



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# Hypoxins effekter på tumörceller

*Stina Bithén*

---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011: 29

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2011

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## Hyroxins effekter på tumörceller

The effects of hypoxia on tumor cells

*Stina Bithén*

**Handledare:**

Eva Hellmén, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

**Examinator:**

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2011

**Omslagsbild:** -

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011: 29  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Hypoxi, tumör, hypoxi-inducerad faktor, metastas, tumörprogression

**Key words:** Hypoxia, tumor, hypoxia-inducible factor, metastasis, cancerprogression



# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING.....	1
SUMMARY .....	2
INLEDNING .....	2
MATERIAL OCH METODER .....	3
LITTERATURÖVERSIKT .....	3
Hypoxi hos tumörer .....	3
<i>DNA instabilitet vid hypoxi</i> .....	4
Hypoxia-inducible factor .....	4
<i>Hypoxia-inducible factor 1</i> .....	4
<i>Hypoxia-inducible factor 2<math>\alpha</math></i> .....	6
<i>Studier kring HIF-1<math>\alpha</math> och HIF-2<math>\alpha</math></i> .....	6
<i>Hypoxia-inducible factor 3<math>\alpha</math></i> .....	7
DISKUSSION.....	7
REFERENSER .....	9

## **SAMMANFATTNING**

I denna litteraturstudie har jag tagit del av den forskning som hittills gjorts på hypoxins effekter på tumörceller. De flesta tumörer utsätts för någon form av hypoxi under dess utveckling eftersom tumörer växer ifrån sin blodtillförsel.

I studier har det visats att en hypoxisk miljö leder till ett instabilt genom vilket, via naturlig selektion, kan bidra till utvecklingen av mer aggressiva tumörer. Under 90-talet hittades två nya transkriptionsfaktorer som aktiverades av hypoxi, dessa visade sig mycket lika både till gensekvens och funktion och namngavs hypoxia-inducible factor 1 och 2 (HIF-1-2). Senare hittades även en tredje HIF som bevisats vara en negativ feed-back till HIF-1. Hypoxin har även visat sig, via de hypoxi-inducerade faktorerna 1 och 2, leda till gentranskription av protein fördelaktiga för tumörens progression och metastasering. Bland annat induceras VEGF, som leder angiogenesisen, av HIF-1. Många studier har genomförts för att kartlägga tumörförlopp mellan HIF-uttryckande celler och celler där HIF-uttrycket saknats men dessa har gett varierande och i vissa fall helt motsägande resultat. Detta kan bero på vilka metoder som använts och vilken celltyp man nyttjat, eftersom man sett att vilket genuttryck hypoxi ger upphov till beror på vilken HIF som induceras och i vilken celltyp de induceras i. Resultaten tyder på att HIF har en positiv påverkan på tumörutvecklingen i vissa tumörer men att den inte är en begränsande faktor för progression och metastasering i all cancer.

## **SUMMARY**

I have, in this literature review, taken part in the research that until now have been conducted on the effects of hypoxia on tumor cells. Most tumors are exposed to hypoxia to some extent during its development because tumors outgrow their blood supply.

It has been shown in studies that a hypoxic environment lead to an unstable genome which, through natural selection, can contribute to the development of more aggressive tumors. In the 1990's two new transcription factors was found that was activated by hypoxia, it was shown that they were alike in both their genetic sequence and function and they were named hypoxia-inducible factor 1 and 2 (HIF-1-2). Later on a third HIF was found, that proved to be a negative feedback mechanism for HIF-1. Hypoxia has proven, through the hypoxia-inducible factors 1 and 2, to induce gene transcription of proteins that are beneficial for tumor progression and metastasis. Among others HIF-1 induces VEGF, an important factor in the angiogenesis. Several studies have been conducted aimed to analyze the effects of HIF in tumor progression but the results are varying and in some cases completely contradicting. This is due to the use of different methods and which cell type was used, since different genetic expression is seen depending on which HIF is induced and which cell type they are induced in. The results indicate that HIF has a positive effect on tumor development in some tumors but is not a limiting factor for progression and metastasis in all cancers.

