1 eingeht (Abb. 3.17). So könnten die beiden Ubiquitin-Ligasen auf die Stabilität der anderen einwirken und VHL gegebenenfalls tatsächlich über NEDD4-1 Einfluss auf PTEN nehmen.

Um mögliche Rückschlüsse auf die Funktion dieser VHL-NEDD4-1-Bindung ziehen zu können, wurde zunächst analysiert, welche Domänen die Interaktion vermitteln. Dafür wurde eine Überexpression von NEDD4-1 und der VHL-Isoform I, der VHL-Isoform III oder den ersten 89 Aminosäuren von VHL in HEK293T induziert und die Proteinlysate der Zellen einer gegen VHL gerichteten IP unterzogen. Die Isoform I (1.ATG) umfasst die gesamten 213 Aminosäuren, beginnend beim ersten Translations-Startpunkt. Die Translation der Isoform III (2.ATG) setzt hingegen am zweiten Translations-Startpunkt an, wodurch diesem Protein die ersten 54 Aminosäuren der Isoform I fehlen. Diese N-terminal gelegenen 54 Aminosäuren enthalten die Repeatsequenz (GXEEX)₈, der jedoch bis jetzt keine Funktion zugesprochen werden konnte (Iliopoulos *et al.*, 1998). Das Konstrukt VHL 1-89 umfasst neben der Repeatsequenz außerdem den N-terminal gelegenen Bereich der β -Domäne. In der IP konnte überraschend eine Interaktion von NEDD4-1 mit allen VHL-Varianten gezeigt werden (Abb. 3.17). Allerdings war die Interaktion von NEDD4-1 mit der VHL-Isoform III deutlich schwächer ausgeprägt als die mit der Isoform I. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Isoform III zwar gleichermaßen im Kern und Zytoplasma zu finden ist, jedoch nie an der Membran lokalisiert ist, wo NEDD4-1 hingegen bevorzugt vorliegt (Iliopoulos *et al.*, 1998; Anan *et al.*, 1998). Die Interaktion könnte also dadurch erschwert werden, dass die Moleküle seltener in Kontakt treten. Erstaunlicherweise scheinen die ersten N-terminal gelegenen 89 Aminosäuren von VHL für eine Interaktion mit NEDD4-1 auszureichen. Hier konnte die stärkste Bindung nachgewiesen werden. Da die (GXEEX)₈-Sequenz vermutlich keine Rolle für die Interaktion spielt, scheint hier der N-terminale Bereich der β -Domäne der Aminosäuren 63-89 zu genügen, um den Kontakt mit NEDD4-1 zu

vermitteln. Die Funktion der β -Domäne von VHL ist die Substraterkennung und -bindung, auch die HIF α -Untereinheiten werden im Bereich der Aminosäuren 65-117 gebunden und der Ubiquitylierung zugeführt (Ohh *et al.*, 2000). Ebenso wie HIF könnte NEDD4-1 möglicherweise ein Substrat von VHL darstellen und VHL-vermittelt reguliert werden. Die Intensität der Interaktionen kann in diesem Experiment leider nicht mit Sicherheit ermittelt werden. Zwar bindet der zur IP verwendete VHL-Antikörper VHL im Bereich der Aminosäuren 54-95 (Iliopoulos *et al.*, 1995) und müsste daher auch alle verwendeten VHL-Konstrukte binden, dennoch ist unklar, ob möglicherweise die Stabilität der Antigen-Antikörper-Interaktion durch veränderte Faltungen beeinträchtigt wurde. Daher wurde im Folgenden zur Ergänzung der Einfluss verschiedener VHL-Punktmutanten und der VHL Isoform II (dEx2) auf die Interaktion von VHL und NEDD4-1 untersucht (Abb. 3.18). Die Isoform II des VHL-Proteins entsteht endogen durch alternatives Splicing, bei dem das Exon 2 entfernt wird (Latif *et al.*, 2003). Dies bewirkt die Deletion der β -Domäne im Bereich der Aminosäuren 114-154, was die Funktionalität der Substrat-Bindedomäne durch den Verlust der Erkennungssequenz für die Substrate stark beeinträchtigt. So bleibt zwar die Interaktion der α -Domäne mit Elongin C erhalten, die Regulation der HIF α -Untereinheiten und der Fibronectin-Matrix wird jedoch inhibiert (Bonicalzi *et al.*, 2000; Clifford *et al.*, 2001). Auch der Kernexport wird unterbunden, da die Bindestelle für die Transport-induzierende GTPase RAN verloren geht, so dass diese VHL-Variante lediglich im Kern vorliegt (Groulx *et al.*, 2000). Die Deletion des Exons 2 führt somit zu einem vollständigen Funktionsverlust von VHL und wird dem VHL Typ 1 zugeordnet, der die Tumorgenese von Hbs und ccRCCs induziert (Clifford *et al.*, 2001; Kaelin, 2008). Die Punktmutation R167Q ist im N-Terminus der α -Domäne von VHL lokalisiert. Sie bewirkt eine Destabilisierung des VHL-Proteins und eine Abschwächung der Elongin C-Bindung (Rathmell *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). Dadurch wird die Ubiquitylierung von HIF1 α und v.a. von HIF2 α deutlich vermindert (Clifford *et al.*, 2001; Hacker *et al.*, 2008). Die Stabilisierung der HIF-Transkriptionsfaktoren führt zur Aktivierung der Transkription einer Vielzahl Tumor-relevanter Gene, besonders die erhöhte Konzentration von HIF2 α konnte in R167Q-Zellen mit der Tumorbildung assoziiert werden (Li *et al.*, 2007). Die Punktmutation G195X induziert die Entstehung eines frühzeitigen Stopkodons, so dass ein VHL-Protein entsteht, dem die letzten 18 Aminosäuren und somit auch der C-Terminus der β -Domäne fehlen. Auch diese VHL-Mutante verhindert die Ubiquitylierung der HIF α -Untereinheiten und erstaunlicherweise auch die Bindung von Elongin C (Clifford *et al.*, 2001). Sowohl R167Q als auch G195X werden aufgrund ihres Phänotyps mit der VHL Typ 2B (V2B)-Erkrankung assoziiert, bei der Hbs, ccRCCs und PCCs induziert werden können (Clifford *et al.*, 2001; Richard *et al.*, 2012). Schließlich wurden ebenso drei VHL Typ 2C (V2C)-Mutationen untersucht, die zur Entstehung von PCCs führen können (Hoffman *et al.*, 2001). Während die V2C-Mutationen R64P und V85L in der β -Domäne liegen, ist L188V im C-Terminus der α -Domäne lokalisiert. Eine V2C-Mutation bewirkt eine Konformationsänderung des VHL-Proteins, die die Interaktionen mit anderen Molekülen abschwächt, wodurch mehr freie V2C-Proteine für die Proteolyse zugänglich sind (Knauth *et al.*, 2009). Die V2C-Mutanten L188V, R64P und V84L vermindern jedoch weder die Interaktion mit Elongin C noch die Ubiquitylierung und die darauffolgende Proteolyse der HIF α -Untereinheiten maßgeblich (Clifford *et al.*, 2001). Stattdessen bewirken sie die Unfähigkeit des VHL-Proteins zur Interaktion mit Fibronectin, die normalerweise zur Stabilisierung der Extrazellulärmatrix beiträgt (Hoffman *et al.*, 2001). Die durch die Mutationen beeinträchtigten Funktionen von VHL sind in Tabelle 4.1 nochmals zusammengefasst (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Funktionsdefekte der VHL-Mutationen. Die Tabelle zeigt die verwendeten VHL-Mutanten, ihre Einordnung in den VHL Typ 1 oder 2 (V2B und V2C) und ihre bereits bekannten und neu ermittelten funktionalen Beeinträchtigungen. +++: intakte Funktion, ++: leicht abgeschwächte Funktion, +: deutlich abgeschwächte Funktion, —: Funktionsverlust

VHL-Mutation	Phänotyp	HIF1/2 α -Regulation	Elongin C-Bindung	Fibronectin-Bindung	NEDD4-1-Interaktion
VHL wt	wt	+++	+++	+++	+++
dEx2	Typ 1	—	+++	—	+++
R167Q	V2B	+	—	—	—
G195X	V2B	+	—	—	—
L188V	V2C	+++	+++	—	++
R64P	V2C	++	+++	+	++
V84L	V2C	+++	+++	+	++

In der IP konnte neben der Interaktion der beiden VHL- und NEDD4-1-Wildtyp-Moleküle auch eine Interaktion aller V2C-Varianten mit NEDD4-1 gezeigt werden. Diese waren verglichen mit der Wildtyp-Bindung etwas abgeschwächt, was auf eine leicht verminderte Bindungsaffinität zu NEDD4-1 aufgrund der V2C-induzierten Konformationsänderung des VHL-Proteins zurückzuführen sein könnte. Diese ist ähnlich auch für den VCB-Komplex nachweisbar (Knauth *et al.*, 2009). Für beide V2B-Mutanten konnte ein fast vollständiger Verlust der Interaktion mit NEDD4-1 gezeigt werden. Da G195X in der β -Domäne lokalisiert ist, bestärkt dieses Ergebnis die Annahme, dass NEDD4-1 als Substrat über die β -Domäne gebunden wird. Die R167Q-Mutation liegt hingegen in der α -Domäne, die die Interaktion mit Elongin C vermittelt. Möglicherweise entsteht durch R167Q eine Konformationsänderung, die ähnliche Auswirkungen auf die Bindepartner von VHL nimmt wie die durch G195X verursachte veränderte Konformation. Erstaunlicherweise konnte für die VHL Isoform II (dEx2) eine NEDD4-1-Bindung ermittelt werden, die in ihrer Intensität der Wildtyp-Interaktion entspricht. Da die β -Domäne in dEx2 nicht funktionell ist, muss hier eine Interaktion über die α -Domäne vermittelt werden. Möglicherweise kann auch NEDD4-1 als E3-Ligase unter bestimmten Bedingungen mit Elongin C interagieren, wodurch in einem lockeren Komplex auch eine indirekte Interaktion zu VHL bzw. dEx2 nachweisbar wäre. Eine Kooperation des VCB-Komplexes und NEDD4-1 wurde bereits für die Ubiquitylierung der RNA-POL II gezeigt (Harreman *et al.*, 2009). Ein verminderter Sauerstoff-Partialdruck bewirkte eine Intensivierung der Interaktion aller VHL-Mutanten mit NEDD4-1 (Abb. 3.18). Dies deutet darauf hin, dass unter Hypoxie die VHL-Bindestelle besser oder häufiger für NEDD4-1 zugänglich ist. Da unter Hypoxie die Bindung der HIF α -Untereinheiten an die β -Domäne inhibiert wird (Jaakkola *et al.*, 2001), wäre es möglich, dass sich HIF α und NEDD4-1 eine Bindedomäne teilen und so miteinander als Substrate des VCB-Komplexes um die Ubiquitylierung konkurrieren. Sogar die Bindung der V2B-Mutanten wird durch Hypoxie verstärkt, was zeigt, dass die HIF-Regulation in V2B-Mutanten vermutlich nicht vollständig verloren geht (Rathmell *et al.*, 2004).

Anschließend sollte ebenso eingegrenzt werden, welche NEDD4-1-Domäne für den Kontakt mit VHL essentiell ist. Das NEDD4-1-Protein besteht aus einer N-terminal gelegenen C2-Domäne, an die sich vier WW-Domänen und C-terminal eine Hect-Domäne anschließen (Abb. 3.1; Anan *et al.*, 1998). Die C2-Domäne ist eine Bindedomäne, die Calcium-abhängig die Interaktion des NEDD4-1-Proteins mit Phospholipiden, Inositol-Phosphatasen und einigen Proteinen vermittelt und so u.a. die Lokalisierung an der Membran induziert (Plant *et al.*, 1997). Die WW-Domänen bestehen aus jeweils 35-40 Aminosäuren, die zwei konservierte Tryptophan-Reste (WW) enthalten. Sie interagieren mit Proteinen über das PPXY-Motiv bzw. Phosphoserin- oder Phosphothreonin-Resten (Lu *et al.*, 1999). Die E3-Ligase-Domäne Hect umfasst ca. 350 Aminosäuren und überträgt Ubiquitin von einem konservierten Cystein-Rest, welcher das katalytische Zentrum der Hect-Domäne bildet, auf einen Lysin-Rest des Substrates (Scheffner *et al.*, 1995; Ingham *et al.*, 2004). Hier wurde nun die Bindung von VHL und der C2-Domäne (C2) bzw. der C2-Domäne mit mutierten Lysin-Resten (C2dK), die die Bindung an andere Moleküle vermitteln, untersucht. Außerdem wurde der Kontakt von VHL und den vier WW-Domänen ermittelt sowie die Interaktion von VHL und einer NEDD4-1-Mutante, bei der die gesamte Hect-Domäne deletiert wurde, analysiert. Schließlich sollte mit Hilfe der NEDD4-1 C894S-Punktmutante, die das katalytische Zentrum mutiert, untersucht werden, inwieweit die E3-Ligase-Funktion von NEDD4-1 für die Interaktion mit VHL nötig ist und ob VHL möglicherweise ebenfalls ein Substrat für NEDD4-1 darstellt (Abb. 3.19). Interessanterweise zeigten die durchgeführten IP, in denen alle VHL-bindenden Moleküle gefällt wurden, eine Interaktion von VHL und jeder einzelnen NEDD4-1-Mutante (Abb. 3.18 und Abb. 3.19). Es scheint also jede Domäne an VHL zu binden, jedoch keine Domäne oder Funktion essentiell zu sein. Dies suggeriert, dass VHL und NEDD4-1 in einem Komplex vorliegen könnte, in dem unterschiedliche Moleküle mit verschiedenen Domänen von NEDD4-1 interagieren, so dass die Fällung dieses an VHL bindenden Komplexes alle NEDD4-1 Mutanten enthielt. Es zeigt aber auch, dass es keinen relevanten Unterschied für die Interaktion von VHL und NEDD4-1 macht, ob die E3-Ligase-Domäne von NEDD4-1 funktionell ist. Daher lässt sich vermuten, dass VHL kein Substrat für die NEDD4-1-vermittelte Ubiquitylierung darstellt und NEDD4-1 VHL demnach nicht destabilisiert und dem proteolytischen Abbau zuführt.

Um zu überprüfen, warum jede einzelne Domäne von NEDD4-1 mit VHL interagiert, wurde nun untersucht, ob VHL und NEDD4-1 tatsächlich in einem Komplex vorliegen, in dem sie gegebenenfalls nur indirekt oder gar nicht miteinander interagieren. Das bisher einzige bekannte Molekül, welches sowohl von VHL als auch NEDD4-1 reguliert wird, ist die RNA-Polymerase II (RNA-Pol II). Die RNA-Pol II ist essentiell für die Transkriptionsinitiation, spielt aber auch eine entscheidende Rolle in der Transkriptions-gekoppelten DNA-Reparatur (*transcription-coupled DNA repair*, TCR; Svejstrup, 2002). Sobald die RNA-Pol II beim Ablesen der Basensequenz auf eine Schädigung der DNA trifft, stoppt die Transkription. Die RNA-Pol fungiert dann wie ein Sensor, der die NER (*nucleotide excision repair*)-Mechanismen induziert, welche die Neusynthese des DNA-Stranges unter Verwendung des Komplementärstranges als *template* vermitteln (Fousteri und Mullenders, 2008). Der Transkriptionsarrest führt schließlich zur Ubiquitylierung und Degradation der RNA-Pol II (Bregman *et al.*, 1996). Bekanntermaßen wird die RPB7-Untereinheit der RNA-Pol II, die die Bindung des Enzyms an die DNA vermittelt, durch VHL gebunden, ubiquityliert und schließlich abgebaut (Na *et al.*, 2003; Meka *et al.*, 2005). Als Antwort auf eine UV-induzierte DNA-Schädigung wird die RNA-Pol II außerdem von NEDD4-1 ubiquityliert (Anandya *et al.*, 2007). Hier wurde nun eine IP durchgeführt, bei der alle Moleküle gefällt wurden, die mit der RNA-Pol II in einem Komplex

vorliegen. Sowohl VHL als auch NEDD4-1 konnte als Bindungspartner der RNA-Pol II identifiziert werden (Abb. 3.20). Interessanterweise konnte eine Interaktion von VHL und der RNA-Pol II nur nachgewiesen werden, wenn auch zusätzlich NEDD4-1 überexprimiert wurde, wohingegen die Bindung von NEDD4-1 mit der RNA-Pol II auch ohne die Überexpression von VHL induziert wurde. Außerdem war die Interaktion von RNA-Pol II mit VHL in jedem Ansatz deutlich schwächer als die mit NEDD4-1. Demnach ist die Bindung von FNEDD4-1 an die RNA-POL II wahrscheinlich von VHL unabhängig, die Interaktion von FVHL und der RNA-POL II jedoch von FNEDD4-1 beeinflusst. Die VHL-Mutante R167Q verhinderte die Interaktion mit der RNA-Pol II sogar vollständig. Da in V2B-Mutanten die Substratbindung erheblich beeinträchtigt ist, bestärkt dieses Ergebnis, dass die RNA-Pol II tatsächlich ein Substrat der E3-Ligase VHL darstellt. Es wäre jedoch auch möglich, dass die Interaktion von VHL R167Q und der RNA-Pol II dadurch verhindert wird, dass NEDD4-1 diese VHL-Mutante nicht binden kann (Abb. 3.18). NEDD4-1 reguliert somit gegebenenfalls die Bindung von VHL an RNA-POL II. Außerdem verhindert auch eine *loss of function*-Mutation des katalytischen Zentrums von NEDD4-1 die Interaktion der RNA-Pol II mit VHL. Möglicherweise bewirkt ein dominant negativer Effekt, dass die RNA-Pol II zwar gebunden aber nicht mehr freigesetzt werden kann und so die Interaktion mit VHL inhibiert wird. Es scheint hier also ein stufenweiser Vorgang der Ubiquitylierung der RNA-POL II stattzufinden, bei dem zunächst NEDD4-1 und dann VHL an RNA-POL II bindet. Dabei könnte NEDD4-1 die Bindung von VHL an die RNA-Pol II vermitteln, welche dann die Ubiquitylierung und schließlich die Proteolyse der RNA-Pol II einleiten könnte. Diese Beobachtungen unterstützen das Modell der RNA-POL II-Ubiquitylierung über einen zweistufigen Prozess, bei dem NEDD4-1 zunächst die Mono-Ubiquitylierung vermittelt und dadurch die Bindung eines weiteren Ubiquitylierungskomplex induziert, welcher eine Poly-Ubiquitylierung und die Degradation der RNA-Pol II bewirkt (Harreman *et al.*, 2009). Demnach ist die bereits beschriebene Interaktion von VHL und NEDD4-1 ausreichend durch den gemeinsam induzierten Abbau der RNA-POL II erklärbar.

Da jedoch bereits gezeigt werden konnte, dass NEDD4-1 mit der β -Domäne von VHL interagiert, wurde im Anschluss untersucht, ob womöglich eine der beiden E3-Ligasen die Ubiquitylierung ihres Bindungspartners induziert und destabilisiert. Der Ubiquitylierungs-Signalweg beginnt mit der Aktivierung des Ubiquitin-Moleküls, die ATP-abhängig von E1 (*Ubiquitin-activating enzyme*) katalysiert wird. Anschließend überträgt E1 das aktivierte Ubiquitin auf E2 (*Ubiquitin-carrier protein*), welches die Übertragung des Ubiquitins auf das Zielmolekül bzw. die E3-Ligasen (*Ubiquitin-protein ligase*) vermittelt (Hershko *et al.*, 1983). Die RING E3-Ligasen, zu denen VHL gehört, vermitteln als Gerüststruktur die Interaktion von E2 und dem Substrat, woraufhin E2 das gebundene Ubiquitin auf das Zielmolekül überträgt. Die HECT E3-Ligasen, welchen NEDD4-1 zugeordnet wird, übernehmen das Ubiquitin von E2 und verknüpfen es selbstständig mit dem Substrat (Yang und Kumar, 2010). Die Ubiquitylierung kann zur Stabilisierung, Translokation oder zur Proteolyse führen. Die proteasomale Degradation durch das 26 S Proteasom führt zur Prozessierung von Proteinen, zur Bildung neuer Peptide mit anderen Funktionen oder zur Freisetzung neuer Bausteine für die Proteinsynthese (Glickman und Ciechanover, 2001). Hier wurde nun neben der Hochregulation verschiedener VHL-, NEDD4-1- und PTEN-Varianten auch eine Überexpression von Ubiquitin in HEK293T erzeugt und zunächst alle an VHL gebundenen Moleküle bezüglich ihrer Ubiquitylierung analysiert (Abb. 3.21 und Abb. 3.22). Es konnte gezeigt werden, dass die Komplexe, die an VHL binden, stark ubiquityliert vorliegen. Da VHL selbst eine E3-Ligase-Funktion besitzt, ist es

naheliegender anzunehmen, dass diese Ubiquitylierungen von VHL induziert wurden und somit das verwendete Konstrukt funktionell ist. Es muss jedoch immer berücksichtigt werden, dass gegebenenfalls auch andere Moleküle in der Zelle die Ubiquitylierung von VHL oder anderen Proteinen innerhalb dieser Komplexe verursachen könnten. Während ubiquitylierte Moleküle bzw. Proteinkomplexe über einen weiten molekularen Bereich von 45-130 kDa nachgewiesen wurden, waren zwei deutlich abgegrenzte Banden bei 30 kDa und ca. 40 kDa sichtbar. Das 30 kDa große Molekül entspricht dabei wahrscheinlich VHL selbst, welches ubiquityliert wurde. So kann VHL beispielsweise an Lys 171 und Lys 196 ubiquityliert werden, was zum Kernexport des Proteins führt und dieses destabilisiert (Cai und Robertson, 2010). Die 40 kDa Bande zeigt vermutlich Dimere bzw. Oligomere von VHL, deren Entstehung durch die SUMOylierung von VHL induziert und durch die Interaktion mit PIASy zusätzlich begünstigt wird. Diese VHL-Oligomere sind deutlich stabiler als das einzelne VHL-Protein, beeinträchtigen jedoch die Funktionalität von VHL (Cai *et al.*, 2010). Die SUMOylierung bewirkt häufig nachhaltige Veränderungen der Proteine, selbst wenn die SUMO-Moleküle bereits wieder gelöst wurden (Hay, 2005). Da Ubiquitin und SUMO um dieselben Bindestellen im VHL-Protein konkurrieren (Cai und Robertson, 2010), könnte dies erklären, warum hier ubiquitylierte und somit nicht SUMOylierte VHL-Moleküle nachgewiesen werden konnten, die jedoch immer noch als Oligomere vorlagen. Die zusätzliche Überexpression von NEDD4-1 veränderte das Ubiquitylierungsmuster nicht. Auch die VHL-Banden bei 30 und 40 kDa waren nicht intensiver. Dies zeigt, dass NEDD4-1 vermutlich nicht die Ubiquitylierung von VHL vermittelt. Die nachweisbaren Ubiquitylierungen für VHL R167Q waren verglichen mit dem Wildtyp-VHL wesentlich verringert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die R167Q-Mutation die Fähigkeit von VHL zur Substratbindung erheblich beeinträchtigt, jedoch nicht vollständig inhibiert (Rathmell *et al.*, 2004). Da VHL R167Q NEDD4-1 nicht binden kann (Abb. 3.18), kann VHL NEDD4-1 auch nicht ubiquitylieren, was ebenfalls zur Abschwächung des Ubiquitylierungsmusters führen könnte. Die VHL L188V-Mutation veränderte hingegen das Ubiquitylierungsmuster nicht. L188V beeinflusst die Funktion von VHL nur teilweise, die Ubiquitylierung von Substraten wie HIF α kann jedoch ungehindert ablaufen (Knauth *et al.*, 2009, Hoffman *et al.*, 2001). Da bereits gezeigt werden konnte, dass NEDD4-1 wahrscheinlich mit HIF α um die Substratbindung an VHL konkurriert (Abb. 3.18), ist hier möglich, dass auch eine VHL-vermittelte NEDD4-1-Ubiquitylierung aufrechterhalten wird. Erstaunlicherweise konnte auch für die VHL Isoform II (dEx2) ohne funktionelle Substrat-Bindedomäne ein wildtypisches Ubiquitylierungsmuster nachgewiesen werden. Diese VHL-Mutante bewirkt den vollständigen Verlust der Ubiquitin-Ligase-Funktion, die Bindung an Elongin B und C bleibt jedoch erhalten (Clifford *et al.*, 2001). Da Elongin B und C auch andere E3-Ligasen binden können (Okumura *et al.*, 2012), ist hier vermutlich eine VHL-unabhängige Ubiquitylierung dargestellt (Abb. 3.21A). Die Überexpression von VHL und der C2- bzw. WW-Domäne von NEDD4-1 bewirkte eine abgeschwächte Ubiquitylierung, wohingegen der Verlust der Hect-Domäne oder die Inaktivierung des katalytischen Zentrums (C894S) von NEDD4-1 keinen Einfluss auf die Intensität der Ubiquitylierung nahm (Abb. 3.22). Die NEDD4-1-Domänen C2 und WW, die die Interaktion mit anderen Molekülen vermitteln (Plant *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1999), sind somit entscheidend für das hier nachgewiesene Ubiquitylierungsmuster, die E3-Ligase-Funktion der Hect-Domäne von NEDD4-1 spielt jedoch keine Rolle. Demnach wird vermutlich die Ubiquitylierung allein durch VHL induziert. Das Substrat dieser VHL-vermittelten Ubiquitylierung stellt mit großer Wahrscheinlichkeit NEDD4-1 dar, welches über C2 und seine WW-Domänen mit der β -Domäne von

VHL interagiert. Um sich der Funktionalität des NEDD4-1-Konstruktes zu vergewissern, wurden infolge alle NEDD4-1-gebundenen Moleküle und deren Ubiquitynylierungsmuster untersucht (Abb. 3.21 B). Hier konnte bei einer Überexpression von PTEN und NEDD4-1 deutlich mehr Ubiquitin als bei einer alleinigen Hochregulation von PTEN detektiert werden. Das NEDD4-1-Konstrukt ist somit funktionell wirksam. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Heraufregulation von NEDD4-1 und VHL zu einer stärkeren Ubiquitynylierung als die Überexpression von NEDD4-1 allein führte. Da hier lediglich NEDD4-1-bindende Moleküle aufgetrennt wurden, stärkt dieses Ergebnis die Annahme, dass VHL NEDD4-1 ubiquitynyliert (Abb. 4.1)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass VHL mit großer Wahrscheinlichkeit die Ubiquitynylierung von NEDD4-1 vermittelt, wurde abschließend überprüft, ob diese Interaktion auch den proteasomalen Abbau der NEDD4-1-Moleküle einleitet. Daher wurden die HEK293T-Zellen nach der Transfektion mit und ohne MG132 kultiviert und anschließend in einer gegen VHL gerichteten IP verglichen (Abb. 3.23). MG132 (ZLLLal) ist ein Peptidaldehyd, das die proteasomale Aktivität des 26 S Proteasom-Komplexes blockiert (Han *et al.*, 2009). Eine längere MG132-Behandlung kann zur Apoptose der Zellen führen und sensibilisiert Krebszellen für die Therapie (Giuliano *et al.*, 2003). Für die Zellen ohne MG132-Zusatz konnte für alle VHL- und NEDD4-1-Varianten ein typisches Bandenmuster nachgewiesen werden. Die Behandlung der Zellen mit MG132, dessen Funktionalität bereits vorher ausgetestet wurde, bewirkte allerdings keine signifikante Erhöhung der NEDD4-1-Konzentrationen. Dies zeigt, dass die VHL-induzierte NEDD4-1-Ubiquitynylierung nicht zur Degradation von NEDD4-1 führt.

