Molekulare und funktionelle Adaptation von Hirntumorstammzellen aus dem humanen Glioblastom an Hypoxie und Oxygenierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

> vorgelegt von Annegret Kathagen aus Rheinberg

> > Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Frau Professor Dr. K. LAMSZUS Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. U. WIENAND Tag der Disputation: 26. Juli 2013

Hamburg, den 11. Juli 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

Für meine Eltern

1 Ell	NLEITUN	IG	1
1.1 GI	liome		1
1.1.1	Das G	ilioblastom (Glioblastoma multiforme)	4
1.1.2	Molek	ularpathologie bei Glioblastomen	5
1.1.3	Thera	pieoptionen bei Glioblastomen	7
1.2 St	ammzell	en	
1.2.1	Adulte	Stammzellen	9
1.2.2	Neura	le Stammzellen	10
1.2.3	Gliobla	astomstammzellen	11
1.2	2.3.1 [Das Adaptationsmodell in Glioblastomen	
1.2.4	Tumo	rstammzellen und Hypoxie	15
1.3 GI	ucosem	etabolismus in Tumorzellen	17
1.3.1	Der Ei	influss von Hypoxie auf den Glucosemetabolismus	20
1.4 Zi	elsetzun	g der Arbeit	21
2 M/	ATERIAL	UND METHODEN	22
21 M	aterialier		22
211	Puffer	und Lösungen	22
212	Medie	n für Zellkultur	23
213	Kits		23
2.1.4	Labor	geräte	
2.1.5	Verbra	auchsmaterial	
	- (1 1		05
Z.Z IVI	Zollku	14. Jr	
2.2.1		Zolllinion	
2.2	2.1.1 Z	Lemmer und Passagieren von Zellen	25
2.2		Kryokonservierung von Zellen	20
2.2	214 A	Auftauen von Zellen	26
2.2	2.1.5 k	Klonogenitätsassav	
2.2	2.1.6 F	Proliferationsassav	
	2.2.1.6.1	EdU Zellproliferationsassav	
	2.2.1.6.2	Manuelle Zellzahlbestimmung	
	2.2.1.6.3	Zellfärbung mittel Kristallviolett	
2.2	2.1.7 [Differenzierung von Glioblastomstammzellen	
2.2	2.1.8 N	- Migrationsassay	
2.2	2.1.9 7	Fierexperimente	31

2.2.2	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.	2.1 RNA-Isolation aus Zellen	32
2.2.	2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.2.	2.3 Reverse Transkription	32
2.2.	2.4 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	33
2.2	2.5 Mikroarray-Analysen	35
2	2.2.2.5.1 Bioinformatische Auswertung	36
	2.2.2.5.1.1 Normalisierung	36
	2.2.2.5.1.2 Cluster-Analyse	37
	2.2.2.5.1.3 Berechnung differenziell regulierter Gene	37
	2.2.2.5.1.4 Biostatistische Klassifizierung der Mikroarray Daten	38
2.2.	2.6 Lentivirale Transduktion	39
2	2.2.2.6.1 Herstellung von lentiviralen Partikeln	40
	2.2.2.6.1.1 Plasmidisolation aus E.coli und Qualitätskontrolle	40
	2.2.2.6.1.2 Kotransfektion von HEK293T-Zellen	40
	2.2.2.6.1.3 Gewinnung von lentiviralen Überständen	41
2	2.2.2.6.2 Bestimmung des Virustiters	41
2	2.2.2.6.3 Lentivirale Transduktion von G55T2 und GS-Zellen	42
2.2.	2.7 Testung lentiviral transduzierter Zellen auf Produktion infektiöser Partikel	42
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	43
2.2.	3.1 Proteinisolation	43
2.2.	3.2 SDS-Plyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE)	43
2.2.	3.3 Immunoblotting (Western Blot)	43
2.2.	3.4 Entfernung gebundener Antikörper (Strippen)	44
2.2.4	Durchflusszytometrische Analysen	45
2.2.	4.1 Analyse der Expression von Stammzellmarker und weiteren intrazelluläre Targets	45
2.2.	4.2 Annexin V Apoptose-Assay	46
2.2.5	Histologische Methoden	47
2.2.	5.1 Histologische Untersuchungen	47
2.2.	.5.2 Immunhistologische Färbungen	48
2.2.	5.3 Tissue Microarray (TMA)	49
2.2.6	Weitere Online Tools	50
2.2.7	Massenspektrometrische Flux Analysen	50
2.2.8	Auswertung und Statistik	52
3 ER	GEBNISSE	53
3.1 Ch	arakterisierung normoxischer und hypoxischer Glioblastomstammzelllinien	53
3.1.1	Morphologie	53
3.1.2	Wachstumsverhalten <i>in vivo</i>	54
3.1.3	Wachstumsverhalten in vitro	56
3.1.4	Klonogenität	56

3.	1.5	Expr	ession v	on Stamm	zellmar	kern						57
3.	1.6	Differenzierbarkeit										
• •	•											
3.2	Ger	nexpre	essionsa	analysen			·····					
3.	2.1		barray-Ai	nalyse und	DIOINTO		Auswe	rtung				
3.	2.2	valid	lierung a	er Genexp	ressior	isdaten aus	aen iv	likroari	ay-Ana	iysen		
3.3	Unt	ersuc	hungen	des me	abolis	chen Flus	ses i	Inter	normox	kischen	und hy	/poxischen
	Bec	lingur	ngen									
3.4	Exp	oressi	onsanal	ysen in Gl	ioblas	tomgeweb	е					75
3.	4.1	In sil _	<i>ico</i> Gene	expression	sanalys	se						75
3.	4.2	Expr	essionsa	inalyse mit	tels Ge	webe-Mikro	barray.					77
3.	4.3	Expr	essionsa	inalyse in (liobla	stomgeweb	e					
3.5	Fun	ktion	elle Ana	lysen der	GS-Ze	Illinien						80
3.	5.1	Unte	rsuchung	g der Prolif	eration	unter norm	noxisch	en und	l hypoxi	ischen B	edingung	jen 80
3.	5.2	Unte	rsuchung	g der Migra	tion ur	nter normox	ischen	und hy	/poxiscl	hen Bedi	ngungen	
3.	5.3	Unte	rsuchun	g der Apop	tose ui	nter normox	ischen	und h	ypoxisc	hen Bedi	ingunger	ı 83
3.6	Fun	ktion	elle Ana	lyse der G	ilykoly	se und des	SPPP.					
3.	6.1	Funk	tionelle	Analyse	der	Glykolyse	und	des	PPP	mittels	shRNA	-vermittelter
	0.0	Heru	nterregu	lation von)		- 4:			
	3.6.	1.1	Validier	ung der sn				erregui	ation vo			
	3.0.	1.2	die Proli	foration	SHRINA	-vennillent		unterre	guiation	I VOIT AL		
	36	13	Auswirk	unden der	shRN/	-vermittelte	n Her	unterre	aulation	n von Al		d G6PD auf
	0.0.	1.0	die Miar	ation	0111 (14)	(vennitent		unterre	guiation			89
	3.6.	1.4	Auswirk	unaen der	shRN/	A-vermittelte	en Her	unterre	aulatior	ר von AL	DOC un	d G6PD auf
			das Wa	chstumsve	rhalten	in vivo				-		
	3.6.	1.5	Auswirk	ungen der	shRN/	A-vermittelte	en Her	unterre	gulatior	n von AL	DOC un	d G6PD auf
			die Klon	ogenität					-			
	3.6.	1.6	Auswirk	ungen der	shRN/	A-vermittelte	en Her	unterre	gulatior	n von AL	DOC un	d G6PD auf
			die Diffe	renzierbar	keit							95
3.	6.2	Funk	tionelle /	Analyse de	r Glyko	olyse und de	es PPF	o mittel	s Inhibit	toren		
	3.6.2	2.1	Einfluss	der Inhibit	ion dei	[.] Glykolyse	und de	es PPP	auf die	Prolifera	ation	97
	3.6.2	2.2	Einfluss	der Inhibit	ion dei	Glykolyse	und de	es PPP	auf die	Migratio	n	
	סופו	VIICO										101
4	ופות	1033								•••••		
4.1	Cha	arakte	risierun	g normoxi	scher	und hypox	ischer	Gliob	lastom	stammze	elllinien.	101
4.	1.1	Morp	hologie.									101
4.	1.2	Expr	ession v	on Stamm	zellmar	kern						102

4	.1.3	Wachstumsverhalten in vivo102
4.	.1.4	Wachstumsverhalten in vitro
4.	.1.5	Klonogenität
4.	.1.6	Differenzierbarkeit
	_	
4.2	G	enexpressionsanalysen105
4.3	Va	lidierung der Genexpressionsdaten aus den Mikroarray-Analysen
4.4	U	ntersuchungen des metabolischen Flusses unter normoxischen und hypoxischen
	Be	edingungen
4.5	E>	xpressionsanalysen in Glioblastomgewebe110
4.6	Fι	Inktionelle Analysen der GS-Zelllinien112
47	Fi	inktionalla Analysa dar Glykolysa und das PPP mittals shRNA-varmittaltar
	He	erunterregulation von ALDOC und G6PD
4	.7.1	Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die
		Proliferation
4.	.7.2	Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die
		Migration
4.	.7.3	Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf das
		Tumorwachstum <i>in vivo</i>
4.	.7.4	Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die
		Klonogenität
4.	.7.5	Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die
		Differenzierbarkeit
10	с.	unktionalla Analysa dar Glykolysa und das PBP mittals Staffwashsalinhihitaran 122
4.0	г. 81	Finfluss der Inhibitoren auf die Proliferation
ч. Д	.0.1 8.2	Einfluss der Inhibitoren auf die Migration
ч.	.0.2	
4.9	Au	ısblick
_		
5	AN	IHANG
5.1	Ζι	ısammenfassung
5.2	Sı	ımmary
5.3	M	aterial und Methoden – Ergänzungen131
5.	.3.1	
5.4	Er	gebnisse der bioinformatischen Mikroarray-Auswertung

5.5	Publikationsverzeichnis	146
5.6	Abkürzungsverzeichnis	147
5.7	Literaturverzeichnis	150
DAN	KSAGUNG	162

1 Einleitung

1.1 Gliome

Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) gehören mit weltweit ca. 240.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu den seltenen onkologischen Erkrankungen¹. In Deutschland liegt die Inzidenzrate für ZNS-Tumore insgesamt bei 5,3 pro 100.000 Einwohnern, wobei Männer mit 6,0 häufiger an Hirntumoren erkranken als Frauen mit 4,5 pro 100.000 Einwohnern¹. Etwa die Hälfte dieser Neuerkrankungen sind primäre Hirntumore. Darunter versteht man alle gut- und bösartigen Neoplasien, die von Zellen des Gehirns, der Meningen, oder der Sellaregion ausgehen². Demgegenüber stehen sekundäre Hirntumore, bei denen es sich um Metastasen anderer Tumoren (z.B. Mammakarzinom) handelt, die sich im Hirn manifestieren³.

Zu den primären Hirntumoren gehören neben überwiegend gutartigen Tumoren wie dem Meningeom und dem Hypophysenadenom auch maligne Tumore. Gliome sind die häufigsten malignen Tumore des zentralen Nervensystems bei Erwachsenen und machen rund 33% aller hirneigenen Neoplasien aus⁴ (Abbildung 1, rötliche Felder). Aufgrund ihrer morphologischen, histologischen und immunhistologischen Ähnlichkeit zu Gliazellen werden der Gliazelltypen in die Gliome entsprechend Tumorfamilien der Astrozytome, Oligodendrogliome und Ependymome eingeteilt⁵, wobei auch Mischformen wie Oligoastrozytome und glioneuronale Tumore existieren.



Abbildung 1: Histologische Verteilung aller primären Tumoren des ZNS (N=98.990). In rot sind alle Tumoren dargestellt, die der Tumorentität der Gliome zugeordnet werden. Die blauen Felder stellen alle Tumore dar, die nicht zu den Gliomen gezählt werden. Abbildung modifiziert nach CBTRUS Statistical Report 2004-2005⁶

Zum Zweck der Klassifizierung der Gliome hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) seit dem Jahr 1979 histologischen Merkmalen Malignitätsgrade zugeordnet⁵. Anhand der Merkmale, wie erhöhter Zelldichte, Pleomorphie (z.B. nukleäre Atypie), der Ausbildung von Tumorgefäßen (Angiogenese), dem Vorhandensein von Nekrosen und dem Grad der Differenzierung, d.h. der morphologischen Ähnlichkeit zu den differenzierten, glialen "Ursprungszellen", werden Gliome seither nach der WHO-Klassifizierung den Malignitätsgraden I bis IV zugeordnet, wobei die Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Graden und Entitäten mit der Zeit immer weiter verfeinert wurde⁷. Maligne Gliome können entweder de novo entstehen, d.h. spontan ohne klinische Vorgeschichte, oder aus einem vormals niedrig gradigeren Tumor als Rezidiv mit einem höheren Malignitätsgrad (WHO-Grad) hervorgehen, was als Progression bezeichnet wird⁸.

Eine Übersicht über die WHO-Klassifizierung der Gliome ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

	Tumortyp	Histologische Klassifizierung	WHO- Grad	Inzidenz	5-Jahres Überlebens- rate
		Pilozytisches Astrozytom	I		94,1%
	Astrozytome	Diffuses Astrozytom	=	20-30%	47,1%
	Astrozytome	Anaplastisches Astrozytom	Ш		25,9%
		Glioblastom	IV	50%	4,7%
Gliome	Oligodendrogliome	Oligodendrogliom	II		79,1%
		Anaplastisches Oligodendrogliom	111	3-4%	49,4%
	Oligoastrozytome	Oligoastrozytom	=		
		Anaplastisches Oligoastrozytom	III	3-4%	58,7%*
		Myxopapilläres Ependymom	I		kA**
	Enendymome	Subependymom		2-6%	73,2%
	Lbendymonie	Ependymom	II	2-070	68,1%
		Anaplastisches Ependymom	111		54,3%

Tabelle 1: WHO-Klassifizierung, Inzidenz und 5-Jahres Überlebensrate bei malignen Hirntumoren. * in der Literatur sind keine getrennten Angaben für die beiden WHO Grade verfügbar. ** 5-Jahres Überlebensrate liegt nach vollständiger Resektion bei 100%, wird in der Literatur allerdings nicht separat aufgeführt. Tabelle modifiziert nach Westphal und Hermann (1999), Radner H. et al. (2002), Surawicz et al. (1998) und Dolecek et al. (2012) ^{4,9–11,4}.

Ependymome sind mit einer Inzidenz von 2-6% eine seltene Form des Glioms. Diese zumeist im Kindesalter oder bei jungen Erwachsenen auftretenden Tumore sind bei Kindern hauptsächlich infratentoriell am vierten Ventrikel und supratentoriell, oft in der periventrikulären weißen Substanz, lokalisiert, wohingegen sie bei Erwachsenen zu über 60% im Rückenmark auftreten¹². Während myxopapilläre Ependymome nach vollständiger

Resektion als geheilt gelten, variiert die Prognose für die anderen Ependymomklassen in Abhängigkeit von der Lokalisation, des Patientenalters und der Vollständigkeit der Tumorresektion¹³.

Weitere 3-4% der Gliome sind Oligodendrogliome, relativ gut differenzierte aber diffus infiltrierende Tumore, die hauptsächlich bei Erwachsenen im mittleren Lebensalter (35 bis 50 Jahre) auftreten und zumeist in den zerebralen Hemisphären lokalisiert sind. Oligodendrogliome können als Tumor des WHO-Grades II mit einer medianen Überlebensrate von ca. 11 Jahren¹⁴, oder als anaplastische Oligodendrogliome mit dem WHO-Grad III auftreten. Die mediane Überlebensrate des anaplastischen Oligodendroglioms liegt bei ca. 5 Jahren.

Einen etwa gleich großen Anteil an den Gliomen machen Mischgliome aus, die sowohl Zellen aufweisen, die Oligodendrogliomen ähneln, als auch Astrozytom-ähnliche Zellen enthalten¹⁵. Diese Mischgliome werden nach der WHO-Klassifizierung in Oligoastrozytome (WHO-Grad II) und anaplastische Oligoastrozytome (WHO-Grad III) eingeteilt, wobei eine exakte Klassifizierung aufgrund eines fehlenden eindeutigen Markers schwierig ist.

Den größten Teil der Gliome stellt mit ca. 80% die Tumorentität der Astrozytome dar (Abbildung 1, dunkel- bis mittelrote Felder). Zu der Gruppe der Astrozytome gehört neben Neoplasien der WHO-Grade I bis III auch das einzige Gliom, das dem höchsten Malignitätsgrad WHO IV zugeordnet ist, das Glioblastom.

Astrozytome des WHO-Grades I werden als pilozytische Astrozytome bezeichnet. Diese langsam und zumeist scharf begrenzt wachsenden Tumore treten vor allem bei Kindern und Jugendlichen auf und sind zu 85% im Kleinhirn lokalisiert. Aufgrund ihres Wachstumsverhaltens ist eine vollständige chirurgische Entfernung meist möglich, die Erkrankung zumeist heilbar und die Prognose mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 94,1% günstig⁴.

Astrozytome des WHO-Grads II werden als diffuse Astrozytome bezeichnet. Hierbei handelt es sich um gut differenzierte, langsam wachsende Gliome, die allerdings im Gegensatz zum pilozytischen Astrozytom eine diffuse Infiltration des angrenzenden Gewebes aufweisen. Diese Neoplasien sind typischerweise in den Großhirnhemisphären lokalisiert und treten hauptsächlich bei jungen Erwachsenen (30 bis 40 Jahre) auf. Aufgrund des invasiven Wachstums ist eine vollständige Resektion nicht möglich, so dass es in der Regel zur Bildung eines Rezidivs oft mit der Ausprägung eines höheren Malignitätsgrads kommt. Die Progressionsdauer eines diffusen Astrozytoms zum anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) bis hin zum Glioblastom (WHO-Grad IV), den beiden sogenannten hochgradigen Gliomen, liegt im Mittel bei 5 Jahren. Die mittlere 5-Jahres Überlebensrate beträgt 48,8%¹⁶. Astrozytome des WHO-Grades III, auch anaplastische Astrozytome genannt, zeichnen sich ebenfalls durch eine diffuse Infiltration aus, zeigen zudem eine erhöhte Zelldichte, eine verstärkte zelluläre und nukleäre Atypie sowie eine erhöhte mitotische Aktivität⁸. Astrozytome des WHO-Grades III treten zumeist im Alter zwischen 35 und 45 Jahren auf und sind, wie diffuse Astrozytome, in den Großhirnhemisphären lokalisiert. Eine vollständige Resektion ist auch in diesem Fall nicht möglich, so dass es zur Rezidivierung kommt, oft in Form eines Glioblastoms. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei anaplastischen Astrozytomen bei 31%.

Das Glioblastom (WHO-Grad IV) ist die aggressivste Form des Glioms⁵. Die zumeist älteren Erkrankten (> 50 Jahre) haben eine mittlere Lebenserwartung von nur etwa 12 Monaten nach Diagnosestellung^{17,18}. Der nachfolgende Abschnitt soll näher auf das Glioblastom eingehen, da dies im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht.

1.1.1 Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme)

Das Glioblastom ist die maligneste Neoplasie glialer Morphologie und zugleich eine der aggressivsten Tumorentitäten überhaupt^{5,7}. Diese Tumore des WHO-Grades IV machen etwa 20% aller intrakraniellen Tumore und sogar über 50% aller Gliome aus^{19,20}. Jährlich werden 3 bis 5 Fälle pro 100.000 Personen diagnostiziert¹⁹.

Obwohl in den letzten Dekaden große Fortschritte sowohl in der Neurochirurgie als auch in der klinischen Neuroonkologie gemacht wurden, hat sich die schlechte Prognose von Glioblastompatienten kaum verbessert. So liegt die durchschnittliche 1-Jahres-Überlebensrate bei 17,7%²¹, wobei die Prognose für ältere Patienten schlechter ist als für unter 50-jährige Erkrankte^{22–25}. Glioblastome sind histologisch charakterisiert durch eine sehr hohe Zelldichte, eine hohe mitotische Aktivität, Pleomorphien, eine diffuse Infiltration des Gewebes, das Vorhandensein von Gefäßproliferaten^{5,26} und die Bildung von Nekrosen²⁷.

In Glioblastomen kann zwischen zwei Arten von Nekrosen unterschieden werden. So treten neben großen landkartenartigen Nekrosen, die bis zu 80% der Gesamttumormasse ausmachen können, vor allem kleine, unregelmäßig geformte Nekrosen mit der Ausprägung von pseudopalisadenförmigen Randwällen auf²⁸. Glioblastome sind in den meisten Fällen im frontotemporalen Bereich des Großhirns lokalisiert. Aufgrund ihres diffusen, extrem schnellen Wachstums und der schnellen Ausbreitung, sogar typischerweise bis in die kontralateralen Areale des Gehirns, ist eine vollständige Resektion nicht möglich.