## **INLEDNING**

Metastaseringen hos tumörer har i lång tid förbryllat forskarna och en massiv forskningsinsats kring dess mekanism har pågått länge. Även om man i mångt och mycket dragit slutsatser om vilka proteiner som uppregleras och vilka som behövs i metastaskaskaden har en gemensam initieringsmekanism saknats. Vikten av att finna en sådan är stor eftersom man då kan utveckla läkemedel som riktar in sig och hämmar hela metastasen vilket vore ovärderligt i behandlingen av cancer.

Att tumörer utsätts för hypoxi på grund av deras överdrivna tillväxt är ett välkänt faktum men har ansetts vara ett problem för behandlingen mer än något annat (Thomlinson & Gray, 1955). Men efter upptäckten av HIF-1 har forskningen kring hypoxins effekt på tumörprogression tagit fart (Wang et al., 1995). I denna litteraturstudie har jag tagit del av forskningen både för och emot att hypoxi leder till en ökad aggressivitet hos tumörer med frågeställningarna:

- Initierar hypoxi tumörprogression och metastasering?
- Krävs hypoxi för tumörprogression?

## **MATERIAL OCH METODER**

Litteratursökningen har jag valt att genomföra genom att plocka ut relevanta sökord såsom ”hypoxia”, ”metastasis”, ”hypoxia-inducible factor” och ”cancer progression” som jag sedan trunkerat eller lagt till olika ändelser och synonymer. Dessa sökord har jag sedan satt ihop och sökt i Science direct, PubMed, Google scholar samt Web of knowledge. Jag har även valt att läsa ett antal reviews och sedan letat reda på deras intressanta referenser via google scholar. Allt eftersom jag hittat mina artiklar har jag även tittat på deras referenser för att se om jag hittar något relevant.

## **LITTERATURÖVERSIKT**

### **Hypoxi hos tumörer**

Den första studien som kartlade hypoxi hos tumörer tittade på histologiska snitt av human lungcancer (Thomlinson & Gray, 1955). De tittade på 160 snitt och fann att alla tumörer som hade en radie på över 200  $\mu\text{m}$  hade ett nekrotiskt centrum medan ingen tumör under 160  $\mu\text{m}$  innehöll central nekros. Det fanns inte heller en viabel tumörcell längre från stroman än 180  $\mu\text{m}$  oberoende av hur stor tumörens radie var. Eftersom de inte hade exakta värden i hur syremättnaden i tumören var kunde inte anledningen till nekrosen fastställas, men i beräkningen på 13 värden från en tidigare studie uppskattade Thomlinson och Gray (1955) att total anoxi uppkom i mitten av en tumör med en radie på 150  $\mu\text{m}$ .

I början av 1990-talet introducerades en elektrod som kunde mäta syresättningen i vävnader mer tillförlitligt än tidigare och visade att brösttumörer hade en kraftigt sänkt syresättning i jämförelse med normal bröstvävnad (Vaupel et al., 1991). Medelvärden i normal bröstvävnad var i denna studie 65 mm Hg medan medelvärdet för de maligna tumörerna låg på 30 mm Hg. Av de maligna tumörerna hade 40% ett värde på mellan noll och 2,5 mm Hg och resten hade värden jämförbara med den normala bröstvävnaden. Tumörerna delades in i fyra olika



tumörstadiet och jämfördes sedan med avseende på syresättningen i tumörerna. I ljuset av denna studie kunde man inte koppla syresättningen till tumörens dåvarande stadium, och därför drogs slutsatsen att hypoxi inte bidrog till progression hos tumörer.

En annan studie genomfördes med samma metod och där följdes 108 kvinnor med diagnostiserad malign cervixcancer under sex år (Höckel et al., 1996). Tumörstorleken som krävdes för att ingå i studien var över 3 cm eftersom metodens validitet kunde ifrågasättas vid mindre tumörstorlekar. Kvinnornas tumörer hade ett medelvärde av syresättning på 12,5 mmHg och de individuella värdena kunde inte korreleras till patientens ålder, klimakteriestatus, rökning eller hemoglobinnivåer. Man såg heller inga samband mellan syresättningen och tumörstadium eller storlek. Däremot involverade de hypoxiska tumörerna (<10 mmHg) i större utsträckning lymf-kärlsystemet och spreds mer frekvent parametrialt i jämförelse med de högre syresatta tumörerna. Under uppföljningsåren behandlades de flesta kvinnorna (90 st) enligt standardmetoder varav en del fick återfall och behandlades upprepade gånger. För de patienter med hypoxiska tumörer visade det sig, vid studiens slut, att de hade en signifikant högre risk för återfall och en minskad överlevnad. Syremättnaden var den enskilt starkaste indikatorn för överlevnad och återfall, oberoende av patientens behandling.