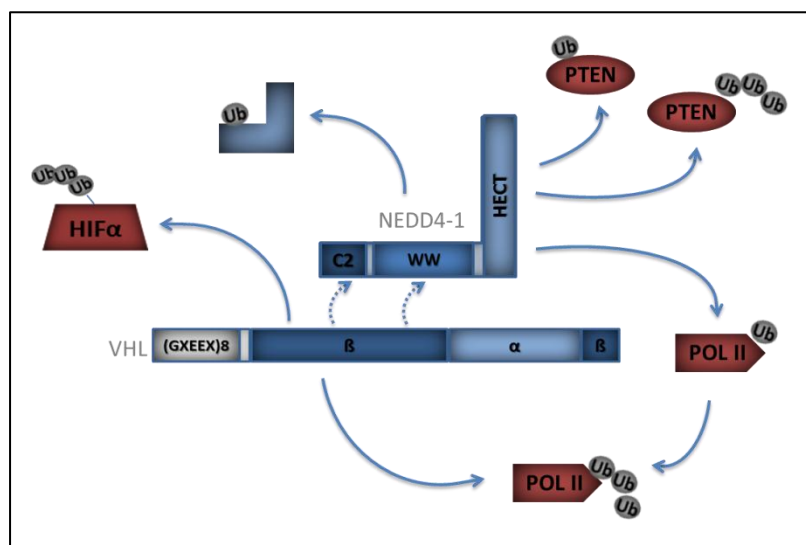


Abb. 4.1 Modell der VHL- und NEDD4-1-vermittelten Ubiquitynylierungen. Die Hect-E3-Ligase NEDD4-1 induziert sowohl die Mono-Ubiquitynylierung des PI3K-Signalweg-Regulators PTEN, die den Kerntransport induziert, als auch die Poly-Ubiquitynylierung von PTEN, welche den proteasomalen Abbau einleitet. Auch RNA-POL II, die die Transkription katalysiert und in der DNA-Reparatur eine Rolle spielt, wird durch NEDD4-1 mono-ubiquitynyliert, wodurch eine VHL-vermittelte Poly-Ubiquitynylierung des Enzyms und die darauf folgende Degradation ermöglicht wird. Die Ring-E3-Ligase VHL ubiquitynyliert weiterhin die α -Untereinheiten der HIF-Transkriptionsfaktoren und induziert dadurch ihren proteasomalen Abbau. Mit HIF α konkurriert auch NEDD4-1 um die Substrat-Bindestelle der β -Domäne von VHL und wird ebenso von VHL ubiquitynyliert und wahrscheinlich inaktiviert. Dadurch nimmt VHL indirekt Einfluss auf die Zielmoleküle von NEDD4-1, indem es z.B. PTEN und vermutlich auch RNA-POL II stabilisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Einflussnahme von VHL auf die Protein-Konzentration von PTEN nachgewiesen und ihre Regulationsmechanismen analysiert. In den embryonalen Nieren-Zelllinien HEK293 bzw. HEK293T wurde gezeigt, dass VHL eine Stabilisierung von PTEN bewirkt. Unter Hypoxie wurde eine Herabregulation der Protein-Menge von PTEN beobachtet, die entgegengesetzt proportional zur Stabilisierung der HIF-Transkriptionsfaktoren auftrat. Dies konnte auch in einer weiteren embryonalen Zelllinie, NIH-3T3, bestätigt werden, in der außerdem nachgewiesen werden konnte, dass diese Verminderung von PTEN-Molekülen durch die Inhibierung der Transkription bewirkt wird. Diese Transkriptionsregulation wird anscheinend v.a. durch HIF-Transkriptionsfaktoren vermittelt, deren proteasomaler Abbau bei Normoxie durch VHL induziert wird. Daher wird bei ausreichend Sauerstoff-Zufuhr die Transkription von *PTEN* vermutlich durch die VHL-vermittelte Degradation der HIF α -Untereinheiten und darauf folgende Inhibierung der HIF-Transkriptionskontrolle gefördert. Auf Protein-Ebene wurde weiterhin eine Interaktion von VHL und NEDD4-1 nachgewiesen. Dieser Kontakt erfolgt über die C2- und WW-Bindedomänen von NEDD4-1 und der β -Domäne von VHL. NEDD4-1 konkurriert hier mit HIF α und gegebenenfalls weiteren Substraten um die Interaktion mit der Substrat-Bindedomäne von VHL und die dadurch vermittelte Ubiquitylierung. Die VHL geförderte Ubiquitylierung von NEDD4-1 induziert jedoch nicht die Proteolyse, sondern die Stabilisierung von NEDD4-1. Dennoch führt sie, gegebenenfalls durch eine Ubiquitylierungs-induzierte Konformationsänderung oder zelluläre Umverteilung, zum Verlust der Fähigkeit PTEN zu regulieren. Tatsächlich ist häufig von der Art der Ubiquitylierung abhängig, welches Schicksal das Molekül ereilt. So können Mono-Ubiquitylierungen zu Veränderungen der subzellulären Lokalisation, Konformation, Aktivität oder Protein-Interaktionen führen (Hagund *et al.*, 2003; Hicke und Dunn, 2003). Es wäre also interessant, die Art der VHL-induzierten NEDD4-1-Ubiquitylierung weiter zu untersuchen, um ihre Auswirkungen im vollen Ausmaß zu verstehen. Hier wurde jedoch erstmals gezeigt, dass VHL zu einer Stabilisierung von PTEN führt, indem es NEDD4-1 ubiquityliert und dadurch in seiner Funktion inhibiert (Abb. 4.2). Während der Tumorgenese scheinen diese Regulationsmechanismen teilweise verloren zu gehen. Hier konnte zunächst nachgewiesen werden, dass die Restitution von VHL in VHL-defizienten Nierenkarzinom-Zelllinien zu einer erheblichen Konzentrationssteigerung von PTEN führt. Allerdings schien die VHL-vermittelte NEDD4-1-Regulation teilweise verloren oder von weiteren Regulationsmechanismen überlagert. Für primäre, größtenteils VHL-defiziente ccRCCs wurde in 40% der Tumore eine Herabregulation von PTEN nachgewiesen, die zu 85% mit einer Erhöhung der NEDD4-1-Konzentration korreliert war. Diese Konzentrationssteigerung von NEDD4-1 in Tumoren ist bereits für andere Karzinome bekannt und ist vermutlich ebenfalls auf eine Fehlregulation zurückzuführen. So könnte zum einen die Transkription, z.B. durch den Transkriptionsfaktor FoxM1B, verstärkt oder Regulationsmechanismen auf Protein-Ebene, wie die Degradation durch Caspasen, verändert worden sein (Dai *et al.*, 2010; Harvey *et al.*, 1998). Die erhöhte Aktivität von NEDD4-1 wird aber vermutlich durch den Verlust von VHL in den Tumoren begünstigt. So konnte weiterhin in primären Tumorzellen gezeigt werden, dass eine CoCl₂-Behandlung, welche die HIF α -Bindung an VHL verhindert, eine zelluläre Umverteilung von PTEN ins Zytoplasma einleitet. Hier wird vermutlich aufgrund der häufiger frei zugänglichen Substrat-Bindedomäne von VHL mehr NEDD4-1 ubiquityliert und so deaktiviert, wodurch es den Kernimport von PTEN nicht mehr induzieren kann (Trotman *et al.*, 2007). Ein Modell der VHL-vermittelten NEDD4-1-Regulation in

Konkurrenz zu HIF α und die Auswirkung auf die PTEN-Konzentration ist in Abbildung 4.2 dargestellt (Abb. 4.2).

Neben der PTEN-Stabilisierung könnte die VHL-vermittelte Inaktivierung von NEDD4-1 auch andere NEDD4-1-Funktionen beeinträchtigen. NEDD4-1 induziert z.B. die Degradation bzw. Endozytose und das Recycling diverser Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie IGF1R (Cao *et al.*, 2008), EGFR (Katz *et al.*, 2002), VEGFR2 (Murdaca *et al.*, 2004) und FGFR1 (Persaud *et al.*, 2011). NEDD4-1 reguliert somit das Wachstum und die Proliferation der Zellen, besonders während der Embryonalentwicklung (Yang und Kumar, 2010). Die Fehlregulation dieser Mechanismen könnte auch die Tumorentstehung begünstigen. NEDD4-1 beeinflusst weiterhin die Interaktion motorischer Neuronen mit den Muskelfasern im Skelettmuskel. NEDD4-1-negative Mausembryonen weisen eine reduzierte Anzahl motorischer Neuronen und eine verminderte Größe der Muskelfasern auf (Liu *et al.*, 2009). Auch das Wachstum der Dendriten und deren Verzweigung während der Embryonalentwicklung sind von NEDD4-1 abhängig. So sterben NEDD4-1-defiziente Mäuse in der späten Embryonalentwicklung aufgrund neuronaler Defekte (Kawabe *et al.*, 2010). Dieser Defekt ist PTEN-abhängig, so schützt die Herabregulation von PTEN vor der verminderten neuronalen Verzweigung (Drinjakovic *et al.*, 2010). Außerdem spielt NEDD4-1 eine Rolle im Immunsystem, der Verlust von NEDD4-1 führt zu einer verminderten T-Zell-Antwort auf Antigene (Yang *et al.*, 2008). Auch der Virustransport wird durch NEDD4-1 vermittelt (Ikeda *et al.*, 2000). Aufgrund dieser vielseitigen Einflussnahme von NEDD4-1 in Entwicklungsprozesse, wäre es interessant zu analysieren, inwieweit die VHL-vermittelte Regulation von NEDD4-1 für diese weiteren NEDD4-1-Funktionen eine Rolle spielt. Die hier nachgewiesene VHL-vermittelte, positive Regulation von PTEN hat vermutlich große Auswirkungen auf die Eigenschaften der Zelle. Beide Tumorsuppressoren wirken der Tumorgenese entgegen, die PTEN-Stabilisierung durch VHL stärkt diese Funktion wahrscheinlich noch. Umgekehrt führt der VHL-Verlust jedoch vermutlich zu einer Destabilisierung von PTEN, wodurch auch dessen Konzentration verringert wird, wie bereits in ccRCCs gezeigt wurde (Brenner *et al.*, 2002). Dies ermöglicht wahrscheinlich eine weniger gehemmte und somit häufigere und stärkere Tumorentstehung. Die These wird auch dadurch gestärkt, dass in eigenen Analysen gezeigt werden konnte, dass V2B-Mutanten, die mit dem breitesten Tumorspektrum des VHL-Syndroms assoziiert werden, NEDD4-1 nicht binden können und so die NEDD4-1-vermittelte Proteolyse von PTEN nicht verhindern können. In den nun folgenden Untersuchungen wurde zunächst die Tumorsuppressor-Funktionen von VHL und PTEN verglichen, um Rückschlüsse ziehen zu können, inwieweit möglicherweise die VHL-Funktion PTEN-vermittelt ist. Anschließend wurde analysiert, ob der Verlust von VHL und PTEN *in vivo* in der Tumorgenese zusammenwirkt und gegebenenfalls das Tumorspektrum des VHL-Syndroms auslöst.

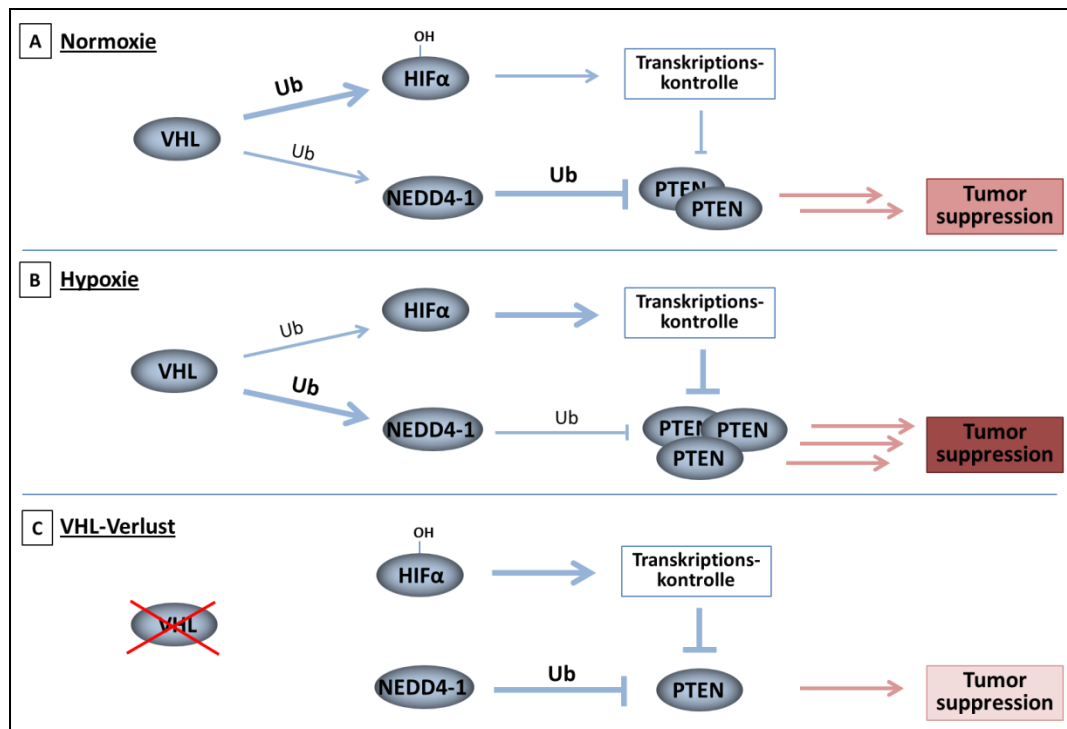


Abb. 4.2 Modell der VHL-vermittelten PTEN-Regulation. **A** Unter Normoxie bindet VHL vermehrt sein Substrat HIF α , wodurch dieses ubiquitinyliert und degradiert wird. Die Transkription wird daher nur wenig durch die HIF-Transkriptionsfaktoren beeinflusst. NEDD4-1 wird häufig von der VHL-Substrat-Bindedomäne durch HIF α verdrängt und dadurch selten ubiquitinyliert. Es vermittelt so selbst die Ubiquitinylierung und somit die Proteolyse von PTEN, wodurch dessen Funktion der Tumorsuppression eingeschränkt wird. **B** Unter Hypoxie kann HIF α VHL nicht binden, so dass es nicht ubiquitinyliert und degradiert wird, sondern die Transkription regulieren kann. Dabei inhibiert es u.a. die Transkription von *PTEN*. Die Substrat-Bindedomäne von VHL ist freier zugänglich für NEDD4-1, welches dadurch häufiger ubiquitinyliert und somit inaktiviert vorliegt. Der Funktionsverlust verhindert die NEDD4-1-vermittelte Ubiquitinylierung und folgende Proteolyse von PTEN, welches dadurch der Tumorgenese verstärkt entgegenwirken kann. **C** Bei VHL-Verlust wirken sowohl die HIF-vermittelte Inhibition der Transkription als auch der NEDD4-1-induzierte Abbau des Proteins auf die PTEN-Konzentration ein, wodurch diese stark vermindert wird und so auch die Tumorsuppression durch PTEN abnimmt. Ub: Ubiquitinylierung

4.2 Kontrolle des Zellverhaltens durch VHL und PTEN

Die Extrazellulärmatrix (ECM) ist ein essentieller Bestandteil der Tumor-Mikroumgebung (TME). Sie setzt sich aus einer Vielzahl von Proteinen, Glycoproteinen, Proteoglycanen und Polysacchariden zusammen, welche die Basalmembran und die interstitielle Matrix ausbilden (Lu *et al.*, 2012). Die Basalmembran umgibt die direkte Oberfläche von Epithel- und Endothelzellen und wird von eben diesen und Stromazellen der TME geformt. Ihre Hauptbestandteile sind Collagen IV und Laminin, die sich zu Suprastrukturen zusammenlagern und so entscheidend die Stabilität der Basalmembran bestimmen (Pöschl *et al.*, 2004; Miner *et al.*, 2004). Nidogen/Entactin und Perlecan verknüpfen diese netzartigen Strukturen und steigern so zusätzlich die Festigkeit und das Widerstandsvermögen (LeBleu *et al.*, 2012). An diese Gerüststruktur binden weitere Moleküle und beeinflussen über zusätzliche Interaktionen die Eigenschaften der Basalmembran. Dazu gehören v.a. Glycoproteine wie Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und Tenascin (Rosso *et al.*, 2004). Die sich an die Basalmembran anschließende interstitielle Matrix wird primär durch Stromazellen generiert und ist reich an fibrillärem Collagen I, Proteoglycanen und Glycoproteinen (Egeblad *et al.*, 2010). Die Zelle interagiert durch die Bildung von Fokalkontakten über verschiedene Membranmoleküle wie Integrine,

Cadherine und Selectine mit der ECM (Yamada und Kemler, 2002). Diese Kontakte führen neben der Adhäsion auch zum Signalaustausch. So induziert die Verknüpfung mit der Basalmembran über eine Signaltransduktionskaskade in der Zelle eine Reaktion, die sowohl die Eigenschaften der Zelle als auch die Beschaffenheit der ECM beeinflussen kann. Dadurch ist die ECM einer ständigen Umgestaltung unterworfen, deren stetig wandelnde Zusammensetzung sich unterschiedlich auf Prozesse der Proliferation, Apoptose, Migration und Differenzierung der Zelle auswirken können (Tsang *et al.*, 2010). Die Interaktion von Krebszellen mit ihrer ECM verstärkt die tumoröse Wirkung auf die Zellen zusätzlich. Krebszellen exprimieren verstärkt Enzyme, die die ECM umstrukturieren oder degradieren. Dazu gehören Heparanasen, Cystein-Cathepsine, Urokinasen und v.a. Matrixmetalloproteasen (MMPs) (Ilan *et al.*, 2006; Kessenbrock *et al.*, 2010). Die Degradation der ECM-Vernetzung führt zur Freisetzung diverser Wachstumsfaktoren wie VEGF, die zuvor in der ECM gespeichert wurden und nun das Wachstum des Tumors begünstigen können (LeBleu *et al.*, 2012). Außerdem wird durch die teilweise Auflösung der ECM-Gerüststruktur die Migration der Zellen erleichtert, wodurch u.a. auch Metastasierungsprozesse induziert werden können (Lu *et al.*, 2012). Die ECM steht also in dauerhaftem Austausch mit den von ihr umgebenen Zellen und nimmt neben der Beeinflussung ihrer Morphologie auch Anteil an der Regulation des Zellverhaltens.

Im folgenden Teil der Arbeit wurde nun untersucht, inwieweit die Tumorsuppressoren VHL und PTEN die Interaktion mit ECM-Molekülen beeinflussen und welche Auswirkungen dies auf das Verhalten der Zelle nimmt. Dafür wurden die VHL-defizienten Nierenkarzinom-Zelllinien 786-O und KTCTL-26A verwendet, in denen eine Überexpression von VHL bzw. PTEN induziert und die Fähigkeit der Adhäsion, der Migration und des Überlebens analysiert. Abschließend wurde der Einfluss von VHL und PTEN auf den Prozess der Metastasierung *in vivo* ermittelt. Zunächst wurde die Adhäsion von 786-O an Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Collagen I und IV untersucht (Abb. 3.24). Hier konnte gezeigt werden, dass 786-O bevorzugt an Fibronectin, Vitronectin und Collagen I adhäreren. Laminin und Collagen IV, welche die Gerüststruktur der Basalmembran bilden, wurden hingegen genauso schwach wie der unbeschichtete Untergrund gebunden. Sowohl die Restitution von VHL als auch von PTEN verstärkte die Adhäsion an alle Untergründe deutlich, wobei die Überexpression von VHL einen noch bedeutsameren Einfluss als PTEN ausübte. Wie bereits beschrieben, bewirkt VHL eine Erhöhung der PTEN-Konzentration in der Zelle (Details siehe 3.1 und 4.1), so dass die gemessene Adhäsion der VHL-überexprimierenden 786-O möglicherweise auf synergistische Effekte von VHL und PTEN zurückzuführen sind. Die ECM, welche Krebszellen umgibt, ist von einer ständigen Umwandlung betroffen, wodurch fokale Kontakte nicht so häufig geknüpft und aufgrund fehlender Stabilität auch schneller wieder gelöst werden. Dadurch verändert sich der Signalaustausch zwischen der Zelle und der Umgebung, was u.a. zu einer veränderten Expression der Integrine führt, die der Krebszelle einen invasiven Charakter verleihen können (Keely, 2011; Jones und Walker, 1999). Das erklärt womöglich auch, dass die unbehandelten 786-O-Nierenkarzinom-Zellen eine schwächere Adhäsion als die VHL- bzw. PTEN-überexprimierenden 786-O aufwiesen. VHL ist entscheidend an der Zusammensetzung der ECM beteiligt. Es vermittelt die Bildung des Collagen IV-Gerüsts (Kurban *et al.*, 2007; Grosfeld *et al.*, 2007) und steigert die Transkription und Zusammenlagerung von Fibronectin (Ohh *et al.*, 1998; Bluysen *et al.*, 2004; Stickle *et al.*, 2004). Die Organisation der extrazellulären Fibronectin-Matrix ist von der $\beta 1$ Integrin-vermittelten fibrillären Adhäsion abhängig, die ebenfalls von VHL gesteuert wird (Esteban-Barragan *et al.*, 2002). Diese Deorganisation der ECM trägt vermutlich zum zystischen Erkrankungsbild des

VHL-Syndroms bei (Li und Kim, 2011). VHL induziert außerdem die Bildung fokaler Kontakte, indem es die Translokation von Vinculin an die Membran reguliert, welches in den Adhäsionskomplexen für die Signalweiterleitung benötigt wird (Kamada *et al.*, 2001). Dadurch wird die Motilität der Zelle vermindert und eine stärkere Bindung an die ECM gefördert, wie sie hier für die einzelnen ECM-Komponenten gezeigt wurde. Weiterhin verstärkt VHL vermutlich die Adhäsion auch durch die Degradation von HIF α , wodurch die HIF-vermittelte Transkriptionsregulation ausbleibt. So unterbindet VHL z.B. die Transkription der Matrixmetalloproteasen wie MMP2, die die ECM-Vernetzung lösen (Wang *et al.*, 2011) und die HIF-vermittelte Expression von LOX (*lysyl oxidase*), die u.a. zur Repression des E-Cadherins und somit zur verminderten Adhäsion führt (Schietke *et al.*, 2010). Die Beeinflussung dieser unterschiedlichen Signalmoleküle durch VHL erklärt die hier beobachtete Verstärkung der Adhäsion von VHL-restituierten 786-O. Doch auch PTEN erzeugt eine erhöhte Anheftung von 786-O auf allen Untergründen. PTEN wird nicht direkt mit der Aktivierung der Adhäsion verknüpft, allerdings ist bekannt, dass PTEN die Migration hemmt (Stiles *et al.*, 2004). So verhindert PTEN durch die Inhibierung des PI3K-Signalweges die Aktivierung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac1, die das Aktinskelett der Zelle regulieren, indem sie die Bündelung der Aktinfilamente und somit fokale Kontakte induzieren können, die die Migration der Zellen fördern (Liliental *et al.*, 2000). Außerdem inhibiert PTEN die Adaptormoleküle FAK und Shc, welche an Integrine binden und die extrazellulären Informationen über den MAPK/ERK-Signalweg in die Zelle vermitteln (Gu *et al.*, 1999; Yamada und Araki, 2001). Dadurch wird die Bildung fokaler Kontakte vermieden, welche zur Migration beitragen. Obwohl die PTEN-vermittelten Effekte zu weniger fokalen Kontakten führen, scheinen lediglich Interaktionen mit der ECM betroffen zu sein, die die Motilität der Zelle regulieren. Die bestehenden fokalen Kontakte scheinen ausreichend, um die Adhäsion der PTEN-überexprimierenden 786-O zu vermitteln. Demnach genügt vermutlich allein die Inhibierung der Mechanismen der Migration, um die Adhäsion der Zellen zu stärken. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass PTEN weitere Funktionen besitzt, die sich positiv auf die Adhäsion auswirken. Um dies zu überprüfen wurde die Migrationsfähigkeit von PTEN-überexprimierenden 786-O untersucht (Abb. 3.29). PTEN-restituierte 786-O-Zellen zeigten verglichen mit unbehandelten 786-O tatsächlich eine deutlich verminderte Migration auf Fibronectin und Vitronectin, was die verstärkte Adhäsion der PTEN-exprimierenden 786-O an diese ECM-Bestandteile erklären könnte. Dies bestätigt auch die Analysen von Tamura *et al.* und deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von PTEN für eine gerichtete Zellbewegung möglicherweise nur in Einzellern wie *Dictyostelium spec.* essentiell ist (Tamura *et al.*, 1998; Postma *et al.*, 2004; Funamoto *et al.*, 2002). Die Adhäsion an Fibronectin führt meist zu einem mildereren Krankheitsverlauf. So reduziert es die Migration von MCF-7 und hemmt die Invasionsfähigkeit von Prostata- und Leber-Karzinomzellen (Sisci *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2010). Die Adhäsion an Vitronectin steigert hingegen sowohl in gesunden als auch in Tumorzellen die Migration (Naik und Naik, 2005; Beck *et al.*, 2005; Cooper *et al.*, 2002). PTEN scheint demnach die Motilität so stark zu unterbinden, dass 786-O selbst auf einem migrationsfördernden Untergrund nicht migrieren. Auch für VHL-überexprimierende 786-O konnte eine eindeutige Reduktion der Migrationsfähigkeit auf Fibronectin und Vitronectin ermittelt werden (Abb. 3.29). Diese war jedoch nicht so stark wie bei PTEN-restituierten Zellen, so dass hier kein synergistischer Effekt von VHL und dem durch VHL stabilisierten PTEN vorzuliegen scheint. Die durch VHL induzierte Verstärkung der Adhäsion hemmt hier vermutlich die Motilität der Zellen. Außerdem verhindert VHL die HIF-abhängige Heraufregulation des Chemokin-Rezeptors CXCR4, welcher die chemotaktische Bewegung

der Zelle fördert (Melchionna *et al.*, 2010). Auch die HIF-vermittelte Expression verschiedener Signalmoleküle, wie VEGF und PDGF, die die Fähigkeit der Zelle zur Migration und Invasion steigern, wird durch VHL unterbunden (Semenza, 2003; Wang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass die migrationshemmenden Einflüsse von PTEN zusätzlich die Motilität der VHL-überexprimierenden 786-O begrenzen.

Im Anschluss wurde die Wirkung von VHL und PTEN auf die Überlebensfähigkeit der 786-O-Zellen untersucht und analysiert, inwieweit diese durch die Adhäsion an die einzelnen ECM-Komponenten beeinflusst wird (Abb. 3.26). Sowohl die unbehandelten als auch VHL bzw. PTEN überexprimierenden Zellen proliferierten trotz Nährstoffmangel bis zum dritten Tag bevor die Lebendzellzahl bis zum sechsten Tag wieder abnahm. Erstaunlicherweise überlebten zu jedem gemessenen Zeitpunkt die meisten 786-O auf dem unbeschichteten Untergrund, durchschnittlich 5% weniger Zellen wurden auf Vitronectin ermittelt. Für andere Zelltypen wie Brustzellen, Endothelzellen und Osteoblasten konnte hingegen ein Überlebensvorteil auf Vitronectin nachgewiesen werden (Kashjap *et al.*, 2011; Scatena *et al.*, 1998; Lacouture *et al.*, 2002). Auf Fibronectin überlebten durchschnittlich 15% weniger 786-O als auf unbeschichteten Böden. Andere Arbeitsgruppen konnten indes z.B. für Fibroblasten, Endothelzellen und Brustkrebszellen zeigen, dass Fibronectin einen positiven Effekt auf das Überleben ausübt (Ilic *et al.*, 1998; Qiao *et al.*, 2000). Die hier ermittelten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verstärkte Adhäsion an Fibronectin und Vitronectin einen schwach negativen Einfluss auf das Überleben von Nierenzellen oder zumindest Nierenkarzinom-Zellen der Zelllinie 786-O ausüben. Es ist jedoch auch möglich, dass das hier verwendete *in vitro*-System die Bedingungen im Gewebe nicht ausreichend imitiert, so dass möglicherweise weitere Einflüsse fehlen, die die Fibronectin- bzw. Vitronectin-vermittelte Überlebensfähigkeit *in vivo* begünstigen. Auch die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen könnte sich gegebenenfalls negativ auswirken. Auf Collagen IV war der geringste Proliferationseffekt und die niedrigste Überlebensrate für die Nierenkarzinom-Zelllinie 786-O nachzuweisen. Andere Arbeitsgruppen dokumentierten hingegen einen positiven Einfluss von Collagen IV auf das Überleben von Leberkarzinomen, aber auch einen Verlust von Collagen von 75% in RCCs (Burnier *et al.*, 2011; Morell-Quadreny *et al.*, 2003). Möglicherweise bewirkt die Restitution von Collagen IV tatsächlich eine Antitumor-Wirkung, die die Apoptose der 786-O-Tumorzellen induziert. Die Zusammensetzung und Wirkung der ECM ist äußerst vielseitig, so können sogar verschiedene Isoformen derselben ECM-Bestandteile bevorzugt durch unterschiedliche Membranrezeptoren gebunden werden und somit der Zelle unterschiedliche Signale übermitteln, die dann auch ein voneinander abweichendes Verhalten der Zelle erzielen. Daher ist es schwierig mit dem hier verwendeten *in vitro*-Aufbau, eindeutige Aussagen bezüglich der Überlebensfähigkeit auf diversen ECM-Bestandteilen zu treffen. Allerdings ist es möglich, die Auswirkung von VHL und PTEN auf das Überleben von 786-O zu untersuchen (Abb. 3.26). Erstaunlicherweise hatte die Überexpression von VHL keinen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Nierenkarzinom-Zellen, obwohl der VHL-Verlust in vielen Krebszellen mit einer verbesserten Überlebensrate assoziiert wird (Kim *et al.*, 2011). Tatsächlich nimmt VHL auf viele Signalmoleküle Einfluss, die die Apoptose regulieren. So stabilisiert es p53 (Roe *et al.*, 2006), verhindert die Aktivierung von NF- κ B (Yang *et al.*, 2007), bewirkt die Inhibierung von JunB (Lee *et al.*, 2005) und stabilisiert Jade-1, wodurch der Wnt-Signalweg gehemmt wird (Zhou *et al.*, 2005). Durch die p400-vermittelte Inaktivierung von Rb, verhindert VHL außerdem eine Seneszenz der Zellen, wodurch sie für die Apoptose-Mechanismen anfällig bleiben (Lee *et al.*, 2005). Verschiedene

Arbeitsgruppen konnten außerdem zeigen, dass die gesteigerte Überlebensfähigkeit in VHL-defizienten Zellen HIF-abhängig ist (Kim und Kaelin, 2004; Kapitsinou und Haase, 2008). Dieser Effekt wird wahrscheinlich v.a. durch die HIF-vermittelte Aktivierung der Transkription der Wachstumsfaktoren IFG2, TGF α und VEGF induziert (Semenza, 2003). In den hier untersuchten 786-O scheint jedoch die VHL-Restitution nicht zu genügen, um den Zelltod der Nierenkarzinom-Zellen zu induzieren. Auch die VHL-vermittelte Adhäsion an die verschiedenen ECM-Komponenten nahm keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen. Es scheint in 786-O also Signalwege zu geben, die die Wirkung von VHL überlagern und das Überleben der Tumorzellen fördern. Im Gegensatz dazu verringerte die Restitution von PTEN in 786-O das Überleben der Zellen deutlich und auf allen ECM-Komponenten gleichermaßen. Für PTEN ist bereits bekannt, dass es das Überleben von zahlreichen Zelltypen reduziert (Sun *et al.*, 1999). Auch der PTEN-Verlust in Tumoren führt zu einer erhöhten Überlebensfähigkeit und so zu einer schlechteren Prognose für die Patienten (Dahia *et al.*, 1999; Saal *et al.*, 2007). PTEN induziert die Aktivierung der Apoptose-Mechanismen durch die Stabilisierung von p53 (Freeman *et al.*, 2003) und die Inhibierung des PI3K- und MAPK/ERK-Signalweges (Cantley und Neel, 1999; Yamada und Araki, 2001). So bewirken diese Signalwege u.a. die Heraufregulation antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 (Stupack *et al.*, 2002) sowie die Herabregulation der proapoptotischen Mitglieder dieser Familie wie Bad (Petosa *et al.*, 1998). Auch Caspase 9, welche den Apoptose-Mechanismus in Gang setzt, indem sie weitere Caspasen und so die Bildung des Apoptosoms induziert, wird AKT-abhängig inhibiert (Cardone *et al.*, 1998). Die PTEN-vermittelte Apoptose-Mechanismen genügen auch in 786-O, um verstärkt den Zelltod der Zellen zu induzieren. Dies zeigt jedoch auch, dass die VHL-vermittelte Stabilisierung von PTEN nicht ausreicht, um auch in VHL-überexprimierenden 786-O das Überleben zu mindern. Da die Adhäsion an die ECM-Bestandteile nur einen geringen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit nahm, wurde anschließend überprüft, ob die Zellen überhaupt eine Anheftung an einen Untergrund benötigten. Dafür wurde die Anoikis der Zellen, welche die Apoptose aufgrund des Verlustes der Adhäsion umfasst (Grossmann, 2002), ermittelt (Abb. 3.27). Bereits nach 2 Tagen ohne Möglichkeit zur Adhäsion waren ca. 50% der 786-O-Zellen gestorben. Bis zum Tag 12 nahm die Lebendzellzahl jedoch nur noch sehr geringfügig weiter ab. Dies zeigt, dass die 786-O viel besser ohne Adhäsion bzw. auf unbeschichteten Untergründen überleben können. Die Beschichtung der Untergründe mit Fibronectin, Vitronectin oder Collagen IV bewirkt gegebenenfalls eine teilweise Restitution der ECM einer gesunden Zelle, die sich negativ auf das Überleben der Nierenkarzinom-Zellen auswirken könnte. Obwohl für VHL als auch für PTEN bereits nachgewiesen wurde, dass sie die Anoikis fördern (Rohwer *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 1999), konnte hier für beide Tumorsuppressoren kein Effekt ermittelt werden. Demnach beeinflusst VHL die Überlebensfähigkeit der 786-O unabhängig von der Anheftung der Zellen überhaupt nicht, wohingegen PTEN den Zelltod der 786-O zumindest Adhäsions-abhängig fördert.