Die Mehrzahl (> 80%) der Glioblastome entsteht sehr schnell ohne das Auftreten von klinischen, radiologischen oder morphologischen Anzeichen eines vorangegangenen niedriggradigeren Glioms^{5,21,29}. Diese *de novo* entstehenden Tumore, die im Regelfall ab der 5. Lebensdekade und mit einer etwas höheren Wahrscheinlichkeit bei Männern auftreten^{30,31}, werden als primäre Glioblastome bezeichnet³². Als sekundäre Glioblastome bezeichnet man Tumore, die aus der malignen Progression eines diffusen Astrozytoms (WHO-Grad II) oder anaplastischen Astrozytoms (WHO-Grad III) hervorgehen^{21,33}. Sekundäre Glioblastome

treten im Unterschied zu primären Glioblastomen zumeist bei jüngeren Patienten auf (< 45 Jahre)^{5,29,31,32}. Obwohl es sich bei diesen Glioblastomsubtypen um zwei pathobiologisch unterschiedliche Entitäten handelt, die Patienten unterschiedlichen Alters betreffen, sich über genetische Mutationen in verschiedenen Signalwegen entwickeln und verschiedene RNAund Proteinexpressionsprofile zeigen, sind sie sowohl histomorphologisch als auch hinsichtlich der Prognose nicht unterschiedbar^{32,34}. Allerdings ist eine Differenzierung auf molekularpathologischer Basis möglich. Diese wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

1.1.2 Molekularpathologie bei Glioblastomen

Die ursächlichen Prozesse für die Entstehung von Glioblastomen sind bislang nicht genau bekannt. Allerdings konnten eine Reihe von molekularpathologischen Veränderungen identifiziert werden, deren Häufigkeitsverteilung zwischen primären und sekundären Glioblastomen sehr verschieden ist und die offensichtlich kausal mit der Entstehung dieser Tumorentitäten im Zusammenhang stehen^{35–37} (Abbildung 2). Darunter sind vor allem Mutationen in Signalwegen repräsentiert, die in die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose eingreifen^{20,38,39}. Dazu zählen beispielsweise der EGFR/PTEN/PI3K-, der TP53/MDM2/p14^{ARF}- und der P16^{INK4a}/CDK4/RB1-Signalweg sowie Mutationen des IDH1-Gens.



Abbildung 2: Molekularpathologische Veränderungen in astrozytären und oligodendroglialen Gliomen. Abbildung modifiziert nach Ohgaki et al. Cancer Science 2009³⁴

Ausgehend von einer Ursprungszelle führt die Akkumulation von verschiedenen molekularpathologischen Veränderungen, wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, zur Entstehung von primären Glioblastomen, Astrozytomen, die sich bei Rezidivierung bis hin zum sekundären Glioblastom entwickeln können, oder Oligodendrogliomen.

In primären Glioblastomen ist eine der häufigsten genetische Veränderung mit ca. 45% die EGFR-Überexpression (in sekundären Glioblastomen nur < 10%), die gewöhnlich mit einer Genamplifikation einhergeht^{37,40–42}. Die EGFR-Genamplifikation ist in etwa 50% der Fälle mit einer Mutation im Bereich der extrazellulären Domäne assoziiert, von denen die Häufigste die konstitutiv-aktivierende EGFR-vIII Mutation ist^{40,41,43–45}. Mutationen im EGFR-Gen tragen über die Aktivierung des nachgeschalteten PI3K/AKT-Signalweg zur Erhöhung der Proliferation, zur Induktion der Angiogenese und der Migration sowie zur Inhibition der Apoptose bei^{5,46–51}.

In ca. 32% der primären Glioblastome, aber nur 4% der sekundären Glioblastome, ist zudem eine Mutation des Tumorsuppressors PTEN zu finden^{52–54}, welche in einer verstärkten Signaltransduktion über den EFGR/PI3K/AKT-Signalweg resultiert⁵⁵.

Mit einer Häufigkeit von 70% tritt in primären Glioblastomen zudem der Verlust von DNA-Bereichen des Chromosoms 10 (loss of heterozygosity 10, LOH 10) auf. Betroffene Foci sind vor allem 10p14-15, 10q23-24 und 10q25. Es wird vermutet, dass diese Bereiche neben dem PTEN-Gen weitere bislang unbekannte Tumorsuppressorgenen kodieren, deren Deletion zur Pathogenese beiträgt^{35,56–59}.

Veränderungen im Zellzyklus-kontrollierenden P16^{INK4a}/RB1-Signalweg, die zumeist auf homozygote Deletion von $p16^{INK4a}$ oder den vollständige Verlust des RB1-Gens zurückzuführen sind, kommen sowohl in primären als auch in sekundären Glioblastomen vor. Dabei tritt die homozygote Deletion von $p16^{INK4a}$ wesentlich häufiger in primären Glioblastomen auf (36% gegenüber 4% in sekundären Glioblastomen)^{60,61}. Mutationen oder eine Hypermethylierung des RB1-Gens werden in 50% der primären, aber auch zu etwa 40% in sekundären Glioblastomen beobachtet⁶¹.

Eine eher seltene molekularpathologische Veränderung, die vor allem in primären Glioblastomen vorkommt, ist die Überexpression (ca. 50%) und Amplifikation (< 15%) von *MDM2* (Mouse Double Minute 2), einem negativen Regulator von p53^{60,62,63}.

Eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53, welches für das Zellzykluskontrollprotein p53 kodiert, tritt dagegen nur zu <10% in primären Glioblastomen auf^{31,64}, ist aber eine häufige genetische Veränderung in sekundären Glioblastomen.

Die häufigste genetische Veränderung in sekundären Glioblastomen, aber auch in diffusen und anaplastischen Astrozytomen sowie Oligodendrogliomen ist mit einer Häufigkeit von über 80% die somatische IDH1 (Isocitratdehydrogenase 1)-Mutation^{39,65,66}. Diese Mutation kommt hingegen fast nicht in primären Glioblastomen vor⁶⁶. Dies deutet darauf hin, dass

Oligodendrogliome, niedrigradige Astrozytome (WHO-Grad II und III) und folglich auch sekundäre Glioblastome vermutlich aus der gleichen IDH1-mutierten Ursprungszelle hervorgehen³⁴, nachfolgende mutagene Ereignisse allerdings die weitere Richtung der malignen Transformation bestimmen. So führt eine Mutation des TP53-Gens zur Entstehung eines diffusen Astrozytoms mit einer möglicher Progression zum sekundären Glioblastom (Häufigkeit: 65%)^{31,64}, wohingegen ein Verlust von DNA-Bereichen des Chromosoms 1 und 19 (LOH 1p/19q) zu Entstehung eines Oligodendroglioms führt (Häufigkeit: über 70%)^{67–70}.

1.1.3 Therapieoptionen bei Glioblastomen

Obwohl Glioblastome eine eher seltene onkologische Erkrankung darstellen, sind sie aufgrund ihrer Lokalisation im Gehirn, ihres invasiven Wachstumsverhaltens und ihrer extrem schlechten Prognose eine der am meisten gefürchteten Krebsformen¹⁹, die bislang ausschließlich palliativ behandelt werden können²⁶. Als Standardtherapie wird seit ca. 10 Jahren zunächst eine möglichst vollständige Tumorresektion durchgeführt. Anschließend findet eine Kombination aus Strahlen- und adjuvanter Chemotherapie statt.

Zum Einsatz kommen dabei DNA-alkylierende Substanzen wie Temozolomid (TMZ, Temodal) oder Nitrosoharnstoffderivate wie ACNU (Nimustin), BCNU (Carmustin) oder CCNU (Lomustin)^{71–73}. Durch die Übertragung von Alkylgruppen auf die DNA-Basen wird die DNA beschädigt und Apoptose in den betroffenen Zellen induziert⁵.

Der therapeutische Erfolg mit diesen Substanzen ist allerdings gering. Beispielsweise führt die Behandlung mit TMZ lediglich zur einer 2,5-monatigen Verlängerung des Überlebens gegenüber einer ausschließlichen Radiotherapie⁵. Grund für den geringen therapeutischen Erfolg ist häufig das Auftreten von Resistenzen gegenüber den verabreichten Zytostatika⁵. Zudem ist bei der Behandlung mit TMZ mit einem unterschiedlichen Ansprechen der Patienten zu rechnen. Als ein möglicher Grund ist die unterschiedliche Expression des DNA-Reparaturproteins O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) zu nennen. MGMT entfernt TMZ-induzierte Alkylierung an der Position O⁶ des Guanins und neutralisiert dadurch den cyotoxischen Effekt^{74–77}. Die MGMT-Expression wird zum einen durch den Grad der Methylierung des MGMT-Promoters moduliert. Je höher der Methylierungsgrad ist, desto geringer ist die MGMT-Expression. Patienten, die eine Hypermethylierung des MGMT-Promoters aufweisen, zeigen ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit TMZ⁵. Zum anderen sprechen auch Patienten mit LOH 10q, dem Chromosombereich, auf dem das MGMT-Gen lokalisiert ist, mit 19.5 Monaten besser auf die Behandlung mit TMZ an als Patienten ohne diesen Allelverlust mit 9,3 Monaten⁷⁸.

Ein anderes Beispiel für eine Therapieresistenz ist das geringe Ansprechen von Patienten auf EGFR–Inhibitoren (10-20%)⁴⁶. Grund hierfür könnte der Funktionsverlust von PTEN sein, der zu einer Fehlregulation der PI3K/AKT-Signalkaskade führt.

Seit ca. 10 Jahren ist bekannt, dass Glioblastome – wie andere Tumorentitäten auch - eine Subpopulation von sogenannten Tumorstammzellen enthalten⁷⁹. Hierbei handelt es sich um Tumorzellen, die über Stammzelleigenschaften verfügen und zudem eine hohe Radio- und Chemoresistenz aufweisen. Aufgrund dessen wird vermutet, dass diese Zellen nach der Resektion und der Radio- und Chemotherapie die Rezidivbildung induzieren. Eine Eliminierung dieser Zellen muss folglich ein weiteres Ziel für eine erfolgreiche Behandlung sein. Da sich die vorliegende Arbeit mit Tumorstammzellen aus dem Glioblastom befasst, soll in den nachfolgenden Kapiteln näher auf deren Eigenschaften eingegangen werden.

1.2 Stammzellen

Unter Stammzellen versteht man Zellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung zu spezialisierten, reiferen Zellen des Organismus besitzen und an der Spitze der zellulären Hierarchie stehen^{80,81}. Als Fähigkeit zur Selbsterneuerung wird die Entstehung identischer Tochterzellen durch symmetrische oder asymmetrische Zellteilung bezeichnet⁸². Im Gegensatz zur symmetrischen Teilung, bei der zwei identische Tochterzellen gebildet werden, die zur Expansion der Stammzellpopulation führen, geht aus der asymmetrischen Teilung eine identische Tochterzelle und eine differenziertere Vorläuferzelle mit einer limitierten Differenzierungs- und Proliferationskapazität hervor⁸³. Sowohl Zellinteraktionen als auch auto- und parakrine Stimulation durch Wachstumsfaktoren regulieren das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung^{83,84,85}.

Anhand ihres Differenzierungspotentials können Stammzellen in totipotente, pluripotente, multipotente, oligopotente und unipotente Stammzellen klassifiziert werden⁸⁶ (Abbildung 3).

Die Stammzelle mit dem größten Differenzierungspotential ist die Zygote bzw. die beginnende segmentierte Zygote, welche als totipotent bezeichnet wird⁸⁰. Sie ist in der Lage, alle Zelltypen des Embryos und den Trophoblast zu bilden.

Als pluripotente Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die in der Lage sind alle Zelltypen der drei Keimblätter, Entoderm, Ektoderm, Mesoderm, zu bilden, nicht aber den Trophoblast. Somit sind sie nicht in der Lage, einen vollständigen Organismus zu generieren⁸⁷. Dazu gehören unter anderem die Zellen aus dem Embryoblast einer Blastozyste, sogenannte embryonale Stammzellen (ES)⁸⁸.

Stammzellen, deren Differenzierungskapazität weiter verringert ist, werden als multipotente Stammzellen bezeichnet. Diese Zellen sind in ihrem Differenzierungspotential auf Zellen ihres Keimblatts beschränkt und werden daher als mesodermale, ektodermale oder endodermale Stammzellen betitelt. Zu diesen als adulte Stammzellen bezeichneten Zellen gehören beispielsweise hämatopoetische oder neurale Stammzellen. Stammzellen, die in ihrer Differenzierungskapazität auf Zellen eines bestimmten Gewebes beschränkt sind, werden entsprechend der Anzahl an Zelltypen, die sie bilden können, als oligopotente, tri-, bi- oder unipotente Stammzellen, sogenannte Vorläuferzellen oder Progenitorzellen, bezeichnet⁸⁹. Diese sehr beschränkt differenzierbaren Zellen mit einem limitierten Proliferationspotential gehen den endgültig differenzierten, reifen Körperzellen voraus⁹⁰.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der hierarchischen Klassen der Stammzellen. Die Eigenschaften (das Potential) der jeweiligen Stammzelle sind links illustriert, beginnend mit der unreifsten Stammzelle bis zur ausdifferenzierten Körperzelle ganz unten. Die entsprechenden Zellbezeichnungen sind in der rechten Spalte zu finden. Der kreisförmige Pfeil steht für die Fähigkeit der Zelle zur Selbsterneuerung. Die kleinen nach oben gerichteten Pfeile mit den Fragezeichen deuten die Möglichkeit der Transdifferenzierung und Dedifferenzierung an.

1.2.1 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind nahezu in allen Geweben, entweder in einem aktiv proliferierenden Zustand oder im Ruhezustand zu finden⁹¹. Ihre Zahl ist allerdings zumeist gering⁹². Bereits vor ca. 50 Jahren wurden zum ersten Mal humane adulte Stammzellen isoliert. Hierbei handelte es sich um hämatopoetische Stammzellen, die von E.D. Thomas isoliert und für die Transplantationsmedizin eingesetzt wurden⁹³. Erst ab dem Jahr 2000 gelang es aus anderen Geweben, wie dem Zentralennervensystem⁹⁴, der Skelettmuskulatur⁹⁵, dem Pankreas⁹⁶ oder dem Kolon⁹⁷ Stammzellen zu isolieren und zu kultivieren.

Adulte Stammzellen bilden die Spitze der Zellhierarchie eines reifen Organismus und können aufgrund ihres Differenzierungspotentials spezialisierte Zelltypen eines Gewebes ausbilden,

um auf diese Weise krankheits- oder verletzungsbedingt beschädigtes Gewebe oder Zellen eines Organs zu ersetzen⁸⁰ und so das Langzeitüberleben des Organismus zu sichern⁸¹.

Adulte multipotente Stammzellen können anhand ihrer spezifischen Marker voneinander unterschieden werden. So ist Nestin ein Marker für ektodermale Stammzellen, Desmin für mesodermale Stammzellen und α-Feroprotein für endodermale Stammzellen^{98,99}. Auch eine Diskriminierung zwischen oligopotenten Stammzellen eines Gewebes ist anhand von sogenannten CD-Markern (Cluster of Differentiation) möglich. Beispielsweise zeigen hämatopoetische und mesodermale Stammzellen aus dem Knochenmark unterschiedliche Expressionsmuster für CD34, CD43, CD3, CD90 und CD105¹⁰⁰.

Bislang wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem Differenzierungspotential der Stammzellen um eine "Einbahnstraße" handelt, d.h. dass sich Stammzellen und Progenitorzellen nur in Richtung einer höheren Spezifizierung bzw. verringerten Differenzierungskapazität entwickeln aber nicht rückwärts einen undifferenzierteren Zustand erreichen können¹⁰¹. Allerdings zeigten Lagasse et al., dass hämatopoetische Stammzellen nichthämatopoetische Gewebe bilden können¹⁰². Des Weiteren konnten Björnson et al. zeigen, dass injizierte neurale Stammzellen in bestrahlten Mäusen zur Bildung von verschiedenen hämatopoetischen Zellen beitragen¹⁰³. Als zugrunde liegender Mechanismus für dieses Phänomen wird die Transdifferenzierung diskutiert, bei der multipotente Stammzellen eines Keimblatts zu Stammzellen eines anderen Keimblatts werden^{104,105}. Aber auch eine Dedifferenzierung der Stammzellen ist denkbar. So gelang es Kondo und Raff bereits vordifferenzierte Oligodendrozyten in neurale und gliale Richtung zu differenzieren¹⁰⁶.

1.2.2 Neurale Stammzellen

Neurale Stammzellen sind sich selbsterneuernde, multipotente Zellen, die kontinuierlich neuronale und gliale Zellen im Nervensystem generieren können¹⁰⁷.

Bereits 1983 beschrieben Raff et al. in *in vitro* Studien am Sehnerv von 7 Tage alten Ratten die Existenz eines gemeinsamen Progenitors für Oligodendrozyten und Astrozyten¹⁰⁸. Im Jahr 1992 gelang es erstmalig, neurale Stammzellen aus dem basalen Vorderhirn von adulten Mäusen und Mausembryonen zu isolieren und diese in Medium unter Zusatz von EGF zu kultivieren^{109,110}. Unter diesen Bedingungen bildeten sich große Sphären aus Zellen, die seither als Neurosphären bezeichnet werden. Diese Neurosphären zeigten eine hohe Expression von Nestin, einem Intermediärfilament, dessen Expression zuvor in Neuroepithelialzellen nachgewiesen wurde. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Zellen proliferative Eigenschaften besitzen, zur Selbsterneuerung befähigt sind, zu allen drei Hauptzelltypen des ZNS, den Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, differenzieren können und somit alle Kriterien multipotenter Stammzellen erfüllen. In den nachfolgenden Jahren gelang es, neurale Stammzellen auch aus dem humanen

Rückenmark zu isolieren¹¹¹. Im Jahr 2000 konnten adulte Stammzellen zum ersten Mal direkt aus frischem humanem Hirngewebe aufgereinigt werden. Hierbei machten sich Uchida et al. die zelltypspezifisch Expression des Oberflächenantigens CD133, auch Prominin genannt, auf neuralen Stammzellen zu Nutze, um diese Zellen markervermittelt zu isolieren⁹⁴. CD133, ein 120 kDa Transmembranzelloberflächenprotein, gilt seither als Marker für humane neurale Stammzellen^{94,112,113}.

All diese Erkenntnisse führten zur Widerlegung der langjährigen Annahme, dass im adulten Gehirn keine Neurogenese stattfindet. Der heutige Stand der Wissenschaft geht von zwei Neurogenese-aktiven Zonen im adulten Hirn aus, der subventrikulären Zone (SVZ) und der subgranulären Zone (SGZ) des lateralen Ventrikels^{114–116}.

Vor einigen Jahren wurde beschrieben, dass Hirntumorzellen diverse Eigenschaften von neuralen Stammzellen aufweisen⁹², weshalb man davon ausgeht, dass das Reservoir an neuralen Stammzellen in den Neurogenese-aktiven Zonen der zelluläre Ursprung von malignen Gliomen sein könnte¹¹⁷. Dieser Zusammenhang soll im folgenden Kapitel erläutert werden.

1.2.3 Glioblastomstammzellen

Eine Frage, die intensiv beforscht und diskutiert wird, ist die nach dem zellulären Ursprung von Gliomen. Vor ca. 10 Jahren wurden Studien veröffentlicht, die postulierten, dass Hirntumore aus einer Zelle mit Stammzelleigenschaften hervorgehen, die durch ihre Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung eine kleine multipotente Subpopulation von Tumorzellen hervorbringt, die maßgeblich an dem Erhalt und der Progression des Tumors beteiligt ist¹¹⁸⁻¹²⁰. Im Jahr 2003 gelang es Singh et al. eine Subpopulation von CD133positive Zellen aus Medulloblastomen und Glioblastomen zu isolieren und zu zeigen, dass diese Zellen ein höheres Potential zur Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung aufwiesen als CD133-negative Zellen⁷⁹. Zudem stellten sie fest, dass die CD133-positive Subpopulation tumorigen war. So zeigte sich, dass bereits 100 CD133-positive Zellen für die Initiierung von Tumoren in Hirnen von NOD/SCID Mäusen ausreichend waren, wohingegen die Transplantation von 10⁵ CD133-negative Zellen zu keiner Tumorbildung führte¹¹⁹. Des Weiteren konnte in den CD133-positive Zellen die Expression des neuralen Stammzellmarkers Nestin¹²¹ und der embryonalen Stammzellmarker SOX-2 und Olig2 nachgewiesen werden¹²². Im Gegensatz zu konventionellen Gliomzellkulturen wuchsen diese Zellen unter serumfreien Bedingungen in EGF- und FGF2-haltigem Medium als Neurosphären^{121,122}. Nachfolgend gelang es Galli et al. stammzellähnliche Zellen aus primären Glioblastomen als stabile Linien zu etablieren, die in vivo infiltrative Tumore bildeten, ihre Tumorigenität in einer seriellen Transplantation behielten bzw. steigerten und sich in neuronale und gliale Richtung differenzieren konnten¹²⁰. Des Weiteren konnten Chen et al. zeigen, dass eine kleine quieszente, chemoresistente Subpopulation an Zellen für die Rezidivierung eines Glioblastoms nach einer zytotoxischen Behandlung mit TMZ verantwortlich ist¹²³.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurde im Jahre 2004 erstmals, analog zu der Zellorganisation in adulten Geweben, für Glioblastome ein hierarchisches Modell der Zellorganisation postuliert¹²¹ (Abbildung 4A). Nach diesem Modell gehen Glioblastome aus einer kleinen Population von radio- und chemoresistenten, multipotenten, CD133-positiven Zellen hervor^{19,121,124}. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorinitiierung in vivo^{119,124,125} sowie das Potential zur multilinearen Differenzierung zu heterogenen, nicht-tumorigenen, reiferen Tumorzellen mit einem limitieren Teilungspotential, die den Großteil der Tumormasse ausmachen^{80,118,120,121,126–128}. Diese Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften wird maßgeblich für den Erhalt und die Tumors verantwortlich gemacht^{123,126,129}. Dieses Progression des hierarchische Tumorstammzellmodell steht im Kontrast zu dem älteren, sogenannten stochastischen Modell (Abbildung 4B). Nach dem stochastischen Modell existiert im Tumor keine definierbare Subpopulation mit Stammzellcharakteristika. Vielmehr wird davon ausgegangen, dass alle Tumorzellen ähnliche Merkmale aufweisen, unbegrenzt proliferieren können und derselben stochastischen Wahrscheinlichkeit unterliegen, in Abhängigkeit von zufällig auftretenden weiteren mutagenen Ereignissen neue Tumore zu generieren⁹².