### ***DNA-instabilitet vid hypoxi***

Enligt Reynolds et al. (1996) såg man en signifikant högre frekvens av mutationer i en cellinje som utsattes för hypoxiska förhållanden efter försök i möss kontra odling i standardförhållanden på platta. För att kontrollera att det var hypoxin som gav upphov till den ökade frekvensen mutationer, i de celler som inplanterats i möss, utsattes senare cellerna som odlats på platta för hypoxi. Resultaten blev en 3,4 gånger högre frekvens mutationer efter en exponering på 4 h med ett syretryck mindre än 1 mmHG, vilket indikerar att hypoxi i sig leder till genetisk instabilitet.

För att undersöka vad som gav upphov till den ökade mutagenisiteten vid hypoxi gjordes forskning på hur väl DNA-repareringsmekanismerna fungerade under hypoxiska förhållanden (Yuan et al., 2000). Forskargruppen fann att celler som utsattes för hypoxi samt pH 6,5 har en minskad kapacitet att reaktivera UV-skadade plasmider jämfört med kontrollceller. Vidare utsattes celler för UV-strålning och fick sedan växa i kultur antingen under standardförhållanden eller under hypoxi vid pH 6.5 i en vecka. Därefter kontrollerades antal mutationer i en supFGI-gen som introducerats i cellerna via en vektor. Resultaten var att de celler som utsattes för hypoxi och lågt pH efter UV-strålning hade en högre frekvens mutationer än de icke bestrålade cellerna samt de bestrålade cellerna som odlats i standardmiljö. Slutsatser från denna studie blev att hypoxi i samband med surt pH gav en minskad effektivitet av de mekanismer som reparerar UV-skador i DNA vilket kan vara en av anledningarna till den ökande mutagenisiteten i hypoxiska celler.

### **Hypoxia-inducible factor**

#### ***Hypoxia-inducible factor 1***

Under 90-talet fann man en ny typ av transkriptionsfaktor, som inducerades av syrebrist, vilken gavs namnet Hypoxia-inducible factor 1, HIF-1(Wang et al., 1995). Det visades att

HIF-1 var uppdelad i två delar, HIF-1 $\alpha$  och HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\beta$  var en isoform av ARNT, aryl carbon receptor nuclear translocator protein, och hör tillsammans med HIF-1 $\alpha$  till gruppen PAS-proteiner. I denna studie fann man även två till isoformer av HIF-1 $\beta$  men dessa analyserades inte vidare. Tillsammans utgör HIF-1 $\alpha$  och HIF-1 $\beta$  en heterodimer som regleras av hypoxi. I en senare studie klargjordes att det var HIF-1 $\alpha$  som reglerades av syre men även av CoCl<sub>2</sub> och järn medan HIF-1 $\beta$  (ARNT) uttrycktes konstitutionellt (Pugh et al., 1997). HIF-1 $\alpha$  visade sig ha två reglerande domäner som vid normoxi gav en instabilitet i proteinet och som stabiliserades vid hypoxi.

Hittills har man funnit över 60 gener som regleras av HIF-1 $\alpha$  men man har sett en variation i vilka av dessa gener som uttrycks beroende på vilken celltyp HIF-1 $\alpha$  induceras i (Semenza, 2003). Många av dessa gener är associerade med progression och malignisering hos tumörer, bl.a styrs uttrycket av vascular endothelial growth factor (VEGF) till stor del av HIF-1 vid hypoxiska förhållanden, som stimulerar till angiogenes (Forsythe et al., 1996). Även metaboliska förändringar i hypoxiska celler styrs av HIF-1, där HIF-1 visat sig öka den anaeroba fermentationen och sänka den oxidativa fermentationen bland annat genom att inducera uttrycket av GLUT-1 (Seagroves et al., 2001). I studien användes fibroblastceller och resultaten visade på att den HIF-1-inducerade metabola förändringen gav en ökad celltillväxt under hypoxi, i kontrast till de celler där HIF-1 uttrycket raderats via knock-in mutationer.