Neben der Adenokarzinom-Zelllinie 786-O wurden auch KTCTL-26A bezüglich der Auswirkung einer Überexpression von VHL bzw. PTEN untersucht. Die Zelllinie KTCTL-26A entstammt einem klarzelligen Nierenkarzinom und ist VHL-defizient, besitzt jedoch im Gegensatz zu 786-O eine endogene PTEN-Expression (Högemann *et al.*, 1994; Tab. 3.1). Ähnlich der 786-O zeigten auch KTCTL-26A eine verstärkte Adhäsion an Fibronectin und Collagen I. Vitronectin wurde hingegen annähernd so schwach gebunden wie die Hauptbestandteile der Basalmembran, Laminin und Collagen IV (Abb. 3.25). Die Restitution von VHL in den Zellen nahm überraschend keinen Einfluss auf das

Adhäsionsverhalten der KTCTL-26A. Da vor diesen Analysen die Überexpression von VHL und PTEN im *Western Blot* bestätigt wurde, kann ausgeschlossen werden, dass Regulationsmechanismen einen schnellen Abbau der Proteine bewirken. Es ist jedoch möglich, dass VHL zwar stabilisiert vorliegt, aber in seiner Funktion beeinträchtigt wird. Dieser Effekt könnte beispielsweise durch die SUMOylierung vermittelt werden (Cai *et al.*, 2010). Es ist aber ebenso wahrscheinlich, dass andere fehlregulierte Mechanismen in KTCTL-26A die Wirkung von VHL überlagern. Auch die Überexpression von PTEN veränderte das Adhäsionsverhalten der Zellen nicht signifikant. Da KTCTL-26A endogenes PTEN bilden, sind in den Tumorzellen möglicherweise Kompensationsmechanismen heraufreguliert, die die Auswirkung von PTEN auf die Adhäsion inaktivieren oder überlagern. Leider wurde für die KTCTL-26A die Migrationsfähigkeit nicht untersucht, so dass keine Rückschlüsse auf den Einfluss von VHL und PTEN auf die Zellmotilität gezogen werden können. Da keine veränderte Adhäsion für VHL- bzw. PTEN-überexprimierende KTCTL-26A ermittelt werden konnte, wurde auch die Überlebensfähigkeit der Zellen lediglich in einer Umgebung ohne Möglichkeit zur Anheftung analysiert (Abb. 3.28). Die Anoikis wurde hier sowohl durch die Restitution von VHL als auch durch die Überexpression von PTEN begünstigt. VHL zeigte sogar einen noch negativeren Effekt auf das Überleben der Zellen. Dies ist vermutlich auch darauf zurückzuführen, dass VHL PTEN stabilisiert (Details siehe 3.1 und 4.1) und so die Kombination der Apoptose-induzierenden Funktionen von VHL und PTEN, welche bereits beschrieben wurden, früher zur Anoikis führen. Möglicherweise wird jedoch auch ein Teil der PTEN-Wirkung in PTEN-überexprimierenden KTCTL-26A durch inaktivierende Regulationsmechanismen kompensiert. So bewirken beispielsweise CK2-vermittelte Phosphorylierungen im C-Terminus von PTEN eine stabilisierende Konformationsänderung des Moleküls, die jedoch die Phosphatase-Aktivität von PTEN stark einschränkt (Vazquez *et al.*, 2001; Torres und Polido, 2001). Auch Acetylierungen oder die durch Ubiquitylierung vermittelte subzelluläre Umverteilung, kann PTEN an seiner Funktionsausübung hindern (Okumura *et al.*, 2006; Trotman *et al.*, 2007). Dies könnte auch erklären, warum KTCTL-26A mit einer Überexpression von Phosphatase-inaktiviertem PTEN ebenfalls schlechter überleben. So fangen die funktionell inaktiven PTEN-Moleküle gegebenenfalls bestimmte Regulationsmechanismen ab, wodurch funktionelles, endogenes PTEN seltener inaktiviert wird und die Apoptose einleiten kann. Demnach scheinen VHL und PTEN auf die Adhäsionsfähigkeit der KTCTL-26A keinen Einfluss zu nehmen, das Überleben der Tumorzellen jedoch deutlich zu beeinträchtigen.

Neben der Adhäsion, Migration und Überlebensfähigkeit tragen weitere Eigenschaften der Tumorzellen zur Entstehung und Progression des Tumors bei. Dazu zählen eine erhöhte Proliferation, eine verstärkte Angiogenese und die Fähigkeit zur Invasion. Diese Prozesse wurden hier im Einzelnen nicht weiter für die 786-O- und KTCTL-26A-Zellen analysiert. Stattdessen wurde ein *in vivo*-Experiment durchgeführt, bei dem das Metastasierungspotential der Karzinom-Zelllinien und der Einfluss der Überexpression von VHL bzw. PTEN in den Zellen auf diesen mehrstufigen Prozess untersucht wurde. Die Metastasierung beginnt normalerweise mit der Ablösung einzelner Tumorzellen vom kompakten Primärtumor und deren Infiltration ins umliegende Gewebe. Mittels Intravasation dringen diese Tumorzellen in umliegende Blut- oder Lymphgefäße ein. Die Zellen, die unter den veränderten Umweltbedingungen überleben, zirkulieren im Gefäßsystem bis sie in feinen Kapillaren stecken bleiben. Nach der Extravasation beginnen die Tumorzellen zu proliferieren, es kommt zu einer Kolonialisierung und schließlich zur Ausbildung von Sekundärtumoren (van Zijl *et al.*, 2011). Die

Metastasierung ist ein höchst ineffizienter Prozess, lediglich $<0,1\%$ der ausgesandten Tumorzellen entwickeln erfolgreich Metastasen in anderen Geweben (Chambers *et al.*, 2002; Mack *et al.*, 2010). Hier wurden 786-O bzw. KTCTL-26A, mit oder ohne Überexpression von VHL, PTEN oder NEDD4-1, in die Schwanzvene von immunsuppressiven Mäusen injiziert und nach acht Wochen die Anzahl der Metastasen in der Lunge ermittelt (Abb. 3.30 und Abb. 3.31). Zwar wurden die initialen Vorgänge der Migration und Invasion in die Gefäße durch die direkte Injektion ins Blutsystem übergangen, jedoch benötigten die Zellen trotzdem eine erhöhte Fähigkeit zum Überleben, zur Invasion, zur Migration und Proliferation, um erfolgreich zu metastasieren. Tatsächlich konnten sowohl für 786-O als auch für KTCTL-26A Metastasen in der Lunge nachgewiesen werden. VHL und PTEN verminderten dieses Metastasierungspotential hingegen in beiden Nierenkarzinom-Zelllinien deutlich. Der negative Einfluss der beiden Tumorsuppressoren auf die Metastasierung ist bereits bekannt. So ist der VHL-Verlust mit metastasierenden ccRCCs und Hbs assoziiert (Shang *et al.*, 2012; Jarell *et al.*, 2006). Eine PTEN-Defizienz fördert u.a. die Metastasierung von ccRCCs, Prostatakarzinomen und Brusttumoren (Schneider *et al.*, 2011; Pourmand *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu 786-O wies VHL in KTCTL-26A einen stärker inhibierenden Effekt auf den Metastasierungsprozess als PTEN auf. Dies ist gegebenenfalls auf einen synergistischen Effekt von VHL und dem durch VHL stabilisierten PTEN zurückzuführen. Es ist jedoch auch möglich, dass Regulationsmechanismen, die das endogen vorhandene PTEN inaktivieren, auch die Funktionalität des überexprimierten PTEN in den Zellen vermindern. Die Überexpression von NEDD4-1, einer Ubiquitin-Ligase von PTEN (Wang *et al.*, 2007), verstärkte das Metastasierungspotential beider Zelllinien, was die Funktion der PTEN-vermittelten Inhibierung der Metastasierung noch verdeutlicht. Das verminderte Metastasierungspotential wird in 786-O wahrscheinlich zumindest teilweise durch die bereits nachgewiesene VHL- und PTEN-induzierte Verstärkung der Adhäsion und Inhibierung der Migrationsfähigkeit vermittelt (Abb. 3.24 und Abb. 3.29). In KTCTL-26A reduziert vermutlich die VHL- und PTEN-induzierte Verminderung des Überlebens die Fähigkeit zur Metastasierung (Abb. 3.28). Es ist jedoch auch bekannt, dass sowohl VHL als auch PTEN die Proliferation, Angiogenese und Invasion beeinflussen (Linehan *et al.*, 2009; Brader und Eccles, 2004), was zusätzlich zur Inhibierung der Metastasierung von 786-O und KTCTL-26A beitragen könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl VHL als auch PTEN die Adhäsion steigern, die Migrationsfähigkeit reduzieren und das Überleben unter erschwerten Bedingungen vermindern. Diese VHL- und PTEN-vermittelten Funktionen scheinen jedoch zellspezifisch bzw. in verschiedenen Tumor-Zelllinien nicht immer ausreichend, um die Eigenschaften der Zelle zu verändern und einen gesünderen Phänotyp zu induzieren. Tatsächlich genügte jedoch die Restitution von VHL bzw. die Überexpression von PTEN in den Karzinom-Zelllinien 786-O und KTCTL-26A, um die Progression der Tumorzellen zu inhibieren, indem die Fähigkeit der Zellen zur Metastasierung deutlich herabgesetzt wurde. Hinsichtlich der Fragestellung, ob die Tumorsuppressor-Funktion von VHL zumindest teilweise durch das VHL-stabilisierte PTEN vermittelt wird, konnten aufgrund der verwendeten Versuchsanordnungen lediglich Vermutungen angestellt werden. Um eine definitive Aussage treffen zu können, müsste die Auswirkung einer Überexpression von VHL mit und ohne zusätzlichem PTEN-*Knockout* in PTEN-defizienten Zellsystemen analysiert werden.

4.3 Die kombinierte VHL- und PTEN-Defizienz induziert die Tumorgenese

Klinische Untersuchungen zeigen vielfach die Korrelation eines VHL-Verlustes mit der Entstehung verschiedener Tumorerkrankungen, wie Hämangioblastomen (Hbs), Phäochromozytomen (PCCs), Nierenzysten und klarzelligem Nierenkrebs (ccRCC). So ist das Krankheitsbild des VHL-Syndroms längst gut beschrieben und sogar bekannt, welche VHL-Mutationen zur Ausbildung diverser Symptome führen können. Die Reproduktion des VHL-Syndroms im Mausmodell gestaltet sich jedoch als schwierig. Die Arbeitsgruppen um Volker H. Haase und Wenbin Ma generierten unabhängig voneinander auf dem Cre/LoxP-System basierende Vhl-Mausmodelle, welche bei Expression der Cre-Rekombinase zu einem konstitutiven vollständigen Funktionsverlust von Vhl führen. Beide Modelle sind homozygot in der Embryogenese letal und entwickelten heterozygot lediglich Hämangiome der Leber und äußerst selten Nierenzysten (Haase *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003). Mithilfe des Vhl-Modells von Haase *et al.*, welches auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (Abb. 3.32 V1KO), wurden anschließend auch verschiedene konditionale Untersuchungen einzelner Organe vorgenommen. So konnte u.a. eine Rolle von Vhl in der Gefäßbildung (Tang *et al.*, 2006), in der Knochenentwicklung (Pfandler *et al.*, 2004), bei der Immunantwort (Biju *et al.*, 2004) und in Entzündungsprozessen (Cramer *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. In der Niere führte hingegen der spezifische Vhl-Verlust in Podozyten lediglich zur Glomerulomegalie (Brukamp *et al.*, 2007) und in proximalen Tubuluszellen, welche den Ursprung des ccRCCs bilden (Neumann und Zbar, 1997), ausschließlich zur Ausbildung von Zysten (Rankin *et al.*, 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass neben dem Verlust von VHL eine Mutation oder Fehlregulation eines weiteren Gens für die Tumorgenese in der Niere nötig ist. In vorangegangenen Teilen dieser Arbeit konnte bereits herausgearbeitet werden, dass der Tumorsuppressor PTEN in ähnlicher Weise wie VHL auf die Eigenschaften von Tumorzellen einwirkt (Details siehe 3.2 und 4.2). Des Weiteren wurde früher gezeigt, dass PTEN in ccRCCs häufig fehlreguliert wird (Brenner *et al.*, 2002). Auch ist bereits bekannt, dass der Verlust von Vhl und Pten in der Tumorgenese von Cystadenomen im Genitaltrakt zusammenwirkt (Frew *et al.*, 2008). Dies führte zu der Hypothese, dass möglicherweise auch für die Entstehung des ccRCCs eine kombinierte Fehlregulation von VHL und PTEN erforderlich sein könnte. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit diverse Mausmodelle mit einer Pten-Defizienz und verschiedenen VHL-Mutationen generiert. Neben der V1KO-Maus von Haase *et al.* wurden auch Mäuse mit einer VHL Typ 2-Mutation verwendet (Abb. 3.32 V2B und V2C), welche zuvor innerhalb unserer Arbeitsgruppe generiert und getestet wurden. Als Pten-Modell diente eine von Suzuki *et al.* generierte, auf dem Cre/LoxP-System basierende Pten-Maus. Die Expression der Cre-Rekombinase führt hier zum *Lox-out* der Exons 3 bis 5 des *Pten*-Gens und somit zu einem Funktionsverlust von Pten (Abb. 3.32 PT). Der konstitutive, homozygote Pten-Verlust induziert dabei den Tod während der Embryogenese, wohingegen eine heterozygote Pten-Defizienz mit einer erhöhten Tumorzinzidenz assoziiert ist. So entwickelten diese Tiere v.a. T-Zell-Lymphome, Hyperplasien der Leber, Terratokarzinome und Prostatatumore (Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2001). Weitere konditionale Untersuchungen verschiedener Organe dieser Maus zeigten außerdem den Tumor-induzierenden Einfluss eines Pten-Verlust auf Brusttumore und Endometriumkrebs (Stambolic *et al.*, 2000), Leberkarzinome (Watanabe *et al.*, 2005) und Dysplasien im Hirn (Backman *et al.*, 2001). Als Effektorlinie diente die Act-Cre-Maus, welche die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert (Abb. 3.32 AC; Lewandoski *et al.*, 1997). Wie für ccRCCs existiert derzeit auch noch kein schlüssiges Tiermodell

für die Entstehung von PCCs. Da sowohl der Verlust von VHL als auch von PTEN eine Rolle in der PCC-Tumorgenese zu spielen scheint (Maher und Kaelin, 1997; Korpershoek *et al.*, 2008), wurde hier neben der Analyse der Nieren ein weiteres Hauptaugenmerk auf die Untersuchung der Nebennieren gelegt.

4.3.1 Funktionalität der *in vivo* Modelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei *compound* Mausmodelle mit einer Pten-Defizienz und jeweils einer von drei Vhl-Mutationen generiert (Abb. 3.32). Das $PT^{ko/wt} V1KO^{ko/wt}$ -Modell induziert einen vollständigen Funktionsverlust von Pten und Vhl. Aufgrund der Verpaarung mit der AC-Effektorlinie, welche das Transgen der Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert, fand der *Loxout* der Gene in allen Zellen des Organismus statt. Die frühe Letalität von Mausembryos mit konstitutivem, homozygotem Verlust von *Vhl* bzw. *Pten* wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Gnarra *et al.*, 1997; Di Cristofano *et al.*, 1999). Auch hier konnten lediglich Tiere mit dem Verlust von nur einem Allel von *Vhl* und *Pten* generiert werden, was die Funktionalität der Transgene bestätigt. Außerdem wurden $PT^{ko/wt}$ -Mäuse mit Mäusen, die die *Knockin*-Variante einer VHL Typ 2-Mutation enthielten, verpaart. Die Nachkommen besaßen sowohl einen heterozygoten *Pten*-Verlust als auch eine ubiquitäre V2B- bzw. V2C-Mutation. Während humane V2B-Mutationen mit Hbs, ccRCC und PCCs assoziiert werden, entwickeln Patienten mit einer V2C-Mutation lediglich PCCs (Kaelin, 2002). Auch Mäuse mit einer homozygoten V2B-Mutation waren nicht lebensfähig, wohingegen $V2C^{ki/ki}$ -Mäuse nachweisbar waren. Diese Tiere unterschieden sich zwar phänotypisch nicht von heterozygoten V2C-Mäusen, dennoch scheint dieser Genotyp die Entwicklung des Organismus zu beeinträchtigen, da $V2C^{ki/ki}$ -Mäuse in viel geringerer Zahl auftraten, als nach Mendel zu erwarten wäre. Auch hier scheint bereits eine homozygote *missense*-Mutation zur Letalität in der Embryonalentwicklung zu führen. Eine Ausnahme bildet jedoch die Mutation R200W, deren homozygote Keimbahn-Ausprägung weder bei Patienten noch im Mausmodell einen frühzeitigen Tod induziert, sondern die sogenannte Cuvash Polycythämie verursacht (Hickey *et al.*, 2007). Schließlich wurden hier ebenfalls single-transgene Mäuse mit den Genotypen $PT^{ko/wt}$, $V1KO^{ko/wt}$, $V2B^{ki/wt}$ oder $V2C^{ki/wt}$ analysiert, um abschätzen zu können, ob für die Entstehung verschiedener Tumore bereits einzelne Fehlregulationen von Vhl oder Pten ausreichen und welche Gen-Defizienz für die Tumorgenese verantwortlich gemacht werden kann.

Die Genotypisierung der Mäuse wurde zunächst mit Hilfe von Schwanzbiopsien und daraus folgenden DNA-Analysen vorgenommen, zusätzlich jedoch bei jeder präparierten Maus nochmals im Nierengewebe überprüft (Abb. 3.36). Da die Analysen der spezifischen Gewebe zu jeder Zeit dieselben Ergebnisse wie die Untersuchung der Schwanzspitze ergab, ist davon auszugehen, dass die Effektorlinie AC funktionell ist und eine Expression der Cre-Rekombinase wahrscheinlich ubiquitär vorliegt bzw. zumindest in der Niere gewährleistet ist. Außerdem wurden die VHL Typ 2-Punktmutationen mittels Sequenzierung der DNA aus exemplarischen Nebennieren bestätigt (Abb. 3.44). Die Sequenzierung der cDNA aus Nieren und Nebennieren von $V2B^{ki/wt}$ -Mäusen zeigte interessanterweise, dass in beiden Organen ausschließlich das mutierte V2B-Allel exprimiert wird (Abb. 3.39). Dies ist erstaunlich, da homozygote V2B-Mäuse nicht lebensfähig sind. Daher scheint hier ein Regulationsmechanismus erst im Verlauf der Entwicklung des Organismus bzw. nur in spezifischen Organen aktiviert zu werden, der die Expression des Wildtyp-Allels von VHL inhibiert.

So simuliert das V2B-Mausmodell zumindest in den hier näher untersuchten Geweben selbst in der heterozygoten Ausprägung eine homozygote VHL-Punktmutation. Für die V2C-Mutation galt diese Beobachtung nicht, hier wurden in Nieren und Nebennieren sowohl das gesunde als auch das mutierte Vhl-Allel exprimiert.

Die Analyse der verschiedenen Mausmodelle umfasste v.a. die Nieren und Nebennieren, zusätzlich wurden jedoch auch andere Organe des Abdomens auf Auffälligkeiten überprüft. Untersuchungen des Auges und des Gehirns wurden hingegen nicht vorgenommen, so dass keine Aussage über gegebenenfalls entstandene Vhl-assoziierte Hbs gemacht werden kann. Generell waren die ersten Dysplasien erst im Alter von 9 bis 12 Monaten erkennbar, die möglicherweise zum Tod des Tieres nach frühestens 18 Monaten beitrugen. Demnach genügen weder die heterozygoten *Vhl*-Mutationen noch die *Pten*-Haploinsuffizienz, um einen aggressiven tumorösen Phänotyp auszubilden. Auch Haase *et al.* konnten erst im Mausalter von 12 bis 17 Monaten in 90% der heterozygoten V1KO-Mäuse vaskuläre Gewebsveränderungen nachweisen, wohingegen lediglich in 50% der 3 bis 12 Monate alten Tiere Läsionen auftraten (Haase *et al.*, 2001). Suzuki *et al.* beschrieben bereits Tumore in 7 Monate alten $PT^{ko/wt}$ -Mäusen (Suzuki *et al.*, 1998), was in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden konnte. Die Mäuse mit heterozygoten VHL-Mutationen entwickelten hier, wie auch genetisch unveränderte Tiere, äußerst selten tumoröse Neoplasien in verschiedenen Geweben, welche mit großer Wahrscheinlichkeit zufällig und Genotyp-unabhängig auftreten. Möglicherweise führen hier spontane Mutationen in *Vhl*, *Pten* oder anderen Genen zur Tumorgenese. Dies bestätigt, dass der heterozygote Phänotyp des VHL Typ 1 (V1KO) bzw. eine heterozygote VHL Typ 2C (V2C)-Mutation nicht genügen, um Tumore zu induzieren. Somit ist mindestens ein *LOH* (*loss of heterozygosity*) einzelner Funktionen von *Vhl* dafür nötig (*Two-hit-Modell*; Kaelin, 2008). Erstaunlicherweise entwickelten auch $V2B^{ki/wt}$ -Mäuse keine phänotypischen Veränderungen, obwohl hier kein Wildtyp-*Vhl* exprimiert wird. Demnach nimmt entweder die hier verwendete Mutation 398G→A wenig Einfluss auf die Funktionalität des *Vhl*-Proteins oder eine homozygote V2B-Mutation allein ist zu schwach, um die mit V2B-assoziierten ccRCCs und PCCs zu induzieren. In fast einem Drittel der $PT^{ko/wt}$ -Mäusen waren PCCs nachweisbar. Zwar konnte bereits in humanen PCCs eine Fehlregulation von PTEN gezeigt (Qin *et al.*, 2007; van Nederveen *et al.*, 2008) und auch PCCs in einem konditionalen Mausmodell mit homozygotem *Pten*-Verlust erzeugt werden (Korpershoek *et al.*, 2009). Hier wurde jedoch erstmals gezeigt, dass bereits eine *Pten*-Haploinsuffizienz für die Tumorgenese in der Nebenniere ausreicht. Vereinzelt traten ebenfalls Nierenzysten auf. Außerdem bildeten $PT^{ko/wt}$ -Mäuse, wie bereits beschrieben, Lymphome im Hals und in der Leistengegend (Suzuki *et al.*, 1998) sowie Ovarialkarzinome (Wu *et al.*, 2007). Mit Ausnahme der PCCs konnte dasselbe Tumorspektrum von Nierenzysten, Lymphomen und Ovarialkarzinomen auch in Tieren mit einem $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$ -Genotyp nachgewiesen werden. Zusätzlich waren Hämangiome der Leber zu finden, welche vermutlich auf die *Vhl*-Defizienz zurückzuführen sind, da diese bereits für das V1KO-Mausmodell dokumentiert werden konnten (Haase *et al.*, 2001). Die Tiere der Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ entwickelten wie auch die $PT^{ko/wt}$ -Mäuse PCCs und sporadisch Nierenzysten, Lymphome und Ovarialkarzinome. Da die Lymphome und Tumore des Ovars hier nicht häufiger als in $PT^{ko/wt}$ -Mäuse auftraten, sind sie vermutlich ausschließlich auf die *Pten*-Haploinsuffizienz zurückzuführen. Die PCCs nahmen hingegen geringfügig in ihrer Anzahl und deutlich in ihrer Größe zu, so dass ein synergistischer Effekt der VHL Typ 2-Mutationen vermutet werden kann. Auch Makrozysten der Niere wurden, wenn auch immer noch selten, doppelt so oft wie in $PT^{ko/wt}$ -Mäusen

dokumentiert. Nierenzysten gelten als Vorläuferstadium der ccRCCs, welche u.a. mit dem V2B-Phänotyp assoziiert werden (Kaelin, 2005). V2C-Mutationen induzieren bekanntermaßen Umstrukturierungen der Extrazellulärmatrix (Hoffman *et al.*, 2001), so dass vermutlich sowohl V2B als auch V2C zusätzlich zur Pten-Defizienz die Entstehung der Nierenzysten fördern. Im weiteren Verlauf wurden nun die Nieren und Nebennieren näher untersucht.

4.3.2 Analyse der Nieren

Über 70% der VHL-Patienten entwickeln Läsionen in der Niere, zu denen einfache Zysten, multifokale Zysten und ccRCCs gezählt werden (Li und Kim, 2011; Gallou *et al.*, 2004). Dabei ist derzeit noch relativ unklar, ob die ccRCCs aus Zystenzellen hervorgehen oder ihren Ursprung in gesunden Tubulusepithelzellen haben. Bei 15% der ccRCCs finden sich zystische Veränderungen in unmittelbarer Umgebung, nur 5% der sporadischen ccRCCs enthalten hingegen auch direkt zystisches Gewebe (Moch, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits während der Präparation der Mäuse einige zystische Nieren identifiziert werden. Diese mit Flüssigkeit gefüllten Makrozysten nahmen teilweise sogar fast das gesamte Volumen der Niere ein und vergrößerten deren Oberfläche zusätzlich (siehe Abb. 3.35 A $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$; Abb. 3.37). Die Zysten waren in jeweils 7% der Mäuse der Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ und in 2% der $V2C^{ki/wt}$ -Mäuse nachweisbar. Auch eine von acht präparierten $PT^{ko/wt}V1KO^{ki/wt}$ -Mäusen (12,5%) entwickelte eine makrozystische Niere. Zwar wurden weitere Analysen verdächtiger Nieren durchgeführt, es konnten allerdings keine weiteren Zysten nachgewiesen werden. Es ist jedoch relativ unwahrscheinlich, dass nicht weitere Mäuse zystische Nieren entwickelten, da die fortgeschrittenen Makrozysten sich auch aus kleineren Zysten gebildet haben müssen und so auch andere Tiere möglicherweise Vorstufen dieser Zysten enthalten könnten. Da die Zysten jedoch auch erst frühestens nach 9 Monaten dokumentiert werden konnten (Abb. 3.34), ist nicht vollständig auszuschließen, dass es sich um spontane, Genotyp-unabhängige Gewebeveränderungen handelt.