Abbildung 4: Modelle der Tumorzellen in soliden Tumoren. A) Hierarchisches Tumormodell: Tumorzellen sind heterogen und nur eine Subpopulation von sogenannten Tumorstammzellen ist in der Lage, sich unentwegt selbst zu erneuern und Tumore zu initiieren, wohingegen die restlichen Zellen ein limitiertes Proliferationspotential und keine Tumorigenität besitzen. B) Stochastisches Tumormodell: Tumorzellen sind heterogen, zeigen aber alle ein hohes proliferatives Potential und jede Zelle kann Tumore initiieren. CSC = Tumorstammzelle. Illustration modifiziert nach Reya et al.⁹².

Das hierarchische Tumorstammzellmodell leitet sich ursprünglich von hämatopoetischen Malignomen ab. Bereits in den 60er Jahren zeigten Bruce et al. und Wodinsky et al., dass bei akuter myeloische Leukämie (AML) nur eine kleine Subpopulation der Zellen in der Lage war, über längere Zeit extensiv *in vitro* zu proliferieren^{130,131}. Verfestigt wurde die Hypothese

im Jahre 1997 als Dick et al. zeigten, dass nur eine kleine Subpopulation von CD34-positiven und CD38-negativen AML-Zellen phänotypische Ähnlichkeiten zu hämatopoetischen Stammzellen besaß und nach Transplantation in immundefiziente Mäuse AML auslösen konnte^{132,133}. Nachfolgend konnten auch in anderen Tumorentitäten wie Brustkrebs¹³⁴, Darmkrebs¹³⁵, Lungenkrebs¹³⁶ und Prostatakrebs¹³⁷, Zellen mit Stammzelleigenschaften nachgewiesen werden.

Wenngleich für die Gliomprogression nach dem hierarchischen Modell Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften verantwortlich gemacht werden, ist der zelluläre Ursprung dieser sogenannten Glioblastomstammzellen bislang nicht geklärt (Abbildung 5). Die Vielzahl an Parallelen zwischen Glioblastomstammzellen und neuralen Stammzellen deutet darauf hin, dass neurale Stammzellen bzw. frühe Progenitorzellen möglicherweise der zelluläre Ursprung von Glioblastomstammzellen sind^{92,138-140}. Indiz dafür ist unter anderem, dass Signalwege, die in der Regulation der Selbsterneuerung, der Proliferation und der Differenzierung von neuralen Stammzellen eine Rolle spielen (z.B. der EGFR/PTEN/PI3K-Signalweg) in Gliomen typischerweise verändert sind¹⁴¹. Auch die Beobachtung, dass die somatische Inaktivierung der Tumorsuppressorgene TP53, Nf1 oder PTEN in Nestinpositiven neuralen Stammzellen oder Progenitorzellen in der Neurogenese-aktiven SVZ in vivo Astrozytomentwicklung induzierte, aber die gleichen Deletionen in nicht-neurogenen Regionen nicht zur Tumorbildung führten, unterstützt die genannte Hypothese¹⁴². Denkbar ist allerdings auch, dass Hirntumorstammzellen aus differenzierten Zellen, die durch Mutationen Stammzelleigenschaften wiedererworben haben, hervorgehen können¹¹⁹. Unterstützt wird Letzteres beispielsweise durch die Studien von Ding et al., die zeigten, dass die Expression einer onkogenen Form von H-Ras (V¹²Ha-ras) in GFAP-positive Astrozyten in über 95% der untersuchten Mäuse zur Astrozytombildung führte¹⁴³.



Abbildung 5: Modell des zellulären Ursprungs von Tumorstammzellen. Die Organentwicklung umfasst die sequenzielle Differenzierung von Stammzellen über Progenitorzellen zu vollständig differenzierten Zellen (linke Seite). Tumorstammzellen, die an der Spitze der Tumorzellhierarchie stehen, können sich potentiell entweder von multipotenten Stammzellen oder differenzierteren Progenitor- oder Vorläuferzellen ableiten. CSC = Tumorstammzelle. Abbildung modifiziert nach Reya et al.⁹².

Die Wahrscheinlichkeit der Akkumulation von neoplastischen Mutationen, die letztlich zur Transformation und somit zur Tumorbildung führen, ist bei kurzlebigeren, eingeschränkt proliferierenden, differenzierten Zellen allerdings geringer als bei neuralen Stammzellen und Progenitorzellen, die über ein höheres Proliferationspotential verfügen⁹². In der Literatur wird daher vermehrt davon ausgegangen, dass diese unreifen Zellen der zelluläre Ursprung von Glioblastomstammzellen sind^{92,132,140,144,145}.

1.2.3.1 Das Adaptationsmodell in Glioblastomen

Erkenntnisse der vergangenen Jahre haben das klassische, hierarchische Modell der Glioblastomstammzellen mit den Definitionskriterien der *in vivo* Tumorigenität, der Differenzierbarkeit, der Klonogenität und der Expression von Stammzellmarkern (CD133 im Speziellen), zumindest in Teilaspekten, in Frage gestellt.

Bezüglich des Kriteriums der *in vivo* Tumorigenität konnten beispielsweise mehrere Studien zeigen, dass diese Fähigkeit stark von dem verwendeten Mausmodell abhängt. In einer Studien von Quintana et al. führte beispielsweise bei der subkutanen Melanomzell-Injektion im herkömmlichen T- und B-Zell defizienten NOD/SCID Modell lediglich ca. eine von 10⁶ Zellen zur Tumorinitiierung, wohingegen die Frequenz tumorinitiierender Zellen in einem NOD/SCID *II2rg-/-* Modell, das zudem eine Defizienz für natürliche Killerzellen aufweist, bei ca. 25% lag¹⁴⁶.

Auch bezüglich der Klonogenität von Tumorzellen konnten *in vitro* Studien eine Modulierbarkeit in Abhängigkeit der Permissivität der gewählten Bedingungen nachweisen. So konnten Zheng et al. zeigen, dass C6 Rattengliomzellen in Anwesenheit von Serum zu 100% klonogen sind, wohingegen diese Fähigkeit in serumfreien Bedingungen um fast 40% geringer ist¹⁴⁷.

Auch die Eignung von CD133 als Marker für Glioblastomstammzellen wird kontrovers diskutiert. So zeigen neuere Studien, dass auch CD133-negative Zellen sich selbst erneuern und differenzieren können und tumorigen sind, wenngleich in geringerem Maße^{147–149}. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass CD133-negative Zellen aus Glioblastomen durchaus auch CD133-positive Zellen hervorbringen können¹⁵⁰. Mehrere Studien zeigten darüber hinaus, dass Hypoxie, d.h. ein verringerter Volumenanteil von Sauerstoff an der Gesamtluft bzw. eine relative Verringerung bezogen auf den physiologischen Zustand (nachfolgend als Sauerstoffkonzentration [%] bezeichnet), die Expression von CD133 induziert^{151–154}. Griguer et al. stellten fest, dass Hypoxie sogar in einer konventionellen Glioblastomzelllinie (U251) die Expression von CD133 in mehr als 50% der Zellen induzierte, wohingegen unter Normoxie, d.h. einer Sauerstoffkonzentration von 21%, keine CD133-Expression zu verzeichnen war¹⁵³. Dies spricht gegen die Spezifität dieses Oberflächenantigens als Glioblastomstammzellmarker. Griguer et al. zu Folge stellt die

CD133-Expression vielmehr eine Antwort auf Stressfaktoren aus der Umgebung dar, die mit weiteren phänotypischen Veränderungen, wie der Sphärenbildung, aber auch einer bioenergetischen Pathway-Verschiebung in Richtung anaerober Glykolyse mit invasivem Wachstum *in vivo* sowie Multipotenz assoziiert ist¹⁵³.

All diese Studien sprechen dafür, dass einige Kriterien des klassischen Glioblastomstammzellmodells entscheidend durch Faktoren der Mikroumgebung determiniert werden. Ausgehend von den Ergebnissen, dass Tumorzellen in Abhängigkeit der Sauerstoffbedingungen ihre bioenergetischen Stoffwechselwege unterschiedlich ausrichten können¹⁵³, postulierten Griguer et al. eine Modulation des klassischen hierarchischen Glioblastomstammzellmodell. In diesem Modell stellen Tumorstammzellen aus dem Glioblastom vielmehr eine kleine Subpopulation von Zellen dar, die eine hochgradige metabolische Anpassungsfähigkeit an die Mikroumgebung aufweisen und ihre Stammzelleigenschaften milieubedingt zu unterschiedlichen Graden ausprägen können¹⁵⁵ (Abbildung 6). Gemäß diesem metabolischen Adaptationsmodell ermöglicht die metabolische Anpassung an sich verändernde Milieubedingungen das Überleben der Zelle unter ungünstigen Wachstumsbedingungen und damit die Tumorprogression¹⁵³. In Abhängigkeit der Permissivität der Mikroumgebung können demnach unter unterschiedlichen Bedingungen unterschiedliche Zellen tumorinitiierend sein.



Abbildung 6: Adaptations-/Plastizitätsmodell nach Griguer et al. Die Zellen im Glioblastomen sind nach einem hierarchischen Modell organisiert, wobei der Tumorstammzellphänotyp durch Signale aus dem Mikromilieu induziert bzw. eingeschränkt werden kann. CSC = Tumorstammzelle. Illustration modifiziert nach Reya et al.⁹².

1.2.4 Tumorstammzellen und Hypoxie

Hypoxie ist nicht nur ein Charakteristikum von Glioblastomen, sondern auch ein in der Literatur vielfach erwähnter Faktor, der den Stammzellphänotyp moduliert. So ist beispielsweise für embryonale Stammzellen bekannt, dass Hypoxie die Pluripotenz aufrechterhält und die Differenzierung inhibiert¹⁵⁶. Auch in neuralen Stammzellen ist Hypoxie durch Aktivierung spezifischer Signalwege und Transkriptionsfaktoren ein Schlüsselfaktor für die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und für den Erhalt des undifferenzierten Zustands^{157–159}. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass Hypoxie auch im Tumor die Selektion für tumorinitiierende Zellen unterstützt. In der Tat konnten Soeda et al. zeigen, dass Hypoxie die Kapazität zur Selbsterneuerung in CD133-positiven Gliomstammzellen im Vergleich zu Normoxie erhöht und die Differenzierung inhibiert¹⁶⁰. Weitere Ergebnisse dokumentierten, dass Hypoxie differenzierten Gliomzellen die Fähigkeit der Selbsterneuerung verleihen kann und die Ausprägung des Stammzellphänotyps fördert, was auf eine Reprogrammierung der Zellen zu Stammzellen hindeutet^{161–163}. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Hypoxie das neuronale und gliale Differenzierungspotential unterstützt, die Bildung von Neurosphären fördert und die Expression von Stammzellmarkern wie CD133, OCT4, SOX-2 und Nestin steigert^{153,154,164,165}. Zudem konnten Seidel et al. nachweisen, dass CD133-positive Zellen vermehrt in hypoxischen Arealen in Glioblastomen, in der sogenannten hypoxischen Nische, lokalisiert sind¹⁶⁴.

Es ist beschrieben, dass die zelluläre Antwort auf Hypoxie maßgeblich über zwei Isoformen der sauerstoffabhängigen funktionellen Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors HIF-1, die Isoformen Hypoxia-inducible Faktor 1 α (HIF-1 α) und Hypoxia-inducible Faktor 2 α (HIF-2 α), vermittelt wird^{164,166}. So kommt es unter Hypoxie HIF-1 α -vermittelt zur Steigerung der Expression von Stammzellmarkern^{157,167,168}. Demnach scheint die Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 α in hypoxischen Tumorbereichen für die Ausprägung von Stammzelleigenschaften, wie Selbsterneuerung und Multipotenz, durch Stimulation entscheidender Signalwege mit verantwortlich zu sein¹⁶⁸.

Wenngleich Glioblastome als hypoxische Tumore beschrieben sind, so liegt die Sauerstoffkonzentration in Glioblastomen nicht überall im Tumor unter 1%, sondern variiert regional zwischen Werten von 0,1 bis 10%, wobei eine mittlere Sauerstoffkonzentration von ca. 7% angenommen wird^{154,169} (Abbildung 7). In Folge der Tumorprogression fluktuiert die Sauerstoffsättigung fokal teilweise stark in Abhängigkeit der Zelldichte, der Diffusionsgrenze des Sauerstoffs, des Ausmaßes der Neovaskularisierung, des Auftretens von Nekrosen und weiteren Gewebeumstrukturierungen, die die Perfusion beeinflussen^{169,170}. Diese Fluktuation induziert metabolischen und hypoxischen Stress, der zu einer Selektion derjenigen Zellen führt, die sich an diese Bedingungen anpassen können (Abbildung 7).



Abbildung 7: Entstehung von metabolischem und hypoxischem Stress in der Tumorentwicklung. Solide Tumore übersteigen während ihres Wachstums die Vorsorgung mit Metaboliten und Sauerstoff, wodurch es zur Entstehung von metabolischem und hypoxischem Stress kommt (betroffene Zellen sind in grau dargestellt). Als Konsequenz durchlaufen Tumorzellen eine Periode metabolischer Adaption, um unter diesem Stress zu überleben. Zur Adaptation nicht befähigte Zellen werden hingegen apoptotisch. Eine Methode der Adaptation ist die Induktion von Angiogenese und Neovaskularisierung, die zur Wiederherstellung der Zellversorgung führt. Abbildung modifiziert nach Jones und Thompson¹⁷¹.

Glioblastomstammzellen sind, wie unter 1.2.3.1 beschrieben, vermutlich hochgradig adaptionsfähig und verfügen über eine außerordentlich hohe metabolische Flexibilität¹⁵⁵, die es ihnen beispielsweise ermöglicht, in Abhängigkeit des lokalen Sauerstoffangebots ihre bioenergetischen Stoffwechselwege flexibel zwischen oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse zu verschieben¹⁵³. Diese Adaptationsfähigkeit ermöglicht es Glioblastomstammzellen das Tumorwachstum auch unter sich verändernden Milieubedingungen voranzutreiben. Im Nachfolgenden soll näher auf Veränderungen im bioenergetischen Metabolismus in Tumorzellen eingegangen werden.

1.3 Glucosemetabolismus in Tumorzellen

Bereits in den 1920er Jahren dokumentierte Warburg erstmals metabolische Unterschiede zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe. Bei der Untersuchung von Rattensarkomgewebeschnitten sowie humanem Tumor- und Normalgewebe fand Warburg, dass in Normalgewebe Laktat nur unter Sauerstoffentzug über die anaerobe Fermentation von Glucose über Pyruvat entsteht, was als Pasteur-Effekt bezeichnet wird¹⁷² (Abbildung 8A). Im Gegensatz dazu konnte in Tumorgewebe Laktat auch in Gegenwart von ausreichend Sauerstoff nachgewiesen werden, und das in deutlich höheren Mengen als in Normalgewebe (Abbildung 8B). Daraus resultierte seine Hypothese, dass der Metabolismus von Tumorzellen durch eine sauerstoffunabhängige Verschiebung von der Zellatmung zur

Fermentation charakterisiert ist¹⁷³. Das Phänomen der Verschiebung des Stoffwechsels zur aeroben Glykolyse in Tumorzellen, aber auch in wachstumsfaktorstimulierten proliferierenden Zellen, erhielt später den Namen "Warburg-Effekt"¹⁷⁴.



Abbildung 8: Schematische Darstellung der metabolischen Unterschiede in differenzierten (A), proliferierenden und Tumorzellen (B). Unter normoxischen Bedingungen wird Glucose in differenzierten Zellen über Pyruvat und den Citratzyklus (TCA) in einer sauerstoffabhängigen Reaktion zu CO₂ umgesetzt und mittels Reduktionsäquivalenten in der oxidativen Phosphorylierung (OxPhos) ATP produziert. Unter Hypoxie kommt es zur Umleitung des Pyruvats zur Laktatproduktion (anaerobe Glykolyse, Pasteur Effekt), bei der sauerstoffunabhängig statt 36 nur 2 mol ATP pro mol Glucose produziert werden. In proliferierenden Zellen und Tumorzellen wird der Großteil der Glucose sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen zu Laktat umgesetzt, um Kohlenstoffatome der Glucose für die Makromolekülsynthese verwenden zu können. In geringerem Maße tragen auch weiterhin die mitochondrialen Funktionen zur ATP-Produktion bei, aber hier vor allen zu kataplerotischen Prozessen. In diesen Zellen liegt der Fokus demnach nicht auf der Maximierung der ATP-Produktion, sondern auf einer schnellen Biomasseproduktion. Abbildung modifiziert nach Vander Heiden¹⁷⁵.

Als Ursache für diesen Effekt vermutete Warburg 1924 irreversible Schäden der Zellatmung bzw. der Mitochondrien als Folge von chronischem Sauerstoffmangel im Gewebe und die daraus resultierende Abhängigkeit der Tumorzellen vom glykolytischen Metabolismus¹⁷². Aus damaliger Sicht war diese Umstellung des Metabolismus ein kausaler Vorgang, der zur Krebsentstehung führte. Spätere Untersuchungen an Tumorzellen konnten diese Hypothese Warburgs allerdings widerlegen. So konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen funktionsfähige Mitochondrien besitzen¹⁷⁶ und der Sauerstoffverbrauch in Tumorzellen nicht zwangsläufig abnimmt¹⁷⁷, sondern die oxidative Phosphorylierung stattdessen sogar erhöht sein kann¹⁷⁸. Wie Griguer et al. später postulierten, liegt in Tumoren, hier Gliomen, vielmehr

eine metabolische Heterogenität vor. So konnten sie zeigen, dass in Gliomen eine glykolyseabhängige Population mit funktioneller oxidativer Phosphorylierung und eine oxidative phosphorylierungsabhängige Population koexistieren¹⁷⁹.

Die dem Warburg-Effekt tatsächlich zugrunde liegenden biochemischen und molekularen Mechanismen sind vermutlich mannigfaltig und beinhalten, wie Warburg postulierte, zum Teil mitochondriale Fehlfunktionen, vor allem aber genetische Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen^{180–183} (Abbildung 9). Beispielsweise ist in den meisten Genen von Glykolyse- oder Glykolyse-assoziierten Enzymen eine evolutionär konservierte Myc-Bindungsstelle zu finden¹⁸⁴. Eine aktivierende Mutation des Myc-Onkogens führt folglich zu einer Expressionssteigerung von Glykolyseenzymen¹⁸⁵. Auch Mutationen des AKT-Onkogens vermitteln über eine erhöhte Genexpression von Glucosetransportproteinen und Glykolyseenzymen einer Steigerung der Glykolyseaktivität^{186,187}. Zudem ist beschrieben, epigenetische Veränderungen, und dass auch Genamplifikationen alternative Splicevarianten ursächlich für den Warburg-Effekt sein können^{181–183,188}.



Abbildung 9: Schematische Darstellung der ursächlichen molekularen und biochemischen Mechanismen des Warburg-Effekts. Aktivierungen von Onkogenen, wie AKT, MYC und p53 resultieren in einer Induktion der Expression von Glykolyseenzymen, im der Stimulation der Glucoseaufnahme durch Steigerung der Glucosetransporter-1 (GLUT1)- Expression und in der Aktivitätssteigerung der Hexokinase 2 (HK2), was insgesamt eine erhöhte Glykolyseaktivität zur Folge hat. Über das RAS-Onkogen oder über Hypoxie kommt es zur Aktivierung von HIF-1. HIF-1 induziert nicht nur die Expression von Glykolyseenzymen, sondern auch von Laktatdahydrogenase (LDH), was in der erhöhten Laktatproduktion resultiert. Mutationen der Tumorsuppressorgene vHL und PTEN führen ebenfalls zu einer Aktivierung von HIF-1 mit den genannten Folgen. Abbildung modifiziert nach Kim¹⁸⁵.

Unabhängig von den genetischen Veränderungen, die letztlich zur Ausprägung des Warburg-Effekts führen, stellen sich die Fragen, weshalb Tumorzellen ihren Metabolismus zur aeroben Glykolyse verschieben und welchen Vorteil diese Verschiebung mit sich bringt.