En annan studie gjord av Ryan et al. (2000) visade att en fibroblastcellinje som uttryckte HIF-1 $\alpha$  hade en tydlig och signifikant högre tillväxt än dess motsvarande fibroblastcellinje där HIF-1 $\alpha$  uttrycket tagits bort, i likhet med ovanstående studie. Detta trots att tumörvaskulariseringen i de olika tumörtyperna inte skiljde sig åt.

I motsats till ovanstående studier fann Carmeliet et al. (1998) att i HIF-1 $\alpha$  uttryckande embryonala stamceller var proliferationen sänkt och apoptosfrekvensen högre än i stamceller där HIF-1 $\alpha$  saknades, trots att uttryck av VEGF och GLUT-1 endast visade sig i de HIF-1 $\alpha$  uttryckande cellerna.

För att reda ut HIF-1 $\alpha$ :s roll vid cancerprogression gjordes en studie där man tittade på överuttryck av detta protein i olika tumörtyper och tumörstadier (Zhong et al., 1999). Man använde histologi där man färgade in preparaten, som kom från kirurgiska rutiningrepp, med immunohistokemi mot HIF-1 $\alpha$ . Resultaten var att 88% av de normala vävnadsproverna inte infärgade HIF-1 $\alpha$  medan de resterande 12% visade svaga tecken på HIF-1 $\alpha$  i cellerna. 13 av de 19 olika primära maligna tumörtyper som undersöktes visade ett överuttryck av HIF-1 $\alpha$ , totalt av alla primära maligna tumörprover (131 st) visade 53% på ett överuttryck. Av de 36 metastaserna visade 67% av dessa på ett onormalt HIF-1 $\alpha$  uttryck, som exempel visade de primära brösttumörerna bara 29 % överuttryck medan bröstmetastaserna hade 69% överuttryck, vilket tyder på att HIF-1 $\alpha$  ger ett övertag vid metastasering. Av de tolv benigna prover man tagit visade ingen av dessa på ett onormalt HIF-1 $\alpha$  uttryck. Bilden av HIF-1 $\alpha$ :s utbredning inom en tumör var att höga koncentrationer fanns i cellerna runt de nekrotiska områdena, runt nybildade kärl och i kanten där invasion kunde ske. I en blindad uppföljning

färgades sedan preparaten in mot p53 vilket gav en positiv korrelation mellan HIF-1 $\alpha$  överuttryck och ackumulering av p53.

De flesta studier på experimentell cancer och HIF-1 har använt sig av maligna cellinjer som sedan injicerats i djur. Liao et al. (2007), undersökte istället hela förloppet av tumörinitiering och metastasprogression i en musmodell för brösttumörer. I studien användes transgena mushonor som utvecklade epiteliära brösttumörer som antingen uttryckte HIF-1 $\alpha$  eller där en knock-out metod användes för att få fram möss som saknade HIF-1 $\alpha$ . Resultatet av studien visade på en tidigare initiering, minskad överlevnad och ökad frekvens lungmetastaser hos de möss som uttryckte HIF-1 $\alpha$ . Däremot utvecklade alla möss maligna brösttumörer vilket tyder på att HIF-1 $\alpha$  inte krävs för utvecklingen av brösttumörer hos möss. I samma studie undersökte man sedan tumörcellernas invasivitet *in vitro*. Ingen signifikant skillnad sågs mellan celltyperna vad gällde slumpartad motilitet men en klar skillnad sågs när man tittade på kemotaktisk migration, slumpartad invasion och kemotaktiskt styrd invasion. Där hade, under hypoxiska förhållanden, HIF-1 $\alpha$  typen en klart ökad aktivitet.