Mechanismus der renalen Zysten-Entstehung

Bekanntermaßen wird der VHL Typ 1 und 2A (V2A) mit der Ausbildung von zystischen Nieren assoziiert. Mutationen und Deletionen von VHL können dabei die Destabilisierung und somit den Verlust der Primärcilien der Tubuluszellen induzieren (Esteban *et al.*, 2006; Thoma *et al.*, 2007a). Dies führt zu einer fehlerhaften Spindelbildung in der Mitose und somit zur Instabilität der Chromosomen, was die Entstehung von Zysten begünstigt (Thoma *et al.*, 2009). Doch auch die Fehlregulation Cilien-assoziiierter Signalwege z.B. von PDGF, Wnt/ β -Catenin und Hedgehog tragen vermutlich zur Zystenbildung in der Niere bei (Peruzzi und Bottaro, 2006; Moch, 2010; Plotnikova *et al.*, 2009). Thoma *et al.* beschrieben 2007 ein Modell, welches sowohl die Zystenbildung als auch die Entstehung von ccRCCs erklären könnte (Abb. 4.3). Sie gingen davon aus, dass in VHL-mutierten Tubuluszellen eine weitere Mutation nötig ist, die zum Verlust von GSK3 β führt. Sowohl VHL als auch GSK3 β sind unabhängig voneinander zur Aufrechterhaltung von Cilien befähigt, so dass erst die Beeinträchtigung beider Moleküle zur Ausbildung von Zysten führt. Weitere Mutationen in den zystischen Zellen induzieren daraufhin die Zysten-abhängigen ccRCCs. Des Weiteren kann nach Thoma *et al.* jedoch auch eine unbekannte Mutation weiterer Gene in den VHL-defizienten

Tubuluszellen der Niere zur Tumorgenese von ccRCCs führen, welche dann Zysten-unabhängig verläuft (Thoma *et al.*, 2007b; Abb. 4.3).

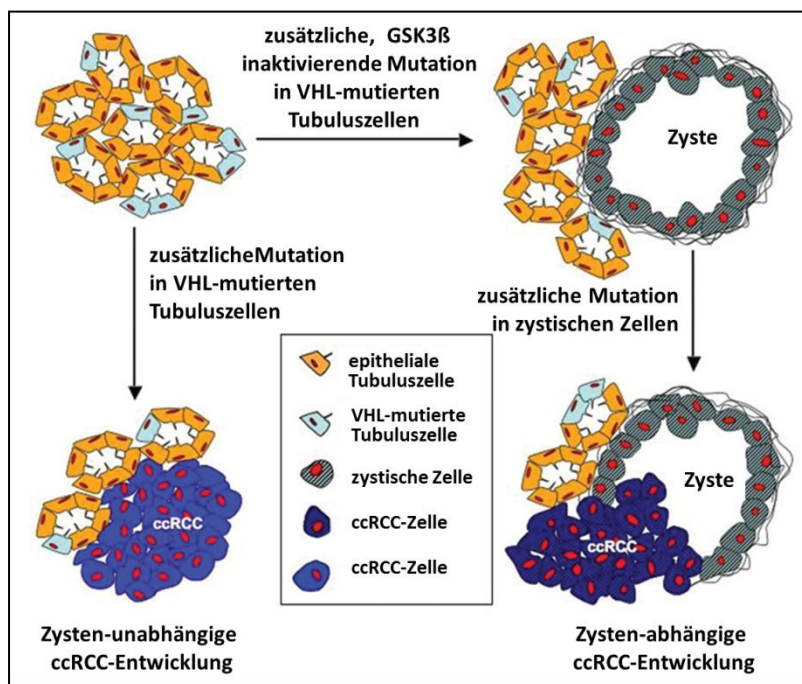


Abb. 4.3 Modell der Zystenbildung und ccRCC-Entstehung, modifiziert nach Thoma *et al.*, 2007b

Im Gegensatz zu VHL wurden PTEN-Mutationen bisher nicht als Effektor für die Entwicklung von Nierenzysten beschrieben. Der PTEN-Verlust bewirkt jedoch AKT- und p70S6K-abhängig die Inaktivierung von GSK3β (Cross *et al.*, 1995; Cantley und Neel, 1995). Außerdem verhindert PTEN durch die Inhibierung des MAPK/ERK-Weges die ERK-vermittelte Phosphorylierung von GSK3β, welche die AKT-induzierte Phosphorylierung begünstigt (Ding *et al.*, 2005; Yamada und Araki, 2001). Die Beeinträchtigung der PTEN-Funktion, entsprechend des Modells von Thoma *et al.*, könnte also dennoch zur Zystenbildung beitragen. Dass die auch innerhalb dieser Arbeit verfolgte Annahme des Zusammenwirkens des Verlustes der Funktion von VHL und PTEN bei Nierenerkrankungen stimmt, konnten Frew *et al.* eindeutig nachweisen. Auch sie entwickelten ein Mausmodell mit kombinierten *Vhl*- und *Pten*-Verlust. Sie schalteten die beiden Gene jedoch konditional in der Niere aus, so dass die Auswirkung eines homozygoten Ausfalls von *Vhl* und *Pten* untersucht werden konnte. Während *Vhl*^{ko/ko}-Mäuse eine Hydronephrose entwickelten, wiesen *Pten*^{ko/ko}-Mäuse lediglich eine erhöhte Proliferation und eine Vergrößerung der epithelialen Tubuluszellen auf. Der homozygote Verlust beider Gene führte hingegen bei 100% der Mäuse zur Ausbildung zahlreicher einfacher und atypischer Zysten. Weitere Analysen ergaben, dass die Zysten HIF-unabhängig entstanden, Gsk3β inaktiviert in den zystischen Zellen vorlag und deren Primärcilien Akt-, Mek-, und Erk-abhängig reduziert waren (Frew *et al.*, 2008). Diese Resultate beweisen, dass die Kooperation des VHL- und PTEN-Verlustes zur Induktion und Entwicklung von Nierenzysten führt. Die in dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle sind jedoch möglicherweise für die Generierung zystischer Nieren ungeeignet, da lediglich ein heterozygoter Verlust von *Vhl* und *Pten* erzeugt werden kann. Des Weiteren ist für die VHL Typ 1-Mutation bekannt, dass sie zum Verlust der Primärcilien führen, so dass gegebenenfalls in *PT*^{ko/wt} *VIKO*^{ko/wt}-Mäusen weitere Zysten zu dokumentieren sein werden. Im

Gegensatz dazu werden die V2B- und V2C-Punktmutationen nicht mit dem Verlust der VHL-vermittelten Stabilisierung der Primärcilien assoziiert (Thoma *et al.*, 2007a). Nach dem Modell von Thoma *et al.* sind hier demnach keine zystischen Nieren zu erwarten. Dennoch zeigten Lee *et al.*, dass V2B^{ki/wt}-Mäuse nach einer Behandlung mit dem Mutagen ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea*) renale Mikrozysten (Lee *et al.*, 2009) entwickeln. Die noch ausstehenden Untersuchungen der Nieren werden zukünftig Klarheit darüber bringen, ob bereits eine kombinierte Haploinsuffizienz von Vhl und Pten genügt, um Nierenzysten zu induzieren und welchen Einfluss die VHL Typ 2-Mutationen V2B und V2C auf die Entstehung der Zysten nehmen.

Klarzellige Nierenkarzinome sind meist stark vaskularisiert und weisen aufgrund der vermehrten Einlagerung von Lipiden eine gelbliche Oberfläche auf. Lipide und Glykogen verhindern außerdem die Färbung des Zytoplasmas in der H/E-Färbung, was zum charakteristischen Erkennungsmerkmal wurde und zur Namensgebung des Tumors führte (Moch, 2012; Arai und Kanai, 2011). Die bisher im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mäuse unterschiedlichen Genotyps wiesen keine klarzelligen Regionen in ihren Nieren auf. Zwar stehen noch Analysen weiterer Nieren aus, um eine gesicherte Aussage machen zu können. Die Tendenz der bereits ermittelten Untersuchungen weist jedoch darauf hin, dass die Haploinsuffizienz von Pten kombiniert mit einer heterozygoten Vhl-Mutation nicht aggressiv genug ist, um ccRCCs zu induzieren. Dies ist möglicherweise auf Kompensationsmechanismen des verbleibenden gesunden Vhl- bzw. Pten-Allels zurückzuführen. Die hier durchgeführten Expressionsanalysen zeigten eine schwache Reduktion der Vhl-Konzentration in Nieren mit heterozygotem Vhl-Verlust und konnten so die Analysen von Haase *et al.* bestätigen (Haase *et al.*, 2001). Die V2B- und V2C-Mutationen bewirkten hingegen keine eindeutige Verminderung der Vhl-Menge, obwohl zumindest für V2C-Mutationen bereits ein destabilisierender Effekt auf das Vhl-Molekül nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.40; Knauth *et al.*, 2009). Möglicherweise wird hier V2C bevorzugt degradiert, so dass das ebenfalls exprimierte Wildtyp-Vhl indirekt stabilisiert wird. Auch auf die Lokalisation des Proteins nahmen die VHL Typ 2-Mutationen keinen Einfluss. So war Vhl generell nur sehr schwach in den Tubuluszellen, jedoch sehr deutlich in den Glomeruli nachweisbar (Abb. 3.41). Andere Arbeitsgruppen wiesen hingegen in humanem Gewebe eine starke VHL-Expression in den proximalen Tubuli und kein VHL in den Glomeruli nach (Shiao *et al.*, 2003; Corless *et al.*, 1997). Die zystischen Gewebe der Mäuse zeigten wiederum eine stark erhöhte Vhl-Konzentration (Abb. 3.40 und Abb. 3.42). Selbst in inhomogenen Geweben mit Anteilen von ccRCCs konnte bereits eine starke VHL-Expression nachgewiesen werden (Shiao *et al.*, 2003). Dass es sich bei diesen Vhl-Molekülen zumindest in den Nieren der Mäuse mit den Genotypen PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt} und PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt} v.a. um funktionell beeinträchtigte Vhl-Varianten handelt, dokumentiert hingegen die etwas verstärkte Vegf-Konzentration in denselben zellulären Strukturen (Abb. 3.43). Diese erhöhte Vegf-Expression in tumorösen Tubuluszellen der Niere wurde durch weitere Analysen bereits belegt (Fu *et al.*, 2011). Der heterozygote Pten-Verlust reduzierte die nachweisbare Menge an Pten leicht, aber nicht stringent (Abb. 3.40). So war Pten unabhängig vom Genotyp im Zytoplasma der Tubuluszellen aller gesunden und zystischen Nieren nachweisbar (Abb. 3.41 und Abb. 3.42). Eine deutliche Lokalisation von PTEN in den Tubuluszellen wurde ebenfalls bereits in humanem Nierengewebe nachgewiesen (Wang *et al.*, 2011; Jun *et al.*, 2011). In Geweben eines späteren Tumorstadiums scheint die subzelluläre Verteilung von Pten jedoch eine Rolle zu spielen. So konnten Hennenlotter *et al.* in humanen, klarzelligen Nierenkarzinomen zeigen, dass deutlich weniger PTEN im Zytoplasma, jedoch verstärkt im Nukleus, der Tubuluszellen zu finden ist

(Hennenlotter *et al.*, 2008). Die Expression von Nedd4-1 in Vhl-defizienten und V2C-mutierten Nieren unterschied sich unabhängig vom Genotyp nicht. Jedoch zeigten die Nieren mit Expression der V2B-Mutante, welche Nedd4-1 nicht binden und somit nicht stabilisiert und deaktiviert werden (Details siehe 3.1 und 4.1), häufig wie vermutet eine verminderte Nedd4-1-Konzentration (Abb. 3.40). Die möglicherweise damit einhergehende Aktivierung der verbleibenden Nedd4-1-Moleküle könnte jedoch erklären, warum die nachweisbare Pten-Konzentration in $PT^{ko/wt}$ -Mäusen höher als in Tieren mit dem Genotyp $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ ist. Nedd4-1 konnte sowohl in gesunden als auch zystischen Nieren besonders stark in den proximalen Tubuluszellen und überhaupt nicht in den Glomeruli nachgewiesen werden (Abb. 3.41 und Abb. 3.42). Die Expression von Nedd4-1 wurde bereits in der humanen Nieren-Zelllinie HEK 293 (Shenoy *et al.*, 2008) und in Proteinsuspensionen aus murinen Nieren sichtbar gemacht (Kumar *et al.*, 1996). Die Expression von Nedd4-1 scheint demnach während der Tumorgenese unverändert, möglicherweise variieren jedoch verschiedene Regulationsmechanismen, wie z.B. die Vhl-Defizienz die Aktivität des Moleküls. Demnach nimmt der Genotyp einen Einfluss auf die Protein-Konzentrationen von Vhl, Pten und Nedd4-1, dieser scheint jedoch zu gering für die Transformation der epithelialen Tubuluszellen zu Nierenkrebszellen.

Im Gegensatz zu den hier ermittelten Resultaten, zeigten Frew *et al.* mit Hilfe ihres $Pten^{ko/ko}Vhl^{ko/ko}$ -Mausmodells, dass der vollständige Verlust von Vhl und Pten in den Nieren der Mäuse die Ausbildung von ccRCCs induzieren kann. So wiesen die Zysten umgebenden Zellen häufig klarzellige Strukturen auf (Frew *et al.*, 2008). Dies bestätigt, dass der homozygote Verlust von Vhl und Pten eine eindeutige Voraussetzung zur Entwicklung von ccRCCs ist. Es stärkt jedoch zusätzlich auch das von Thoma *et al.* entwickelte Modell, in dem die ccRCCs aus den zuvor gebildeten Nierenzysten entstehen können (Abb. 4.3). Neben der VHL Typ 1-Mutation ist auch der V2B-Phänotyp mit der Ausbildung von ccRCC assoziiert (Kaelin, 2008). Da V2B nicht zur Destabilisierung der Primärcilien beiträgt (Thoma *et al.*, 2007a), ist hier möglicherweise eine Zysten-abhängige Tumorgenese der ccRCCs auszuschließen. Obwohl im Mausmodell $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ das Wildtyp-Allel von Vhl nicht exprimiert und so die Homozygotie der V2B-Mutation simuliert wird, entstand kein ccRCC. Dies kann verschiedene Ursachen haben. So ist es möglich, dass neben V2B auch homozygote Mutationen von Pten mit anschließendem vollständigen Funktionsverlust für die Tumorgenese in der Niere nötig sind. Ebenso könnte gegebenenfalls neben einer V2B-Mutation eine VHL Typ 1-Mutation bzw. die Inhibierung des gesunden *Vhl*-Allels in bestimmten Entwicklungsstufen erforderlich sein, um so die Auswirkung der verbleibenden Funktionen der Vhl-Punktmutante weiter zu mindern. Schließlich könnten auch andere Mutationen als die von *Pten* bzw. die Fehlregulationen weiterer Moleküle die entscheidende Rolle in der V2B-induzierten ccRCC-Entstehung spielen.

Mechanismus der ccRCC-Entstehung

Der Entstehungsmechanismus der ccRCCs ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings können ccRCC eindeutig mit verschiedenen VHL-Mutationen assoziiert werden (von Teichman *et al.*, 2011). Die PTEN-Konzentration ist ebenfalls häufig in ccRCCs mit fortgeschrittener Entwicklung herabreguliert, was sich sowohl positiv auf das Tumorwachstum als auch den Metastasierungsprozess auszuwirken scheint (Shin *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2001). Auch lassen wirksame Therapieansätze Rückschlüsse auf entscheidende Signalwege zu, die für die Entwicklung von ccRCCs essentiell zu sein scheinen. So bewirkt die Behandlung mit den RTK (*Receptor tyrosine kinase*)-Inhibitoren Sunitinib und Sorafenib ebenso wie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab eine Inhibierung der

Progression des Tumors und somit ein bessere Prognose für die Patienten (Motzer *et al.*, 2007; Escudier *et al.*, 2007a; Escudier *et al.*, 2007b). Auch mTOR-Inhibitoren wie Temsirolimus oder Everolimus werden erfolgreich v.a. gegen metastasierende ccRCC eingesetzt (Hudes *et al.*, 2007; Motzer *et al.*, 2008). Kombinations-Therapien mit diesen Wirkstoffen werden ebenfalls derzeit eingehend geprüft (Azim *et al.*, 2010). Dies zeigt, dass die Heraufregulation von HIF-Zielgenen wie VEGF und die Aktivierung von mTOR eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von ccRCCs spielen. So konnte auch bereits in einem Mausmodell mit einer konstitutiv aktivierenden HIF1 α -Mutation Nierenzysten und ccRCCs generiert werden (Fu *et al.*, 2011). Des Weiteren bewirken Funktions-mindernde Mutationen des TSC1/2 (*Tuberous sclerosis complex 1/2*), der Rheb-abhängig die mTOR-Aktivierung hemmt (Mak *et al.*, 2004), die Induktion von Nierenzysten und -tumoren (Jimenez *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2005). So verhindert der VHL-Verlust die Degradation der HIF α -Untereinheiten, welche dadurch in den Tubuluszellen angereichert werden und nach der Interaktion mit ihrem Bindungspartner ARNT die Genexpression maßgeblich umgestalten und die Tumorgenese induzieren können (Maxwell *et al.*, 1999). mTOR steigert diesen Effekt, indem es die Translation fördert und so auch die Bildung der HIF α -Proteine verstärkt (Hudson *et al.*, 2002). Der additive Verlust von PTEN führt somit zu einer häufigeren Anregung des PI3K-Weges, welcher AKT-abhängig auch mTORC1 aktiviert und die HIF α -Konzentration weiter erhöht (Manning und Cantley, 2007). Funktions-hemmende Mutationen oder Fehlregulationen von VHL und PTEN wirken demnach synergistisch auf die verfügbare, funktionelle HIF-Menge in der Zelle ein. HIF selbst induziert wiederum u.a. die Expression verschiedene Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF, IGF und TGF α , die diverse Signalwege induzieren und so das Verhalten der Zellen verändern können (Semenza *et al.*, 2003). Zu diesen Signalwegen gehört auch der PI3K-Weg, so dass ein positiver Feedback-Mechanismus entsteht, bei dem HIF die Bildung seiner eigenen α -Untereinheiten fördert. Die erhöhte HIF α -Konzentration, welche durch den VHL-Verlust und die verstärkte Aktivierung von mTOR-Komplexen bewirkt wird, scheint also der essentielle Effekt in der Zelle zu sein, der die Entstehung des ccRCCs induziert. Weitere durch den Verlust von VHL und PTEN fehlregulierte Signalmoleküle verstärken daraufhin vermutlich zusätzlich den durch HIF induzierten Tumor-fördernden Einfluss. Allerdings scheinen nicht alle HIF-Subtypen gleichermaßen an der Tumorentwicklung beteiligt zu sein. Während in einigen ccRCC v.a. HIF1 nachzuweisen ist, wird in vielen ccRCCs scheinbar bevorzugt HIF2 stabilisiert (Zhang *et al.*, 2006). Tatsächlich konnte in mehreren Analysen bereits dokumentiert werden, dass HIF1 keinen Tumor-fördernden Effekt in der Niere hat (Maranchie *et al.*, 2002; Raval *et al.*, 2005). Der Verlust von HIF2 verhindert hingegen die Bildung von ccRCCs, so dass wahrscheinlich die Kombination von HIF1 und HIF2 bzw. HIF2 allein die Tumorgenese in der Niere induziert (Kondo *et al.*, 2003; Maranchie *et al.*, 2002). So kommt es gegebenenfalls sogar während der Tumorentwicklung zu einer Verschiebung der Konzentrationen der HIF-Subtypen mit der zunehmenden Tendenz zu HIF2 (Shen und Kaelin, 2012). Möglicherweise ist in unterschiedlichen Entwicklungsphasen des Tumors die Expression verschiedener Zielgene von HIF1 und HIF2 nötig, um die Progression voranzutreiben. Während HIF1 beispielsweise bevorzugt die glykolytischen Gene induziert (Hu *et al.*, 2003) und c-MYC inhibiert (Zhang *et al.*, 2007), aktiviert HIF2 c-MYC (Gordan *et al.*, 2007) und ist der Hauptregulator von VEGF (Flamme *et al.*, 1998), EPO (Warnecke *et al.*, 2004) und TGF α (Smith *et al.*, 2005). Der Reduktion der HIF1 α -Konzentration im Laufe der ccRCC-Bildung könnten verschiedene, VHL-unabhängige Regulationsmechanismen zugrunde liegen. So könnte HSP90, welches HIF1 α stabilisiert (Whitesell und Lindquist, 2005), inhibiert bzw. HAF oder

RACK1, die die Degradation von HIF1 α fördern (Koh und Povis, 2009; Liu *et al.*, 2007), vermehrt aktiviert werden. Auch die Heraufregulation von FIH, welches die Aktivität von HIF1 deutlich mindert, HIF2 jedoch nicht in diesem Maße beeinträchtigt, wäre möglich (Khan *et al.*, 2011). Ein negativer *Feedback*-Mechanismus, bei dem die HIF α -Untereinheiten REDD4-abhängig mTORC1 inhibieren, könnte ebenso lediglich die Menge an HIF1 reduzieren, da HIF2 α scheinbar verstärkt durch mTORC2 gebildet werden kann (Kucejova *et al.*, 2011; Toschi *et al.*, 2008). Um diese möglicherweise für die Entwicklung der Tumore in der Niere essentiellen Fehlregulationen verstehen zu können, bedarf es in der Zukunft weitere Untersuchungen. Ein Modell, welches die diskutierten Signalwege zur ccRCC-Entstehung zusammenfasst, ist in Abbildung 4.4 dargestellt (Abb. 4.4).

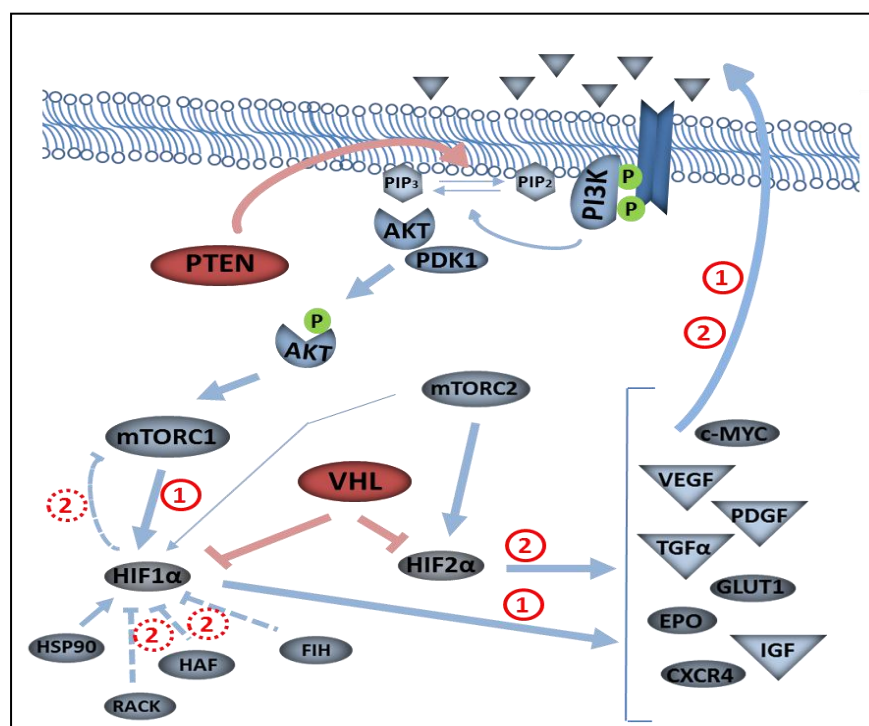


Abb. 4.4 Modell der Entstehung von klarzelligen Nierenkarzinomen. Die wildtypische Expression von VHL und PTEN verhindern synergistisch die Stabilisierung der HIF-Transkriptionsfaktoren und somit die Bildung von Tumoren in der Niere. Der Verlust von VHL und PTEN verstärkt die Synthese und Stabilisierung der HIF-Regulatoren, wodurch die Entstehung von ccRCCs veranlasst wird. Nachdem HIF1 die Tumorgenese induziert hat ①, wird es im Verlauf der Tumorentwicklung durch noch unbekannte Mechanismen inhibiert ②. HIF2 reguliert anschließend vermutlich die Progression des ccRCCs ②.

4.3.3 Analyse der Nebennieren

Phäochromozytome (PCCs) sind Tumore des Nebennieren-Marks und werden dem Erkrankungsbild des VHL-Syndroms zugeordnet (Kaelin, 2002). Wie auch für die weiteren VHL-assoziierten Tumorerkrankungen, scheinen dabei die Dosiseffekte einer Haploinsuffizienz von VHL nicht ausreichend, um PCCs auszubilden, so dass die Mutation bzw. Fehlregulation beider VHL-Allele nötig ist (*Two-hit-Modell*; Knudson und Strong, 1972). Dieser *LOH* (*loss of heterozygosity*)-Effekt scheint jedoch nur für einzelne VHL-Funktionen zutreffend zu sein. So entstehen beim VHL Typ 1, welcher mit einem vollständigen Funktionsverlust von VHL assoziiert ist, nie PCCs, wohingegen Patienten mit dem VHL Typ 2, der durch einen teilweisen Funktionsverlust gekennzeichnet ist, häufig PCCs entwickeln (Neumann und Wiestler, 1991). Auch der Verlust von PTEN wurde bereits in

sporadischen, benignen und v.a. malignen, humanen PCCs gezeigt (van Nederveen *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnten PCCs in $PT^{ko/wt}$ -Mäusen induziert werden, welche erstmals für dieses Mausmodell beschrieben wurden. Auch *compound* Mäuse der Genotypen $PT^{ko/wt} V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt} V2C^{ki/wt}$ entwickelten PCCs. Wie zu erwarten bildeten die $V1KO^{ko/wt}$ -Mäuse, die den VHL Typ 1 simulieren, keine PCCs, was auch bereits von Haase *et al.* gezeigt wurde (Haase *et al.*, 2001). Die heterozygote V2C-Mutation war ebenfalls nicht ausreichend, um einzelne VHL-Funktionen vollständig zu inhibieren, so dass auch dieser Genotyp nicht zur Ausbildung von PCCs im Phänotyp führte. Wider Erwarten bewirkte auch die heterozygote V2B-Mutation keine PCC-Entwicklung, obwohl V2B die Expression des Wildtyp-Vhl-Allels unterdrückt und so einen homozygoten, teilweisen Funktionsverlust auslöst (Abb. 3.39). Die PCC-Entstehung wird demnach vermutlich in einem Entwicklungsstadium des Organismus induziert, in dem auch das Wildtyp-VHL-Allel der $V2B^{ki/wt}$ -Mäuse noch exprimiert wird. Die hier generierten PCCs entstanden unabhängig vom Genotyp uni- oder bilateral und Geschlechts-unspezifisch. Die Inzidenz der PCCs nahm ab dem Alter der Mäuse von 9 Monaten stetig zu (Abb. 3.34). Verglichen mit den $PT^{ko/wt}$ -Mäusen wiesen die Nebennieren-Tumore der *compound* Mäuse mit zunehmendem Alter einen größeren Umfang und eine höhere Masse auf (Abb. 3.35). Dies zeigt erstmals, dass eine heterozygote VHL Typ 2-Mutation allein zwar nicht ausreicht, um die Bildung von PCCs zu induzieren, jedoch die Progression des Nebennieren-Tumors verstärken kann.

Erstaunlicherweise war trotz der Tumorentstehung in der Nebenniere keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation in den einzelnen Mausmodellen zu dokumentieren und auch keine spontanen zusätzlichen Mutationen im verbleibenden, gesunden Allel nachzuweisen (Abb. 3.47 und Tab. 3.2). Die Vhl-Konzentration war unabhängig vom Genotyp sehr gering. Wie auch in den Nieren zeigte die V2B-Mutation keinen Effekt auf die Stabilität des Vhl-Proteins. Gegensätzlich zu den vorangegangenen Analysen in den Nieren reduzierte jedoch die V2C-Mutation in den Nebennieren die Proteinkonzentration von Vhl zumindest geringfügig. Die Instabilität von V2C- mutierten Proteinen konnte ebenso bereits von Knauth *et al.* gezeigt werden (Knauth *et al.*, 2009). Obwohl die Pten-Expression in murinen Nebennieren bereits deutlich belegt werden konnte (Lai *et al.*, 2007), war hier generell nur eine sehr schwache Pten-Konzentration nachweisbar. Wie auch schon die Nieren wiesen die Nebennieren von $PT^{ko/wt}$ -Mäusen nur teilweise eine zusätzliche, durch die Haploinsuffizienz verursachte Verminderung der Pten-Menge auf. Sowohl die subzelluläre Verteilung als auch die Lokalisation im Gewebe von Vhl, Pten und Nedd4-1 war in PCCs verglichen mit Wildtyp-Nebennieren unverändert. So waren die Moleküle ausnahmslos im Zytoplasma detektierbar und wesentlich stärker in den Rindenstrukturen als im Nebennieren-Mark exprimiert (Abb. 3.47). Diese typische Lokalisation von VHL im adrenalen Kortex ist bereits bekannt (Los *et al.*, 1996), auch die erhaltene Expression von VHL und PTEN in Phäochromozytomen wird durch weitere Analysen bestätigt (Dannenbergh *et al.*, 2003; van Nederveen *et al.*, 2006). Interessanterweise ähnelte sich das Expressionsmuster von Vhl und Pten stark, indem die Proteinmenge beider Tumorsuppressoren proportional zum Tumorgrad der Nebenniere erhöht vorlag (Abb. 3.46). Da die Konzentration von Nedd4-1 in allen untersuchten Organen annähernd gleich war, lässt sich eine allgemein erhöhte Genexpression in Tumorgeweben als Ursache für die gesteigerte Vhl- und Pten-Konzentration ausschließen. Vermutlich ist zumindest teilweise die bereits beschriebene Vhl-vermittelte, Nedd4-1-abhängige Stabilisierung von Pten (Details siehe 3.1 und 4.1) für das Expressionsmuster von Pten verantwortlich. Dies erklärt hingegen nicht die erhöhte Menge des Tumorsuppressors Vhl in den

PCCs. Möglicherweise ist dieses Vhl-Protein nicht mehr funktionell. Aufgrund Zeitmangels konnte im Rahmen dieser Arbeit die Expression oder Aktivität der Vhl- bzw. Pten-regulierten Signalmoleküle nicht mehr untersucht werden. Diese Analyse wäre jedoch nötig, um Rückschlüsse einerseits auf die Funktionalität der Vhl- und Pten-Moleküle und andererseits auf den zugrunde liegenden Mechanismus zur PCC-Entstehung zu ziehen.