Ein Grund, der in der Literatur intensiv diskutiert wird ist, dass Tumorzellen, anders als differenzierte Körperzellen, keinem Selektionsdruck für eine optimierte ATP-Produktion ausgesetzt sind, sondern vielmehr ein selektiver Druck in Richtung einer maximierten metabolischen Rate besteht, um den Bedarf an Makromolekülen für die schnelle Zellteilung zu decken¹⁷⁵. Die mit dem Warburg-Effekt assoziierte zellautonome Nährstoffaufnahme unterstützt in Tumorzellen die Umleitung von Glucosemetaboliten in anabole Stoffwechselwege zugunsten einer schnellen Biomasseproduktion. So kann als Folge der Umverteilung beispielsweise Glucose-6-Phosphat, das erste Zwischenprodukt der Glykolyse, vermehrt über den Pentosephosphatweg in einer NADP⁺-abhängigen Reaktion zu dem Grundbaustein von Nukleinsäuren, Ribose-5-Phosphat, umgesetzt werden. Das entstandene NADPH stellt wiederum ein essentielles Reduktionsäquivalent für zahlreiche anabole Prozesse dar, wie die Fettsäuresynthese. Weitere Glykolyseintermediate, wie beispielsweise 3-Phosphoglycerat oder Pyruvat, dienen zudem der Synthese nicht-essentieller Aminosäuren, wie Serin oder Alanin^{189,190}. Somit tragen Glykolyseintermediate entscheidend zur Produktion von Makromolekülen bei, die eine Grundvoraussetzung für die Zellteilung sind. Durch die Verschiebung des zellulären Stoffwechsels in Richtung eines anabolen, proproliferativen Metabolismus stellt der Warburg-Effekt bzw. die aeroben Glykolyse folglich einen Selektionsvorteil für schnell proliferierende Tumorzellen dar¹⁷⁵.

1.3.1 Der Einfluss von Hypoxie auf den Glucosemetabolismus

Nicht nur genetische Mutationen, sondern auch die in soliden Tumoren beobachtete akute und chronische Hypoxie tragen über die hypoxievermittelte Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 zur gesteigerten Glykolyse bei^{166,191,192} (Abbildung 9). So sind als Zielgene für diesen Transkriptionsfaktor zahlreiche Glykolyseenzyme beschrieben, deren Expression folglich unter Hypoxie induziert wird¹⁹³. Zudem kommt es unter Hypoxie zur HIF-1-vermittelten Suppression des sauerstoffabhängigen, mitochondrialen Pyruvatmetabolismus, des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung^{194–196}, wodurch wiederum der glykolytische Phänotyp begünstigt wird. Die Tatsache, dass Tumorzellen sauerstoffunabhängig einen glykolytischen Metabolismus aufweisen, zeigt, dass periodische Hypoxie durch den Pasteur-Effekt eher eine unterstützende Wirkung auf den Warburg-Effekt hat und das Überleben von anpassungsfähigen Zellen mit einer konstitutiv hochregulierten aeroben Glykolyse begünstigt^{188,191} aber keine kausale Ursache für die Verschiebung zur aeroben Glykolyse ist¹⁷⁵.

Zusammenfassend ist der Warburg-Effekt entgegen Warburgs Hypothese keine Grundvoraussetzung für die Transformation, sondern wird vielmehr als eine Eigenschaft angesehen, die mit der Karzinogenese einhergeht¹⁸⁶. Dieser Prozess ermöglicht es der

Tumorzelle ihren Energiebedarf und ihre Versorgung mit anabole Vorprodukten für die *de novo* Synthese von Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden auszubalancieren^{197–199}, sich an veränderte Milieubedingungen anzupassen und ihr Proliferations- und Invasionspotential zu erhöhen¹⁸⁴.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf der Basis des Adaptationsmodells der Tumorstammzellhypothese zu untersuchen, inwieweit der Tumorstammzellphänotyp humaner Glioblastomzellen durch Hypoxie modulierbar ist. Insbesondere sollte die These der hypoxieinduzierten Verstärkung des Stammzellphänotyps *in vitro* und *in vivo* überprüft werden. Dazu wurden Glioblastomstammzelllinien (GS-Linien) aus frisch resezierten Glioblastomen parallel unter normoxischen und hypoxischen Kulturbedingungen etabliert, kultiviert und hinsichtlich der Stammzellkriterien untersucht.

Vor dem Hintergrund, dass während der Tumorprogression die Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit von Faktoren wie der lokalen Tumorzelldichte, Nekrosen und Neovaskularisierung stark fluktuiert, war ein weiteres Ziel Adaptationsmechanismen von Glioblastomstammzellen (GS-Zellen) an chronische und akute Hypoxie sowie Oxygenierung zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden die chronisch normoxischen und hypoxischen Linien zur Simulation fluktuierender Sauerstoffkonzentrationen anschließend akuter Hypoxie bzw. akuter Normoxie ausgesetzt und eine Analyse der genomweiten Genexpressionsmuster aller GS-Kulturproben durchgeführt. Da aus den bioinformatischen Regulation Analysen Hinweise auf eine reziproke der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs (PPP) durch akute Veränderung der Sauerstoffbedingung hervorgingen, erfolgte nachfolgend eine Fokussierung der Zielsetzung der Arbeit auf die Validierung und Verifizierung dieses sauerstoffkonzentrationsabhängigen Regulationsmechanismus. Ziel war es, das Ergebnis der Mikroarray-Analysen auf mRNA- und Proteinebene sowohl in vitro als auch in silico, massenspektrometrisch sowie in situ an Tumorgewebe zu überprüfen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit akute und chronische Hypoxie bzw. Normoxie funktionelle Eigenschaften der GS-Zellen, wie die Proliferation, die Migration und die Apoptose beeinflussen.

Abschließend sollte zudem die Frage untersucht werden, wie sich eine gezielte Herunterregulation von Schlüsselenzymen der Glykolyse und des PPP mittels shRNA bzw. eine Inhibition der Glykolyse und des PPP auf zelluläre Funktionen und den Stammzellphänotyp *in vitro* und *in vivo* auswirkt. Diese Experimente sollten die potentielle Nutzbarkeit der Inhibition der beiden Stoffwechselwege als therapeutische Targets überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden sind die Puffer, Lösungen, Zellkulturmedien, Kits, Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien tabellarisch ausgelistet. Eine Liste der verwendeten Chemikalien ist im Anhang in Tabelle A1 zu finden.

2.1.1 Puffer und Lösungen

TNT	0.15 M NaCl
	10 mM Tris-HCl
	0.05% Tween 20
Laemmli-Puffer (10x)	0.1 M Tris/HCL pH 7.4
	50% (v/v) β-Mercaptoethanol
	25% (w/v) SDS
	0.1% (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer	1 87 M Gylcin
	0.25 M Tris-HCI
	1 % (w/v) SDS
Transferouffer	1 92 M Glycin
	0.5 M Tris-HCI
Ponceau S-Lösung	
T onceau o Losung	
	In dest H_O
Coomassie-Lösung	0.077% (w/v) Coomassie
	25% Isopropanol
	10% Fisessia
	In dest $H_{2}O$
Tris-Triton-Puffer (TPP)	0.05 M Tris
	0.145 M NaCl
	0.01% Triton
	pH 7.6
Citratouffer (10 mM pH 6 0)	Stammlösung A:
	0 1M Citronensäure-Monobydrat in dest H ₂ O
	Stammlsöung B
	0.1M Natriumcitrat auf in dest. H ₂ O
	Citratouffer:
	27 ml. Stammlösung A + 123 ml. Stammlösung B
	$\pm 1350 \text{ m}$ dest H ₂ O
CXCR4-Lysepuffer	10 % (w/y) Glycerol
	50 mM Tris. pH 7.4
	100 mM NaCl
	1 % (w/v) NP-40
	2 mM MaCl2
	1 Tablette CompleteProtease-Inhibitor auf 50 ml
	dest.H ₂ O
MS-Waschpuffer	0.9% (w/v) NaCl
	4,5 g/L D-Glucose
MS-Quenchingpuffer	2:1 (v/v) Dichlormethan:Ethanol

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

2.1.2 Medien für Zellkultur

Medium	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1x),	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
high glucose, GlutaMAX [™] , Pyruvate	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), no	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glucose	_
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
glucose, HEPES, no Phenol Red	
Neurobasal Medium (1x)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Neurobasal Medium (1x) (Costum, glucose-free)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Neurobasal Medium (1x) Minus Phenol Red	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
aballa 2: Madian für Zallkultur	

Tabelle 3: Medien für Zellkultur

2.1.3 Kits

Kit	Hersteller		
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA		
Nucleospin RNA XS	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren		
Nucleospin RNA II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren		
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren		
NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren		
Protein Quantification Assay	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren		
L-Lactate Assay Kit	Eton Bioscience Inc., San Diega, CA, USA		
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA		
Click-iT® Edu Alexa Fluor EdU® 555 Imaging Kit	Invitrogen, Life Technologies GmbH,		
	Darmstadt		

Tabelle 4: Kits

2.1.4 Laborgeräte

Name	Hersteller			
Zellkultur und andere Anwendungsbereiche				
Sicherheitswerkbank HeraSafe Klasse 2	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund			
Zellkulturbrutschrank HeraCell	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund			
CO ₂ Inkubator C16 mit O ₂ -Regelung	Labotect, Göttingen			
CO ₂ Inkubator Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen			
Mikroskop "DM IL"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar			
Mikroskop "DM IRB"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar			
Floureszenzlampe	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar			
Fluoreszenzmikroskop "Axioskop"	Carl Zeiss AG, Oberkochen			
Fluoreszenzlampe "HBO 50"	Carl Zeiss AG, Oberkochen			
Zentrifuge "Megafuge 1.0R"	Heraeus GmbH, Bad Grund			
Zentrifuge "Centrifuge 5810"	Eppendorf AG, Hamburg			
Tisch-Zentrifuge "Minispin"	Eppendorf AG, Hamburg			
Tisch-Kühlzentrifuge "Biofuge Fresco"	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund			
-80°C Kühltruhe	Kryotec GmbH, Hamburg			
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze			
	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach			
Vortex	Heidolph GmbH, Schwabach			
Durchflusszytometer PAS	Partec GmbH, Münster			
BD FACSCanto II Durchflusszytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA			
SpectraFluor Fluorescence, TRF, FI, FRET and	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz			
Absorbance Microplate Reader				
Präzisionswaage "440-33"	Kern Sohn GmbH, Balingen			
pH Meter "CG820"	Schott-Geräte GmbH, Ludwigshafen			
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg			
Power Pac 200	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA			

Shaker Incubator Series 25	New Brunswick Scientific Co., Inc., New		
	Jersey, USA		
Schüttler "Polymax"	Heidolph GmbH, Schwabach		
Design Reiskocher Pro 42518	Gastroback GmbH, Hollenstedt		
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen		
RNA-Präpara	ation		
Elektrophoresekammer "Mini Gel Migration Trough"	Cosmo Bio Co Ldt, Carlsbad, CA, USA		
UV-Tisch	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell		
Kamera	Kodak GmbH, Stuttgart		
cDNA-Präparation			
FlexCycler Thermal Cycler	Analytik Jena AG, Jena		
Real-Time PCR	Analysen		
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA		
Tierversuche			
Mikrotiterspritze zur Injektion	Hamilton		
Mikrotom "SM 2000R"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar		
Tabelle 5: Laborgeräte			

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Combitips advanced (0,1 / 0,5 / 1 / 2,5 / 5 / 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips Plus (1 / 5 / 12,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalspritzen "Injekt" (1 / 5 / 10 / 20 ml)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf Reagiergefäße (0,5 / 1,5 / 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Cellstar-Gefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filtermembranen Polycarbonat	Neuro Probe, Gaithersburg, Maryland, USA
Glasgeräte (Bechergläser, Kolben etc.)	Schott-Duran, Mainz
Immobilon-P Transfer Membran (PVDF-Membran),	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA,
Porengröße 0,45 µm	USA
Kulturplatten 35 x 10 mm "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Kulturplatten 100 x 20 mm "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes,
	New Jersey, USA
Kryoröhrchen "Cryo Pure" (1,6 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mini-PROTEAN® TGX [™] Gels (4-15%)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Multiwell "Primaria" Flat Bottom 6-Well "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes,
	New Jersey, USA
Neubauer Zählkammer	Rudolf Brand GmbH & Co., Wertheim
Objektträger SuperFrost®	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Pipettenspitzen (10 / 200 / 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettten Biosphere® Filter Tips (10 /20 /200 /1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten "Falcon" (2 / 5 / 15 / 25 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Sterile Spitzenvorsatzfilter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Stericup & Steritop Vacuum-driven Filtration Systems	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
T-25 Zellkulturflaschen "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
T-25 "Primaria" Tissue Culture Plates "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
T-75 Zellkulturflaschen "Cellstar"	Greiner Bio One, Frickenhausen
T-75 "Primaria" Tissue Culture Plates "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
T-175 Zellkulturflaschen "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Whatman Benchkote and Benchkote Plus Absorbent	Whatman International Ldt, Maidstone, GB

Papers	
Zellkulturplaten (96-well, 48-well, 24-well, 6-well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
96-well Platte für qPCR	Applied Biosystems, Darmstadt

Tabelle 6: Verbrauchsmaterial

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl humane adhärent wachsende Glioblastomzelllinien, die in vitro unter serumhaltigen Bedingungen kultiviert werden, als auch als Neurosphären wachsende Glioblastomstammzelllinien verwendet, die unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden. Letztere stammen aus Vorarbeiten des Labors für Hirntumorbiologie der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Zum Zweck der Etablierung von Glioblastomstammzelllinien wurden nach Einwilligung der Patienten aus den frisch resezierten Tumoren Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Zellen in Stammzellmedium (siehe Kapitel 2.2.1.2) parallel unter normoxischen (21% O₂, GS^N) und zum Erhalt der Tumorhypoxie unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂, GS^H) kultiviert.

Zur Herstellung von lentiviralen Partikeln wurden HEK293FT-Zellen von Invitrogen verwendet. Dabei handelt es sich um eine Modifikation der humanen 293F Zelllinie, die das SV40 large T Antigen von pDCMVSPORT6Tag.neo stabil und konstitutiv exprimieren. Folgende Tabelle 7 fasst die verwendeten Zelllinien zusammen.

Zelllinie	Spezies	Histologische Herkunft	Quelle
G55T2	Mensch	Glioblastom	Neurochirurgie, UKE
GS-10 ^{N/H} , GS-11 ^{N/H} , GS-12 ^{N/H} und GS-13 ^{N/H}	Mensch	Glioblastom	Neurochirurgie, UKE
HEK 293FT	Mensch	Niere	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Tabelle 7: verwendete Zelllinien

2.2.1.2 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit den Dimensionen T25, T75 oder T175 bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert.

Die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Kulturmedien sind im Folgenden angegeben. Alle Kulturmedien enthielten 100U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Zusätzlich dazu wurden dem Neurobasalmedium 0,5% Fungizone und rekombinant hergestellte Wachstumsfaktoren zugesetzt.

Glioblastomzelllinie G55T2	10% FCS 1 mM Natriumpyruvat in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Glioblastomstammzelllinien	2% B-27 Supplement 1% Glutamax 20 ng/ml FGF-2 20 ng/ml EGF 32 IE/ml Heparin in Neurobasalmedium (NBM)
HEK293FT	10% FCS 1 mM Natriumpyruvat 500 μg/ml Geneticin in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Alle adhärent wachsenden Zellen wurden im subkonfluenten Zustand gehalten und im Verhältnis 1:10 gesplittet. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mittels Trypsin vom Gefäßboden abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von serumhaltigem Medium inaktiviert und die Zellen im entsprechenden Medium in gewünschter Dichte ausgesät.

Alle nicht-adhärent, sphärisch wachsende Kulturen wurden für optimale Wachstumsbedingungen mindestens einmal pro Woche mit frischem Medium, inklusive Wachstumsfaktoren und Heparin, versorgt. Bei Erreichen einer Sphärengröße von 200-500 µm wurden die Zellen mechanisch dissoziiert.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden grundsätzlich in der optimalen subkonfluenten Wachstumsphase eingefroren. Zum Einfrieren von Zellen wurden adhärent wachsenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen und trypsiniert. Etwa 1 x 10⁶ Zellen bzw. sphärisch wachsende Zellen wurden bei 1300 rpm pelletiert, in 1,6 ml Einfriermedium (10% DMSO in FCS) sorgfältig resuspendiert und in Kryo-Röhrchen langsam bei -80°C eingefroren. Nach 5 Tagen wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung bei -196°C in Stickstofftanks überführt.

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der eingelagerten Zellen erfolgt zügig im 37°C warmen Wasserbad. Anschließend wurde der Inhalt des Kryo-Röhrchens in 5 ml vorgewärmtes Kulturmedium gegeben, die Zellsuspension 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert und das Zellpellet einmal sorgfältig mit PBS gewaschen, um restliches DMSO und FCS zu entfernen. Das Aussäen der Zellen erfolgte anschließend in dem entsprechenden Kulturmedium.

2.2.1.5 Klonogenitätsassay

Klonogenität ist ein Charakteristikum von Stammzellen und beschreibt die Fähigkeit einer Einzelzelle sich unabhängig von äußeren Faktoren, wie parakriner Stimulation durch umgebende Zellen, zu teilen und klonale Zellkulturen zu etablieren. Um die Klonogenität von Glioblastomstammzelllinien nachzuweisen, wurden die Neurosphären mechanisch vereinzelt und in einer theoretischen Dichte von einer Zelle pro Well in 100 µl NBM in einer 96-Well Platte ausgesät. Über einen Zeitraum von 5 Wochen wurden die Zellen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert, einmal wöchentlich mit frischem NBM mit Wachstumsfaktoren versorgt, am Ende die Anzahl von gebildeten Klonen bestimmt und der prozentuale Anteil anhand der ursprünglich ausgesäten Einzelzellen berechnet. Für jede Zelllinie und jede Bedingung wurden Triplikate bestimmt und die Klonogenitätsrate als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

2.2.1.6 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde je nach Zelllinie und Untersuchungsansatz eine entsprechend geeignete Methode gewählt.

2.2.1.6.1 EdU Zellproliferationsassay

Um bereits geringe Unterschiede in der proliferatorischen Aktivität von Glioblastomstammzelllinien nach kurzer Zeit (72 h) ermitteln zu können, wurde das Click-iT EdU Assay Kit verwendet. Bei diesem Assay kann die relative Proliferationsgeschwindigkeit einer Zelllinie anhand der Anzahl an fluoreszierenden Zellen nach Inkubation mit dem Thymidinanalogon EdU (5'Ethynyl-2'-deoxyuridine) und anschließender chemischer Kopplungsreaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff bestimmt werden.

EdU (5'Ethynyl-2'-deoxyuridine) ist ein Nukleosidanalogon von Thymidin, das bei Zugabe zum Medium während der DNA-Synthese in die DNA als Baustein eingebaut wird. Die Detektion der inkorporierten Nukleoside findet über die schnelle Click-Reaktion-vermittelte Bindung von Alexa Fluor® Dye Fluoreszenzfarbstoffe an EdU statt und ermöglicht eine Analyse mit einer Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen ohne vorheriges Denaturieren.

Für den Assay wurden die Neurosphären zunächst mechanisch dissoziiert, pro Probe 2 x 10⁴ Zellen in 6-Well Platten ausgesät, und zur Regeneration über Nacht (ü/N) entweder unter normoxischen oder unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde die EdU-

Lösung (Endkonzentration 1 µM) zugefügt und die Zellen für weitere 48h unter Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Cytospins auf Objektträger aufgetragen, mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert, mit 3% BSA in PBS zweimal gewaschen und abschließend mit 0,5% Triton X-100 in PBS für 20 min bei RT permeabilisiert. Für die EdU-Detektion wurden die Zellen zweimal mit 3% BSA in PBS gewaschen, die Waschlösung entfernt und umgehend mit dem nach Angaben im Herstellerprotokoll frisch angesetzten Click-iT Reaction Cocktail für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen erneut einmal gewaschen und für 10 min im Dunkeln bei RT mit DAPI (1:10000 in PBS) inkubiert, bevor der Anteil EdU-positiver Zellen in 5 zufällig gewählten Feldern pro Probe mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt wurde.

2.2.1.6.2 Manuelle Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Proliferation von Glioblastomstammzelllinien über eine Inkubationszeit von bis zu drei Wochen wurde die Zellzahl zu den verschiedenen Zeitpunkten (3 Tage, 5 Tage, 7 Tage, 10 Tage, 12 Tage, 14 Tage, 17 Tage) manuell bestimmt. Dazu wurden die Neurosphären zu Beginn einmal mit PBS gewaschen und mit warmer Dissoziationslösung vorsichtig resuspendiert, 10 min bei RT inkubiert und nach Zugabe von NBM abzentrifugiert, um die Dissoziationslösung von den Zellen zu entfernen. Die Zellen wurde anschließend in NBM sorgfältig vereinzelt und mit einer Dichte von 2500 Zellen pro Well in einer 48-Well Platte ausgesät. Nachfolgend wurden die Zellen entweder unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen über einen bestimmten Zeitraum kultiviert. An den 7 aufeinander folgenden Zeitpunkten wurde das Medium durch Zentrifugation vollständig von den Zellen entfernt, das Zellpellet in 50-200 µl Alfazym resuspendiert und 10 min bei 37°C inkubiert, die Zellen erneut sehr sorgfältig resuspendiert und abschließend die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Pro Zeitpunkt und Bedingung wurde die Zellzahl als Sechsfach-Wert bestimmt, der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und daraus eine Proliferationskinetik erstellt.