### ***Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$***

Ytterligare ett HIF-protein har funnits, endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1 eller HIF-2 $\alpha$ ), som har 48% sekvenslikhet med HIF-1 $\alpha$  (Tian et al., 1997). I studien visades att HIF-2 $\alpha$  kunde binda till ARNT och tillsammans aktivera gentranskription och att HIF-2 $\alpha$  inducerades vid hypoxi. Vidare sågs att både HIF-2 $\alpha$  och HIF-1 $\alpha$  uttrycktes i alla vävnader men att distributionen av mängden skiljde sig mellan typerna, HIF-2 $\alpha$  uttrycktes i betydligt högre grad i endoteliära vävnader vilket gav upphov till dess namn. Studien indikerade även på att det fanns skillnader i vilket gensvar som inducerades av HIF-1 $\alpha$  respektive HIF-2 $\alpha$ , trots deras många likheter.

### ***Studier kring HIF-1 $\alpha$ och HIF-2 $\alpha$***

I en kohortstudie där man tittade på överuttryck av HIF-1 $\alpha$  och HIF-2 $\alpha$  vid colorektalcancer och prognos i ett stort antal fall, fann man en signifikant förkortad överlevnad vid överuttryck av HIF-1 $\alpha$ , som uttrycktes i 19% av tumörerna (Baba et al., 2010). HIF-2 $\alpha$  överuttrycktes däremot i 46 % av fallen men man såg ingen signifikant skillnad i överlevnadstid mellan HIF-2 $\alpha$  överuttryckta fall och övriga fall.

I en nyligen presenterad artikel tittade man på skillnaderna i tre cellinjer av klarcellig njurcancer (clear-cell renal cell carcinoma); en där endast HIF-1 $\alpha$  uttrycktes, en där endast HIF-2 $\alpha$  uttrycktes och en kontrollinje (Biswas et al., 2010). Dessa injicerades sedan i möss och förloppet kartlades. Fynden från studien var att de celler som överuttryckte HIF-2 $\alpha$  hade en högre tillväxt än de andra grupperna samt att cellinjen som överuttryckte HIF-1 $\alpha$  hade en långsammare tillväxt än både HIF-2 $\alpha$  cellerna och kontrollcellerna.

En annan studie som även den tittade på skillnaderna mellan HIF-1 $\alpha$  och HIF-2 $\alpha$ , använde hepatocellulära carcinomceller (Menrad et al., 2010). Här använde man en knock-down metod för att cellen skulle tappa uttrycket av antingen HIF-1 $\alpha$  (benämndes sh1 $\alpha$ ) eller HIF-2 $\alpha$  (benämndes sh2 $\alpha$ ) vilket visade sig ge ett ökat uttryck av den andra  $\alpha$ -subenheten, alltså slog

man ut HIF-1 $\alpha$  uppreglerades uttrycket av HIF-2 $\alpha$  och vice versa. Man använde även en wild-type-linje (WT) och en linje där man slog ut HIF-1 $\beta$  (benämndes sh1 $\beta$ ). Testerna visade att både sh1 $\alpha$  och sh2 $\alpha$  fick en signifikant högre tillväxt och lägre hypoxi-inducerad apoptos än både WT och sh1 $\beta$ . Vidare tittade man på mängden proapoptotiska och antiapoptotiska protein som uttrycktes i cellerna för att ta reda på varför sh1 $\alpha$  och sh2 $\alpha$  hade en minskad apoptosfrekvens. Testerna visade på att sh1 $\alpha$  och sh2 $\alpha$  hade signifikant lägre uttryck av proapoptotiskt protein (kluvet kaspas-3) än WT och sh1 $\beta$  samt ett högre uttryck av Bcl-X<sub>L</sub> (antiapoptotiskt protein). Vidare hade sh1 $\alpha$  och sh1 $\beta$  ett minskat uttryck av proapoptotiska Bax men detta var oförändrat hos sh2 $\beta$ . Avslutningsvis ville de titta på om tillväxteffekterna kom av överuttryck av en  $\alpha$ -subenhet genom att i en sh2 $\alpha$  även slå ut HIF-1 $\alpha$ , resultaten blev en tillväxthastighet i likhet med sh1 $\beta$  samt en ökning av uttrycket av kaspas-3 och en minskning av uttrycket av antiapoptotiska proteiner. Detta tyder på att det var överuttrycket av HIF-1 $\alpha$  som gav sh2 $\alpha$ :s överlevnadsfördel.