Obwohl kein eindeutiger Einfluss des Genotyps auf die phänotypische Expression ermittelt werden konnte, waren die Nebennieren der Mäuse der Genotypen $PT^{ko/wt}$, $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ oftmals stark vergrößert und wiesen eine für PCCs charakteristische Morphologie auf (Abb. 3.45). So waren diese Nebennieren von einer dicken Tumorkapsel umgeben und zeigten v.a. bei $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ -Mäusen häufig stärker vaskularisierte Regionen, was besonders die VHL-assoziierten PCCs kennzeichnet (Komminoth *et al.*, 2009). Des Weiteren ließ das Gewebe keine Ähnlichkeit mehr mit gesunden Nebennieren zu, die Aufteilung in Rinde und Mark war nicht mehr zu erkennen. Die typische Morphologie der PCCs konnte v.a. in den Nebennieren der *compound* $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ - und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Tiere nachgewiesen werden, deren gesamtes Volumen aus chromaffinen Zellen bestand (Koch *et al.*, 2002). Demnach scheint das zusätzlich zur Pten-Heterozygotie mutierte Vhl tatsächlich die Progression des Tumors zu induzieren oder zumindest zu beschleunigen. Ein weiteres Kennzeichen von PCCs ist die Fehlregulation diverser sekretorischer Moleküle, welche charakteristisch für die mit den PCCs assoziierten Syndrome ist (Eisenhofer *et al.*, 2008; Brouwers *et al.*, 2007). Um weiter eingrenzen zu können, dass es sich bei den Nebennieren-Tumoren tatsächlich um PCCs handelt, wurde daher anschließend die Expression des Vasodilators Adrenomedullin (Adm) untersucht. Adm besitzt eine angiogene und Tumor-fördernde Aktivität und wird HIF-abhängig in VHL-assoziierten PCCs heraufreguliert (Dai *et al.*, 2010; Garayoa *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2006). Tatsächlich konnte in allen vergrößerten und tumorösen Nebennieren eine Überexpression von Adm festgestellt werden, welche jedoch nicht proportional zur Größe der Nebenniere zunahm (Abb. 3.48). Neben den Tumoren der $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ - und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ -Tiere bildeten auch die vergrößerten Nebennieren der $PT^{ko/wt}$ -Mäuse vermehrt Adm, obwohl hier keine Fehlregulation von Vhl stattfand. Allerdings ist auch für PTEN bereits bekannt, dass es die Adm-Expression inhibiert (Betchen *et al.*, 2006), so dass hier scheinbar bereits die Haploinsuffizienz von Pten für die gesteigerte Adm-Bildung genügt. Des Weiteren konnte mittlerweile in immunhistochemischen Untersuchungen auch eine verminderte Pnmt (*Phenylethanolamine N-methyltransferase*)-Expression in den stark vergrößerten Nebennieren der Mäuse mit den Genotypen $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Herabregulation der PNMT ist ein Kennzeichen von VHL-assoziierten PCCs und bewirkt, dass die Tumore im Gegensatz zu gesunden Nebennieren kein Adrenalin mehr bilden können (Eisenhofer *et al.*, 2004; Komminoth *et al.*, 2009). Demnach stellen die Nebennieren-Tumore der hier untersuchten Mäuse der Genotypen $PT^{ko/wt}$, $PT^{ko/wt}V2B^{ki/wt}$ und $PT^{ko/wt}V2C^{ki/wt}$ eindeutig PCCs mit unterschiedlichem Tumorgrad dar, so dass die hier verwendeten Mausmodelle weiterhin zur Analyse des zugrunde liegenden Entstehungs-Mechanismus verwendet werden können.

Mechanismus der PCC-Entstehung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits eine Pten-Defizienz die Ausbildung von PCCs induzieren kann. Dies ist zunächst überraschend, da PCCs nicht zum Krankheitsbild von PTEN-assoziierten Syndromen gezählt werden. Demnach entstehen sie scheinbar selten oder erst so spät, dass sie weniger Relevanz als andere Tumore für die Prognose und die Befindlichkeit des Patienten zu

haben scheinen. Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass die Pten-vermittelte PCC-Bildung nur auf murine Nebennieren beschränkt ist. Auch Korpershoek *et al.* konnten bereits nachweisen, dass der Pten-Verlust im Mausmodell zur Entstehung von PCCs führt (Korpershoek *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurde hingegen erstmals gezeigt, dass bereits die Haploinsuffizienz von Pten genügt, um die Tumorgenese in den Nebennieren zu induzieren. Demnach ist ein spontaner Defekt eines PTEN-Allels ausreichend, um die PCC-Entwicklung auszulösen, was auch erklärt, warum die PTEN-Defizienz meist in sporadischen PCCs nachgewiesen werden kann (van Nederveen *et al.*, 2006). Der genaue Mechanismus, welcher zur PTEN-vermittelten Tumorgenese in der Nebenniere führt, ist derzeit noch unbekannt. PCCs entstehen aus neuronalen Vorläuferzellen, die normalerweise im Verlauf der Embryonalentwicklung der Nebenniere aufgrund der Abnahme des NGF (*Nerve growth factor*) apoptotisch werden. Wird diese Regulation jedoch gestört, bleiben die Zellen erhalten und bilden den Ursprung der PCCs (Komminoth *et al.*, 2009; Kaelin, 2008). NGF ist ein Wachstumsfaktor, der die Differenzierung von Neuronen fördert, indem er die Überlebensfähigkeit der Zellen erhöht und die Ausbildung und Verzweigung der Neuriten reguliert (Fiore *et al.*, 2009; Madduri *et al.*, 2009). Indem NGF mit seinem Rezeptor TRK interagiert bewirkt es die Bindung von SHC und PI3K, was die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege zur Folge hat (Obermeier *et al.*, 1993). Die MAPK/ERK- und PI3K-Signalwege steigern daraufhin die Überlebensfähigkeit der Zelle, indem sie Apoptose-Mechanismen hemmen und das Wachstum verstärken (Song *et al.*, 2012). Zusätzlich inhibiert NGF über die Bindung von NTK CK2-abhängig den Tumorsuppressor PTEN, was die Aktivierung der Signalwege weiter intensiviert (Arevalo und Rodriguez-Tebar, 2006). Der Verlust von PTEN bewirkt wahrscheinlich selbst nach der Reduktion von NGF eine dauerhafte Induktion des MAPK/ERK- und des PI3K-Weges in den neuronalen Vorläuferzellen, die möglicherweise dadurch den Zelltod umgehen und sich zu PCCs weiterentwickeln können (Abb. 4.5). Weitere PTEN-regulierte Mechanismen, wie die Destabilisierung von p53 (Freeman *et al.*, 2003), verstärken gegebenenfalls diesen Effekt. Wie bereits vielfach beschrieben, ist auch das VHL-Syndrom des VHL Typs II mit der Entstehung von PCCs assoziiert (Neumann und Wiestler, 1991). Hier konnte bestätigt werden, dass eine Mutation in nur einem Vhl-Allel nicht genügt, um die Tumorgenese in der Nebenniere zu induzieren. Allerdings verstärkt die heterozygote Vhl-Punktmutation die Pten-induzierte PCC-Entwicklung. Dies zeigt, dass in VHL-Patienten nicht zwingend eine spontane Mutation des zweiten VHL-Allels nötig ist, sondern auch eine zusätzliche, heterozygote Mutation bzw. Fehlregulation eines anderen Gens wie PTEN zur Ausbildung von PCCs führen kann. Der Mechanismus, welcher VHL-abhängig zur PCC-Entstehung führt, wurde bereits eingehend von der Arbeitsgruppe von W.G. Kaelin Jr. untersucht. So konnten Lee *et al.* zeigen, dass der VHL-Verlust ebenso wie PTEN das Überleben der neuronalen Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung fördert. Die zunehmende Reduktion von NGF führt normalerweise zur Stabilisierung von c-JUN, welches PHD3-abhängig die Apoptose der Zellen einleitet. VHL aktiviert ebenfalls, aPKC- und JunB-abhängig, c-JUN und verstärkt so den Apoptose-Mechanismus. HIF induziert hingegen die Expression von JunB, welches c-JUN inhibiert, und so dem Zelltod entgegen wirkt (Abb. 4.5; Lee *et al.*, 2005; Kaelin, 2008; Maxwell, 2005). Der Erhalt der VHL-induzierten HIF α -Degradation ist somit entscheidend für die Aufrechterhaltung der VHL-vermittelten Apoptose der neuronalen Vorläuferzellen. Dies erklärt auch die Tatsache, dass lediglich VHL-Patienten des Typs II, bei denen die HIF-Regulation zumindest teilweise bewahrt wird, PCCs entwickeln (Neumann und Wiestler, 1991). Der Verlust von VHL führt demnach sowohl HIF- als auch Jun-B-abhängig zur Inhibierung von c-JUN, was das Überleben der embryonalen Zellen bewirkt,

welche weiterhin proliferieren und so PCCs bilden können. Auch NF1, RET und die Untereinheiten der SDH, deren Gene oftmals in PCCs mutiert vorliegen, greifen regulierend in diesen Apoptose-Mechanismus der neuronalen Vorläuferzellen ein (Lee *et al.*, 2005). Neben der Inhibierung des Zelltods, verstärkt der Verlust von VHL vermutlich auch durch die Fehlregulation weiterer Signalmoleküle die Progression der PCCs. So bewirkt u.a. der VHL-assoziierte Defekt in der Fibronectin-Zusammenlagerung die PCC-typische Akkumulation des extrazellulären Stomas (Eisenhofer *et al.*, 2004; Komminoth *et al.*, 2009). Nach den derzeitigen Erkenntnissen aktivieren PTEN und VHL den Zelltod der neuronalen Vorläuferzellen nach dem Rückgang von NGF. Allerdings geschieht dies voraussichtlich über verschiedene Mechanismen, so dass im Gegensatz zur ccRCC-Entstehung nicht der Verlust beider Tumorsuppressoren nötig ist, um die Tumorgenese in der Nebenniere einzuleiten. Wie hier jedoch gezeigt werden konnte, induziert die Defizienz von Vhl und Pten eine synergistische Wirkung auf das Überleben der Zellen, so dass die Progression der PCCs beschleunigt wird.

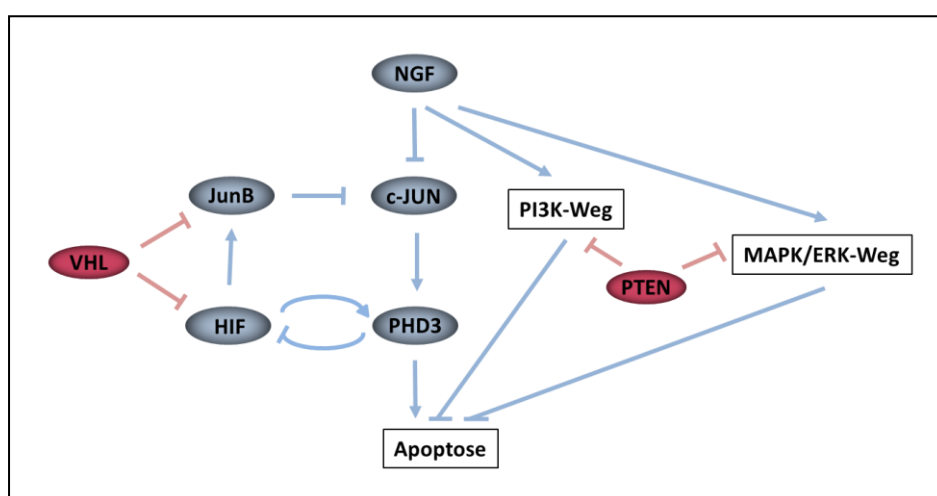


Abb. 4.5 Modell der Induktion von Phäochromozytomen. Der Wachstumsfaktor NGF verhindert in der Embryonalentwicklung durch die Regulation verschiedener Signalwege die Einleitung des Zelltods von neuronalen Vorläuferzellen in der Nebenniere. Nach der Reduktion von NGF induzieren VHL und PTEN durch die Inaktivierung dieser Signalwege die Apoptose der Zellen. Der Verlust von VHL und/oder PTEN führt zur Inaktivierung der Apoptose-Mechanismen und somit zur weiteren Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen und zur Induktion von PCCs.

Patienten mit VHL-Syndrom entwickeln Tumore in verschiedenen Organen mit einer unterschiedlich hohen Wahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Art der Mutation bzw. Fehlregulation von *VHL*. Erstaunlicherweise scheint dabei in jedem Gewebe der Verlust einer anderen *VHL*-Funktion für die Induktion der Tumorgenese essentiell zu sein. So bewirkt die Destabilisierung der Mikrotubuli in Abhängigkeit einer $GSK3\beta$ -Defizienz, welche u.a. durch einen *PTEN*-Verlust induziert werden kann, die Ausbildung von Nierenzysten. Für die Entstehung von ccRCCs scheint v.a. die Stabilisierung von $HIF\alpha$ entscheidend zu sein. Dabei ist eine synergistische Wirkung der verminderten Degradation des $HIF\alpha$ -Proteins, die auf den Funktionsverlust von *VHL* zurückgeführt werden kann, und die verstärkte Bildung von $HIF\alpha$ durch eine erhöhte Translationsrate, die durch die gesteigerte Aktivierung des *PI3K*-Signalweges aufgrund einer *PTEN*-Defizienz induziert werden kann, nötig. Für die Entwicklung von PCCs ist hingegen eine Fehlregulation von *c-JUN* verantwortlich, das bei *VHL*-Verlust *JunB*-abhängig inhibiert wird, wodurch die neuronalen Zellen in den Nebennieren erhalten bleiben und PCC induzieren. Über andere, *VHL*-unabhängige Signalwege

kann hier auch eine PTEN-Defizienz die Entstehung von PCCs auslösen. Diese Erkenntnisse zeigen, dass VHL und PTEN tatsächlich in einigen Geweben in der Tumorsuppression zusammenwirken, indem sie teilweise dieselben Signalmoleküle inhibieren oder aber auf unterschiedlichem Weg den gleichen Einfluss auf die Zelle erzielen.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine eingehende Analyse der beiden Tumorsuppressoren VHL und PTEN vorgenommen, bei der sowohl Regulationsmechanismen als auch ihre Interaktion in der Beeinflussung des Zellverhaltens und der Tumorsuppression untersucht wurden. Dabei wurde zunächst eine VHL-vermittelte Stabilisierung des PTEN-Proteins in embryonalen und kanzerogenen Zellsystemen der Niere nachgewiesen. Um die Allgemeingültigkeit dieser Regulation zu prüfen, wäre die Analyse des Einflusses von VHL auf die PTEN-Konzentration in weiteren Zellsystemen unterschiedlicher Gewebe mit verschiedenen Differenzierungsgraden zu empfehlen. Des Weiteren wäre es sinnvoll, die Untersuchung der von PTEN regulierten Signalwege in den Karzinom-Zelllinien 786-O und KTCTL-26A nachzuholen, um Rückschlüsse auf die Funktionalität des durch VHL stabilisierten PTEN ziehen zu können. Auch in einer Auswahl von primären ccRCC-Geweben im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe wurde die PTEN-Konzentration ermittelt. Zwar ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ein Funktionsverlust von VHL in den Zellen der ccRCCs stattgefunden hat, um die Ergebnisse jedoch ins richtige Verhältnis setzen zu können, wäre es nötig, noch zusätzlich den VHL-Status der Proben zu prüfen. Aufgrund des wenigen, verfügbaren Gewebematerials könnten auf den bereits angefertigten Paraffinschnitten VHL-regulierte Signalmoleküle mittels immunhistochemischer Färbemethoden sichtbar gemacht werden, welche die Beurteilung der Funktionalität von VHL zulassen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expressionsrate von PTEN unter Hypoxie verändert wird. Ob bei einer Sauerstoff-Absenkung tatsächlich wie vermutet die VHL-regulierten HIF-Transkriptionsfaktoren die Transkription von *PTEN* variieren, bleibt jedoch noch abzuschließen. Hier könnte beispielweise eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) durchgeführt werden, bei der die potentielle Bindung von HIF an die im *PTEN*-Promotor befindlichen *HREs* untersucht werden können. Des Weiteren sollte auch die erstmals nachgewiesene Interaktion von VHL und NEDD4-1 noch detaillierter charakterisiert werden. So steht der eindeutige Nachweis noch aus, ob VHL und NEDD4-1 eine direkte Bindung eingehen oder VHL möglicherweise über Cofaktoren mit NEDD4-1 interagiert. Mithilfe eines *Gluthation-S-Transferase* (GST) *pull-down*-Experimentes könnten hier neue Erkenntnisse gewonnen werden. Besonders interessant wäre es, den Einfluss dieser VHL-NEDD4-1-Bindung auf das von NEDD4-1 inhibierte PTEN zu prüfen, um abzuschließen, ob die VHL-vermittelte PTEN-Stabilisierung NEDD4-1-abhängig stattfindet. Dafür könnte u.a. die Änderung der Proteinmenge von PTEN bei unterschiedlichen Dosierungen einer Überexpression von VHL und NEDD4-1 in HEK293T-Zellen überprüft werden. Auch die Auswirkungen der Interaktion von VHL und NEDD4-1 auf weitere Zielmoleküle von NEDD4-1 wäre interessant, in verschiedenen Zellsystemen genauer zu untersuchen. Ergänzend konnte nachgewiesen werden, dass sowohl VHL als auch PTEN einen ähnlichen Einfluss auf das Zellverhalten ausüben. Aufgrund der Versuchsanordnung konnte nur spekuliert werden, ob die VHL-induzierten Effekte teilweise auch durch das VHL stabilisierte PTEN vermittelt wurden. Um hier eine deutlichere Aussage machen zu können, könnten die Auswirkungen einer VHL-Überexpression in

einem PTEN-defizienten Zellsystem untersucht werden, welches teilweise zusätzlich mit einer Expression einer gegen *PTEN* gerichteten siRNA ausgestattet wurde.

Mit Hilfe der verschiedenen Mausmodelle konnte der Einfluss einer *Pten*-Defizienz und unterschiedlicher *Vhl*-Mutationen im Einzelnen sowie in Kombination auf die Tumorentstehung von Nierenzysten, ccRCCs und PCCs gezeigt werden. Um die Erkenntnisse über die *Vhl*- und *Pten*-induzierte Tumorgenese zu vervollständigen, wäre es sinnvoll, noch weitere Mäuse mit den Genotypen $PT^{ko/wt}V1KO^{ko/wt}$ und $V1KO^{ko/wt}$ zu analysieren. Zwar beschrieben Frew *et al.* bereits die Auswirkungen eines homozygoten Funktionsverlustes von *Vhl* und *Pten* auf die Nierenentwicklung (Frew *et al.*, 2008), ob jedoch auch bereits der Verlust eines Allels der beiden Gene zu tumorösen Veränderungen in der Niere und der Nebenniere führt, ist derzeit noch unbekannt und könnte hier noch ergänzend ermittelt werden. Des Weiteren müssten noch weitere Nieren bereits präparierter Mäuse aller Genotypen auf zystische und klarzellige Regionen untersucht werden, um eine eindeutige Aussage über den Einfluss der Haploinsuffizienz von *Pten* und der VHL Typ 1 und 2-Mutationen auf die Tumorgenese in diesem Gewebe treffen zu können. Um die Tumore der Nebennieren eindeutig zu charakterisieren, ist es nötig, von *Vhl* und *Pten* regulierte Signalmoleküle und -wege zu analysieren. Dafür eignen sich besonders die Methoden des *Western Blots*, der Immunhistochemie und der umfassenden Expressionsanalyse (*expression profiling*). Mithilfe dieser Untersuchungen kann die Funktionalität der herabregulierten *Pten*- und *Vhl*-Moleküle und der V2B- und V2C-Mutanten geprüft und somit Rückschlüsse auf die Genotyp-Phänotyp-Korrelation gezogen werden. Außerdem können anhand der Analyse typischer, in PCCs fehlregulierter Signalmoleküle schließlich auch Erkenntnisse über den der Tumorgenese zugrunde liegenden Mechanismus gewonnen werden. Um das *Two-hit*-Modell für VHL in der Entstehung von ccRCCs und PCCs zu überprüfen, könnten mit den zur Verfügung stehenden Mauslinien zwei zusätzliche Tiermodelle generiert werden, die ubiquitär einen kombinierten, heterozygoten *Vhl*-Verlust und eine VHL-Typ 2-Mutation (V2B oder V2C) tragen. Hier müsste jedoch zunächst die Überlebensfähigkeit der Tiere analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Das VHL-Syndrom umfasst Erkrankungen, die mit einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust von VHL einhergehen. VHL ist ein Tumorsuppressor, der die Eigenschaften der Zelle vielfältig beeinflusst, indem er u.a. die Stabilität der HIF-Transkriptionsfaktoren, die Aktivierung von c-JUN, die Bildung von Cilien und die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix reguliert. VHL-Patienten tragen eine Keimbahn-Mutation im *VHL*-Gen, jedoch erst der spontane Verlust des zweiten *VHL*-Allels führt zur Ausbildung zystischer und tumoröser Veränderungen im betroffenen Gewebe. Das Tumorspektrum umfasst retinale und zerebrale Hämangioblastome, Nierenzysten und klarzellige Nierenkarzinome, Zysten und Tumore des Pankreas, Phäochromozytome, Adenome der Hoden und Tumore des Mittelohrs. Obwohl aufgrund klinischer Studien bereits vielfach bekannt ist, welche VHL-Mutation mit welchen Neoplasien assoziiert werden können, konnte bisher kein VHL-Mausmodell das Krankheitsbild des VHL-Syndroms widerspiegeln. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine zusätzliche Fehlregulation weiterer Gene nötig ist, um die Tumorgenese in den verschiedenen Geweben zu induzieren. PTEN ist nach p53 der am häufigsten in Karzinomen fehlregulierte Tumorsuppressor. Tatsächlich konnte auch in mehreren klarzelligen Nierenkarzinomen bereits eine PTEN-Defizienz nachgewiesen werden. Der Verlust von PTEN wird außerdem auch mit der Tumorgenese von Phäochromozytomen assoziiert. Möglicherweise wirken VHL und PTEN also in der Tumorsuppression in der Niere und der Nebenniere zusammen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zunächst mögliche Interaktionen der beiden Tumorsuppressoren VHL und PTEN aufzuklären und zu analysieren, und schließlich ihren Einfluss auf das Zellverhalten zu prüfen. Außerdem wurden mehrere *in vivo*-Mausmodelle mit einer *Pten*-Haploinsuffizienz und verschiedenen *Vhl*-Mutationen generiert, um die Auswirkungen einer kombinierten *Vhl*- und *Pten*-Defizienz auf die Entstehung von Nierenzysten, klarzelligen Nierenkarzinomen und Phäochromozytomen zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine VHL-vermittelte Stabilisierung der PTEN-Konzentration sowohl in embryonalen als auch in Tumor-Zellen der Niere nachgewiesen werden. Die Analyse des Regulationsmechanismus ergab erstens eine Hypoxie-abhängige Abnahme der Transkription von *PTEN*, welche antiproportional zur Stabilisierung der VHL-regulierten HIF-Transkriptionsfaktoren verlief. Des Weiteren konnte eine Interaktion von VHL und NEDD4-1, welches als E3-Ligase von PTEN dessen Degradation und Kerntransport reguliert, ermittelt werden. Detaillierte Untersuchungen dieser Interaktion zeigten, dass NEDD4-1 von der Substrat-Bindedomäne des VHL-Moleküls gebunden und so wahrscheinlich auch VHL-abhängig die Ubiquitylierung von NEDD4-1 vermittelt wird, welche das Molekül stabilisiert und vermutlich auch inaktiviert.

In Nierenkarzinom-Zellen wurde eine VHL- bzw. PTEN-Restitution induziert, um die Auswirkungen der beiden Tumorsuppressoren auf die Zell-Eigenschaften zu untersuchen. Sowohl VHL als auch PTEN hatten dieselben Effekte lediglich in unterschiedlicher Intensität auf das Verhalten der Zellen. So konnte VHL- und PTEN-abhängig eine Verstärkung der Adhäsion, eine Inhibierung der Migration und eine Verminderung der Überlebensfähigkeit nachgewiesen werden. Die Summe dieser Auswirkungen verringerte außerdem die Metastasierungsfähigkeit von VHL- bzw. PTEN-überexprimierenden Tumorzellen in immunsupprimierten Mäusen.

Des Weiteren wurden Mausmodelle mit einem ubiquitären, heterozygoten *Pten*-Verlust generiert, die teilweise eine zusätzliche Haploinsuffizienz von *Vhl* bzw. eine heterozygote VHL Typ 2-Mutation

(V2B oder V2C) trugen. Sporadisch entwickelten diese Mäuse Vhl-abhängig Lebertumore und Pten – abhängig Lymphome und Ovarialkarzinome. Einige Mäuse mit einer kombinierten Vhl- und Pten-Defizienz bildeten zusätzlich Nierenzysten aus, die teilweise das gesamte Volumen der Niere einnahmen. Besonders häufig entstanden in $PT^{ko/wt}$ -Mäusen Nebennieren-Tumore, die durch eine zusätzliche V2B- oder V2C-Mutation in gleichaltrigen Mäusen deutlich weiterentwickelt waren und eine für Phäochromozytome typische Morphologie aufwiesen. Hier konnte also gezeigt werden, dass erst der gemeinsame Verlust von Vhl und Pten zur Ausbildung von Nierenzysten und Phäochromozytomen führt, welche dem Krankheitsbild des VHL-Syndroms zugeordnet werden.

Die Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit zeigen erstmalig die Interaktion und Kooperation von VHL und PTEN in der Tumorsuppression. Die Resultate bieten außerdem die Grundlage für weitere Analysen der Auswirkung der VHL-vermittelten PTEN-Stabilisierung und für detailliertere Untersuchungen der durch die kombinierte Vhl- und Pten-Defizienz induzierten Neoplasien der Niere und der Nebennieren-Tumore in *in vivo*-Mausmodellen.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, J.M. und Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324–1337.
- Adryan, B., Decker, H.J., Papas, T.S. und Hsu, T. (2000). Tracheal development and the von Hippel-Lindau tumor suppressor homolog in *Drosophila*. *Oncogene* 19, 2803–2811.
- Ahn, Y., Hwang, C.Y., Lee, S.-R., Kwon, K.-S. und Lee, C. (2008). The tumour suppressor PTEN mediates a negative regulation of the E3 ubiquitin-protein ligase Nedd4. *Biochem. J.* 412, 331–338.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. und Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.* 7, 261–269.
- Algaba, F., Akaza, H., López-Beltrán, A., Martignoni, G., Moch, H., Montironi, R. und Reuter, V. (2011). Current pathology keys of renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* 60, 634–643.
- Alimonti, A., Carracedo, A., CLOHessy, J.G., Trotman, L.C., Nardella, C., Egia, A., Salmena, L., Sampieri, K., Haveman, W.J., Brogi, E., et al. (2010b). Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat. Genet.* 42, 454–458.
- Al-Khouri, A.M., Ma, Y., Togo, S.H., Williams, S. und Mustelin, T. (2005). Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J. Biol. Chem.* 280, 35195–35202.
- Alvarez-Núñez, F., Bussaglia, E., Mauricio, D., Ybarra, J., Vilar, M., Lerma, E., de Leiva, A. und Matias-Guiu, X. (2006a). PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid* 16, 17–23.
- Amodio, N., Scrima, M., Palaia, L., Salman, A.N., Quintiero, A., Franco, R., Botti, G., Pirozzi, P., Rocco, G., De Rosa, N., et al. (2010). Oncogenic role of the E3 ubiquitin ligase NEDD4-1, a PTEN negative regulator, in non-small-cell lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* 177, 2622–2634.
- Ampofo, E., Kietzmann, T., Zimmer, A., Jakupovic, M., Montenarh, M. und Götz, C. (2010). Phosphorylation of the von Hippel-Lindau protein (VHL) by protein kinase CK2 reduces its protein stability and affects p53 and HIF-1alpha mediated transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1729–1735.
- Anan, T., Nagata, Y., Koga, H., Honda, Y., Yabuki, N., Miyamoto, C., Kuwano, A., Matsuda, I., Endo, F., Saya, H., et al. (1998). Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells* 3, 751–763.
- Anindya, R., Aygün, O. und Svejstrup, J.Q. (2007). Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Mol. Cell* 28, 386–397.
- Arai, E. und Kanai, Y. (2010b). Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 4, 58–73.
- Arevalo, M.-A. und Rodríguez-Tébar, A. (2006). Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3beta and stimulate axonal growth. *Mol. Biol. Cell* 17, 3369–3377.
- Arquier, N., Vigne, P., Duplan, E., Hsu, T., Therond, P.P., Frelin, C. und D'Angelo, G. (2006). Analysis of the hypoxia-sensing pathway in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 393, 471–480.