2.2.1.6.3 Zellfärbung mittel Kristallviolett

Zur Zellzahlbestimmung von Monolayerkulturen wurden die kolorimetrische Methode nach Gillies et al. angewendet²⁰⁰. Dabei wurde die Zellmasse, die proportional zur Zellzahl ist, mit Hilfe von Kristallviolett bestimmt, ein basischer Farbstoff, der vorwiegend DNA-assoziierte Nucleoproteine anfärbt. Zunächst wurden 500 Zellen pro Well in einer 96-Well Platte in 100 µl des entsprechenden Mediums ausgesät und über einen Zeitraum von maximal 7 Tagen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 1% Glutaraldehyd für 15 min bei RT fixiert und das Glutaraldehyd durch
dreimaliges Waschen mit PBS von den Zellen entfernt. Die Zellen wurden mit 0,1% Kristallviolett-Lösung (0,1% Kristallviolett, 20% Methanol in dest. H₂O) überschichtet und für 1 h bei RT leicht schüttelnd inkubiert. Nachfolgend wurden die Wells vorsichtig mit Leitungswasser gespült, um restliches Kristallviolett zu entfernen, die Platte für mindestens 16 h getrocknet und das gebundene Kristallviolett in 100 µl 10% SDS-Lösung gelöst. Die Absorption bei 540 nm wurde am ELISA Reader gemessen.

Pro Zeitpunkt und Bedingung wurde die Zellzahl als Quadruplikate bestimmt, der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und daraus eine Proliferationskinetik erstellt.

2.2.1.7 Differenzierung von Glioblastomstammzellen

Adulte Stammzellen sind multipotente Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in verschiedene Zelltypen eines genetisch determinierten Gewebes zu differenzieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich auch Glioblastomstammzellen in neuronale, astrozytäre oder oligodendrogliale Richtung differenzieren lassen.

Zur Induktion der Differenzierung wurde spezielles Differenzierungsmedium mit Zusatz von 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,5% Fungizone folgender Zusammensetzung verwendet:

Differenzierungsmedium	2% B-27 Supplement 1% Glutamax 10% FCS 0,75 mM cAMP 1 μM Retinsäure in Neurobasalmedium (NBM)
	in Neurobasalmedium (NBM)

Hierbei wird Retinsäure sowohl die Fähigkeit zur Induktion der neuronalen^{201–203} als auch zur Induktion der astrozytären Differenzierung²⁰⁴ beigemessen, wohingegen cAMP zur Induktion der oligodendroglialen Differenzierung befähigt ist²⁰⁵.

Zur Untersuchung des Differenzierungspotentials wurden die Zellen an Tag 3 und Tag 10 post-Induktion mechanisch vom Flaschenboden gelöst, vereinzelt und durchflusszytometrisch untersucht (siehe Kapitel 2.2.4.1). Als Kontrolle wurden die Zellen parallel unter normalen Stammzellbedingungen kultiviert und an den verschiedenen Zeitpunkten identisch aufgearbeitet und analysiert.

2.2.1.8 Migrationsassay

Die Fähigkeit der Migration unterscheidet sich zwischen Zellen unterschiedlicher Herkunft und kann durch chemotaktische Faktoren stimuliert werden. Um zum einen die Migrationsfähigkeit unter verschiedenen Kulturbedingungen (Normoxie und Hypoxie) und zum anderen den Effekt von Substanzen auf die Zellmigration zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit modifizierte Boyden Kammer Assays durchgeführt. Für diesen Assay wurde Boydenmedium der folgenden Zusammensetzung verwendet:

Glioblastomzelllinie G55T2	0,1% BSA 1 mM Natriumpyruvat in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Glioblastomstammzelllinien	0,1% BSA 1% Glutamax in Neurobasalmedium (NBM)

In beiden Fällen war das Medium mit Pen/Strep versetzt. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, wurden adhärent wachsende Zellen einen Tag vor dem Versuch und Glioblastomstammzelllinien 2 Tage vor dem Versuch subkultiviert.

Am Tag vor dem Versuch wurde ein Filter (Neuroprobe, 8 μ m Porengröße) entweder mit 0,875% Vitrogen in 0,1% Essigsäure ü/N bei 37°C im Trockenschrank für G55T2-Zellen oder mit 5 μ g/ml Laminin in PBS mindestens 16 h bei 37°C im CO₂-Inkubator für GS-Linien beschichtet, anschließend mit 100 ml 0,1% BSA in PBS gewaschen und getrocknet.

Am Tag des Versuchs wurden die Testsubstanzen in verschiedenen Verdünnungen in dem entsprechenden Boydenmedium angesetzt. Nachfolgend wurden die Zellen ggf. trypsiniert und bei 1300 rpm für 7 min zentrifugiert. Um restliches Kulturmedium von den Zellen zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit Boydenmedium gewaschen und anschließend mit Boydenmedium, ggf. versetzt mit den entsprechenden Verdünnungen an Testsubstanzen, auf eine Zellzahl von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Nach dem Befüllen der unteren Kammer mit $30 \,\mu$ l der entsprechenden Testsubstanzen, wurde der beschichtete Filter vorsichtig aufgelegt, die obere Kammer aufgesetzt und die Kammer fest verschraubt. Anschließend wurden pro Testsubstanz und Zelllinie mindestens Quadruplikate von $1,5 \times 10^4$ Zellen in $50 \,\mu$ I der entsprechenden gut gemischten Zellösung pro Well in die oberen Wells eingefüllt und die Zellen je nach Zelllinie für weitere 6 h (G55T2) bis 24 h (GS-Linien) unter den gewünschten Kulturbedingungen (Normoxie bzw. Hypoxie) inkubiert.

Für die Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die Migration wurde die schnell migrierende, konventionelle Glioblastomzelllinie G55T2 für ca. 42 h unter hypoxischen Bedingungen präinkubiert, bevor die Zellen in die Boydenkammer aufgetragen wurden. Für die wesentlich langsamer migrierenden GS-Linien wurde keine Präinkubation durchgeführt, die Inkubationszeit der Zellen in der Kammer unter Hypoxie allerdings von 6 h auf 24 h erhöht.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Kammer auseinandergeschraubt, die Oberseite des Filters mit Hilfe eines Q-Tips von nicht migrierten Zellen befreit, in den drei DiffQuick-

Lösungen nach Anleitung jeweils 3 min gefärbt und die Zellen in je 10 Felder pro Well in der 40-fachen Vergrößerung ausgezählt, der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet und als migrierte Zellen/10 high power fields (hpf) angegeben.

2.2.1.9 Tierexperimente

Alle Tierexperimente wurden durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt und nach den gesetzlichen Vorgaben und Richtlinien für Tierhaltung unter der Genehmigungsnummer 98/12 durchgeführt.

Zur *in vivo*-Testung der Tumorigenität verschiedener Glioblastomzelllinien wurden die im Labor für Hirntumorbiologie etablierte Standardmethode verwendet. Dabei wurden, entsprechend der zu untersuchenden Zelllinie, 4 x 10⁴ Zellen (G55T2) oder 3 x 10⁵ Zellen (GS-Linien) mechanisch dissoziiert, in entsprechend serumfreien Medium gewaschen und intrazerebral in 6 bis 8 Wochen alte Nacktmäuse (Stamm NMRI-FoxN1^{nu}) injiziert.

Die Tumorzellinjektion erfolgte unter Vollnarkose durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (120 mg/kg) und Xylazin (16 mg/kg). Die Operation wurde unter Verwendung eines Stereotaxiegeräts durchgeführt. Die Kopfhaut wurde desinfiziert und der Kopf in der Stereotaxievorrichtung fixiert. Nach Eröffnen der Kopfschwarte durch einen sagittalen Mittellinienschnitt wurde das Bregma identifiziert. Die Kraniotomie erfolgte durch ein Bohrloch 2 mm links lateral der Sagittalnaht und 1 mm anterior des Bregmas. Eine Hamilton Spritze wurde am Arbeitsarm der Stereotaxie-Vorrichtung befestigt und die Nadel wurde vorsichtig ca. 2,5 mm tief bis in das Caudatum/Putamen vorgeschoben. Die Injektion der Zellen (in 4 µl PBS) erfolgt langsam über 5 min mit Hilfe der "Microinjektion-Unit", um das Herausquellen der Zellen aus dem Gewebe zu verhindern. Um eine schnelle Heilung zu gewährleisten wurde das Bohrloch mit Knochenwachs und die Kopfschwarte mit Gewebekleber verschlossen. Zur Linderung post-operativer Schmerzen bekamen die Tiere noch während der Narkose Carprofen (Rimadyl) 6 mg/kg s.c. sowie post-operativ 25 mg Novalgin in 20 ml Trinkwasser über 3 Tage verabreicht. Um das Auftreten von Belastungen und Symptomen frühzeitig zu erkennen und somit unnötiges Leiden der Tiere zu verhindern, wurden die Tiere im Anschluss an die Operation regelmäßig überwacht und Gewichtskontrollen durchgeführt. Sobald ein Gewichtsverlust von über 10% des Ausgangsgewichts oder andere Symptome auftraten, wurde dieses Tier umgehend mittels finaler CO₂–Narkose getötet. Nach Feststellung des Todes wurde der Schädel eröffnet, das Hirn entnommen und in 4% Formalin (36-40% Formaldehyd) ü/N fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gehirne in Einbetautomaten des Instituts für Neuropathologie weiter prozessiert und in Paraffinblöcke gegossen. Zur histologischen und immunhistologischen Untersuchung wurden von den Paraffinblöcken, wie unter 2.2.5.1 beschrieben, koronare Stufenserienschnitte angefertigt.

Die Größe der jeweiligen Versuchsgruppen im Tierversuch betrug 10 Tiere/Gruppe. Diese Anzahl ergab sich aus der biometrischen Planung, dass selbst bei einer erfahrungsgemäß möglicherweise hohen Standardabweichung von 35% noch eine erwartete Differenz von 33% statistisch signifikant war (Power= 0.8; α bei einseitiger Fragestellung = 0.05). Als primärer Endpunkt wurde bei allen Studien das Überleben gewertet (Analyse nach Kaplan-Meier), d.h. die Zeit bis zum Auftreten abbruchrelevanter Symptome.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation aus Zellen

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen wurde je nach Zellzahl das NucleoSpin RNA II Kit (bei 5 x 10^5 bis 5 x 10^6 Zellen) oder das NucleoSpin RNA XS Kit (\leq 5 x 10^5 Zellen) von Macherey-Nagel verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde eine photometrische Messung bei 260 nm durchgeführt. Zudem wurde die Absorption bei 280 nm und 230 nm gemessen. Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} gilt als Maß für die Reinheit der Probe. Ein Wert von 1,8 steht für reine DNA und ein Wert von 2,0 zeigt reine RNA an.

Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₃₀ wird ebenfalls zur Bestimmung der Reinheit verwendet, wobei hier ein Wert zwischen 2,0 und 2,2 die Abwesenheit von Kontaminationen, wie Proteinen, anzeigt.

2.2.2.3 Reverse Transkription

cDNA aus isolierter RNA wurde mittels reverser Transkriptase-Reaktion und des SuperScript First-Strand® Synthese System für RT-PCR unter Verwendung von oligo-dT Primern synthetisiert. Für einen 100 µl Reaktionsansatz wurde folgende Komponenten auf Eis in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

Komponente	Menge
RNA	15 µg
dNTP-Mix (10 mM each)	50 µM
Oligo-dT Primer	2,5 µg
DNase/RNase-free water	ad 60 µl

Dieser Prämix wurde für 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend auf 4°C gekühlt und parallel der cDNA-Mix wie folgt angesetzt:

Komponente	Menge/Probe
5x Reaktionspuffer	20 µl
DTT (100 mM)	10 µl
RNaseOut (40U/µI)	5 µl
SuperScript II RT (200 U/µI)	5 µl

Nach dem Abkühlen der Probe wurden je 40 µl des cDNA-Mix zugegeben und die Proben für die reverse Transkription für weitere 52 min bei 42°C inkubiert. Um die Reaktion abschließend zu stoppen wurde eine Hitze-Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70°C für 15 min durchgeführt. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.4 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Bei der quantitativen Real-Time-PCR handelt es sich, wie bei der klassischen PCR, um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, bei der allerdings zusätzlich die Quantifizierung der entstandenen DNA mittels fluoreszenzmarkierter Sonden ermöglicht wird. Wie bei einer klassischen PCR besteht der Prozess aus mehreren Zyklen der Denaturierung des doppelsträngigen DNA-Templates in Einzelstränge, der Hybridisierung des Primerpaars mit der DNA und der Elongation des jeweils komplementären DNA-Strangs an der freien 3'-OH-Gruppe am Ende des angelagerten Primers. So werden sowohl der codogene als auch der nicht-codogene Strang der Matrize *de novo* synthetisiert. Die Wahl der Primer legt jeweils den Start- und Endpunkt des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts fest. Dabei wird darauf geachtet, dass der Primer Exon-Exon-überspannend ist, um die Mitamplifikation von enthaltener genomischer DNA und somit Hintergrundsignale zu verringern. Die in jedem Zyklus synthetisierten DNA-Stränge dienen im Anschluss als Template für die nächste Runde der DNA-Amplifikation, so dass es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des definierten DNA-Abschnitts kommt.

In dieser Arbeit wurde das Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System mit validierten FAM-gelabelten TaqMan-Sonden der Firma Applied Biosystems (ABI) genutzt. Bei diesen Sonden wird das Fluoreszenzsignal zunächst durch das Prinzip des Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) auf einen Quencher unterdrückt. Während des Elongationsprozesses kommt es zur räumlichen Trennung des Quenchers vom Fluoreszenz-farbstoff (Reporter), wodurch eine ansteigende Reporter-Fluoreszenz gemessen und eine Echtzeitdarstellung der synthetisierten Amplifikate in der Reaktion realisiert werden kann.

Für die Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der Ct-Wert verwendet, ein Schwellwert, der den Zyklus beschreibt, an dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant exponentiell

über das Hintergrund-Fluoreszenzsignal ansteigt. Um die Ct-Werte zweier Proben miteinander vergleichen und damit Rückschlüsse auf die relative Template-DNA-Menge vor der Amplifikation ziehen zu können, wurden die Ct-Werte der Zielgene mit dem Ct-Wert einer endogenen Kontrolle (RPL-13A, Haushaltsgen) normalisiert. Der Wert für die Differenz des Target Ct-Wertes und des Ct-Wertes der endogenen Kontrolle wird als delta Ct (ΔCt) bezeichnet. Um die relative Quantität des Ausgangstemplates gegenüber eines Bezugsprobe (Kalibratorprobe, z.B. unbehandelte Kontrolle) zu analysieren, wurden der ΔCt-Wert der Kalibratorprobe von der zu untersuchenden Probe abgezogen, so der ΔΔCt-Wert gebildet und zur Bestimmung der n-fachen Expression eines Transkripts einer Probe gegenüber der Kalibratorprobe in die Gleichung x = $2^{-\Delta\DeltaCt}$ eingesetzt.

Alle PCR-Ansätze wurden als Triplikate durchgeführt, und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Für die qPCR wurden je 20 µl Ansätze pro Well in einer thermostabilen 96-Well Platten (Applied Biosystems) wie folgt zusammenpipettiert:

Komponente	Menge
cDNA-Probe	1 µl
Taq-Man Sonde	1 µl
RNase freies Wasser	8 µl
2x Real-Time Mastermix TaqMan Fast	10.01
Universal PCR Master Mix	το μι

Als Reaktionsbedingungen wurden die empfohlenen Standardbedingungen der Firma Applied Biosystems gewählt und 40 Zyklen (Denaturierung und Annealing/Elongation) durchlaufen:

Phase	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	50 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	
Annealing und Elongation	60°C	1 min	

Nachfolgend sind alle verwendeten Primer-Sonden-Gemische der Firma Applied Biosystems ausgelistet.

Gen-Name	ABI-ID
Humanes GLUT1	Hs00892681_m1
Humanes HK2	Hs00606086_m1
Humanes PFKP	Hs00242993_m1
Humanes ALDOC	H200193059_m1
Humanes PKM2	Hs0076178251_s1
Humanes LDHA	Hs00855332_g1
Humanes G6PD	Hs00166169_m1
Humanes PGD	Hs00427230_m1
Humanes TKT	Hs01115545_m1
Humanes TKTL1	Hs00202061_m1
Humanes PDHA	Hs00264851_m1
Humanes PDHB	Hs00168650_m1
Humanes SOX-2	Hs01053049_s1
Humanes Nestin	Hs04187831_g1
Humanes GFAP	Hs00909233_m1
Humanes MAP2	Hs00258900_m1
Humanes CD133 (Prom1)	Hs01009250_m1
Humanes RPL-13a	Hs01578912_m1

Tabelle 8: Verwendete Primer-Sonden-Gemische

2.2.2.5 Mikroarray-Analysen

Zur Erstellung von Expressionsprofilen wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Genentech (Genentec Inc., San Francisco, CA, USA) Mikroarray-Analysen durchgeführt. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Aktivität zehntausender Gene einer Probe gleichzeitig zu messen und dadurch biologische Fragestellungen aus der genomischen Perspektive zu behandeln. Mikroarray-Analysen beruhen auf dem Prinzip der komplementären Bindung zwischen Nukleotiden. In der vorliegenden Arbeit wurden ein Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 Chip verwendet. Dieser Chip beinhaltet die Daten des Humangenom-Projekts (HG) (Schuler G.D. 1997) aus der UniGene Version 133 von April 2001.

Bei einem solchen Oligonukleotid- oder Probeset-Array sind auf der Quartzoberfläche bekannte Sonden aus 25 Nukleotiden immobilisiert. Dabei sind die Positionen (Spots) der jeweiligen Sonde auf dem Array klar definiert. Ein Gen wird auf einem Array zumeist durch mehrere Sonden dargestellt, die zusammen ein Probeset bilden. Die auf dem Chip gespotteten Sonden decken über 48000 Transkripte bzw. etwa 38500 Gene ab, was einer Abdeckung des gesamten Transkriptoms sowie einem großen Anteil von Isoformen einzelner Transkripte entspricht²⁰⁶.

Zur Probengewinnung wurde zunächst aus den Zellen RNA isoliert, diese in cRNA umgeschrieben und anschließend mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei der nachfolgenden Hybridisierung binden die markierten cRNA-Stücke an die entsprechende komplementäre Oligonukleotid-Sequenz auf dem Array. Nachdem ungebundene cRNAs von

dem Array abgewaschen wurden, können die Fluoreszenzsignale jedes Spots mit Hilfe eines Lasers ausgelesen und quantifiziert werden. Dabei korreliert die Signalintensität der einzelnen Spots mit der Menge der Transkripte in der aufgetragenen Probe. Auf dem Array ist zusätzlich zu jeder Sonde, der einem realen DNA-Abschnitt entspricht (Perfect Match-Sonden), die entsprechende Mismatch-Sonde aufgetragen, bei der ein Nukleotid in der Mitte ausgetauscht ist. Durch diese Paarung von Perfect Match- und Mismatch-Sonden kann die Spezifität der cRNA-Bindung an die Sonde und somit die Echtheit eines Signals ermittelt und das Ausmaß an unspezifischen Bindungen quantifiziert werden.

Die Arrayergebnisse sind Ergebnisse einer Zusammenarbeit mit Genentec. Die RNA wurde im Labor für Hirntumorbiologie aus den Zellen isoliert, die Durchführung des Arrays wurde von Genentec bewerkstelligt. Die Auswertung der Rohdaten wurde erneut im Labor für Hirntumorbiologie durchgeführt.

2.2.2.5.1 Bioinformatische Auswertung

Für die Auswertung der Rohdaten wurden bioinformatische Verfahren angewendet, die in den folgenden Unterkapiteln erläutert werden. Das Ziel war es, aus den großen Datenmengen Informationen über differenziell exprimierte Gene zu extrahieren, d.h. herauszufinden, welche Gene bzw. funktionelle Gengruppen für die Unterscheidung zwischen zwei Proben von Bedeutung sind, in welcher Beziehung die Gene zueinander stehen, und, ob hinter einem ähnlichen Expressionsprofil eine reale biologische Bedeutung steht^{207,208}.

2.2.2.5.1.1 Normalisierung

Um Expressionsunterschiede zwischen Genen von nicht biologischer Herkunft, wie genspezifische Unterschiede in der Hybridisierung, arrayspezifische Effekte und Hintergrundrauschen, auszuschließen und somit den Vergleich von Signalintensitäten zwischen verschiedenen Sonden und Arrays zu ermöglichen, wurden die Rohdaten in der Statistiksoftware R mit dem Bearbeitungspaket GCRMA²⁰⁹ normalisiert. Die GCRMA Normalisierung ist ein Verfahren, bei dem eine Hintergrundkorrektur durchgeführt wird, die die Anfälligkeit verschiedenere Sondensequenzen zu unspezifischen Bindungen anhand der Basensequenz (A, T, G und C) an jeder Position berücksichtigt. Des Weiteren erfolgt eine verteilungsbasierte Quantilnormalisierung mit dem Ziel, die Expressionsverteilungen der Arrays aneinander anzugleichen, und über Medianglättung eine Zusammenfassung der Sonden zu sogenannten Probesets.