### ***Hypoxia-inducible factor 3 $\alpha$***

En sista  $\alpha$ -subenhet som hittats namngavs HIF-3 $\alpha$  (Gu et al., 1998). Den delar 57% sekvenslikhet med HIF-1 $\alpha$  och 53% med HIF-2 $\alpha$  och fanns, såsom även dess familjemedlemmar, kunna binda till ARNT (HIF-1 $\beta$ ). Studien visade att även HIF-3 $\alpha$  var hypoxiinducerad men resultaten indikerade på att heterodimeren HIF-3 $\alpha$  och ARNT inte hade samma potens i sin transkription som HIF-1 $\alpha$  och HIF-2 $\alpha$ .

Senare forskning indikerar på att HIF-3 $\alpha$ , även kallad IPAS (inhibitory PAS protein), hämmar HIF-1 $\alpha$  genom att binda till både  $\alpha$  och  $\beta$ -subenheten och förhindra gentranskription vid hypoxi (Jang et al., 2005). De fann att gensekvensen för HIF-3 $\alpha$  kunde genomgå s.k. alternativ splicing och hittade genom detta tre proteiner som namngavs IPAS1, IPAS2 och IPAS3. Därefter klonades IPAS1 och IPAS2 fram från humant DNA och deras regulatoriska effekt på HIF-1 $\alpha$  kartlades. Studiens resultat var att HIF-1 $\alpha$  leder till en transkription av både IPAS1 och IPAS2 samt att dessa båda protein i sin tur kunde nedreglera uttrycket av HIF-1 $\alpha$ . Utöver detta såg man att uttryck av IPAS1 och IPAS2 gav en inhibering av den hypoxi-medierade angiogenesisen. Detta tyder på att HIF-3 $\alpha$  fungerar som en negativ feed-back-mekanism för HIF-1 $\alpha$ .

## **DISKUSSION**

I denna litteraturstudie har jag försökt reda ut i vilken grad hypoxi och de hypoxi-initierande mekanismerna påverkar tumörprogression och metastasering. Delvis tycker jag mig ha funnit vedertagna effekter av hypoxin men mycket är fortfarande debatterat, framför allt kring de hypoxi-inducerade faktorerna.

Efter denna litteraturstudie kan man inte dra slutsatsen att hypoxi är en initieringsmekanism för metastaseringen hos alla tumörer, och med vetskapen om hur enormt heterogena tumörer är, tror jag att varken jag eller någon annan kommer finna en sådan mekanism. Däremot pekar mycket på att hypoxi och den stress som den utsätter tumörcellerna för stimulerar

tumörprogressionen genom att öka mutationerna (Reynolds et al., 1996) vilket under selektionstrycket leder till en ökad aggressivitet hos tumörer. Detta visade Höckel et al. (1996) i sin studie där de följt kvinnor med malign cervixcancer under 6 år. Resultaten indikerade starkt på en tydlig bild av att de hypoxiska tumörerna gav en mer aggressiv och dödlig form av cervixcancer. Fem år tidigare hade en studie publicerats där man använt samma metod för att mäta syresättningen, men istället dragit slutsatsen att hypoxi inte främjade tumörprogressionen (Vaupel et al., 1991). Denna studie var dock bara en punktstudie, och att dra slutsatser från ett syretryck och det stadie tumören i dåvarande stund befann sig i känns inte relevant eftersom man inte såg hur de hypoxiska/icke hypoxiska tumörerna utvecklades. Förutom detta så användes inga exklusionskriterier vad gällande tumörstorlek vilket Höckel et al. (1996) gjort då metoden för syremätning ansågs osäker hos tumörer på en storlek under tre cm.