- Azim, H., Azim, H.A., Jr und Escudier, B. (2010). Targeting mTOR in cancer: renal cell is just a beginning. *Target Oncol* 5, 269–280.
- Backman, S.A., Stambolic, V., Suzuki, A., Haight, J., Elia, A., Pretorius, J., Tsao, M.S., Shannon, P., Bolon, B., Ivy, G.O., et al. (2001). Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat. Genet.* 29, 396–403.
- Bauer, A.L., Paulding, W.R., Striet, J.B., Schnell, P.O. und Czyzyk-Krzeska, M.F. (2002). Endogenous von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates catecholaminergic phenotype in PC12 cells. *Cancer Res.* 62, 1682–1687.
- Beck, V., Herold, H., Bengel, A., Lubert, B., Hutzler, P., Tschesche, H., Kessler, H., Schmitt, M., Geppert, H.-G. und Reuning, U. (2005). ADAM15 decreases integrin α v β 3/vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 590–603.
- Bellacosa, A., Godwin, A.K., Peri, S., Devarajan, K., Caretti, E., Vanderveer, L., Bove, B., Slater, C., Zhou, Y., Daly, M., et al. (2010). Altered gene expression in morphologically normal epithelial cells from heterozygous carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Cancer Prev Res (Phila)* 3, 48–61.
- Berger, A.H., Knudson, A.G. und Pandolfi, P.P. (2011). A continuum model for tumour suppression. *Nature* 476, 163–169.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D. und Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J.* 22, 4082–4090.
- Berx, G. und van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003129.
- Betchen, S.A., Musatov, S., Roberts, J., Pena, J. und Kaplitt, M.G. (2006). PTEN inhibits adrenomedullin expression and function in brain tumor cells. *J. Neurooncol.* 79, 117–123.
- Biju, M.P., Neumann, A.K., Bensinger, S.J., Johnson, R.S., Turka, L.A. und Haase, V.H. (2004). Vhlh gene deletion induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9038–9047.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Bishop, T., Lau, K.W., Epstein, A.C.R., Kim, S.K., Jiang, M., O'Rourke, D., Pugh, C.W., Gleadle, J.M., Taylor, M.S., Hodgkin, J., et al. (2004). Genetic analysis of pathways regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 2, e289.
- Blumenthal, G.M. und Dennis, P.A. (2008). PTEN hamartoma tumor syndromes. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 1289–1300.
- Bluyssen, H.A.R., Lolkema, M.P.J.K., van Beest, M., Boone, M., Snijckers, C.M.J.T., Los, M., Gebbink, M.F.B.G., Braam, B., Holstege, F.C.P., Giles, R.H., et al. (2004). Fibronectin is a hypoxia-independent target of the tumor suppressor VHL. *FEBS Lett.* 556, 137–142.
- Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M.F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G.J. und Nabel, E.G. (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J.* 21, 3390–3401.
- Bonicalzi, M.E., Groulx, I., de Paulsen N und Lee, S. (2001). Role of exon 2-encoded beta -domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 276, 1407–1416.

- Bracken, C.P., Fedele, A.O., Linke, S., Balrak, W., Lisy, K., Whitelaw, M.L. und Peet, D.J. (2006). Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J. Biol. Chem.* *281*, 22575–22585.
- Brader, S. und Eccles, S.A. (2004). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis. *Tumori* *90*, 2–8.
- Bradley, J.F., Lin, E.C. und Rothberg, P.G. (2000). Gene symbol: VHL. Disease: pancreatic cancer. *Hum. Genet.* *106*, 671.
- Brauch, H., Kishida, T., Glavac, D., Chen, F., Pausch, F., Höfler, H., Latif, F., Lerman, M.I., Zbar, B. und Neumann, H.P. (1995). Von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum. Genet.* *95*, 551–556.
- Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C. und Warren, S.L. (1996). UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 11586–11590.
- Brenner, W., Färber, G., Herget, T., Lehr, H.-A., Hengstler, J.G. und Thüroff, J.W. (2002). Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int. J. Cancer* *99*, 53–57.
- Brouwers, F.M., Gläsker, S., Nave, A.F., Vortmeyer, A.O., Lubensky, I., Huang, S., Abu-Asab, M.S., Eisenhofer, G., Weil, R.J., Park, D.M., et al. (2007). Proteomic profiling of von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 pheochromocytomas reveals different expression of chromogranin B. *Endocr. Relat. Cancer* *14*, 463–471.
- Brkamp, K., Jim, B., Moeller, M.J. und Haase, V.H. (2007a). Hypoxia and podocyte-specific Vhlh deletion confer risk of glomerular disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *293*, F1397–1407.
- Burnier, J.V., Wang, N., Michel, R.P., Hassanain, M., Li, S., Lu, Y., Metrakos, P., Anteck, E., Burnier, M.N., Ponton, A., et al. (2011). Type IV collagen-initiated signals provide survival and growth cues required for liver metastasis. *Oncogene* *30*, 3766–3783.
- Cai, Q. und Robertson, E.S. (2010). Ubiquitin/SUMO modification regulates VHL protein stability and nucleocytoplasmic localization. *PLoS ONE* *5*,.
- Cai, Q., Verma, S.C., Kumar, P., Ma, M. und Robertson, E.S. (2010). Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. *PLoS ONE* *5*, e9720.
- Cantley, L.C. und Neel, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 4240–4245.
- Cao, X.R., Lill, N.L., Boase, N., Shi, P.P., Croucher, D.R., Shan, H., Qu, J., Sweezer, E.M., Place, T., Kirby, P.A., et al. (2008). Nedd4 controls animal growth by regulating IGF-1 signaling. *Sci Signal* *1*, ra5.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. und Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* *282*, 1318–1321.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* *69 Suppl 3*, 4–10.
- Caro, J. (2001). Hypoxia regulation of gene transcription. *High Alt. Med. Biol.* *2*, 145–154.
- Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C. und White, R.L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* *305*, 779–784.

- Chagpar, R.B., Links, P.H., Pastor, M.C., Furber, L.A., Hawrysh, A.D., Chamberlain, M.D. und Anderson, D.H. (2010). Direct positive regulation of PTEN by the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 5471–5476.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. und MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 563–572.
- Chaudhary, J. und Skinner, M.K. (1999). Basic Helix-Loop-Helix Proteins Can Act at the E-Box Within the Serum Response Element of the C-Fos Promoter to Influence Hormone-Induced Promoter Activation in Sertoli Cells. *Molecular Endocrinology* *13*, 774–786.
- Chen, F., Kishida, T., Duh, F.M., Renbaum, P., Orcutt, M.L., Schmidt, L. und Zbar, B. (1995). Suppression of growth of renal carcinoma cells by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res.* *55*, 4804–4807.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* *436*, 725–730.
- Cheng, L., Zhang, S., MacLennan, G.T., Lopez-Beltran, A. und Montironi, R. (2009). Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum. Pathol.* *40*, 10–29.
- Chou, M.T.-H., Anthony, J., Bjorge, J.D. und Fujita, D.J. (2010). The von Hippel–Lindau Tumor Suppressor Protein Is Destabilized by Src. *Genes Cancer* *1*, 225–238.
- Chung, M.J., Jung, S.H., Lee, B.J., Kang, M.J. und Lee, D.G. (2004). Inactivation of the PTEN gene protein product is associated with the invasiveness and metastasis, but not angiogenesis, of breast cancer. *Pathol. Int.* *54*, 10–15.
- Ciuffreda, L., Di Sanza, C., Cesta Incani, U., Eramo, A., Desideri, M., Biagioni, F., Passeri, D., Falcone, I., Sette, G., Bergamo, P., et al. (2012). The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade controls phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression through multiple mechanisms. *J. Mol. Med.* *90*, 667–679.
- Clarke, M.F. und Fuller, M. (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* *124*, 1111–1115.
- Clifford, S.C., Cockman, M.E., Smallwood, A.C., Mole, D.R., Woodward, E.R., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J. und Maher, E.R. (2001). Contrasting effects on HIF-1alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumorigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1029–1038.
- Cohen, H.T., Zhou, M., Welsh, A.M., Zarghamee, S., Scholz, H., Mukhopadhyay, D., Kishida, T., Zbar, B., Knebelmann, B. und Sukhatme, V.P. (1999). An important von Hippel-Lindau tumor suppressor domain mediates Sp1-binding and self-association. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *266*, 43–50.
- Cooper, C.R., Chay, C.H. und Pienta, K.J. (2002). The Role of $\alpha v \beta 3$ in Prostate Cancer Progression. *Neoplasia* *4*, 191–194.
- Corless, C.L., Kibel, A.S., Iliopoulos, O. und Kaelin, W.G., Jr (1997). Immunostaining of the von Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Hum. Pathol.* *28*, 459–464.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., et al. (2003). HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* *112*, 645–657.
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. und Pandolfi, P.P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet.* *19*, 348–355.

- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. und Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* *378*, 785–789.
- Dahia, P.L., Aguiar, R.C., Alberta, J., Kum, J.B., Caron, S., Sill, H., Marsh, D.J., Ritz, J., Freedman, A., Stiles, C., et al. (1999). PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 185–193.
- Dahia, P.L., Marsh, D.J., Zheng, Z., Zedenius, J., Komminoth, P., Frisk, T., Wallin, G., Parsons, R., Longy, M., Larsson, C., et al. (1997). Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Res.* *57*, 4710–4713.
- Dai, B., Pieper, R.O., Li, D., Wei, P., Liu, M., Woo, S.Y., Aldape, K.D., Sawaya, R., Xie, K. und Huang, S. (2010a). FoxM1B regulates NEDD4-1 expression, leading to cellular transformation and full malignant phenotype in immortalized human astrocytes. *Cancer Res.* *70*, 2951–2961.
- Dai, X., Ma, W., Jha, R.K. und He, X. (2010b). Adrenomedullin and its expression in cancers and bone. A literature review. *Front Biosci (Elite Ed)* *2*, 1073–1080.
- Damania, B. und Alwine, J.C. (1996). TAF-like function of SV40 large T antigen. *Genes Dev.* *10*, 1369–1381.
- Damania, B., Lieberman, P. und Alwine, J.C. (1998a). Simian virus 40 large T antigen stabilizes the TATA-binding protein-TFIIA complex on the TATA element. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 3926–3935.
- Damania, B., Mital, R. und Alwine, J.C. (1998). Simian Virus 40 Large T Antigen Interacts with Human TFIIB-Related Factor and Small Nuclear RNA-Activating Protein Complex for Transcriptional Activation of TATA-Containing Polymerase III Promoters. *Mol Cell Biol* *18*, 1331–1338.
- Dankort, D., Curley, D.P., Carlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E., Jr, You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M. und Bosenberg, M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat. Genet.* *41*, 544–552.
- Dannenbergh, H., De Krijger, R.R., van der Harst, E., Abbou, M., IJendoorn, Y., Komminoth, P. und Dinjens, W.N.M. (2003). Von Hippel-Lindau gene alterations in sporadic benign and malignant pheochromocytomas. *Int. J. Cancer* *105*, 190–195.
- Das, S., Dixon, J.E. und Cho, W. (2003). Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 7491–7496.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. und Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* *91*, 231–241.
- Denu, J.M., Stuckey, J.A., Saper, M.A. und Dixon, J.E. (1996). Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* *87*, 361–364.
- van Diepen, M.T., Parsons, M., Downes, C.P., Leslie, N.R., Hindges, R. und Eickholt, B.J. (2009). Myosin V controls PTEN function and neuronal cell size. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1191–1196.
- Dimmeler, S. und Zeiher, A.M. (1999). Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ.* *6*, 964–968.
- Ding, Q., Xia, W., Liu, J.-C., Yang, J.-Y., Lee, D.-F., Xia, J., Bartholomeusz, G., Li, Y., Pan, Y., Li, Z., et al. (2005). Erk associates with and primes GSK-3 β for its inactivation resulting in upregulation of β -catenin. *Mol. Cell* *19*, 159–170.

- Dollfus, H., Massin, P., Taupin, P., Nemeth, C., Amara, S., Giraud, S., Bérout, C., Dureau, P., Gaudric, A., Landais, P., et al. (2002). Retinal hemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease: a clinical and molecular study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *43*, 3067–3074.
- Dorević, G., Matusan-Ilijas, K., Babarović, E., Hadzisejdić, I., Grahovac, M., Grahovac, B. und Jonjić, N. (2009). Hypoxia inducible factor-1 α correlates with vascular endothelial growth factor A and C indicating worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *28*, 40.
- Drinjakovic, J., Jung, H., Campbell, D.S., Strohlic, L., Dwivedy, A. und Holt, C.E. (2010). E3 ligase Nedd4 promotes axon branching by downregulating PTEN. *Neuron* *65*, 341–357.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. und Calos, M.P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* *7*, 379–387.
- Dunn, J.M., Phillips, R.A., Becker, A.J. und Gallie, B.L. (1988). Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science* *241*, 1797–1800.
- Einhauer, A. und Jungbauer, A. (2001). The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* *49*, 455–465.
- Eisenhofer, G., Goldstein, D.S., Walther, M.M., Friberg, P., Lenders, J.W.M., Keiser, H.R. und Pacak, K. (2003). Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true- from false-positive test results. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 2656–2666.
- Eisenhofer, G., Huynh, T.-T., Elkahloun, A., Morris, J.C., Bratslavsky, G., Linehan, W.M., Zhuang, Z., Balgley, B.M., Lee, C.S., Mannelli, M., et al. (2008). Differential expression of the regulated catecholamine secretory pathway in different hereditary forms of pheochromocytoma. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *295*, E1223–1233.
- Eisenhofer, G., Huynh, T.-T., Pacak, K., Brouwers, F.M., Walther, M.M., Linehan, W.M., Munson, P.J., Mannelli, M., Goldstein, D.S. und Elkahloun, A.G. (2004a). Distinct gene expression profiles in norepinephrine- and epinephrine-producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia-driven angiogenic pathways in von Hippel-Lindau syndrome. *Endocr. Relat. Cancer* *11*, 897–911.
- Eisenhofer, G., Lenders, J.W. und Pacak, K. (2004b). Biochemical diagnosis of pheochromocytoma. *Front Horm Res* *31*, 76–106.
- Eng, C. (2000). Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J. Med. Genet.* *37*, 828–830.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., et al. (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* *107*, 43–54.
- Escrivà, M., Peiró, S., Herranz, N., Villagrasa, P., Dave, N., Montserrat-Sentís, B., Murray, S.A., Francí, C., Gridley, T., Virtanen, I., et al. (2008). Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 1528–1540.
- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W.M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A.A., et al. (2007a). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *356*, 125–134.
- Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczylik, C., Chevreau, C., Filipek, M., Melichar, B., Bajetta, E., et al. (2007b). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* *370*, 2103–2111.

- Esteban, M.A., Harten, S.K., Tran, M.G. und Maxwell, P.H. (2006). Formation of primary cilia in the renal epithelium is regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 1801–1806.
- Esteban-Barragán, M.A., Avila, P., Alvarez-Tejado, M., Gutiérrez, M.D., García-Pardo, A., Sánchez-Madrid, F. und Landázuri, M.O. (2002). Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in the formation of beta1-integrin fibrillar adhesions. *Cancer Res.* *62*, 2929–2936.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. und Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* *69*, 119–128.
- Fassnacht, M., Weismann, D., Ebert, S., Adam, P., Zink, M., Beuschlein, F., Hahner, S. und Allolio, B. (2005). AKT is highly phosphorylated in pheochromocytomas but not in benign adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 4366–4370.
- Faucherre, A., Taylor, G.S., Overvoorde, J., Dixon, J.E. und Hertog, J. den (2008). Zebrafish pten genes have overlapping and non-redundant functions in tumorigenesis and embryonic development. *Oncogene* *27*, 1079–1086.
- Feldman, D.E., Thulasiraman, V., Ferreyra, R.G. und Frydman, J. (1999). Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. *Mol. Cell* *4*, 1051–1061.
- Fine, B., Hodakoski, C., Koujak, S., Su, T., Saal, L.H., Maurer, M., Hopkins, B., Keniry, M., Sulis, M.L., Mense, S., et al. (2009). Activation of the PI3K pathway in cancer through inhibition of PTEN by exchange factor P-REX2a. *Science* *325*, 1261–1265.
- Flamme, I., Krieg, M. und Plate, K.H. (1998). Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF-2alpha. *Am. J. Pathol.* *153*, 25–29.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D. und Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4604–4613.
- Fouladkou, F., Landry, T., Kawabe, H., Neeb, A., Lu, C., Brose, N., Stambolic, V. und Rotin, D. (2008). The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 8585–8590.
- Fousteri, M. und Mullenders, L.H.F. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* *18*, 73–84.
- Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.-H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D., et al. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* *3*, 117–130.
- Frew, I.J., Minola, A., Georgiev, S., Hitz, M., Moch, H., Richard, S., Vortmeyer, A.O. und Krek, W. (2008a). Combined VHLH and PTEN mutation causes genital tract cystadenoma and squamous metaplasia. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 4536–4548.
- Frew, I.J., Thoma, C.R., Georgiev, S., Minola, A., Hitz, M., Montani, M., Moch, H. und Krek, W. (2008b). pVHL and PTEN tumour suppressor proteins cooperatively suppress kidney cyst formation. *EMBO J.* *27*, 1747–1757.
- Fu, L., Wang, G., Shevchuk, M.M., Nanus, D.M. und Gudas, L.J. (2011). Generation of a mouse model of Von Hippel-Lindau kidney disease leading to renal cancers by expression of a constitutively active mutant of HIF1 α . *Cancer Res.* *71*, 6848–6856.
- Fukuyama, M., Rougvie, A.E. und Rothman, J.H. (2006). *C. elegans* DAF-18/PTEN mediates nutrient-dependent arrest of cell cycle and growth in the germline. *Curr. Biol.* *16*, 773–779.

- Funamoto, S., Meili, R., Lee, S., Parry, L. und Firtel, R.A. (2002). Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 109, 611–623.
- Gallou, C., Chauveau, D., Richard, S., Joly, D., Giraud, S., Olschwang, S., Martin, N., Saquet, C., Chrétien, Y., Méjean, A., et al. (2004). Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau families with renal lesions. *Hum. Mutat.* 24, 215–224.
- Gao, X., Neufeld, T.P. und Pan, D. (2000). Drosophila PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev. Biol.* 221, 404–418.
- Garayoa, M., Martínez, A., Lee, S., Pfo, R., An, W.G., Neckers, L., Trepel, J., Montuenga, L.M., Ryan, H., Johnson, R., et al. (2000). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Mol. Endocrinol.* 14, 848–862.
- García, J.M., Silva, J., Peña, C., Garcia, V., Rodríguez, R., Cruz, M.A., Cantos, B., Provencio, M., España, P. und Bonilla, F. (2004). Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 41, 117–124.
- Georgescu, M.M., Kirsch, K.H., Akagi, T., Shishido, T. und Hanafusa, H. (1999). The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10182–10187.
- Gil, A., Andrés-Pons, A., Fernández, E., Valiente, M., Torres, J., Cervera, J. und Pulido, R. (2006). Nuclear localization of PTEN by a Ran-dependent mechanism enhances apoptosis: Involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. *Mol. Biol. Cell* 17, 4002–4013.
- Gimm, O., Attié-Bitach, T., Lees, J.A., Vekemans, M. und Eng, C. (2000). Expression of the PTEN tumour suppressor protein during human development. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1633–1639.
- Ginn-Pease, M.E. und Eng, C. (2003). Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res.* 63, 282–286.
- Giuliano, M., D'Anneo, A., De Blasio, A., Vento, R. und Tesoriere, G. (2003). Apoptosis meets proteasome, an invaluable therapeutic target of anticancer drugs. *Ital. J. Biochem.* 52, 112–121.
- Glickman, M.H. und Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A. und Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615–623.
- Gnarra, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F. und Duh, F.M. (1994). Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat. Genet.* 7, 85–90.
- Gnarra, J.R., Ward, J.M., Porter, F.D., Wagner, J.R., Devor, D.E., Grinberg, A., Emmert-Buck, M.R., Westphal, H., Klausner, R.D. und Linehan, W.M. (1997). Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9102–9107.
- Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.-J., Diehl, J.A. und Simon, M.C. (2007). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 11, 335–347.
- Gordan, J.D., Lal, P., Dondeti, V.R., Letrero, R., Parekh, K.N., Oquendo, C.E., Greenberg, R.A., Flaherty, K.T., Rathmell, W.K., Keith, B., et al. (2008). HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell* 14, 435–446.

- Gothié, E., Richard, D.E., Berra, E., Pagès, G. und Pouyssegur, J. (2000). Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* 275, 6922–6927.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–74.
- Greene, L.A. und Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2424–2428.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. und Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463–471.
- Grosfeld, A., Stolze, I.P., Cockman, M.E., Pugh, C.W., Edelman, M., Kessler, B., Bullock, A.N., Ratcliffe, P.J. und Masson, N. (2007). Interaction of hydroxylated collagen IV with the von hippel-lindau tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* 282, 13264–13269.
- Grossmann, J. (2002). Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis--Anoikis.” *Apoptosis* 7, 247–260.
- Groulx, I., Bonicalzi, M.E. und Lee, S. (2000). Ran-mediated nuclear export of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein occurs independently of its assembly with cullin-2. *J. Biol. Chem.* 275, 8991–9000.
- Gruber, M.B., Healey, G.B., Toguri, A.G. und Warren, M.M. (1980). Papillary cystadenoma of epididymis: component of von Hippel-Lindau syndrome. *Urology* 16, 305–306.
- Gu, J., Tamura, M., Pankov, R., Danen, E.H., Takino, T., Matsumoto, K. und Yamada, K.M. (1999). Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J. Cell Biol.* 146, 389–403.
- Guldberg, P., thor Straten, P., Birck, A., Ahrenkiel, V., Kirkin, A.F. und Zeuthen, J. (1997). Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res.* 57, 3660–3663.
- Haase, V.H. (2006a). Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291, F271–281.
- Haase, V.H. (2006b). The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int.* 69, 1302–1307.
- Haase, V.H., Glickman, J.N., Socolovsky, M. und Jaenisch, R. (2001). Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1583–1588.
- Hacker, K.E., Lee, C.M. und Rathmell, W.K. (2008). VHL type 2B mutations retain VBC complex form and function. *PLoS ONE* 3, e3801.
- Hager, M., Haufe, H., Kemmerling, R., Mikuz, G., Kolbitsch, C. und Moser, P.L. (2007). PTEN expression in renal cell carcinoma and oncocytoma and prognosis. *Pathology* 39, 482–485.
- Haglund, K. und Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.* 24, 3353–3359.
- Haglund, K., Di Fiore, P.P. und Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 28, 598–603.
- Han, Y.H., Moon, H.J., You, B.R. und Park, W.H. (2009). The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol. Rep.* 22, 215–221.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation in *Escherichia coli*. *DNA cloning I*: 109-135.

- Hanssen, A.M. und Fryns, J.P. (1995). Cowden syndrome. *J. Med. Genet.* *32*, 117–119.
- Hao, J., Zhu, L., Zhao, S., Liu, S., Liu, Q. und Duan, H. (2011). PTEN ameliorates high glucose-induced lipid deposits through regulating SREBP-1/FASN/ACC pathway in renal proximal tubular cells. *Exp. Cell Res.* *317*, 1629–1639.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozlowski, M.T., Belham, C. und Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* *273*, 14484–14494.
- Harreman, M., Taschner, M., Sigurdsson, S., Anindya, R., Reid, J., Somesh, B., Kong, S.E., Banks, C.A.S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., et al. (2009). Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 20705–20710.
- Harvey, K.F., Harvey, N.L., Michael, J.M., Parasivam, G., Waterhouse, N., Alnemri, E.S., Watters, D. und Kumar, S. (1998). Caspase-mediated cleavage of the ubiquitin-protein ligase Nedd4 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* *273*, 13524–13530.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* *18*, 1–12.
- He, L., Fan, C., Kapoor, A., Ingram, A.J., Rybak, A.P., Austin, R.C., Dickhout, J., Cutz, J.-C., Scholey, J. und Tang, D. (2011). α -Mannosidase 2C1 attenuates PTEN function in prostate cancer cells. *Nat Commun* *2*, 307.
- He, L., Ingram, A., Rybak, A.P. und Tang, D. (2010). Shank-interacting protein-like 1 promotes tumorigenesis via PTEN inhibition in human tumor cells. *J. Clin. Invest.* *120*, 2094–2108.
- Hennenlotter, J., Ohneseit, P.A., Simon, P., Merseburger, A.S., Serth, J., Kuehs, U., Kramer, M., Hartmann, J.T., Stenzl, A. und Kuczyk, M.A. (2008). PTEN and p27Kip1 are not downregulated in the majority of renal cell carcinomas—implications for Akt activation. *Oncol. Rep.* *19*, 1141–1147.
- Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P. und Krek, W. (2003). Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat. Cell Biol.* *5*, 64–70.
- Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A. und Lamb, N.J.C. (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 8267–8280.
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 425–479.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. und Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* *258*, 8206–8214.
- Hettinger, K., Vikhanskaya, F., Poh, M.K., Lee, M.K., de Belle, I., Zhang, J.-T., Reddy, S.A.G. und Sabapathy, K. (2007). c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death Differ.* *14*, 218–229.
- Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Riordan, M.V., Tian, Y.-M., Bullock, A.N., Welford, R.W., Elkins, J.M., Oldham, N.J., Bhattacharya, S., Gleadle, J.M., et al. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J. Biol. Chem.* *277*, 26351–26355.
- Hicke, L. und Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 141–172.
- Hickey, M.M., Lam, J.C., Bezman, N.A., Rathmell, W.K. und Simon, M.C. (2007). von Hippel-Lindau mutation in mice recapitulates Chuvash polycythemia via hypoxia-inducible factor-2 α signaling and splenic erythropoiesis. *J Clin Invest* *117*, 3879–3889.

- Higuchi, R., Krummel, B. und Saiki, R.K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* *16*, 7351–7367.
- von Hippel, E., (1904). *Über eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut.* „Albrecht von Graefes Arch Ophthal”. *59*, s. 83-106.
- Hobert, J.A. und Eng, C. (2009). PTEN hamartoma tumor syndrome: an overview. *Genet. Med.* *11*, 687–694.
- Hodges, T.W., Hossain, C.F., Kim, Y.-P., Zhou, Y.-D. und Nagle, D.G. (2004). Molecular-targeted antitumor agents: the Saururus cernuus dineolignans manassantin B and 4-O-demethylmanassantin B are potent inhibitors of hypoxia-activated HIF-1. *J. Nat. Prod.* *67*, 767–771.
- Hoffman, M.A., Ohh, M., Yang, H., Klco, J.M., Ivan, M. und Kaelin, W.G., Jr (2001). von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1019–1027.
- Högemann, I., Bock, S., Heppner, P. und Petrides, P.E. (1994). Cytogenetic and growth factor gene analysis of a renal carcinoma cell line. *Cancer Genet. Cytogenet.* *78*, 175–180.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L. und Conlon, P.J. (1988). A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nature Biotechnology* *6*, 1204–1210.
- Hsu, P.P. und Sabatini, D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* *134*, 703–707.
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L.A., Keith, B. und Simon, M.C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 9361–9374.
- Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., et al. (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *356*, 2271–2281.
- Hudson, C.C., Liu, M., Chiang, G.G., Otterness, D.M., Loomis, D.C., Kaper, F., Giaccia, A.J. und Abraham, R.T. (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7004–7014.
- Huse, J.T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S.H., Sohn-Lee, C., le Sage, C., Agami, R., Tuschl, T., et al. (2009). The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev.* *23*, 1327–1337.
- Iijima, M., Huang, Y.E. und Devreotes, P. (2002). Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev. Cell* *3*, 469–478.
- Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L.C. und Longnecker, R. (2000). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology* *268*, 178–191.
- Ikenoue, T., Inoki, K., Zhao, B. und Guan, K.-L. (2008). PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res.* *68*, 6908–6912.
- Ilan, N., Elkin, M. und Vlodavsky, I. (2006). Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 2018–2039.
- Ilić, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S. und Damsky, C.H. (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J. Cell Biol.* *143*, 547–560.

- Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S. und Kaelin, W.G., Jr (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat. Med.* 1, 822–826.
- Iliopoulos, O., Ohh, M. und Kaelin, W.G., Jr (1998). pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11661–11666.
- Ingham, R.J., Gish, G. und Pawson, T. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23, 1972–1984.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim Av, Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., et al. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468–472.
- Jaroszewski DE, Tessier DJ, Schlinkert RT, Grant CS, Thompson GB, van Heerden JA, Farley DR, Smith SL, Hinder RA. (2003). Laparoscopic adrenalectomy for pheochromocytoma. *Mayo Clin Proc.* 2003 Dec;78(12):1501-4.
- Jamis-Dow, C.A., Turner, J., Biesecker, L.G. und Choyke, P.L. (2004). Radiologic manifestations of Proteus syndrome. *Radiographics* 24, 1051–1068.
- Jarrell, S.T., Vortmeyer, A.O., Linehan, W.M., Oldfield, E.H. und Lonser, R.R. (2006). Metastases to hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease. *J. Neurosurg.* 105, 256–263.
- Jia, D., Entersz, I., Butler, C. und Foty, R.A. (2012). Fibronectin matrix-mediated cohesion suppresses invasion of prostate cancer cells. *BMC Cancer* 12, 94.
- Jia, L., Ji, S., Maillet, J.-C. und Zhang, X. (2010). PTEN suppression promotes neurite development exclusively in differentiating PC12 cells via PI3-kinase and MAP kinase signaling. *J. Cell. Biochem.* 111, 1390–1400.
- Jiang, Q., Zhou, C., Bi, Z. und Wan, Y. (2006). EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PI3K/AKT pathways in cultured human lens epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 22, 93–102.
- Jimenez, R.E., Eble, J.N., Reuter, V.E., Epstein, J.I., Folpe, A.L., de Peralta-Venturina, M., Tamboli, P., Ansell, I.D., Grignon, D.J., Young, R.H., et al. (2001). Concurrent angiomyolipoma and renal cell neoplasia: a study of 36 cases. *Mod. Pathol.* 14, 157–163.
- Jones, J.L. und Walker, R.A. (1999). Integrins: a role as cell signalling molecules. *MP, Mol. Pathol.* 52, 208–213.
- Joyce, J.A. und Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9, 239–252.
- Kaelin, W.G., Jr (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat. Rev. Cancer* 2, 673–682.
- Kaelin, W.G., Jr (2008). The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 865–873.
- Kaelin, W.G., Jr (2005). von Hippel-Lindau-associated malignancies: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Drug Discovery today* Vol.2, No.2.
- Kaelin, W.G., Jr und Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30, 393–402.
- Kamada, M., Suzuki, K., Kato, Y., Okuda, H. und Shuin, T. (2001). von Hippel-Lindau protein promotes the assembly of actin and vinculin and inhibits cell motility. *Cancer Res.* 61, 4184–4189.