Im Anschluss wurde mit dem PANP-Bearbeitungspacket (Presence Absence calls with Negative Probesets) für R eine Present-Absent-Normalisierung durchgeführt²¹⁰. Dabei wurden die Transkripte, deren Expressionswerte oberhalb eines definierten Schwellwertes

lagen, als vorhandene (present-calls), und Transkripte, deren Expressionswerte unterhalb dieses Wertes lagen, als nicht-vorhandene Transkripte (absent-calls) definiert. Transkripte, die in allen untersuchten Proben als nicht-vorhanden gewertet wurden, wurden aus dem Datensatz entfernt. Dadurch werden in den weiteren Analysen signifikantere Ergebnisse erzielt.

2.2.2.5.1.2 Cluster-Analyse

Mit Hilfe einer Clusteranalyse können Ähnlichkeiten und Differenzen zwischen Expressionsprofilen verschiedener Proben erkannt und dargestellt werden. Dabei werden die Sonden anhand ihrer Signalintensität, sprich die Transkripte nach ihrer Expressionsstärke, sortiert. Das Resultat ist eine "Heatmap", bei der die Expressionsstärke mit Farbintensitäten korreliert ist.

Durch diese Sortierung entstehen sogenannte Cluster, d.h. Gruppen von Proben, die ähnliche Expressionsmuster aufweisen²⁰⁸.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Prozess des Clusterns ohne Verwendung von äußeren Informationen durchgeführt. In dem Fall wurde eine Anordnung der Daten (Proben) anhand einer Distanzfunktion erhalten und man spricht von einem unvoreingenommenen Cluster ("unsupervised clustering").

Zudem wurde in der Cluster Analyse ein hierarchischer Algorithmus angewendet, wodurch ein Dendrogramm erhalten wurde, d.h. eine Darstellung der Daten in Form eines binären Baums, in dem die Proben anhand ihrer Ähnlichkeiten bezüglich des Expressionsmusters in einer Hierarchie von verschachtelten Untergruppen ("Subsets") angeordnet sind²¹¹. Proben mit dem ähnlichsten Expressionsmuster sind dabei in direkter Nachbarschaft angeordnet. Mit zunehmender Differenz in den Expressionsmustern nimmt auch die Zahl der Verzweigungen zwischen den Proben hierarchisch zu.

Für die Berechnung des Clusters in der vorliegenden Arbeit wurde die Software Cluster 3.0 verwendet, alle Probesets eingeschlossen, die mindestens in einer Probe nach der Present-Absent-Normalisierung als "present" bezeichnet wurde und ein hierarchischer Algorithmus ("Correlation centered" und "Complete Linkage") gewählt. Zur Visualisierung der Clusteranalyse wurde die Software Java TreeView verwendet²¹².

2.2.2.5.1.3 Berechnung differenziell regulierter Gene

Um differenziell regulierte Gene genauer zu identifizieren, wurden im Anschluss genweise Analysen durchgeführt. Dazu wurde der Quotient des Expressionswerts eines Transkripts jeder einzelnen Probe mit jeder weiteren Probe berechnet (n-fache Expressionen, "fold changes", FC-Wert). In dieser Arbeit wurde als Definition für differenzielle Genexpression ein FC-Wert von \geq 2,5 gewählt. Um diejenigen Transkripte zu identifizieren, die zwischen Proben gleichermaßen reguliert sind, wurden Schnittmengendiagramme angefertigt. Dazu wurde das Online Tool Venny genutzt und anhand der Transkript-IDs der differenziell regulierten Gene der verschiedenen Proben sogenannte Venn-Diagramme erstellt²¹³. Anhand dieser Mengendiagramme können Schnittmengen zwischen den Proben erkannt und für weitere biostatistische Klassifizierungen genutzt werden.

2.2.2.5.1.4 Biostatistische Klassifizierung der Mikroarray Daten

Um die Zugehörigkeit der differenziell regulierten Gene zu funktionellen Gruppen zu untersuchen und so den Datensatz hinsichtlich der funktionellen Bedeutung zu vergleichen, kamen in der vorliegenden Arbeit verschiedene Online-Ressource zum Einsatz. In diesen Online-Ressource werden sogenannte "Ontologies" verwendet. Diese bieten eine strukturierte biologische Beschreibung der untersuchten Gene. Eine der weit verbreitetsten "Ontologies" ist die "Gene Ontology" (GO), in der Informationen einer Vielzahl von Genen über ihre molekulare Funktionen, ihre Beteiligung an biologische Prozessen und ihr Vorkommen in zellulären Kompartimenten in verschiedenen Organismen zusammengestellt und organisiert sind²¹⁴. Mit Hilfe dieser Datenbank können Gene speziellen GO Terms zugeordnet werden, die ihre Funktion und Lokalisation näher beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gene Ontology-Datenbank genutzt, um die differenziell regulierten Gene zu den entsprechenden GO Terms der drei verschiedenen Gene Ontology Kategorien, a) biologische Prozesse, b) molekulare Funktionen, c) zelluläre Komponente, zuzuordnen. Innerhalb dieser drei Gruppen findet nach der Zuordnung der Gene ein Ranking nach der jeweiligen Präzision, d.h. nach der Signifikanz der beobachteten differenziellen Regulation statt, mit Level 9 für die differenziell regulierten Gene mit der höchsten Signifikanz bis Level 1 für die Gene mit der geringsten Präzision.

Des Weiteren wurden über diese funktionellen Annotationen sogenannte KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Signalwege identifiziert^{215,216}. Mit Hilfe von KEGG können Gengruppen des Genoms mit einem Netzwerk von interagierenden Molekülen in der Zelle verknüpft werden, wie beispielsweise Signalwegen oder Molekülkomplexen. Mittels KEGG konnten somit Signalwege identifizieren werden, die zwischen den untersuchten Gengruppen differenziell reguliert waren.

Es existieren eine Reihe von Online Tools, die die unterschiedliche funktionelle Annotation der Gene zu GO Terms und KEGG Signalwege nutzen, um signifikante funktionelle Anreicherungen ("functional Enrichment") in den untersuchten Proben zu identifizieren, die für die Interpretation von Mikroarray Analysen nützlich sind^{217,218}.

Um überrepräsentierte GO Terms und KEGG Signalwege einer Probe gegenüber dem Gesamtgenom zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Annotation in die GO

Terms mittels DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, http://david.abcc.ncifcrf.gov) durchgeführt^{219,220}.

Zum Zweck der Identifikation signifikant überrepräsentierter GO Terms und KEGG Signalwege einer Gengruppe gegenüber einer Referenzgruppe wurde in dieser Arbeit die Babelomics v3.2 Plattform mit dem Webtool FatiGO (Fast Assignment and Transference of Information using Gene Ontology (GO), http://www.fatigo.org)²²¹ verwendet, in dem zur Signifikanzberechnung den Fisher Exact Test benutzt wurde.

2.2.2.6 Lentivirale Transduktion

Um spezifische Gene stabil runterzuregulieren, wurden in dieser Arbeit shRNA-Konstrukte mittels Lentiviren stabil in die Zielzellen (u.a. Primärzellen) eingebracht.

Zu diesem Zweck wurde das RNAintro GIPZ lentiviral shRNAmir transduction kit (Katalognummer RHS5086) der Firma Open Biosystems (Lafayette, CO, USA, Thermo Scientific ABgene) erworben. Das Kit beinhaltet Glycerolstocks verschiedener *E.coli* Klone, die pGIPZ lentivirale Vektoren (Abbildung 10) mit unterschiedlichen genspezifischen oder scambled shRNA-Sequenzen tragen (siehe Tabelle 9) und zur Produktion von Plasmid-DNA genutzt werden können.



Abbildung 10: Vektorkarte des pGIPZ lentiviral shRNAmir Vektors. shRNAmir: shRNA-Sequenz. CMV: CMV-Promoter. cPPT: Zentraler Polypurine Bereich. WRE: WER-Element. Ψ: Verpackungssignal psi. tGFP: GFP-Gen. Puro^r: Puromycin-Resistenzgen. Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen. 5'LTR: Long terminal repeat am 5' Ende. pUC ori: Replikationsursprung. SIN-LTR: 3' selbst-inaktivierender long terminal repeat. RRE: Rev responsive element. Zeo: Zeozin-Resistenzgen²²².

Der pGIPZ Vektor enthält neben der spezifisch shRNA, flankiert durch mir-Sequenzen, das lentivirale Verpackungssignal ψ , einen Promotor, einen Replikationsursprung, Signalsequenzen zur Transkriptionsinitiation und –termination und Stabilisierung, Translokation und Translation, einen sich selbst-inaktivierenden long terminal repeat (SIN-LTR) am 3'Ende, 5'LTR, ein Rev response element, TurboGFP zur Visualisierung transduzierter Zellen, und bakterielle (Ampicillin) und eukaryotische Selektionsmarker (Zeocin und Puromycin).

Name des Klons	Bestellnummer	Klon ID
Non-silencing pGIPZ lentiviral shRNAmir negative	RHS4346	
GAPDH – pGIPZ lentiviral shRNAmir positive control vector	RHS4371	
Human pGIPZ lentiviral shRNAmir individual clone shG6PD 1	RHS4430- 98851229	V2LHS_92826
Human pGIPZ lentiviral shRNAmir individual clone shG6PD 2	RHS4430- 99290366	V2LHS_232479
Human pGIPZ lentiviral shRNAmir individual clone shG6PD 3	RHS4430- 101520605	V3LHS_315154
Human pGIPZ lentiviral shRNAmir individual clone shALDOC 1	RHS4430- 101167229	V3LHS_325165
Human pGIPZ lentiviral shRNAmir individual clone shALDOC 2	RHS4430- 101165498	V3LHS_325164
Human pGIPZ lentiviral shRNAmir individual clone shALDOC 3	RHS4430- 101163275	V3LHS_325168

Tabelle 9: Verwendete E.coli Klone

In dem Kit sind zudem eine Verpackungszellinie HEK293T, das Transfektionsreagenz Arrest-In und der Trans-lentiviral GIPZ Packaging Mix aus verschiedenen Verpackungsplasmiden enthalten.

2.2.2.6.1 Herstellung von lentiviralen Partikeln

2.2.2.6.1.1 Plasmidisolation aus E.coli und Qualitätskontrolle

Je nach gewünschter Plasmid-DNA Menge wurde die Plasmid-DNA in Mini- oder Maxipräparationen mittels NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit oder NucleoBond Xtra Maxiprep Kit isoliert. Dazu wurde eine Übernachtkultur mit LB broth (low salt) Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit dem entsprechenden E.coli Klon aus den Glycerolstocks angeimpft und die Plasmid-DNA am Folgetag nach Herstellerangaben präpariert. Zur anschließenden Qualitätskontrolle wurde ein Verdau mit Hilfe der Restriktionsendonuklease SacII (Fermentas, #ER0201) unter den vom Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen durchgeführt. Dazu wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 10 U Restriktionsenzym und dem entsprechenden 10x Restriktionspuffer versetzt und 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (1% (w/V) Agarose in 0,5 x TAE Puffer, 100 V, 30 min) analysiert.

2.2.2.6.1.2 Kotransfektion von HEK293T-Zellen

Zur Herstellung von lentiviralen Partikeln wurde die Verpackungszelllinie HEK293T mit dem jeweiligen shRNAmir Konstrukt und dem Trans-Lentiviral Packaging Mix bestehend aus 5 Packaging Plasmiden mittels Arrest-In (lipo-polymerische Zusammensetzung) als

Transfektionsreagenz kotransfiziert. Dazu wurden 24 h vor der Transfektion 5,5 x 10⁶ HEK293T-Zellen in 10 cm²-Kulturschalen ausgesät. Am Tag der Kotransfektion wurden pro Ansatz 9 µg Plasmid-DNA aus den entsprechenden Plasmidpräparationen und 28,5 µg Plasmid-DNA des Lentiviral Packaging Mix in 1 ml serumfreien Medium gemischt. Parallel dazu wurde das Arrest-In Transfektionsreagenz 1:5 mit serumfreien Medium gemischt und zur Bildung liposomaler Vesikel 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und zur Bildung von kationischen Komplexen aus DNA und Lipidpolymeren für 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium auf den HEK293T-Zellen gegen 3 ml serumfreies Medium ausgetauscht, die jeweilige DNA/Polymer-Suspension zu den Zellen getropft und vorsichtig gemischt. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium auf den Zellen gegen serumhaltiges Kulturmedium ausgetauscht.

2.2.2.6.1.3 Gewinnung von lentiviralen Überständen

48h nach der Kotransfektion wurden erstmalig Viren von den Verpackungszellen geerntet. Dazu wurde das virushaltige Kulturmedium von den Zellen abgenommen, bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert und frisches Kulturmedium zugegeben, um eine erneute Ernte nach weiteren 24 h zu ermöglichen.

Um die Konzentration von viralen Partikeln in den viralen Überständen zu erhöhen wurden die Partikel aus den gewonnen Überständen mittels PEG-it[™] Precipitation Solution (SBI) nach Protokoll gefällt, das Viruspellet anschließend in 100 µl kaltem PBS resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.6.2 Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter wurde an der späteren Zielzelllinie GS-11 ermittelt. Zu diesem Zweck wurden 6 x 10⁴ Zellen pro Well einer 24-Well Platte in 333 µl Medium ausgesät, die jeweiligen viralen Stocks in einer 5fach-Verdünnungsreihe zugegeben und nach 48-stündiger Inkubation der Prozentsatz an GFP-positiven, d.h. transduzierten Zellen, mittels Durchflusszytometrie im FITC-Kanal ermittelt. Zur Berechnung des Titers T wurde folgende Formel verwendet:

$$T = (N^*P)/V$$

mit N der Anzahl der ausgesäten Zellen, V dem Volumen des zugegebenen viralen Überstands und P dem prozentualen Anteil an transduzierten Zellen. Der Titer wurde angegeben als TU/ml (transducing unit per ml).

Zur Berechnung des nötigen Volumens für die Tranduktion mit einem MOI (Multiplicity of Transfection) von 100 wurde folgende Formel verwendet:

TU/mI = N*MOIgewünscht

mit N der Anzahl ausgesäter Zellen, TU/ml dem Titer der viralen Stocklösung und einem MOI von 100.

2.2.2.6.3 Lentivirale Transduktion von G55T2 und GS-Zellen

Zur lentiviralen Transduktion von G55T2- und GS-Zellen wurden am Tag vor der Transduktion 5×10^4 Zellen pro Well in einer 24-Well Platte in 300 µl des entsprechenden Mediums ausgesät. Am Tag der Transduktion wurde das Medium im Fall der G55T2 gegen serumfreies Medium gewechselt und die entsprechenden lentiviralen Partikel (MOI 100) zu den Zellen geben. Nach 24 h wurde das Virus-haltige Medium entfernt und frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h wurde 1 µg/ml Puromycin zur Selektion der transduzierten Zellen verwendet und das Puromycin-haltige Medium alle 3 bis 4 Tage erneuert.

2.2.2.7 Testung lentiviral transduzierter Zellen auf Produktion infektiöser Partikel

Die in dieser Arbeit synthetisierten und verwendeten lentiviralen Partikel sollten durch verschiedene Voraussetzungen in den Zielzellen replikationsinkompetent sein. Zum einen wurde das lentivirale DNA-Gerüst (Backbone) insofern modifiziert, als dass ausschließlich die essentiellsten genetischen Elemente für die Integration und die Verpackung (5'LTR, Psi-Sequenz, Polypurin-Bereich und 3'LTR) erhalten geblieben sind und zum anderen liegen die zur Herstellung infektiöser Partikel nötigen Sequenzen gag, pol und env auf verschiedenen Helferplasmiden, die lediglich bei der Kotransfektion der HEK293T Zellen verwendet werden. Diese Sequenzen sind daher nicht in den Zielzellen enthalten. Um dennoch die Produktion von infektiösen Partikeln durch lentiviral transduzierte Zellen ausschließen zu können, wurde mit den Medienüberständen dieser Zellen ein Helferviren-Assay durchgeführt. Für diesen Assay wurden 1 x 10⁵ Zellen in 500 µl Medium in einer 12-Well Platte ausgesät und für 24 h mit konditioniertem Medium lentiviral transduzierter Zellen kultiviert. Nach 24 h wurde die Selektion potentiell transduzierter Zellen mit Puromycin-haltigem Medium gestartet. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage erneuert. Nach 14 Tagen wurde das Vorhandensein von überlebenden Zellkolonien ermittelt. Bei vollständiger puromycininduzierter Zelltötung wurde davon ausgegangen, dass von den transduzierten Zellen keine replikationskompetenten Lentiviren gebildet wurden und die Arbeiten unter S1-Bedingungen fortgesetzt werden konnten.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinisolation

Für die Isolation von Proteinen aus eukaryotischen Zellen wurde Lysepuffer (CXCR4-Lysepuffer, Kapitel 2.1.1) mit Orthovanadat verwendet. Zunächst wurden adhärent wachsende Zellen nach Abschluss der Inkubation mittels Trypsin vom Flaschenboden gelöst und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Bei sphärisch wachsenden Zellen wurde auf die Trypsinierung verzichtet. Anschließend wurden das Zellpellet in 200 µl CXCR4-Lysepuffer pro 1 x 10⁶ Zellen aufgenommen, 30 min auf Eis schüttelnd inkubiert, 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand zur Proteinbestimmung und für Western Blot Versuche verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde der Protein Quantifikation Assay verwendet. Der Vorteil dieses Assay gegenüber anderen Methoden zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen ist, dass dieser Assay nicht durch reduzierende Agenzien wie SDS beeinflusst wird. So können mit diesem Assay auch bereits mit Laemmli-Puffer aufgekochte Lysate analysiert werden. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.2 SDS-Plyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE)

Zur analytischen Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden kommerzielle Gradientengele verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 10x Laemmli (Endkonzentration 1x) für 5 min bei 95°C aufgekocht. Durch das enthaltene β-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken zerstört und das SDS führt zur Zerstörung der nichtkovalenten Bindungen zwischen Aminosäuren und bringt die Proteine zudem auf eine einheitliche negative Ladung, so dass die Auftrennung rein nach Proteingröße erfolgen kann. Als Molekulargewichtsmarker wurde der BenchMark Pre-Stained Protein Ladder mit einer Bandenbreite von 10 bis 190 kDa verwendet.

Von den Proteinlysaten wurden jeweils 0,5-20 µg Protein pro Geltasche aufgetragen und die Proteine bei 100 V ca. 1 bis 2 h aufgetrennt bis die blaue Lauffront das Gelende erreicht hatte. Die Zusammensetzung des verwendeten Laufpuffers ist Tabelle 2 zu entnehmen.

2.2.3.3 Immunoblotting (Western Blot)

Die Polyacrylamid-Gele wurden nach Anweisung des Herstellers aus der Gelkammer gelöst und die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel und die Methanol-aktivierte Membran zwischen zwei Glasfasermatten und je zwei Transferpuffer getränkten Filtern (3MM, Whatman) fixiert und in eiskaltem Transferpuffer (Tabelle 1) bei 100 V für 30 min geblottet. Um die Transfereffizienz zu überprüfen wurde die Membran kurz mit Ponceau S-Lösung gefärbt und anschließend mit H₂O wieder entfärbt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran im Anschluss für mindestens 1 h in 1x Roti-Block inkubiert, bevor die Membran ü/N bei 4°C mit dem Primärantikörper leicht schüttelnd inkubiert wurde. Die Antikörper wurden dazu in TNT-Puffer verdünnt (Tabelle 10). Ungebundener Primärantikörper wurde am Folgetag durch viermaliges Waschen für 10 min mit TNT-Puffer entfernt. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in der entsprechenden Verdünnung für 1 h bei RT inkubiert (Tabelle 11), ungebundener Antikörper erneut durch Waschen entfernt, schließlich mit dest. H₂O nachgespült und die Membran für ca. 5 min mit den Chemi-lumineszenz-Reagenzien Luminol/Enhancer und stabiler H₂O₂-Lösung (SuperSignal West Pico oder Femto) inkubiert. Zur Detektion der Signale wurden Filme in einer Dunkelkammer für variable Expositionszeiten aufgelegt und anschließend entwickelt. Zur densitometrischen Quantifizierung wurde die Software ImageJ verwendet.