För att en tumörcell ska kunna metastasera krävs en kraftig förändring av cellens genotyp, så att den förlorar många regleringsmekanismer och antar en aggressiv fenotyp långt från cellens ursprungsfunktion. Hypoxins ökning av mutageniciteten bidrar till förändringen av cellens genotyp men man har även sett att de hypoxi-inducerade faktorerna kan tillföra fördelar för metastaseringsprocessen. I studien som Zhong et al. (1999) publicerade såg man att de sekundära tumörerna hade en ökad frekvens av överuttryck av HIF-1 $\alpha$  i motsats till de primära maligna tumörerna, vilket indikerar på att HIF-1 $\alpha$  främjar metastaseringen. Förutom detta såg man, i de primära tumörerna, att uttrycket av HIF-1 $\alpha$  var som starkast i cellerna runt blodkärl och i de invasiva zonerna vilket också pekar på betydelsen av HIF-1 $\alpha$  vid invasion och metastasering. Även i studien där man undersökt effekterna av HIF-1 $\alpha$  hos transgena möss som utvecklade brösttumörer, visade de HIF-1 $\alpha$  uttryckande mössen en högre frekvens lungmetastaser än de mushonor som saknade HIF-1 $\alpha$  (Liao et al., 2007). Däremot utvecklade även alla mushonor som saknade HIF-1 $\alpha$ , om än med en senare initiering, brösttumörer. Detta tyder på att HIF-1 $\alpha$  uttryck främjar tumörinitiering, progression och metastasering men inte är ett absolut krav för tumörutveckling.

Studierna kring de hypoxi-inducerade faktorerna har än så länge givit väldigt motstridiga resultat. En uppsjö av studier har genomförts där man använt olika celltyper och olika metoder vilket jag tror är två stora anledningar till diskrepansen. Att HIF aktiverar olika gener beroende på vilken celltyp HIF induceras i (Semenza, 2003) och vilken  $\alpha$ -subenhet som uppregleras (Tian et al., 2007) är känt och det tror jag är en del av svaret på varför studierna får olika resultat. Bland annat visade två studier på att HIF-1 $\alpha$  uttryck i fibroblastceller gav en ökad tillväxt (Ryan et al., 2000; Seagroves et al., 2001) medan HIF-1 $\alpha$  uttryck i klarcellig njurcancer gav en sänkt tillväxt. I den senare tumörtypen gav istället HIF-2 $\alpha$  en ökad tillväxt (Biswas et al., 2010). Detta pekar på att de hypoxi-inducerade faktorerna inte alltid har en roll i tumörprogressionen men ger en klar fördel för tillväxt i en del tumörformer.

Den nyligen upptäckta mekanismen, att knock-down av den ena  $\alpha$ -subenheten ger ett överuttryck av den andra, är väldigt viktig (Menrad et al., 2010). Detta behöver såklart verifieras i fler studier, men stämmer denna mekanism måste man fundera på om de tidigare studierna, som endast tittat på HIF-1 $\alpha$  via olika knock-down modeller, är tillförlitliga. Detta

på grund av att dessa metoder i så fall studerat ett överuttryck av HIF-2 $\alpha$  istället för en förlust av HIF-1 $\alpha$ .

En annan metod som använts är när man injicerat djur med tumörceller subkutant för att sedan se hur cellerna utvecklas i en hypoxisk miljö i kroppen. Detta är inte en optimal metod eftersom man inte studerar hur tumören initieras och progredierar i dess naturliga miljö, utan sätter in celler med en bestämd fenotyp i en omgivning som saknar dess naturliga miljöuttryck. Det ger förändrade förutsättningar vilket i sin tur kan leda till resultat som inte stämmer med verkligheten.

Vad jag tycker är viktigt att tänka på är att flera studier visat på att både HIF-1 $\alpha$  och HIF-2 $\alpha$  ofta överuttrycks i tumörer, och detta är visat i ett antal olika tumörtyper (Zhong et al., 1999; Baba et al., 2010). Det faktum att de hypoxi-inducerade faktorerna 1 och 2 överuttrycks i en del tumörer tycker jag indikerar på att dessa faktorer selekteras fram under tumörprogressionen. Som jag ser det skulle inte överuttryck ses hos en så stor del av de maligna tumörerna om de hypoxi-inducerade faktorerna skulle ha hämmande effekt, vilket vissa studier pekar på (Carmeliet et al., 1998; Biswas et al., 2010).