- Kamura, T., Conrad, M.N., Yan, Q., Conaway, R.C. und Conaway, J.W. (1999a). The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev.* *13*, 2928–2933.
- Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K. und Nakayama, K.I. (2004). Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1229–1235.
- Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr, Elledge, S.J., Conaway, R.C., et al. (1999b). Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* *284*, 657–661.
- Kapitsinou, P.P. und Haase, V.H. (2008). The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ.* *15*, 650–659.
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* *438*, 820–827.
- Karreth, F.A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S.M., Rust, A.G., DeNicola, G., Webster, K.A., Weiss, D., Perez-Mancera, P.A., et al. (2011). In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell* *147*, 382–395.
- Kashyap, A.S., Hollier, B.G., Manton, K.J., Satyamoorthy, K., Leavesley, D.I. und Upton, Z. (2011). Insulin-like growth factor-I: vitronectin complex-induced changes in gene expression effect breast cell survival and migration. *Endocrinology* *152*, 1388–1401.
- Katz, M., Shtiegman, K., Tal-Or, P., Yakir, L., Mosesson, Y., Harari, D., Machluf, Y., Asao, H., Jovin, T., Sugamura, K., et al. (2002). Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic* *3*, 740–751.
- Kawabe, H., Neeb, A., Dimova, K., Young, S.M., Jr, Takeda, M., Katsurabayashi, S., Mitkovski, M., Malakhova, O.A., Zhang, D.-E., Umikawa, M., et al. (2010). Regulation of Rap2A by the ubiquitin ligase Nedd4-1 controls neurite development. *Neuron* *65*, 358–372.
- Keely, P.J. (2011). Mechanisms by which the extracellular matrix and integrin signaling act to regulate the switch between tumor suppression and tumor promotion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *16*, 205–219.
- Kessenbrock, K., Plaks, V. und Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* *141*, 52–67.
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F.R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S. und Brenner, H.J. (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* *15*, 659–670.
- Khan, M.N., Bhattacharyya, T., Andrikopoulos, P., Esteban, M.A., Barod, R., Connor, T., Ashcroft, M., Maxwell, P.H. und Kiriakidis, S. (2011). Factor inhibiting HIF (FIH-1) promotes renal cancer cell survival by protecting cells from HIF-1 α -mediated apoptosis. *Br. J. Cancer* *104*, 1151–1159.
- Kim, D.-S., Choi, Y.-B., Han, B.-G., Park, S.-Y., Jeon, Y., Kim, D.-H., Ahn, E.-R., Shin, J.-E., Lee, B.I., Lee, H., et al. (2011). Cancer cells promote survival through depletion of the von Hippel-Lindau tumor suppressor by protein crosslinking. *Oncogene* *30*, 4780–4790.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. und Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* *266*, 2011–2015.

- Kim, S.S., Yoo, N.J., Jeong, E.G., Kim, M.S. und Lee, S.H. (2008). Expression of NEDD4-1, a PTEN regulator, in gastric and colorectal carcinomas. *APMIS* 116, 779–784.
- Kim, W.Y. und Kaelin, W.G. (2004). Role of VHL gene mutation in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 4991–5004.
- Kim, W.Y., Safran, M., Buckley, M.R.M., Ebert, B.L., Glickman, J., Bosenberg, M., Regan, M. und Kaelin, W.G., Jr (2006). Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor alpha phenocopies VHL inactivation in vivo. *EMBO J.* 25, 4650–4662.
- Kim, Y.-C., Kitaura, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. und Ariga, H. (2009). Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN. *Int. J. Oncol.* 35, 1331–1341.
- Knauth, K., Cartwright, E., Freund, S., Bycroft, M. und Buchberger, A. (2009). VHL mutations linked to type 2C von Hippel-Lindau disease cause extensive structural perturbations in pVHL. *J. Biol. Chem.* 284, 10514–10522.
- Knudson, A.G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *PNAS* 68, 820–823.
- Knudson, A.G. (1996). Hereditary cancer: two hits revisited. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122, 135–140.
- Knudson, A.G., Jr und Strong, L.C. (1972). Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am. J. Hum. Genet.* 24, 514–532.
- Koch, C.A., Mauro, D., Walther, M.M., Linehan, W.M., Vortmeyer, A.O., Jaffe, R., Pacak, K., Chrousos, G.P., Zhuang, Z. und Lubensky, I.A. (2002). Pheochromocytoma in von hippel-lindau disease: distinct histopathologic phenotype compared to pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2. *Endocr. Pathol.* 13, 17–27.
- Koh, M.Y. und Powis, G. (2009). HIF : the new player in oxygen-independent HIF-1alpha degradation. *Cell Cycle* 8, 1359–1366.
- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J. und Roth, R.A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271, 31372–31378.
- Kohno, T., Takahashi, M., Manda, R. und Yokota, J. (1998). Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEP1 gene in human lung cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 152–156.
- Komminoth, P., Perren, A., van Nederveen, F.H. und de Krijger, R.R. (2009). Familial endocrine tumours: pheochromocytomas and extra-adrenal paragangliomas. *Diagnostic Histopathology* 15, 61–68.
- Kondo, K., Kim, W.Y., Lechpammer, M. und Kaelin, W.G., Jr (2003). Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol.* 1, E83.
- Kondo, K., Yao, M., Kobayashi, K., Ota, S., Yoshida, M., Kaneko, S., Baba, M., Sakai, N., Kishida, T., Kawakami, S., et al. (2001). PTEN/MMAC1/TEP1 mutations in human primary renal-cell carcinomas and renal carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 91, 219–224.
- Koong, A.C., Chen, E.Y. und Giaccia, A.J. (1994). Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res.* 54, 1425–1430.
- Korpershoek, E., Loonen, A.J.M., Corvers, S., van Nederveen, F.H., Jonkers, J., Ma, X., Ziel-van der Made, A., Korsten, H., Trapman, J., Dinjens, W.N.M., et al. (2009). Conditional Pten knock-out mice: a model for metastatic pheochromocytoma. *J. Pathol.* 217, 597–604.

- Kucejova, B., Peña-Llopis, S., Yamasaki, T., Sivanand, S., Tran, T.A.T., Alexander, S., Wolff, N.C., Lotan, Y., Xie, X.-J., Kabbani, W., et al. (2011). Interplay between pVHL and mTORC1 pathways in clear-cell renal cell carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 9, 1255–1265.
- Kühn, R. und Torres, R.M. (2002). Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol. Biol.* 180, 175–204.
- Kumar, S., Harvey, K.F., Kinoshita, M., Copeland, N.G., Noda, M. und Jenkins, N.A. (1997). cDNA cloning, expression analysis, and mapping of the mouse *Nedd4* gene. *Genomics* 40, 435–443.
- Kurban, G., Duplan, E., Ramlal, N., Hudon, V., Sado, Y., Ninomiya, Y. und Pause, A. (2008). Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2. *Oncogene* 27, 1004–1012.
- Kurose, K., Bando, K., Fukino, K., Sugisaki, Y., Araki, T. und Emi, M. (1998). Somatic mutations of the PTEN/MMAC1 gene in fifteen Japanese endometrial cancers: evidence for inactivation of both alleles. *Jpn. J. Cancer Res.* 89, 842–848.
- Kuzmin, I., Duh, F.M., Latif, F., Geil, L., Zbar, B. und Lerman, M.I. (1995). Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Oncogene* 10, 2185–2194.
- Kuznetsova, A.V., Meller, J., Schnell, P.O., Nash, J.A., Ignacak, M.L., Sanchez, Y., Conaway, J.W., Conaway, R.C. und Czyzyk-Krzeska, M.F. (2003). von Hippel-Lindau protein binds hyperphosphorylated large subunit of RNA polymerase II through a proline hydroxylation motif and targets it for ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2706–2711.
- Kwon, C.H., Zhu, X., Zhang, J., Knoop, L.L., Tharp, R., Smeyne, R.J., Eberhart, C.G., Burger, P.C. und Baker, S.J. (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat. Genet.* 29, 404–411.
- Lachyankar, M.B., Sultana, N., Schonhoff, C.M., Mitra, P., Poluha, W., Lambert, S., Quesenberry, P.J., Litofsky, N.S., Recht, L.D., Nabi, R., et al. (2000). A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J. Neurosci.* 20, 1404–1413.
- Lacouture, M.E., Schaffer, J.L. und Klickstein, L.B. (2002). A comparison of type I collagen, fibronectin, and vitronectin in supporting adhesion of mechanically strained osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 17, 481–492.
- Lai, E.W., Rodriguez, O.C., Aventian, M., Cromelin, C., Fricke, S.T., Martiniova, L., Lubensky, I.A., Lisanti, M.P., Picard, K.L., Powers, J.F., et al. (2007). ErbB-2 induces bilateral adrenal pheochromocytoma formation in mice. *Cell Cycle* 6, 1946–1950.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L. und Bruick, R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 16, 1466–1471.
- Larrea, M.D., Wander, S.A. und Slingerland, J.M. (2009). p27 as Jekyll and Hyde: regulation of cell cycle and cell motility. *Cell Cycle* 8, 3455–3461.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W. und Geil, L. (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260, 1317–1320.
- LeBleu, V.S., MacDonald, B. und Kalluri, R. (2007). Structure and Function of Basement Membranes. *Experimental Biology and Medicine* 232, 1121–1129.
- Lee, C.M., Hickey, M.M., Sanford, C.A., McGuire, C.G., Cowey, C.L., Simon, M.C. und Rathmell, W.K. (2009). VHL Type 2B gene mutation moderates HIF dosage in vitro and in vivo. *Oncogene* 28, 1694–1705.

- Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P. und Pavletich, N.P. (1999a). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99, 323–334.
- Lee, L.G., Connell, C.R., Woo, S.L., Cheng, R.D., McArdle, B.F., Fuller, C.W., Halloran, N.D. und Wilson, R.K. (1992). DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res.* 20, 2471–2483.
- Lee, S., Nakamura, E., Yang, H., Wei, W., Linggi, M.S., Sajan, M.P., Farese, R.V., Freeman, R.S., Carter, B.D., Kaelin, W.G., Jr, et al. (2005a). Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell* 8, 155–167.
- Lee, S., Neumann, M., Stearman, R., Stauber, R., Pause, A., Pavlakis, G.N. und Klausner, R.D. (1999b). Transcription-Dependent Nuclear-Cytoplasmic Trafficking Is Required for the Function of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Mol Cell Biol* 19, 1486–1497.
- Lee, S.-R., Yang, K.-S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W. und Rhee, S.G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 277, 20336–20342.
- Lee, Y.-R., Shim, H.-J., Yu, H.-N., Song, E.-K., Park, J., Kwon, K.-B., Park, J.-W., Rho, H.-W., Park, B.-H., Han, M.-K., et al. (2005b). Dimethylsulfoxide induces upregulation of tumor suppressor protein PTEN through nuclear factor-kappaB activation in HL-60 cells. *Leuk. Res.* 29, 401–405.
- Leibovich, B.C., Cheville, J.C., *LOHse*, C.M., Zincke, H., Frank, I., Kwon, E.D., Merchan, J.R. und Blute, M.L. (2005). A scoring algorithm to predict survival for patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *J. Urol.* 174, 1759–1763; discussion 1763.
- Leslie, N.R. und Downes, C.P. (2004). PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem. J.* 382, 1–11.
- Leverrier, Y., Thomas, J., Mathieu, A.L., Low, W., Blanquier, B. und Marvel, J. (1999). Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. *Cell Death Differ.* 6, 290–296.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Lewandoski, M., Meyers, E.N. und Martin, G.R. (1997). Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62, 159–168.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., et al. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943–1947.
- Li, L., Zhang, L., Zhang, X., Yan, Q., Minamishima, Y.A., Olumi, A.F., Mao, M., Bartz, S. und Kaelin, W.G., Jr (2007). Hypoxia-inducible factor linked to differential kidney cancer risk seen with type 2A and type 2B VHL mutations. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5381–5392.
- Li, M. und Kim, W.Y. (2011). Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 187–195.
- Li, Z., Dong, X., Dong, X., Wang, Z., Liu, W., Deng, N., Ding, Y., Tang, L., Hla, T., Zeng, R., et al. (2005). Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat. Cell Biol.* 7, 399–404.

- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.-H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., et al. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat. Med.* 8, 1153–1160.
- Liliental, J., Moon, S.Y., Lesche, R., Mamillapalli, R., Li, D., Zheng, Y., Sun, H. und Wu, H. (2000). Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr. Biol.* 10, 401–404.
- Lindau A., (1927). Zur Frage der Angiomatosis Retinae und ihrer Hirnkompliation. *Acta Ophthalmol.* 4, 193-226.
- Linehan WM, Ricketts CJ.(2012). The metabolic basis of kidney cancer. *Semin Cancer Biol.* 2012 Jun 13
- Linehan, W.M., Rubin, J.S. und Bottaro, D.P. (2009). VHL loss of function and its impact on oncogenic signaling networks in clear cell renal cell carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 753–756.
- Liu, F., Wagner, S., Campbell, R.B., Nickerson, J.A., Schiffer, C.A. und Ross, A.H. (2005). PTEN enters the nucleus by diffusion. *J. Cell. Biochem.* 96, 221–234.
- Liu, Y., Oppenheim, R.W., Sugiura, Y. und Lin, W. (2009). Abnormal development of the neuromuscular junction in Nedd4-deficient mice. *Dev. Biol.* 330, 153–166.
- Liu, Y.V., Baek, J.H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R.N. und Semenza, G.L. (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol. Cell* 25, 207–217.
- Lonser, R.R., Glenn, G.M., Walther, M., Chew, E.Y., Libutti, S.K., Linehan, W.M. und Oldfield, E.H. (2003). von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 361, 2059–2067.
- Los, M., Jansen, G.H., Kaelin, W.G., Lips, C.J., Blijham, G.H. und Voest, E.E. (1996). Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. *Lab. Invest.* 75, 231–238.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. und Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533–539.
- Lu, J., Jeong, H.-W., Jeong, H., Kong, N., Yang, Y., Carroll, J., Luo, H.R., Silberstein, L.E., Yupoma und Chai, L. (2009). Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex. *PLoS ONE* 4, e5577.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M. und Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3,.
- Lu, P., Weaver, V.M. und Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196, 395–406.
- Lu, P.J., Zhou, X.Z., Shen, M. und Lu, K.P. (1999a). Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 283, 1325–1328.
- Lu, Y., Lin, Y.Z., LaPushin, R., Cuevas, B., Fang, X., Yu, S.X., Davies, M.A., Khan, H., Furui, T., Mao, M., et al. (1999b). The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene* 18, 7034–7045.
- Luo, J., Manning, B.D. und Cantley, L.C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4, 257–262.

- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Behrendt, N., Chen, Z., Noda, T., Hino, O., Cordon-Cardo, C. und Pandolfi, P.P. (2005). Genetic analysis of Pten and Tsc2 functional interactions in the mouse reveals asymmetrical haploinsufficiency in tumor suppression. *Genes Dev.* 19, 1779–1786.
- Ma, W., Tessarollo, L., Hong, S.-B., Baba, M., Southon, E., Back, T.C., Spence, S., Lobe, C.G., Sharma, N., Maher, G.W., et al. (2003). Hepatic vascular tumors, angiectasis in multiple organs and impaired spermatogenesis in mice with conditional inactivation of the VHL gene. *Cancer Res.* 63, 5320–5328.
- Mack, G.S. und Marshall, A. (2010). Lost in migration. *Nat. Biotechnol.* 28, 214–229.
- Maher, E.R. und Kaelin, W.G., Jr (1997). von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)* 76, 381–391.
- Maher, E.R., Neumann, H.P. und Richard, S. (2011). von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur. J. Hum. Genet.* 19, 617–623.
- Mak, B.C. und Yeung, R.S. (2004). The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. *Cancer Invest.* 22, 588–603.
- Mamane, Y., Petroulakis, E., Rong, L., Yoshida, K., Ler, L.W. und Sonenberg, N. (2004). eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* 23, 3172–3179.
- Mandriota, S.J., Turner, K.J., Davies, D.R., Murray, P.G., Morgan, N.V., Sowter, H.M., Wykoff, C.C., Maher, E.R., Harris, A.L., Ratcliffe, P.J., et al. (2002). HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* 1, 459–468.
- Manning, B.D. und Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261–1274.
- Maranchie, J.K., Vasselli, J.R., Riss, J., Bonifacino, J.S., Linehan, W.M. und Klausner, R.D. (2002). The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 1, 247–255.
- Marsh, D.J., Coulon, V., Lunetta, K.L., Rocca-Serra, P., Dahia, P.L., Zheng, Z., Liaw, D., Caron, S., Duboué, B., Lin, A.Y., et al. (1998). Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum. Mol. Genet.* 7, 507–515.
- Marsh, D.J., Kum, J.B., Lunetta, K.L., Bennett, M.J., Gorlin, R.J., Ahmed, S.F., Bodurtha, J., Crowe, C., Curtis, M.A., Dasouki, M., et al. (1999). PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1461–1472.
- Marsit, C.J., Zheng, S., Aldape, K., Hinds, P.W., Nelson, H.H., Wiencke, J.K. und Kelsey, K.T. (2005). PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Hum. Pathol.* 36, 768–776.
- Masse, I., Molin, L., Billaud, M. und Solari, F. (2005). Lifespan and dauer regulation by tissue-specific activities of *Caenorhabditis elegans* DAF-18. *Dev. Biol.* 286, 91–101.
- Maulik, D., Ashraf, Q.M., Mishra, O.P. und Delivoria-Papadopoulos, M. (2008). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-jun N-terminal kinase (JNK) during hypoxia in cerebral cortical nuclei of guinea pig fetus at term: role of nitric oxide. *Neurosci. Lett.* 439, 94–99.
- Maxwell, P.H. (2005). A common pathway for genetic events leading to pheochromocytoma. *Cancer Cell* 8, 91–93.

- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wyckoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. und Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275.
- McMahon, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D.E. und Dubois, C.M. (2006). Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J. Biol. Chem.* 281, 24171–24181.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L. und Burgering, B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782–787.
- Meka, H., Werner, F., Cordell, S.C., Onesti, S. und Brick, P. (2005). Crystal structure and RNA binding of the Rpb4/Rpb7 subunits of human RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.* 33, 6435–6444.
- Melchionna, R., Romani, M., Ambrosino, V., D’Arcangelo, D., Cencioni, C., Porcelli, D., Toietta, G., Truffa, S., Gaetano, C., Mangoni, A., et al. (2010). Role of HIF-1alpha in proton-mediated CXCR4 down-regulation in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 86, 293–301.
- Miner, J.H., Li, C., Mudd, J.L., Go, G. und Sutherland, A.E. (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131, 2247–2256.
- Mirmohammadsadegh, A., Marini, A., Nambiar, S., Hassan, M., Tannapfel, A., Ruzicka, T. und Hengge, U.R. (2006). Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res.* 66, 6546–6552.
- Mishra, R. (2010). Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol. Cancer* 9, 144.
- Moch, H. (2010). [Cystic renal neoplasms. New entities and molecular findings]. *Pathologe* 31 Suppl 2, 239–243.
- Moch, H. (2012). An overview of renal cell cancer: Pathology and genetics. *Seminars in Cancer Biology*.
- Morell-Quadreny, L., Rubio, J., Lopez-Guerrero, J.A., Casanova, J., Ramos, D., Iborra, I., Solsona, E. und Llombart-Bosch, A. (2003). Disruption of basement membrane, extracellular matrix metalloproteinases and E-cadherin in renal-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 23, 5005–5010.
- Morgenstern, J.P. und Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 18, 3587–3596.
- Motzer, R.J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T.E., Porta, C., Bracarda, S., Grünwald, V., Thompson, J.A., Figlin, R.A., Hollaender, N., et al. (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 372, 449–456.
- Motzer, R.J., Michaelson, M.D., Rosenberg, J., Bukowski, R.M., Curti, B.D., George, D.J., Hudes, G.R., Redman, B.G., Margolin, K.A. und Wilding, G. (2007). Sunitinib efficacy against advanced renal cell carcinoma. *J. Urol.* 178, 1883–1887.
- Mu, P., Han, Y.-C., Betel, D., Yao, E., Squatrito, M., Ogradowski, P., de Stanchina, E., D’Andrea, A., Sander, C. und Ventura, A. (2009). Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev.* 23, 2806–2811.
- Mukhopadhyay, D., Knebelmann, B., Cohen, H.T., Ananth, S. und Sukhatme, V.P. (1997). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5629–5639.

- Murdaca, J., Treins, C., Monthouël-Kartmann, M.-N., Pontier-Bres, R., Kumar, S., Van Obberghen, E. und Giorgetti-Peraldi, S. (2004). Grb10 prevents Nedd4-mediated vascular endothelial growth factor receptor-2 degradation. *J. Biol. Chem.* 279, 26754–26761.
- Na, X., Duan, H.O., Messing, E.M., Schoen, S.R., Ryan, C.K., di Sant’Agnese, P.A., Golemis, E.A. und Wu, G. (2003). Identification of the RNA polymerase II subunit hSRPB7 as a novel target of the von Hippel-Lindau protein. *EMBO J.* 22, 4249–4259.
- Naik, M.U. und Naik, U.P. (2006). Junctional adhesion molecule-A-induced endothelial cell migration on vitronectin is integrin alpha v beta 3 specific. *J. Cell. Sci.* 119, 490–499.
- Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M. und Verma, I.M. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.* 70, 5701–5705.
- van Nederveen, F.H., Perren, A., Dannenberg, H., Petri, B.-J., Dinjens, W.N.M., Komminoth, P. und de Krijger, R.R. (2006). PTEN gene loss, but not mutation, in benign and malignant pheochromocytomas. *J. Pathol.* 209, 274–280.
- Neumann, A.K., Yang, J., Biju, M.P., Joseph, S.K., Johnson, R.S., Haase, V.H., Freedman, B.D. und Turka, L.A. (2005). Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17071–17076.
- Neumann, H.P. und Wiestler, O.D. (1991). Clustering of features and genetics of von Hippel-Lindau syndrome. *Lancet* 338, 258.
- Neumann, H.P. und Zbar, B. (1997). Renal cysts, renal cancer and von Hippel-Lindau disease. *Kidney Int.* 51, 16–26.
- O’Lague, P.H. und Huttner, S.L. (1980). Physiological and morphological studies of rat pheochromocytoma cells (PC12) chemically fused and grown in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1701–1705.
- Obermeier, A., Lammers, R., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1993). Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3’-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J. Biol. Chem.* 268, 22963–22966.
- Ogg, S. und Ruvkun, G. (1998). The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol. Cell* 2, 887–893.
- Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V. und Kaelin, W.G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat. Cell Biol.* 2, 423–427.
- Ohh, M., Yauch, R.L., Lonergan, K.M., Whaley, J.M., Stemmer-Rachamimov, A.O., Louis, D.N., Gavin, B.J., Kley, N., Kaelin, W.G., Jr und Iliopoulos, O. (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol. Cell* 1, 959–968.
- Okuda, H., Saitoh, K., Hirai, S., Iwai, K., Takaki, Y., Baba, M., Minato, N., Ohno, S. und Shuin, T. (2001). The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Mediates Ubiquitination of Activated Atypical Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 276, 43611–43617.
- Okumura, F., Matsuzaki, M., Nakatsukasa, K. und Kamura, T. (2012). The Role of Elongin BC-Containing Ubiquitin Ligases. *Front Oncol* 2, 10.
- Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R.M., DePinho, R.A., Cavenee, W.K. und Furnari, F.B. (2006). PCAF modulates PTEN activity. *J. Biol. Chem.* 281, 26562–26568.

- Okumura, K., Zhao, M., Depinho, R.A., Furnari, F.B. und Cavenee, W.K. (2005). Cellular transformation by the MSP58 oncogene is inhibited by its physical interaction with the PTEN tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 2703–2706.
- Park, D.M., Zhuang, Z., Chen, L., Szerlip, N., Maric, I., Li, J., Sohn, T., Kim, S.H., Lubensky, I.A., Vortmeyer, A.O., et al. (2007). von Hippel-Lindau disease-associated hemangioblastomas are derived from embryologic multipotent cells. *PLoS Med.* *4*, e60.
- Patard, J.-J., Rioux-Leclercq, N., Masson, D., Zerrouki, S., Jouan, F., Collet, N., Dubourg, C., Lobel, B., Denis, M. und Fergelot, P. (2009). Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *Br. J. Cancer* *101*, 1417–1424.
- Patel, L., Pass, I., Coxon, P., Downes, C.P., Smith, S.A. und Macphée, C.H. (2001). Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARGgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr. Biol.* *11*, 764–768.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. und Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 8392–8396.
- Perren, A., Komminoth, P., Saremaslani, P., Matter, C., Feurer, S., Lees, J.A., Heitz, P.U. und Eng, C. (2000). Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am. J. Pathol.* *157*, 1097–1103.
- Persaud, A., Alberts, P., Hayes, M., Guettler, S., Clarke, I., Sicheri, F., Dirks, P., Ciruna, B. und Rotin, D. (2011). Nedd4-1 binds and ubiquitylates activated FGFR1 to control its endocytosis and function. *EMBO J.* *30*, 3259–3273.
- Peruzzi, B. und Bottaro, D.P. (2006). Beta-catenin signaling: linking renal cell carcinoma and polycystic kidney disease. *Cell Cycle* *5*, 2839–2841.
- Petosa, C., Masters, S.C., Bankston, L.A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H. und Liddington, R.C. (1998). 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J. Biol. Chem.* *273*, 16305–16310.
- Petrella, B.L. und Brinckerhoff, C.E. (2009). PTEN suppression of YY1 induces HIF-2 activity in von-Hippel-Lindau-null renal-cell carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* *8*, 1389–1401.
- Pfander, D., Kobayashi, T., Knight, M.C., Zelzer, E., Chan, D.A., Olsen, B.R., Giaccia, A.J., Johnson, R.S., Haase, V.H. und Schipani, E. (2004). Deletion of Vhlh in chondrocytes reduces cell proliferation and increases matrix deposition during growth plate development. *Development* *131*, 2497–2508.
- Pilarski, R. und Eng, C. (2004). Will the real Cowden syndrome please stand up (again)? Expanding mutational and clinical spectra of the PTEN hamartoma tumour syndrome. *J. Med. Genet.* *41*, 323–326.
- Plant, P.J., Yeager, H., Staub, O., Howard, P. und Rotin, D. (1997). The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca²⁺-dependent plasma membrane localization. *J. Biol. Chem.* *272*, 32329–32336.
- Plotnikova, O.V., Pugacheva, E.N. und Golemis, E.A. (2009). Primary cilia and the cell cycle. *Methods Cell Biol.* *94*, 137–160.
- Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P.E. und Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 1563–1568.

- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J. und Pandolfi, P.P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 465, 1033–1038.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. und Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8, 9–22.
- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y. und Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131, 1619–1628.
- Postma, M., Bosgraaf, L., Loovers, H.M. und Van Haastert, P.J.M. (2004). Chemotaxis: signalling modules join hands at front and tail. *EMBO Rep.* 5, 35–40.
- Pourmand, G., Ziaee, A.-A., Abedi, A.R., Mehraei, A., Alavi, H.A., Ahmadi, A. und Saadati, H.R. (2007). Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urol J* 4, 95–100.
- Prangere, T., Bowden, A.D., Beauchat, V., Caulier, M.T., Ziegels, P., Huglo, D., Pickett, R.D. und Steinling, M. (1997). A study of the behaviour of cobalt chloride during the labelling of leukocytes with ⁹⁹Tcm-HMPAO stabilised in vitro by the addition of cobalt chloride solution. *Nucl Med Commun* 18, 258–261.
- Prowse, A.H., Webster, A.R., Richards, F.M., Richard, S., Olschwang, S., Resche, F., Affara, N.A. und Maher, E.R. (1997). Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 765–771.
- Puc, J., Keniry, M., Li, H.S., Pandita, T.K., Choudhury, A.D., Memeo, L., Mansukhani, M., Murty, V.V.V.S., Gaciong, Z., Meek, S.E.M., et al. (2005). Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* 7, 193–204.
- Puc, J., Placha, G., Wocial, B., Podsypanina, K., Parsons, R. und Gaciong, Z. (2006). Analysis of PTEN mutation in non-familial pheochromocytoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1073, 317–331.
- Qiao, H., Saulnier, R., Patrykat, A., Rahimi, N., Raptis, L., Rossiter, J., Tremblay, E. und Elliott, B. (2000). Cooperative effect of hepatocyte growth factor and fibronectin in anchorage-independent survival of mammary carcinoma cells: requirement for phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Growth Differ.* 11, 123–133.
- Qin, Z.-K., Zhou, F.-J., Dai, Y.-P., Chen, W., Hou, J.-H., Han, H., Liu, Z.-W., Yu, S.-L., Zhang, D.-Z. und Yang, J.-A. (2007). [Expression and clinical significance of survivin and PTEN in adrenal tumors]. *Ai Zheng* 26, 1143–1147.
- Rafty, L.A. und Khachigian, L.M. (2002). von Hippel-Lindau tumor suppressor protein represses platelet-derived growth factor B-chain gene expression via the Sp1 binding element in the proximal PDGF-B promoter. *J. Cell. Biochem.* 85, 490–495.
- Rankin, E.B., Rha, J., Unger, T.L., Wu, C.H., Shutt, H.P., Johnson, R.S., Simon, M.C., Keith, B. und Haase, V.H. (2008). Hypoxia-inducible factor-2 regulates vascular tumorigenesis in mice. *Oncogene* 27, 5354–5358.
- Rankin, E.B., Tomaszewski, J.E. und Haase, V.H. (2006). Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res.* 66, 2576–2583.
- Rathmell, W.K., Hickey, M.M., Bezman, N.A., Chmielecki, C.A., Carraway, N.C. und Simon, M.C. (2004). In vitro and in vivo models analyzing von Hippel-Lindau disease-specific mutations. *Cancer Res.* 64, 8595–8603.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G.B., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.-L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L. und Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5675–5686.