Antikörper	Spezies	Poly-/ monoklonal	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
ALDOC	Schaf	polyklonal	0,2 µg/ml	Santa Cruz	sc-12065
G6PD	Maus	monoklonal	1 µg/ml	Lifespan Biosciences	LS-B3587
HK2	Maus	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Novus	NBP1-51643
LDHA	Kaninchen	polyklonal	0,2µg/ml	Santa Cruz	Sc-33781
PDHB	Maus	monoklonal	0,4 µg/ml	Abnova	H00005162-M03
PFKP	Kaninchen	polyklonal	0,25 µg/ml	Abnova	PAB3996
PGD	Maus	monoklonal	0,5 µG7ml	Abnova	H00005226-M01
PKM2	Kaninchen	polyklonal	0,25 µg/ml	Abnova	PAB2038
TKTL1	Kaninchen	polyklonal	0,79 µg/ml	Novus Biologicals	NBP1-31674
Tubulin	Maus	monoklonal	0,1 µg/ml	Calbiochem	CP06

Tabelle 10: Verwendete primäre Antikörper

Spezifität	Gekoppelte Substanz	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
α-Kaninchen-IgG	HRP	Schaf	1:80000	Sigma	A0545
α-Ziege-IgG	HRP	Kaninchen	1:20000	Sigma	A4174
α-Maus-IgG	HRP	Schaf	1:20000	Sigma	A9309

Tabelle 11: Verwendete sekundäre Antikörper

2.2.3.4 Entfernung gebundener Antikörper (Strippen)

Zum Entfernen von gebundenen Sekundär- und Primärantikörpern wurden die Membranen nach dem einmaligen Waschen mit TNT für 15 min bei RT mit Restore Western Blot Stripping Buffer inkubiert, anschließend mit TNT für 5 min gewaschen und konnten anschließend erneut blockiert und zur Detektion anderer Proteine verwendet werden.

2.2.4 Durchflusszytometrische Analysen

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Zellpopulation unterschiedlicher Zellgröße und -morphologie, anhand und unterschiedlichem Expressionsmuster von spezifischen Antigenen, die mittels Antikörper markiert werden können, innerhalb einer Gesamtpopulation identifiziert und quantifiziert werden können. Für das Messprinzip können entweder Antigene mittels fluorochromgekoppelter Antikörper markiert, fluoreszierende Proteine spezifisch an zelluläre Strukturen gebunden oder Substrate durch eine chemische Reaktion intrazellulär zu einem fluoreszierenden Molekül umgesetzt werden. Die daraus resultierenden fluorezenzmarkierten Zellen fließen bei der Messung in hohem Tempo in den Mikrokanal einer Küvette und passieren dabei einen Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge. Das dabei entstehende Streulicht wird im Vorwärtsstreulich-Kanal (forward scatter, FCS) als Maß für die Größe der Zelle und im Seitwärtsstreulicht-Kanal (sideward scatter, SSC) als Maß für die Granularität der Zelle ermittelt. Parallel zum Streulicht kommt es zur Emission von Fluoreszenzsignalen durch die laserinduzierte Anregung der fluoreszierenden Moleküle, welches von einem Photomultiplier detektiert wird.

Bei allen durchflusszytometrischen Methoden wurden mindestens Quadruplikate gemessen und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Als Kontrolle diente ggf. jeweils eine unbehandelte Kontrolle, die parallel zur behandelten Probe gleichermaßen aufgearbeitet wurde.

2.2.4.1 Analyse der Expression von Stammzellmarker und weiteren intrazelluläre Targets

Für die Quantifizierung intrazellulärer Antigene (Stammzell- und Differenzierungsmarker, sowie Stoffwechselenzyme) wurden pro Probe 5 x 10⁵ GS-Zell am Messtag ggf. zunächst mechanisch vom Flaschenboden gelöst und dissoziiert, für 20 min in 4% PFA fixiert (ausgenommen CD133, siehe unten) und mit 0,1% BSA/0,1% Saponin in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 3% Triton in PBS permeabilisiert, gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen mit 0,5% BSA/0,1% Saponin in PBS für 1 h blockiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit dem Primärantikörper für 2 h inkubiert, durch Waschen mit 0,01% NaN₃ in PBS, unterschichtet mit 150 µl FCS, ungebundener Antikörper entfernt und die Zellen nachfolgend für 1 h mit Sekundärantikörper im Dunkeln inkubiert. Für die abschließende Färbung des Zellkerns wurden die Zellen nach dem letzten Waschschritt mit 0,01% NaN₃ in PBS in DAPI-CyStain in PBS aufgenommen und die Fluoreszenzemission Partec PAS Signale ie nach erwarteter am Durchflusszytometer oder in der UKE FACS Core Facility am BD FACS Canto II Durchflusszytometer gemessen. Alle Schritte wurden, falls nicht anders beschrieben, bei 4°C durchgeführt.

Bei dem Stammzellmarker CD133 handelt es sich um ein Oberflächenantigen, weshalb für die Detektion die Permeabilisierung der Zellen entfällt. Zudem wurde hier ein fluoreszenzmarkierter Primärantikörper verwendet. Für die Detektion von CD133 wurden pro Probe 1,5 x 10^5 Zellen mechanisch dissoziiert und in 150 µl PBS-Azid aufgenommen, 10 µl FcR Blocking Reagenz, jeweils 5 µl anti-CD133/1 PE und 5 µl CD133/2 PE zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen 30 min mit 10 µl mouse IgG1-PE (Miltenyi, #130-092-212) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml 0,01% NaN₃ in PBS, unterschichtet mit 150 µl FCS, gewaschen, die Zellen abschließend in 100 µl DAPI-Cystain aufgenommen und innerhalb von 30 min analysiert, da das Signal erfahrungsgemäß nach dieser Zeit abnimmt. Die für die durchflusszytometrischen Analysen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 12 und 13 aufgeführt.

Antikörper	Spezies	Poly-/ monoklonal	Konzentration/ Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
ALDOC	Schaf	polyklonal	4 µg/ml	Santa Cruz	sc-12065
G6PD	Maus	monoklonal	1:200	Thermo Scientific	MA5-15918
SOX-2	Maus	monoklonal	2 µg/ml	R&D Systems	MAB2018
GalC	Maus	monoklonal	5 µg/ml	Millipore	MAB342
GFAP	Kaninchen	polyklonal	4,8 µg/ml	Dako	Z0334
Nestin	Kaninchen	polyklonal	1:200	Millipore	AB5922
Neurofilament (SMI-311)	Maus	monoklonal	1:500	Covance	SMI-311R
CD133/1 (AC133)-PE	human	monoklonal	1,5 µg/ml	Miltenyi Biotec	130-080-801
CD133/2 (AC141)-PE	human	monoklonal	1,5 µg/ml	Miltenyi Biotec	130-080-901

Tabelle 12: Verwendete primäre Antikörper

Spezifität	Gekoppelte Substanz	Spezies	Verdünnung	Fluoreszenz	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Schaf	FITC	Kaninchen	35 µg/ml	Grün	Dako	F0250
Anti-Kaninchen	FITC	Schwein	20,25 µg/ml	Grün	Dako	F0205
Anti-Maus	FITC	Schaf	10 µg/ml	Grün	Dako	F0479
Anti-Schaf	TRITC	Kaninchen	65 µg/ml	Rot	Dako	R0270
anti-Kaninchen	TRITC	Schwein	50 µg/ml	rot	Dako	R0156

Tabelle 13: Verwendete sekundäre Antikörper

2.2.4.2 Annexin V Apoptose-Assay

Die Detektion und Quantifizierung von Apoptose auf Einzelzellebene wurde unter Verwendung des Annexin V Apoptosis Detection Kit I durchgeführt. Die Methode basiert auf der Annexin V-Markierung von Phosphatidylserinen, die als Folge von apoptoseinduzierter Veränderung der Zelloberfläche von der inneren an die äußere Zellmembran translozieren^{223–225}. Annexin V ist ein Ca²⁺-abhängiges Phospholipidbindeprotein mit einer

hohen Affinität gegenüber Phosphatidyserin²²⁶. Um zudem apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen zu unterscheiden, wurde Proidiumiodid (PI) verwendet, ein Farbstoff der nur in durchlässige nekrotische Zellen eindringen kann und die DNA anfärbt.

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen innerhalb einer Zellpopulation wurden die Zellen nach der entsprechenden Behandlung mechanisch zerkleinert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und die Zellzahl mit 1x Binding Buffer auf 1 x 10^6 Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wurden 100 µl dieser Zellsuspension mit 5 µl PI und 0,5 µl FITC-Annexin V für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und abschließend innerhalb von einer 1 h durchflusszytometrisch am Canto II analysiert.

2.2.5 Histologische Methoden

2.2.5.1 Histologische Untersuchungen

Zur Feststellung der Tumorlokalisation, -morphologie und des Invasionsverhaltens wurden Gewebeschnitte mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung (H&E-Färbung) gefärbt. Dabei wird Hämatoxylin durch saure Bestandteile (überwiegend Zellkerne) zu dem blauen Farbstoff Hämatein oxidiert, wohingegen Eosin basische Zellbestandteile, wie das Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern rot färbt. Folgende Lösungen wurden zu Beginn hergestellt:

Eosin-Stammlösung (1%)	1000ml Ethanol (99%) + 10 g EosinG
------------------------	------------------------------------

Ethanol/HCI-Differenzierungslösung 964 ml Ethanol (98%) + 21,6 ml HCI (25%)

Für die H&E-Färbung wurden von den fixierten Mäusehirnen mit einem Mikrotom (Leica) 4 µm dicke koronare Stufenserienschnitte angefertigt, auf SuperFrost Objektträger aufgebracht und ü/N bei 37°C getrocknet. Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst zweimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert und dann in 2 min Intervallen in einer absteigenden Alkoholreihe (98%, 96%, 90%, 80%, 70%) rehydriert. Nach fünfminütigem Inkubieren in dest. Wasser wurden die Schnitte für 5 min in Hämatoxylin inkubiert, um die Kerne zu färben. Nach dem Spülen unter fließendem Leitungswasser für 5 min wurden die Schnitte für 2 Sekunden in Ethanol/HCI-Lösung differenziert und für weitere 5 min unter Leitungswasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte für 7 min in 1% Eosin (in 96% Ethanol) inkubiert und nachfolgend zum Auswaschen des Eosins und der Dehydrierung in 60 Sekunden Intervallen durch eine aufsteigende Alkoholreihe (90%, 96% 100%) geführt, einmal für je 10 min in Xylol inkubiert und abschließend mit Eukitt® Eindeckmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die histologische Auswertung fand mikroskopisch statt.

2.2.5.2 Immunhistologische Färbungen

Mittels immunhistologischer Färbungen ist es möglich, Expressionsmuster bzw. Lokalisationen von bestimmten Proteinen in Gewebeschnitten zu analysieren.

Für diese Methode wurden sowohl aus fixierten und in Paraffin eingebetteten Mäusehirnen als auch aus frisch reseziertem Glioblastomgewebe, wie unter 2.2.5.1 beschrieben, Stufenserienschnitte angefertigt, getrocknet und am Folgetag zweimal für 10 min in Xylol entparaffiniert, für 2 min in 100% Ethanol von Xylol befreit und die endogene Peroxidase durch Inkubation in 3% H₂O₂ in 100% Ethanol für 30 min bei RT inhibiert. Anschließend durchliefen die Schnitte in 2 min Intervallen eine Alkoholreihe (100 % bis 70 %) zur Rehydrierung des Gewebes. Nach 5 minütigem Waschen der Schnitte in dest. H₂O wurde das Gewebe für 60 min in kochendem 10 mM Citratpuffer (pH 6.0) demaskiert. Nachfolgend wurden die Schnitte 5 min in dest. H₂O und dann in Trit-Triton-Puffer (TTP) gewaschen und das Gewebe mit dem entsprechenden Primärantikörper ü/N bei RT (HIF-1a) oder 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte am Folgetag dreimal für 5 min in TTP gewaschen, nachfolgend mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT in der Feuchtkammer inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Durch Zugabe des Vector NovaRed Substrates für Peroxidase kommt es durch die Aktivität der HRP am Sekundärantikörper zur Umsetzung des Substrats zu einem braunen unlöslichen Farbstoff. Nach der Farbreaktion wurden die Schnitte für 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen, für 30 Sekunden in Hämalaun zur Kernfärbung inkubiert, erneut für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und dann mit Glyceringelatine eingedeckelt.

Die verwendeten Primär- und Sekund	ärantikörper sind in Tabelle 14 u	d 15 aufgelistet.
------------------------------------	-----------------------------------	-------------------

Antikörper	Spezies	Poly-/ monoklonal	Hersteller	Bestellnummer	Konzentrationen
ALDOC	Kaninchen	polyklonal	Lifespan Biosciences	LS-B3453	5 µg/ml
G6PD	Maus	monoklonal Lifespan Biosciences		LS-B3587	1 µg/ml
HIF-1α	Maus	monoklonal	Santa-Cruz	sc-53546	2 µg/ml
HK2	Maus	monoklonal	Novus	NBP1-51643	Nicht quantifiziert, 1:500 verdünnen
PFKP	Kaninchen	polyklonal	Abnova	PAB3996	8,3 µg/ml
PGD	Maus	monoklonal	Abnova	H00005226- M01	5 µg/ml
MIB1 (Ki-67)	Ratte	monoklonal	Dako	M7248	1,6 µg/ml

Tabelle 14: Verwendete primäre Antikörper

Spezifität	Gekoppelte Substanz	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Histofine [®] Simple Stain [™] MAX PO (M) Histofine α-Maus-IgG	HRP	Schaf	Unverdünnt	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan	41413
Histofine [®] Simple Stain [™] MAX PO (R) Histofine α- Kaninchen-IgG	HRP	Schaf	Unverdünnt	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan	41414
Histofine [®] Simple Stain [™] MAX PO (G) Histofine α -Schaf-IgG	HRP	Kaninchen	unverdünnt	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan	41416

Tabelle 15: Verwendete sekundäre Antikörper

2.2.5.3 Tissue Microarray (TMA)

Diese Gewebearray-Technik bietet den Vorteil in einem Versuch bis zu 1000 Gewebeproben beispielsweise von Tumoren materialschonend, kostengünstig und zeitsparend gleichzeitig auf einem Objektträger zu analysieren und somit eine gute Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten.

TMA 400 Gliomproben, 25 AVM-Proben Auf den wurden (Arteriovenöse Malformationsproben) und 24 Sektionen aufgetragen. Die 400 Gliomproben stammten von Patienten, die in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zwischen 1989 und 2010 behandelt wurden. Alle Gliomproben wurden nach der Standardbehandung im Institut für Neuropathologie analysiert und nach den neusten WHO-Standards klassifiziert⁷. Zur Herstellung des Gewebearrays wurde der für den Grad charakteristische Fokus jeder Probe mikroskopisch auf dem histologischen Schnitt ermittelt und parallel auf dem originalen (Donor-) Paraffinblock identifiziert und markiert. Anschließend wurden mit Hilfe einer speziellen Stanzmaschine aus dem Empfängerblock Löcher ausgestanzt und aus jedem Donorblock eine genormte zylindrische Biopsie mit einem Durchmesser von 0,6 mm entnommen und mittels eines Rasters und einer dünnwandigen Nadel kontrolliert in den Empfängerblock übertragen. Die Position jeder Probe wurde erfasst, um eine spätere Identifikation der Proben auf dem Objektträger zu ermöglichen. Nach der Konstruktion des Arrayblocks wurden serielle 5-µm Schnitte mit einem Mikrotom unter Verwendung eines adhäsionsbeschichteten Tape Sectioning Systems geschnitten. Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte wurden für die histologische Überprüfung des Tumorgewebes genutzt. Die immunhistologische Färbung der spezifischen Proteine erfolgte nach dem Protokoll unter 2.2.5.2. Allerdings wurden die Schnitte zur Entparaffinierung zweimal je 60 min in Xylol inkubiert.

2.2.6 Weitere Online Tools

Um die Expression verschiedener Gene in den verschiedenen WHO-Graden von Gliomen und Normalhirn zu untersuchen, wurde die REMBRANDT (REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa) Datenbank genutzt (http://caintegrator-info.nci.nih.gov/rembrandt). Hierbei handelt es sich um die Initiative von NCI und NINDS eine öffentlich zugängliche Datenbank für molekulare, genetische und klinische Ergebnisse zu erstellen. In erster Linie ist das Ziel eine große Anzahl von adulten und pädiatrischen primären Hirntumoren mittels Affymetrix Genexpressions-Arrays molekular zu charakterisieren und diese mit retrospektiven und prospektiven Daten zu korrelieren. Unter Nutzung dieser Datenbank ist es möglich, Genexpression, chromosomale Aberration und klinische Daten gesuchter Gene zwischen den verschiedenen WHO-Graden und Normalhirn zu vergleichen.

2.2.7 Massenspektrometrische Flux Analysen

Zur Analyse des metabolischen Flux in GS-Zellen wurde [1,2-¹³C₂]-D-Glucose (99 %ige Isotopenanreicherung der spezifischen Positionen, Cambridge Isotopes Laboratories, Woburn, MA) als Einzeltracer verwendet. Dies ermöglicht die Bestimmung der Isotopologverteilung in extrazellulärem Laktat, dem Triosephosphat Produkt des Embden-Meyerhof Wegs. Die Flux Analyse bzw. die Bestimmung der Herkunft des gebildeten Laktats beruht darauf, dass sich das Markierungsmuster der Kohlenstoffatome, d.h. die Isotopologverteilung im Laktat je nachdem, ob es durch Umsetzung der [1,2-¹³C₂]-D-Glucose über die Glykolyse oder den Pentosephosphatweg entstanden ist, unterscheidet (Abbildung 11). Insgesamt setzt sich das entstandene Laktat am Ende aus 4 Isotopologen zusammen, die jeweils dieselbe Strukturformel, aber unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen, jenachdem wie viele ¹²C – Atome durch das Isotop ¹³C ersetzt worden sind. So zeigt Laktat, dass über die direkte Glykolyse entstanden ist entweder eine m0 Markierung (Ion LAC89), was gebildetes Laktat aus dem unmarkierten unteren Teil des eingesetzten [1,2-¹³C₂]-D-Glucosemoleküls repräsentiert, oder eine m2 Markierung (Ion LAC91), sofern es aus dem zweifach-markierten oberen Teil desselben Moleküls hervorgegangen ist. Im Gegensatz dazu führt eine Verstoffwechselung über den PPP zur Bildung von m1 markiertem Laktat (Ion LAC90), da ein ¹³C-Atom bei Umsetzung von 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-Phosphat als CO₂ abgespalten wird²²⁷. *m*3 markiertes Laktat liegt vor, wenn das metabolisierte [1,2-¹³C₂]-D-Glucosemolekül durch die natürliche ¹³C-Abundanz zusätzlich an der Position C-3 ein weiteres ¹³C-Atom trägt.

Die Isotopologverteilung kann mittels LC-MS quantifiziert werden.



Abbildung 11: Schematische Darstellung des Glucosemetabolismus mit Markierungsmuster der Kohlenstoffatome in den Intermediaten. Roter Pfeil: Glucosemetabolismus über die Glykolyse (Vorbereitungs- und Ertragsphase). Blauer Pfeil: Glucosemetabolismus über den PPP und die Ertragsphase der Glykolyse. Schwarze Kugel: ¹²C-Atome. Rote Kugeln: ¹³C-Atome

Für die Bestimmung der extrazellulären Laktatlevel wurden 1 x 10⁵ Zellen pro Well einer 6-Well Platte in 1 ml glucosefreiem NBM mit 1% Glutamax, 2% Supplement B27, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml FGF-2, 32 IE/ml Heparin und 4,5 g/L [1,2-¹³C₂]-D-Glucose ausgesät. Anschließend wurden die Zellen parallel für 8, 12, 16, 24 oder 48 h unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen kultiviert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen aus dem Brutschrank direkt auf Eis gestellt, um den Stoffwechsel deutlich zu verlangsamen, der Zellüberstand durch Zentrifugation von abgelösten Zellen und Zelltrümmern befreit, durch einen 0,2 μm PVDF Filter (Corning Inc., No. 3504, Corning, NY) gereinigt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Von jedem Ansatz wurden jeweils Triplikate analysiert. Zudem wurde zellfreies Medium mit [1,2-¹³C₂]-D-Glucose analysiert, um den Einfluss des Mediums auf das analytische Signal zu ermitteln.

Die (-)ESI-UPLC-MS Analyse der Laktat- und Glucoseisotopologe wurde mittels Acquity (Waters GmbH, Eschborn, Germany) - Q-Trap 3200 system (AB-Sciex, Toronto, CA) durch Einzelionen Monitoring der Ionen 89 (unmarkiertes Laktat), 90 (einfach-markiertes Laktat), 91 (zweifach-markiertes Laktat) und 92 (dreifach-markiertes Laktat) durchgeführt. Die MS Quellenparameter sind nachfolgend aufgelistet: Quellentemperatur: 600 °C und Stickstoffgegenstrom: 35, gas 1: 60, gas 2: 70 (in arbiträren Einheiten), CAD gas: medium. Die MS Parameter wurden wie folgt gewählt (in V): Entrance Potential: -10, Kollisionsenergie -10, Zellaustrittspotential -5, das declustering Potential wurde für alle Laktatisotopologe auf -15 V gesetzt. Die individuelle Haltezeit wurde auf 50 ms fixiert. Die chromatographische Auftrennung wurde über Säulen des Typs Vision HT HL (100 mm*2.1 mm*1.5 μ m, Alltech Grom GmbH, Rottenburg-Hailfingen) durch Ionenpaarung mit 10 mM Tributylamin in H₂O (A) und Acetonitrilin H₂O (B) wie beschrieben durchgeführt²²⁸.