Som avslutning vill jag betona att efter upptäckten av HIF-1 $\alpha$  och den potential som en reglerande faktor vid tumörutvecklingen skulle innebära, har forskningen runt hypoxi och de hypoxi-inducerade faktorerna varit enorm. Dock har olika forskningsresultat uppnåtts och frågan om de hypoxi-inducerade faktorernas effekter är omstridda. Enligt min mening har inte forskningen bevisat att hypoxi och dess inducerade faktorer har en överordnad roll i all cancerinitiering, progression eller metastasering. Däremot tror jag att dess effekter hos vissa tumörformer är viktiga och kan vara ett mål för framtida terapier, möjligtvis genom användning av HIF-3 $\alpha$  och dess negativa feedback-mekanism.

## REFERENSER

- Baba, Y., Noshio, K., Shima, K., Irahara, N., Chan, A., Meyerhardt, J., Chung, D., Giovannucci, E., Fuchs, C. & Ogino, S. (2010). HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *The American Journal of Pathology*, 176, 2292-2301.
- Biswas, S., Troy, H., Leek, R., Chung, Y., Li, J., Raval, R., Turley, H., Gatter, K., Pezzella, F., Griffiths, J., Stubbs, M. & Harris, A. (2010). Effects of HIF-1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts. *Journal of Oncology*, doi: 757908.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D. & Keshert, E. (1998). Role of HIF-1[ $\alpha$ ] in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394, 485-490.
- Forsythe, J., Jiang, B., Iyer, N., Agani, F., Leung, S., Koos, R. & Semenza, G. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 4604-4613.

- Gu, Y., Moran, S., Hogenesch, J., Wartman, L. & Barfield, C. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 alpha. *Gene expression*, 7, 205-213.
- Höckel, M., Schlenger, K., Aral, B., Mitze, M., Schäffer, U. & Vaupel, P. (1996). Association between Tumor Hypoxia and Malignant Progression in Advanced Cancer of the Uterine Cervix. *Cancer Research*, 56, 4509 -4515.
- Jang, M.S., Park, J.E., Lee, J.A., Park, S.G., Myung, P.K., Lee, D.H., Park, B.C. & Cho, S. (2005). Binding and regulation of hypoxia-inducible factor-1 by the inhibitory PAS proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337, 209-215.
- Liao, D., Corle, C., Seagroves, T.N. & Johnson, R.S. (2007). Hypoxia-Inducible Factor-1? Is a Key Regulator of Metastasis in a Transgenic Model of Cancer Initiation and Progression. *Cancer Research*, 67, 563 -572.
- Menrad, H., Werno, C., Schmid, T., Copanaki, E., Deller, T., Dehne, N. & Brune, B. (2010). Roles of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) versus HIF-2alpha in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51, 2183-2192.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M. & Ratcliffe, P.J. (1997). Activation of Hypoxia-inducible Factor-1; Definition of Regulatory Domains within the ? Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 11205 -11214.
- Reynolds, T.Y., Rockwell, S. & Glazer, P.M. (1996). Genetic Instability Induced by the Tumor Microenvironment. *Cancer Research*, 56, 5754 -5757.
- Ryan, H.E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassman, M., Arbeit, J.M. & Johnson, R.S. (2000). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Research*, 60, 4010-4015.
- Seagroves, T.N., Ryan, H.E., Lu, H., Wouters, B.G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K. & Johnson, R.S. (2001). Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 3436-3444.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 3, 721-732.
- Thomlinson, R.H. & Gray, L.H. (1955). The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy. *British Journal of Cancer*, 9, 539-549.
- Tian, H., McKnight, S.L. & Russell, D.W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & Development*, 11, 72 - 82.
- Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C. & Höckel, M. (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O2 tension measurements. *Cancer Research*, 51, 3316-3322.

- Wang, G.L., Jiang, B., Rue, E.A. & Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5510-5514.
- Yuan, J., Narayanan, L., Rockwell, S. & Glazer, P.M. (2000). Diminished DNA Repair and Elevated Mutagenesis in Mammalian Cells Exposed to Hypoxia and Low pH. *Cancer Research*, 60, 4372 -4376.
- Zhong, H., De Marco, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L. & Simons, J.W. (1999). Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1alpha in Common Human Cancers and Their Metastases. *Cancer Research*, 59, 5830 -5835.