- Rennie, P.S. und Nelson, C.C. (1998). Epigenetic mechanisms for progression of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 401–409.
- Reutzel, D. (2003). Molekularzytogenetische Untersuchungen an Nierenzelltumoren des Menschen – eine Subtypspezifische Differenzierung. Dissertation
- Richard, S., Campello, C., Taillandier, L., Parker, F. und Resche, F. (1998). Haemangioblastoma of the central nervous system in von Hippel-Lindau disease. French VHL Study Group. *J. Intern. Med.* 243, 547–553.
- Richard, S., Gardie, B., Couvé, S. und Gad, S. (2012). Von Hippel-Lindau: How a rare disease illuminates cancer biology. *Seminars in Cancer Biology.*
- Richards, F.M. (2001). Molecular pathology of von Hippel-Lindau disease and the VHL tumour suppressor gene. *Expert Rev Mol Med* 2001, 1–27.
- Richards, F.M., Schofield, P.N., Fleming, S. und Maher, E.R. (1996). Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 5, 639–644.
- Robey, R.B. und Hay, N. (2006). Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* 25, 4683–4696.
- Roe, J.-S., Kim, H., Lee, S.-M., Kim, S.-T., Cho, E.-J. und Youn, H.-D. (2006). p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol. Cell* 22, 395–405.
- Roe, J.-S., Kim, H.-R., Hwang, I.-Y., Cho, E.-J. und Youn, H.-D. (2011). von Hippel-Lindau protein promotes Skp2 destabilization on DNA damage. *Oncogene* 30, 3127–3138.
- Rohwer, N., Welzel, M., Daskalow, K., Pfander, D., Wiedenmann, B., Detjen, K. und Cramer, T. (2008). Hypoxia-inducible factor 1alpha mediates anoikis resistance via suppression of alpha5 integrin. *Cancer Res.* 68, 10113–10120.
- van Rooijen, E., Voest, E.E., Logister, I., Bussmann, J., Korving, J., van Eeden, F.J., Giles, R.H. und Schulte-Merker, S. (2010). von Hippel-Lindau tumor suppressor mutants faithfully model pathological hypoxia-driven angiogenesis and vascular retinopathies in zebrafish. *Dis Model Mech* 3, 343–353.
- van Rooijen, E., Voest, E.E., Logister, I., Korving, J., Schwerte, T., Schulte-Merker, S., Giles, R.H. und van Eeden, F.J. (2009). Zebrafish mutants in the von Hippel-Lindau tumor suppressor display a hypoxic response and recapitulate key aspects of Chuvash polycythemia. *Blood* 113, 6449–6460.
- Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M. und Barbarisi, A. (2004). From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J. Cell. Physiol.* 199, 174–180.
- Rost, M., Mann, S., Lambert, C., Döring, T., Thomé, N. und Prange, R. (2006). Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J. Biol. Chem.* 281, 29297–29308.
- Roupret, M., Hopirtean, V., Mejean, A., Thiounn, N., Dufour, B., Chretien, Y., Chauveau, D. und Richard, S. (2003). Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma and von Hippel-Lindau's disease: a single center experience. *J. Urol.* 170, 1752–1755.
- Saal, L.H., Johansson, P., Holm, K., Gruberger-Saal, S.K., She, Q.-B., Maurer, M., Koujak, S., Ferrando, A.A., Malmström, P., Memeo, L., et al. (2007). Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7564–7569.
- Salmena, L., Carracedo, A. und Pandolfi, P.P. (2008). Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133, 403–414.

- Salnikow, K., Donald, S.P., Bruick, R.K., Zhitkovich, A., Phang, J.M. und Kasprzak, K.S. (2004). Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J. Biol. Chem.* 279, 40337–40344.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Sano, T., Lin, H., Chen, X., Langford, L.A., Koul, D., Bondy, M.L., Hess, K.R., Myers, J.N., Hong, Y.K., Yung, W.K., et al. (1999). Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res.* 59, 1820–1824.
- Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M.L., Fausto, N., Nicosia, R.F. und Giachelli, C.M. (1998). NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J. Cell Biol.* 141, 1083–1093.
- Schietke, R., Warnecke, C., Wacker, I., Schödel, J., Mole, D.R., Campean, V., Amann, K., Goppelt-Struebe, M., Behrens, J., Eckardt, K.-U., et al. (2010). The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J. Biol. Chem.* 285, 6658–6669.
- Schneider, E., Keppler, R., Prawitt, D., Steinwender, C., Roos, F.C., Thüroff, J.W., Lausch, E. und Brenner, W. (2011). Migration of renal tumor cells depends on dephosphorylation of Shc by PTEN. *Int. J. Oncol.* 38, 823–831.
- Schofield, C.J. und Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 343–354.
- Schubert, D. und Klier, F.G. (1977). Storage and release of acetylcholine by a clonal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5184–5188.
- Schultz, L., Chaux, A., Albadine, R., Hicks, J., Kim, J.J., De Marzo, A.M., Allaf, M.E., Carducci, M.A., Rodriguez, R., Hammers, H.-J., et al. (2011). Immunoeexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 1549–1556.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721–732.
- Semenza, G.L. (2011). Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N. Engl. J. Med.* 365, 537–547.
- Semenza, G.L., Agani, F., Booth, G., Forsythe, J., Iyer, N., Jiang, B.H., Leung, S., Roe, R., Wiener, C. und Yu, A. (1997). Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.* 51, 553–555.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. und Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.
- Shang, D., Liu, Y., Yang, P., Chen, Y. und Tian, Y. (2012). TGFBI-promoted adhesion, migration and invasion of human renal cell carcinoma depends on inactivation of von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Urology* 79, 966.e1–7.
- Sharrard, R.M. und Maitland, N.J. (2000). Alternative splicing of the human PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1494, 282–285.
- Shen, C. und Kaelin, W.G., Jr (2012). The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Seminars in Cancer Biology*.
- Shen, C., Nettleton, D., Jiang, M., Kim, S.K. und Powell-Coffman, J.A. (2005). Roles of the HIF-1 hypoxia-inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 280, 20580–20588.

- Shen, H.-C.J., Adem, A., Ylaya, K., Wilson, A., He, M., Lorang, D., Hewitt, S.M., Pechhold, K., Harlan, D.M., Lubensky, I.A., et al. (2009). Deciphering von Hippel-Lindau (VHL/Vhl)-associated pancreatic manifestations by inactivating Vhl in specific pancreatic cell populations. *PLoS ONE* 4, e4897.
- Shen, W.H., Balajee, A.S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P.P. und Yin, Y. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128, 157–170.
- Shenoy, S.K., Xiao, K., Venkataramanan, V., Snyder, P.M., Freedman, N.J. und Weissman, A.M. (2008). Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 283, 22166–22176.
- Sherr, C.J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235–246.
- Shiao, Y.-H., Forsti, A., Egevad, L., Anderson, L.M., Lindblad, P. und Hemminki, K. (2003). VHL down-regulation and differential localization as mechanisms in tumorigenesis. *Kidney Int.* 64, 1671–1674.
- Shigematsu, S., Yamauchi, K., Nakajima, K., Iijima, S., Aizawa, T. und Hashizume, K. (1999). IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr. J.* 46 Suppl, S59–62.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.-Y., Bakin, A.V., Baselga, J. und Arteaga, C.L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat. Med.* 8, 1145–1152.
- Shin Lee, J., Seok Kim, H., Bok Kim, Y., Cheol Lee, M. und Soo Park, C. (2003). Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *J Surg Oncol* 84, 166–172.
- Sisci, D., Aquila, S., Middea, E., Gentile, M., Maggiolini, M., Mastroianni, F., Montanaro, D. und Andò, S. (2004). Fibronectin and type IV collagen activate ERalpha AF-1 by c-Src pathway: effect on breast cancer cell motility. *Oncogene* 23, 8920–8930.
- Skoczylas, C., Henglein, B. und Rundell, K. (2005). PP2A-dependent transactivation of the cyclin A promoter by SV40 ST is mediated by a cell cycle-regulated E2F site. *Virology* 332, 596–601.
- Smith, K., Gunaratnam, L., Morley, M., Franovic, A., Mekhail, K. und Lee, S. (2005). Silencing of epidermal growth factor receptor suppresses hypoxia-inducible factor-2-driven VHL-/- renal cancer. *Cancer Res.* 65, 5221–5230.
- Smyth, N., Vatansever, H.S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M. und Edgar, D. (1999). Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J. Cell Biol.* 144, 151–160.
- Song, L.-B., Li, J., Liao, W.-T., Feng, Y., Yu, C.-P., Hu, L.-J., Kong, Q.-L., Xu, L.-H., Zhang, X., Liu, W.-L., et al. (2009). The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 119, 3626–3636.
- Song, M.S., Carracedo, A., Salmena, L., Song, S.J., Egia, A., Malumbres, M. und Pandolfi, P.P. (2011). Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* 144, 187–199.
- Song, M.S., Salmena, L., Carracedo, A., Egia, A., Lo-Coco, F., Teruya-Feldstein, J. und Pandolfi, P.P. (2008). The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature* 455, 813–817.
- Song, M.S., Salmena, L. und Pandolfi, P.P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 283–296.

- Soria, J.-C., Lee, H.-Y., Lee, J.I., Wang, L., Issa, J.-P., Kemp, B.L., Liu, D.D., Kurie, J.M., Mao, L. und Khuri, F.R. (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin. Cancer Res.* 8, 1178–1184.
- Sorrell, A.D., Lee, S., Stolle, C., Ellenhorn, J., Grix, A., Kaelin, W.G., Jr und Weitzel, J.N. (2011). Clinical and functional properties of novel VHL mutation (X214L) consistent with Type 2A phenotype and low risk of renal cell carcinoma. *Clin. Genet.* 79, 539–545.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S. und Mak, T.W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol. Cell* 8, 317–325.
- Stambolic, V., Tsao, M.S., Macpherson, D., Suzuki, A., Chapman, W.B. und Mak, T.W. (2000). High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in *pten*^{+/-} mice. *Cancer Res.* 60, 3605–3611.
- Starink, T.M., van der Veen, J.P., Arwert, F., de Waal, L.P., de Lange, G.G., Gille, J.J. und Eriksson, A.W. (1986). The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin. Genet.* 29, 222–233.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., et al. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, *MMAC1*, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* 15, 356–362.
- von Stein, W., Ramrath, A., Grimm, A., Müller-Borg, M. und Wodarz, A. (2005). Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* 132, 1675–1686.
- Stickle, N.H., Chung, J., Klco, J.M., Hill, R.P., Kaelin, W.G., Jr und Ohh, M. (2004). pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3251–3261.
- Stiles, B., Groszer, M., Wang, S., Jiao, J. und Wu, H. (2004). PTENless means more. *Dev. Biol.* 273, 175–184.
- Stupack, D.G. und Cheresch, D.A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell. Sci.* 115, 3729–3738.
- Sufan, R.I., Jewett, M.A.S. und Ohh, M. (2004). The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F1–F6.
- Sun, H., Lesche, R., Li, D.M., Liliental, J., Zhang, H., Gao, J., Gavrilova, N., Mueller, B., Liu, X. und Wu, H. (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6199–6204.
- Sundqvist, A., Bengoechea-Alonso, M.T., Ye, X., Lukiyanchuk, V., Jin, J., Harper, J.W. und Ericsson, J. (2005). Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab.* 1, 379–391.
- Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Stambolic, V., Elia, A.J., Sasaki, T., del Barco Barrantes, I., Ho, A., Wakeham, A., Itie, A., Khoo, W., et al. (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr. Biol.* 8, 1169–1178.
- Suzuki, A., Yamaguchi, M.T., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., et al. (2001). T cell-specific loss of *Pten* leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* 14, 523–534.
- Svejstrup, J.Q. (2002). Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 21–29.

- Taha, C., Liu, Z., Jin, J., Al-Hasani, H., Sonenberg, N. und Klip, A. (1999). Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J. Biol. Chem.* *274*, 33085–33091.
- Takahashi, Y., Morales, F.C., Kreimann, E.L. und Georgescu, M.-M. (2006). PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling. *EMBO J.* *25*, 910–920.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R. und Yamada, K.M. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* *280*, 1614–1617.
- Tang, N., Mack, F., Haase, V.H., Simon, M.C. und Johnson, R.S. (2006). pVHL function is essential for endothelial extracellular matrix deposition. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2519–2530.
- Tang, N.-H., Chen, Y.-L., Wang, X.-Q., Li, X.-J., Wu, Y., Zou, Q.-L. und Chen, Y.-Z. (2010). N-terminal and C-terminal heparin-binding domain polypeptides derived from fibronectin reduce adhesion and invasion of liver cancer cells. *BMC Cancer* *10*, 552.
- Tashiro, H., Blazes, M.S., Wu, R., Cho, K.R., Bose, S., Wang, S.I., Li, J., Parsons, R. und Ellenson, L.H. (1997). Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res.* *57*, 3935–3940.
- Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S.M., Ala, U., Karreth, F., Poliseno, L., Provero, P., Di Cunto, F., et al. (2011). Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell* *147*, 344–357.
- von Teichman, A., Comp rat, E., Behnke, S., Storz, M., Moch, H. und Schraml, P. (2011). VHL mutations and dysregulation of pVHL- and PTEN-controlled pathways in multilocular cystic renal cell carcinoma. *Mod. Pathol.* *24*, 571–578.
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 740–746.
- Thoenes, W., St rkel, S., Rumpelt, H.J. und Moll, R. (1990). Cytomorphological typing of renal cell carcinoma--a new approach. *Eur. Urol.* *18 Suppl 2*, 6–9.
- Thoma, C.R., Frew, I.J., Hoerner, C.R., Montani, M., Moch, H. und Krek, W. (2007a). pVHL and GSK3beta are components of a primary cilium-maintenance signalling network. *Nat. Cell Biol.* *9*, 588–595.
- Thoma, C.R., Frew, I.J. und Krek, W. (2007b). The VHL tumor suppressor: riding tandem with GSK3beta in primary cilium maintenance. *Cell Cycle* *6*, 1809–1813.
- Thoma, C.R., Toso, A., Gutbrodt, K.L., Reggi, S.P., Frew, I.J., Schraml, P., Hergovich, A., Moch, H., Meraldi, P. und Krek, W. (2009). VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nat. Cell Biol.* *11*, 994–1001.
- Torres, J. und Pulido, R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* *276*, 993–998.
- Toschi, A., Lee, E., Gadir, N., Ohh, M. und Foster, D.A. (2008). Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2. *J. Biol. Chem.* *283*, 34495–34499.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C. und Greenberg, M.E. (2003). The many forks in FOXO's road. *Sci. STKE* *2003*, RE5.
- Trotman, L.C., Niki, M., Dotan, Z.A., Koutcher, J.A., Di Cristofano, A., Xiao, A., Khoo, A.S., Roy-Burman, P., Greenberg, N.M., Van Dyke, T., et al. (2003). Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol.* *1*, E59.

- Trotman, L.C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., Pavletich, N.P., Carver, B.S., Cordon-Cardo, C., Erdjument-Bromage, H., et al. (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 128, 141–156.
- Tsang, K.Y., Cheung, M.C.H., Chan, D. und Cheah, K.S.E. (2010). The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. *Cell Tissue Res.* 339, 93–110.
- Turcotte, S., Desrosiers, R.R. und Beliveau, R. (2004). Hypoxia upregulates von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein through RhoA-dependent activity in renal cell carcinoma. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F338–348.
- Valiente, M., Andrés-Pons, A., Gomar, B., Torres, J., Gil, A., Tapparel, C., Antonarakis, S.E. und Pulido, R. (2005). Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 28936–28943.
- Vasudevan, K.M., Gurumurthy, S. und Rangnekar, V.M. (2004). Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1007–1021.
- Vazquez, F., Grossman, S.R., Takahashi, Y., Rokas, M.V., Nakamura, N. und Sellers, W.R. (2001). Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J. Biol. Chem.* 276, 48627–48630.
- Venkatachalam, S., Shi, Y.P., Jones, S.N., Vogel, H., Bradley, A., Pinkel, D. und Donehower, L.A. (1998). Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J.* 17, 4657–4667.
- Virolle, T., Adamson, E.D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T. und de Belle, I. (2001). The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat. Cell Biol.* 3, 1124–1128.
- Vogelstein, B. und Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9, 138–141.
- Wagenseil, J.E. und Mecham, R.P. (2007). New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 81, 229–240.
- Wanebo, J.E., Lonser, R.R., Glenn, G.M. und Oldfield, E.H. (2003). The natural history of hemangioblastomas of the central nervous system in patients with von Hippel-Lindau disease. *J. Neurosurg.* 98, 82–94.
- Wang, C., Lisanti, M.P. und Liao, D.J. (2011a). Reviewing once more the c-myc and Ras collaboration: converging at the cyclin D1-CDK4 complex and challenging basic concepts of cancer biology. *Cell Cycle* 10, 57–67.
- Wang, S., Li, X., Parra, M., Verdin, E., Bassel-Duby, R. und Olson, E.N. (2008a). Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *PNAS* 105, 7738–7743.
- Wang, S.I., Puc, J., Li, J., Bruce, J.N., Cairns, P., Sidransky, D. und Parsons, R. (1997). Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 57, 4183–4186.
- Wang, X., Shi, Y., Wang, J., Huang, G. und Jiang, X. (2008b). Crucial role of the C-terminus of PTEN in antagonizing NEDD4-1-mediated PTEN ubiquitination and degradation. *Biochem. J.* 414, 221–229.
- Wang, X., Trotman, L.C., Koppie, T., Alimonti, A., Chen, Z., Gao, Z., Wang, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cordon-Cardo, C., et al. (2007). NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* 128, 129–139.
- Wang, Y., Blandino, G., Oren, M. und Givol, D. (1998). Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Oncogene* 17, 1923–1930.

- Wang, Y., Tang, Z., Xue, R., Singh, G.K., Shi, K., Lv, Y. und Yang, L. (2011b). Combined effects of TNF- α , IL-1 β , and HIF-1 α on MMP-2 production in ACL fibroblasts under mechanical stretch: an in vitro study. *J. Orthop. Res.* 29, 1008–1014.
- Wang, Y., Wan, C., Deng, L., Liu, X., Cao, X., Gilbert, S.R., Bouxsein, M.L., Faugere, M.-C., Guldberg, R.E., Gerstenfeld, L.C., et al. (2007c). The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J. Clin. Invest.* 117, 1616–1626.
- Wang, Y.-Y., Liu, R.-X., Guo, B., Xiao, Y., Shi, M.-J., Pi, M.-J., Wen, Q.-Y. und Zhang, G.-Z. (2011c). [Down-regulation of PTEN expression in kidney and its role in development of diabetic nephropathy in rats]. *Sheng Li Xue Bao* 63, 325–332.
- WARBURG, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.
- Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V.A., Frei, U., Wiesener, M. und Eckardt, K.-U. (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J.* 18, 1462–1464.
- Watanabe, S., Horie, Y. und Suzuki, A. (2005). Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 41, 161–166.
- Whitesell, L. und Lindquist, S.L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 761–772.
- Williams, R.D., Elliott, A.Y., Stein, N. und Fraley, E.E. (1976). In vitro cultivation of human renal cell cancer. I. Establishment of cells in culture. *In Vitro* 12, 623–627.
- Witz, I.P. (2009). The tumor microenvironment: the making of a paradigm. *Cancer Microenviron* 2 *Suppl 1*, 9–17.
- Woodward, E.R., Buchberger, A., Clifford, S.C., Hurst, L.D., Affara, N.A. und Maher, E.R. (2000). Comparative sequence analysis of the VHL tumor suppressor gene. *Genomics* 65, 253–265.
- Wu, R., Hendrix-Lucas, N., Kuick, R., Zhai, Y., Schwartz, D.R., Akyol, A., Hanash, S., Misek, D.E., Katabuchi, H., Williams, B.O., et al. (2007). Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer Cell* 11, 321–333.
- Wu, X., Hepner, K., Castelino-Prabhu, S., Do, D., Kaye, M.B., Yuan, X.J., Wood, J., Ross, C., Sawyers, C.L. und Whang, Y.E. (2000). Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4233–4238.
- Xia, D., Srinivas, H., Ahn, Y.-H., Sethi, G., Sheng, X., Yung, W.K.A., Xia, Q., Chiao, P.J., Kim, H., Brown, P.H., et al. (2007). Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 3507–3519.
- Xu, X., Ehdai, B., Ohara, N., Yoshino, T. und Deng, C.-X. (2010). Synergistic action of Smad4 and Pten in suppressing pancreatic ductal adenocarcinoma formation in mice. *Oncogene* 29, 674–686.
- Yamada, K.M. und Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J. Cell. Sci.* 114, 2375–2382.
- Yamada, K.M. und Kemler, R. (2002). Cell-to-cell contact and extracellular matrix. Editorial overview. *Current Opinion in Cell Biology* 14:527–530
- Yang, B., Gay, D.L., MacLeod, M.K.L., Cao, X., Hala, T., Sweezer, E.M., Kappler, J., Marrack, P. und Oliver, P.M. (2008). Nedd4 augments the adaptive immune response by promoting ubiquitin-mediated degradation of Cbl-b in activated T cells. *Nat. Immunol.* 9, 1356–1363.

- Yang, B. und Kumar, S. (2010). Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ.* 17, 68–77.
- Yang, H., Minamishima, Y.A., Yan, Q., Schlisio, S., Ebert, B.L., Zhang, X., Zhang, L., Kim, W.Y., Olumi, A.F. und Kaelin, W.G., Jr (2007). pVHL acts as an adaptor to promote the inhibitory phosphorylation of the NF-kappaB agonist Card9 by CK2. *Mol. Cell* 28, 15–27.
- Yilmaz, M. und Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15–33.
- Yim, E.-K., Peng, G., Dai, H., Hu, R., Li, K., Lu, Y., Mills, G.B., Meric-Bernstam, F., Hennessy, B.T., Craven, R.J., et al. (2009). Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function. *Cancer Cell* 15, 304–314.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. und Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345–347.
- Yoo, L.I., Liu, D.W., Le Vu, S., Bronson, R.T., Wu, H. und Yuan, J. (2006). Pten deficiency activates distinct downstream signaling pathways in a tissue-specific manner. *Cancer Res.* 66, 1929–1939.
- Young, A.P., Schlisio, S., Minamishima, Y.A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S. und Kaelin, W.G., Jr (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat. Cell Biol.* 10, 361–369.
- Yuen, J.S.P., Cockman, M.E., Sullivan, M., Protheroe, A., Turner, G.D.H., Roberts, I.S., Pugh, C.W., Werner, H. und Macaulay, V.M. (2007). The VHL tumor suppressor inhibits expression of the IGF1R and its loss induces IGF1R upregulation in human clear cell renal carcinoma. *Oncogene* 26, 6499–6508.
- Zabarovsky, E.R., Lerman, M.I. und Minna, J.D. (2002). Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* 21, 6915–6935.
- Zalvide, J., Stubdal, H. und DeCaprio, J.A. (1998). The J domain of simian virus 40 large T antigen is required to functionally inactivate RB family proteins. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1408–1415.
- Zatyka, M., da Silva, N.F., Clifford, S.C., Morris, M.R., Wiesener, M.S., Eckardt, K.-U., Houlston, R.S., Richards, F.M., Latif, F. und Maher, E.R. (2002). Identification of cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by expression array analysis and investigation of cyclin D1 genotype as a modifier in von Hippel-Lindau disease. *Cancer Res.* 62, 3803–3811.
- Zeng, Z.-P., Liu, D.-M., Li, H.-Z., Fan, X.-R., Liu, G.-Q., Yan, W.-G., Tong, A.-L. und Zheng, X. (2006). Expression and effect of adrenomedullin in pheochromocytoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1073, 270–276.
- Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V. und Semenza, G.L. (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11, 407–420.
- Zhang, N., Gong, K., Yang, X.-Y., Xin, D.-Q. und Na, Y.-Q. (2006). [Expression of hypoxia-inducible factor-1-alpha, hypoxia-inducible factor-2alpha and vascular endothelial growth factor in sporadic clear cell renal cell carcinoma and their significance in the pathogenesis thereof]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 86, 1526–1529.
- Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A.C., Hiller, D.J., Chen, A.-J., Perry, S.R., Tonon, G., Chu, G.C., Ding, Z., et al. (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 455, 1129–1133.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B. und Hung, M.C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 3, 973–982.

Zhou, M.I., Foy, R.L., Chitalia, V.C., Zhao, J., Panchenko, M.V., Wang, H. und Cohen, H.T. (2005). Jade-1, a candidate renal tumor suppressor that promotes apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11035–11040.

Zhou, M.I., Wang, H., Ross, J.J., Kuzmin, I., Xu, C. und Cohen, H.T. (2002). The von Hippel-Lindau tumor suppressor stabilizes novel plant homeodomain protein Jade-1. *J. Biol. Chem.* 277, 39887–39898.

Zhou, X.-P., Marsh, D.J., Morrison, C.D., Chaudhury, A.R., Maxwell, M., Reifenberger, G. und Eng, C. (2003a). Germline inactivation of PTEN and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway cause human Lhermitte-Duclos disease in adults. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1191–1198.

Zhou, X.-P., Waite, K.A., Pilarski, R., Hampel, H., Fernandez, M.J., Bos, C., Dasouki, M., Feldman, G.L., Greenberg, L.A., Ivanovich, J., et al. (2003b). Germline PTEN promoter mutations and deletions in Cowden/Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome result in aberrant PTEN protein and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 404–411.

van Zijl, F., Krupitza, G. und Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat. Res.* 728, 23–34.

Zimmer, M., Doucette, D., Siddiqui, N. und Iliopoulos, O. (2004). Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL^{-/-} tumors. *Mol. Cancer Res.* 2, 89–95.

7 Anhang

Publikationsliste und Kongressbeiträge

Schneider, E., **Keppler, R.**, Prawitt, D., Steinwender, C., Roos, F.C., Thüroff, J.W., Lausch, E. und Brenner, W. (2011). Migration of renal tumor cells depends on dephosphorylation of Shc by PTEN. *Int. J. Oncol.* 38, 823–831.

Lausch E, **Keppler R**, Hilbert K, Cormier-Daire V, Nikkel S, Nishimura G, Unger S, Spranger J, Superti-Furga A, Zabel B. (2009). Mutations in MMP9 and MMP13 determine the mode of inheritance and the clinical spectrum of metaphyseal anadysplasia. *Am J Hum Genet.* 85(2):168-78. Epub 2009 Jul 16. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2009 Sep;85(3):420.

Spangenberg, C., Lausch, E. U., Trost, T. M., Prawitt, D., May, A., **Keppler, R.**, Fees, S. A., Reutzel, D., Bell, C., Schmitt, S., Schiffer, I. B., Weber, A., Brenner, W., Hermes, M., Sahin, U., Türeci, Ö., Koelbl, H., Hengstler, J. G., Zabel, B. U. (2006). ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the 5 β 1 Integrin Fibronectin Receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. *Cancer Research* 66: 3715-3725.

Keppler R., Steinwender C., Reicherter K., Zabel B., Lausch E. The additional effect of VHL and PTEN mutations in tumour development. *European Human Genetics Conference 2012* (Nürnberg)

Lausch E., **Keppler R.**, Maas E., Zabel B., Niemeyer C., Rössler J. Vascular malformations and soft tissue tumours in segmental overgrowth disorders respond to mTOR inhibitors, in spite of normal PTEN and AKT1 function. *European Human Genetics Conference 2012* (Nürnberg)

Reicherter K., Lausch E., Hermanns P., **Keppler R.**, Steinwender C., Welting T.J.M., Zabel B. The mutation makes the difference - Analysis of RMRP transcript. *European Human Genetics Conference 2012* (Nürnberg)

Steinwender C., Fees S., Spangenberg C., Prawitt D., Bockamp E., **Keppler R.**, Reicherter K., Zabel B., Lausch E. A conditional mouse model for granulosa cell tumour driven by WT1. *European Human Genetics Conference 2012* (Nürnberg)

Keppler R., Zabel B., Lausch E. VHL and PTEN cooperation in tumour development. *Keystone Symposia, Cancer and Metabolism / Advances in Hypoxic Signaling 2012* (Banff, Kanada)

Keppler R., Reutzel D., Bockamp E., Steinwender C., Reicherter K., Zabel B., Lausch E. VHL and PTEN act cooperatively in tumour suppression. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2011 (Regensburg)

Reicherter K., Lausch E., Hollander S., **Keppler R.**, Steinwender C., Welting T.J.M., Zabel B. Do RMRP mutations affect telomerase function? Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2011 (Regensburg)

Steinwender C., Fees S., Spangenberg C., Prawitt D., Bockamp E., **Keppler R.**, Reicherter K., Zabel B., Lausch E. WT1 is a stem cell factor in early haematopoiesis. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2011 (Regensburg)

Danksagung

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Romy Keppler