Der Säulenfluss wurde durchweg auf 0,4 ml pro min und die Säulentemperatur auf 40°C eingestellt. Die Gradientenbedingungen wurden wie folgt gewählt: 0-2 min: 2% B, 2-18 min: Gradient bis 36% B, 18-20 min: Gradient bis 95% B, 20-22 min: 95% B, 22-24 min: 2% B. Das Injektionsvolumen betrug 10 μ l. Die Rohsignale wurden mit Hilfe der Software Analyst 1.5.1 (AB Sciex, Toronto, CA) integriert. Anschließend wurden die Level der Laktatisotopologe um die natürliche ¹³C-Abundanz und die zu 1% falsche Isotopenanreicherung an den spezifischen Positionen unter der Annahme einer ¹²C-Verunreinigung von [1,2-¹³C₂]-D-Glucose ausschließlich an der C-2 Position korrigiert.

Anhand dieser korrigierten *m1* und *m2* Werte konnte die PPP-Aktivität relativ zur Glykolyseaktivität mit Hilfe der folgenden Formel ermittelt werden²²⁷:

PPP = (m1/m2)/[3+(m1/m2)]

2.2.8 Auswertung und Statistik

Die Datenaufarbeitung, Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Corporation) und SigmaPlot (Systat Software). Für die Auswertung des Überlebens in den *in vivo*-Experimenten wurde die Software MedCal verwendet und Kaplan-Meier-Überlebenskurven erstellt. Die Signifikanz wurde über den Logrank-Test berechnet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert mit den zugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Die vergleichende Statistik wurde mittels SigmaPlot und SigmaStat durchgeführt. Zum Vergleich zweier Gruppen, unabhängiger oder abhängiger Stichproben, wurde der t-Test benutzt. In allen Fällen wurde ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p < 0,05 als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung normoxischer und hypoxischer Glioblastomstammzelllinien

Aus vier frisch resezierten Glioblastomen (T-10, T-11, T-12 und T-13) wurden Hirntumorstammzelllinien (GS-Linien) unter Verwendung von Neurobasalmedium mit Zusatz von Wachstumsfaktoren (Kapitel 2.2.1.2) parallel entweder unter normoxischen (21% O_2 , GS^N) oder unter hypoxischen (1% O_2 , GS^H) Bedingungen etabliert.

Zunächst wurden die chronisch normoxischen (GS-10^N bis GS-13^N) und die chronisch hypoxischen Glioblastomstammzelllinien (GS-10^H bis GS-13^H) hinsichtlich der beschriebenen Stammzelleigenschaften (Kapitel 1.2.3) charakterisiert und die Hypothese des Erhalts beziehungsweise der Verstärkung des Stammzellphänotyps unter hypoxischen gegenüber normoxischen Kulturbedingungen überprüft. Dabei sollte zudem analysiert werden, ob zwischen den Zelllinien aus den unterschiedlichen Tumoren (GS-10 bis GS-13) phänotypische Unterschiede bestehen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Folgenden dargestellt.

3.1.1 Morphologie

Bezüglich der Zellmorphologie konnten zwischen den parallelen normoxischen und hypoxischen Zelllinien eines Ursprungstumors (GS^N und GS^H) *in vitro* keine Unterschiede festgestellt werden. Die Zelllinien GS-10^N und GS-10^H, GS-12^N und GS-12^H, und GS-13^N und GS-13^H wuchsen als Neurosphären (Abbildung 12) und zeigten somit die ursprünglich beschriebene Morphologie von Hirntumorstammzellkulturen¹¹⁸. Demgegenüber konnte bei den Zelllinien GS-11^N und GS-11^H, welche aus einem Glioblastomrezidiv etabliert wurden, ein teiladhärentes Wachstum festgestellt werden (Abbildung 12).



Abbildung 12: Phasenkontrastaufnahme der GS-Zelllinien: Die Zelllinienpaare (GS^N und GS^H) der GS-10, GS-12 und GS-13 zeigten durchweg ein sphärisches Wachstum, exemplarisch gezeigt für die GS-12^N und GS-12^H. Die GS-11^N und GS-11^H zeigte hingegen neben dem überwiegend sphärischen Wachstumsmuster, dass Zellen des Sphärenrandes lange Fortsätze zum Kulturgefäßboden ausbildeten und ganze Zellverbände adhärierten.

Diese Diversität bezüglich der Morphologie zwischen aus verschiedenen Tumoren etablierten Zelllinien ist nicht unerwartet, sondern wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben¹²⁵. Anschließend wurden die parallelen Linien systematisch vergleichend hinsichtlich weiterer Tumorstammzellkriterien getestet.

3.1.2 Wachstumsverhalten in vivo

Das Hauptkriterium von Tumorstammzellen ist die Fähigkeit zur Tumorinitiierung *in vivo*¹¹⁹. Um die Tumorigenität der Zelllinien zu testen, wurde ein orthotopes Xenotransplantationsmodell verwendet²²⁹. Dabei wurden 1,5 x 10⁵ Zellen pro Zelllinie in das Striatum (Caudatum/Putamen) von Nacktmäusen (NMRI-FoxN1^{nu}) injiziert und das Überleben der Tiere dokumentiert. Als Endpunkt der Studie wurde das Auftreten von Symptomen, wie ein Gewichtsverlust von \ge 10% oder neurologische Verhaltensstörungen definiert.

Hinsichtlich der *in vivo* Tumorigenität und der Wachstumsgeschwindigkeit konnten zwischen den normoxischen und hypoxischen Zelllinienpaaren signifikante Unterschiede festgestellt werden. Generell zeigte sich, dass hypoxische Zelllinien ein schnelleres Tumorwachstum und eine höhere *in vivo* Tumorigenität aufwiesen als normoxischen GS-Linien (Abbildung 13 und Abbildung 14). So lag das mediane Überleben der Tiere nach Injektion der GS-11^H bei 87 Tagen, wohingegen die Injektion der GS-11^N erst nach 270 Tagen zum Auftreten von abbruchrelevanten Symptomen führte ($p \le 0,05$). Für die GS-12^H lag das mediane Überleben der Mäuse bei 117 Tagen, wohingegen Mäuse nach der Injektion der GS-12^N ein medianes Überleben von 135 Tagen zeigten ($p \le 0,05$).



Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurven. Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Versuchstiere nach intrakranieller Injektion der normoxischen bzw. hypoxischen GS-Linien. (Kaplan-Meier Analyse, log-rank test, N = 5 für beide GS-11-Zelllinien, N = 3 für beide GS-12-Zelllinien).

Im Gegensatz dazu kam es bei den Mäusen nach GS-13^N bzw. GS-13^H-Injektion nicht zum Auftreten von Symptomen. Im Hinblick auf das vorangeschrittene Alter der Mäuse wurde der Versuch nach 374 Tagen beendet, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch altersbedingtes Versterben der Tiere auszuschließen. In histologischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass alle Tiere nach Injektion der normoxischen und hypoxischen GS-11 und GS-12 sowie nach GS-13^H-Injektion Tumore aufwiesen, es allerdings zu keiner Tumorbildung durch die GS-13^N-Injektion kam (Abbildung 14).



Abbildung 14: Mikroskopische Darstellung der durch die GS-11^N, GS-11^H, GS-12^N, GS-12^H und GS-13^H generierten diffus infiltrierenden Tumore *in vivo* am jeweiligen Endpunkt des Versuchs. Bei der GS-13^N konnte nach Beendigung des Versuchs kein Tumorwachstum festgestellt werden. Dargestellt sind HE-Präparate der Coronar-Schnitte repräsentativ von jeweils einem Gehirn einer Nacktmaus pro Versuchsgruppe. Die Pfeile deuten auf hyperzelluläre Bereiche.

3.1.3 Wachstumsverhalten in vitro

Die Beobachtung, dass hypoxische Linien *in vivo* ein schnelleres Wachstum aufwiesen, führte zu der Frage, ob diese Linien auch *in vitro* eine schnellere Proliferation zeigten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden parallel mit den chronisch normoxischen und den chronisch hypoxischen Zelllinien Proliferationsassays durchgeführt. Es zeigte sich, dass entgegen der Beobachtung aus den *in vivo* Experimenten, hypoxische Linien *in vitro* eine signifikant langsamere Proliferation aufwiesen als normoxische Linien (Abbildung 15).



Abbildung 15: Die Proliferation von chronisch normoxischen und hypoxischen GS-Linien wurde mittels EdU-Proliferationsassay nach 72-stündiger Inkubation bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Vierfach-Bestimmung \pm Standardabweichungen.* Signifikanzniveau p \leq 0,05.

So lag die Proliferationsrate bei der GS-11^N 39,8% und bei der GS-12^N 62% über der Proliferationsrate der entsprechenden hypoxischen Linien. Für die GS-13^N konnte sogar eine um das 2,08-fache höhere Proliferationsrate gegenüber der korrespondierenden hypoxischen Linie verzeichnet werden.

Die Ergebnisse aus den Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 deuten an, dass sich das Proliferationsverhalten *in vivo* und *in vitro* grundlegend unterscheidet. So zeigten hypoxische Zelllinien gegenüber den parallelen normoxischen Zelllinien eine geringere Proliferation *in vitro* aber ein erhöhtes Tumorwachstum *in vivo*.

3.1.4 Klonogenität

Ein weiteres Kriterium von Tumorstammzellen ist die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, d.h. die Fähigkeit einer Zelle, sich klonal zu vermehren und eine neue Zellkolonie hervorzubringen⁷⁹. Die Klonogenität wird oft als *in vitro* Korrelat für die Tumorinitiierungsfähigkeit einer Zelle *in vivo* verwendet. Um das klonogene Potential der verwendeten Stammzelllinien zu testen, wurden Klonogenitätsassays durchgeführt. Hierbei wurde der Prozentanteil an Zellen bestimmt, der in der Lage war, aus einer einzeln ausgesäten Zelle durch klonale Vermehrung nach 5 Wochen eine Neurosphäre zu bilden.

Es zeigte sich, dass alle Zelllinien grundsätzlich in der Lage waren, neue Sphären aus einer einzelnen Zelle zu bilden (Abbildung 16). Die Frequenz der Neubildung lag dabei zwischen 9,36% (GS-13^H) und 17,69% (GS-12^H).



Abbildung 16: Klonogenität der chronisch normoxischen und chronisch hypoxischen GS-Linien. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifach-Bestimmung ± Standardabweichungen.

Es konnte allerdings entgegen der Annahme, dass das schnellere Tumorwachstum hypoxischer Linien *in vivo* möglicherweise durch eine erhöhte Selbsterneuerungskapazität der Zellen unter Hypoxie zu begründen ist, kein signifikanter Unterschied in der Klonogenität zwischen normoxischen und hypoxischen Linien *in vitro* festgestellt werden (Abbildung 16).

3.1.5 Expression von Stammzellmarkern

Die Expression von Stammzellmarkern stellt ein weiteres Kriterium von Hirntumorstammzellen dar^{120,121}. Marker für neurale Stammzellen sowie Hirntumorstammzellen sind SOX-2 und Nestin¹²². SOX-2 ist ein SRY-verwandter HMG-Box Transkriptionsfaktor, dem regulatorische Funktionen in der Embryogenese nachgewiesen wurden²³⁰. Bei Nestin handelt es sich um einen neuralen Stamm- und Progenitorzellmarker, der allerdings eine geringere Spezifität aufweist.

Die durchflusszytometrischen Analysen der GS-Linien hinsichtlich der genannten Marker zeigten, dass die SOX-2⁺- und Nestin⁺-Subpopulation unter chronisch hypoxischen Bedingungen signifikant größer war als unter Normoxie (Abbildung 17). So war der Anteil an SOX⁺ Zellen bei der GS-11^H um das 4-fache, bei der GS-12^H um das 1,4-fache und der GS-13^H um 2,5-fache gegenüber den entsprechenden GS^N-Linien erhöht. Selbiges war für Nestin zu beobachten. Hier lag der prozentuale Anteil an positiven Zellen unter chronischer Hypoxie bei der GS-11 um das 1,62-fache, bei der GS-12 um das 2,1-fache und bei der GS-13 um das 47,2-fache höher als in den korrespondierenden chronisch normoxischen Linien.



Abbildung 17: Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression der Stammzellmarker --2 und Nestin in den GS-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Vierfach-Bestimmung \pm Standardabweichungen.* Signifikanzniveau p \leq 0,05

Wenngleich die Eignung von CD133 als Marker für Hirntumorstammzellen in der Literatur kontrovers diskutiert wird, ist CD133 noch immer der am häufigsten verwendete Glioblastomstammzellmarker. Daher wurde auch die Expression von CD133 unter chronisch normoxischen und hypoxischen Bedingungen bestimmt. Es zeigte sich, dass unter chronischer Hypoxie ein höherer Prozentanteil an CD133⁺-Zellen in den Kulturen vorlag (Abbildung 18). So resultierte die Kultivierung unter chronischer Hypoxie in der GS-11 in einem 1,19-fach, in der GS-12 in einem 2,2-fach und in der GS-13 in einem 2,3-fach höheren Anteil der CD133⁺-Subpopulation gegenüber einer Kultivierung unter normoxischen Bedingungen.



Abbildung 18: Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD133 in den GS-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifach-Bestimmungen \pm Standardabweichungen. * Signifikanzniveau p \leq 0,05

Zusammenfassend konnte unter Hypoxie ein höherer Anteil stammzellmarkerexprimierender Zellen (Sox-2⁺, Nestin⁺ sowie CD133⁺) in den GS-Kulturen festgestellt werden als unter Normoxie. Dies deutet darauf hin, dass Hypoxie entweder den Anteil an stammzellmarkerexprimierender Zellen in der Kultur erhöht oder den Anteil an stammzellmarkerexprimierenden Zellen aus dem Originaltumor in einem höheren Maße aufrechterhält als Normoxie.

3.1.6 Differenzierbarkeit

Ein weiteres Kriterium für Tumorstammzellen ist die Multipotenz⁷⁹. Glioblastomstammzellen sollten demnach zur Differenzierung in gliale und neuronale Richtung befähigt sein. Um dies zu überprüfen, wurden die GS-Zelllinien über 3 Tage in Differenzierungsmedium mit all-trans Retinsäure, cyclischem AMP (cAMP) und FCS kultiviert, und anschließend die Expression von Galactocerebrosidase-C (GalC, Marker für oligodendrozytäre Differenzierung), Neurofilament (NF, Marker für neuronale Differenzierung) und GFAP (saures Gliafaserprotein, Marker für astrozytäre Differenzierung) quantitativ durchflusszytometrisch bestimmt.

Alle Zelllinien adhärierten in Differenzierungsmedium bereits nach 24 h und bildeten lange Fortsätze auf dem Boden der Kulturflaschen (Abbildung 19).



Abbildung 19: Differenzierbarkeit von chronisch normoxischen bzw. hypoxischen GS-Linien. Die Zellen wurden über 3 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert, und morphologische Veränderungen mikroskopisch untersucht und festgehalten. Exemplarisch sind hier die morphologischen Veränderungen der GS-11^N und GS-11^H nach der Differenzierungsinduktion dargestellt.

In den nachfolgenden durchflusszytometrischen Analysen konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Differenzierungspotentials zwischen normoxischen und hypoxischen Linien detektiert werden. Chronisch normoxische Linien zeigten im Vergleich zu den chronisch hypoxischen Linien eine stärkere oligodendrogliale und neuronale Differenzierung (Abbildung 20). Der Anteil von NF⁺ Zellen nach der Differenzierung lag in der GS-11^N 87% und in der GS-12^N 32% höher als in der entsprechenden hypoxischen Linie. Die normoxischen Linien zeigten nach der Differenzierung zudem eine höhere Immunreaktivität gegenüber GalC als die entsprechenden hypoxischen Linien (GS-11^N 1,26-fach höher als GS-11^H, GS-12^N 3,4-fach höher als GS-12^H).



Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse der Differenzierungsmarker-Expression in chronisch normoxischen und hypoxischen GS-Linien. Dargestellt sind die n-fachen Expressionsveränderungen nach 3-tägiger Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten Kontrollen. Abgebildet sind die Mittelwerte einer Vierfach-Bestimmungen \pm Standardabweichungen.* Signifikanzniveau p \leq 0,05

Für die Differenzierung in astrozytäre Richtung konnte kein konsistenter Expressionsunterschied zwischen normoxischen und hypoxischen Linien festgestellt werden (Abbildung 20). So zeigte die GS-12^N eine signifikant erhöhte Expression von GFAP gegenüber der GS-12^H (GS-12^N 2,4-fach höher als GS-12^H), wohingegen sich das GFAP-Expressionsmuster in der GS-11 exakt entgegengesetzt verhielt (GS-11^H 3,1-fach höher als GS-11^N). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Normoxie die oligodendrogliale und neuronale Differenzierung begünstigt.

Zusammenfassend zeigen die unter 3.1 beschriebenen Experimente, dass unter Hypoxie der Anteil stammzellmarkerexprimierender Zellen in der Gesamtpopulation erhöht ist. Darüber hinaus steigert Hypoxie die Tumorigenität und Aggressivität der resultierenden Tumore *in vivo*. Im Gegensatz dazu scheint Normoxie die Tendenz zur oligodendroglialen und neuralen Differenzierung und die Proliferation von GS-Linien zu begünstigen. Es konnte kein Einfluss von Hypoxie auf die Klonogenität nachgewiesen werden.

Diese beobachteten phänotypischen Unterschiede sowie die Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens *in vivo* zwischen den chronisch normoxischen und chronisch hypoxischen GS-Linien führten zu der Frage, auf welche Veränderungen im Genexpressionsprofil die jeweiligen Unterschiede zurückzuführen sein könnten und welche zellulären Adaptationsmechanismen durch diese veränderte Genexpression in den chronisch normoxischen bzw. chronisch hypoxischen GS-Linien aktiviert werden.

3.2 Genexpressionsanalysen

Die gezeigten Daten deuten darauf hin, dass Hypoxie den Phänotyp von Glioblastomstammzellen beeinflusst, was auf eine Modifikation der globalen Genexpression zurückzuführen sein könnte.

Da die Sauerstoffkonzentration in Glioblastomen nicht konstant ist, sondern lokal stark variiert, sollten nicht nur die Auswirkungen einer Kultivierung unter chronisch hypoxischen Bedingungen, sondern zudem der Einfluss von akuten Veränderungen der Sauerstoffkonzentration auf die Genexpression in GS-Zellen untersucht werden. Um die Fluktuation der Sauerstoffkonzentration im Tumor zu simulieren, wurden die chronisch normoxischen Linien (GS^N) akuter Hypoxie (48 h, GS^{N→H}) und die chronisch hypoxischen Linien (GS^H) akuter Normoxie (48 h, akute Oxygenierung, GS^{H→N}) ausgesetzt. Anschließend wurden sowohl mit den chronisch normoxischen und hypoxischen und hypoxischen kinien den akut normoxischen und hypoxischen Linien Genexpressionanalysen mittels Mikroarrays durchgeführt und die Ergebnisse anschließend auf RNA- und Protein-Ebene verifiziert.

3.2.1 Mikroarray-Analyse und bioinformatische Auswertung

Für die Analyse der Genexpression aller chronisch normoxischen (GS^N) und chronisch hypoxischen (GS^H) sowie aller akut hypoxischen ($GS^{N \rightarrow H}$) und akut normoxischen ($GS^{H \rightarrow N}$) Zelllinien (N = 16) und der Ursprungstumore (N = 4) wurde der HG-U133 Plus 2.0 Chip der Firma Affymetrix verwendet (U133) (Kapitel 2.2.2.5).

Nach Normalisierung der Rohdaten, GCRMA-Präprozessierung und Reduktion des Datensatzes auf vorhandene Transkripte, sogenannte "Present-calls", umfasste der Datensatz 27821 Transkripten, was einer Datenreduzierung um etwa 50% entsprach. Die Transkripte des reduzierten Datensatzes wurden einem hierarchischen "unsupervised" Clustering unterzogen (Kapitel 2.2.2.5.1.2). Das daraus resultierende Dendrogramm zeigte, dass die Expressionsprofile der akut hypoxischen Linien und der korrespondierenden chronisch normoxischen GS-Linie ($GS^{N \rightarrow H}$ und GS^{N}) bzw. die Expressionsprofile der akut normoxischen und korrespondierenden chronisch hypoxischen GS-Linie ($GS^{H \rightarrow N}$ und GS^{H}) die größten Ähnlichkeiten aufwiesen (Abbildung 21). Eine akute Veränderung der Sauerstoffkonzentration hatte demnach geringere Auswirkungen auf die Genexpression als chronisch unterschiedliche Sauerstoffbedingungen.



Abbildung 21: Dendrogramm der Genexpressionsanalyse der GS^N, GS^H, GS^{N→H}, GS^{H→N} und der primären Tumore (T). Im hierarchischen "unsupervised" Cluster zeigte sich die größte Ähnlichkeit zwischen den GS^{N→H}- und den entsprechenden GS^N-Linien bzw. zwischen den GS^{H→N}- und den entsprechenden GS^N-Linien.

Es bildeten sich jedoch keine voneinander getrennten Subcluster aller chronisch normoxischen und aller chronisch hypoxischen Zelllinien. Auch bildeten sich keine voneinander getrennten Subcluster aller Linien, die demselben Ursprungstumor entstammten (mit Ausnahme der GS-11). Allerdings bildeten die Ursprungstumore ein deutliches Subcluster, das sich von den anderen Proben abgrenzte. Daraus lässt sich ableiten, dass die GS-Zelllinien nicht das Expressionsmuster der Ursprungstumore widerspiegeln, sondern es allein durch die Inkulturnahme zu entscheidenden Veränderungen der Genexpression kommt.

Zur Identifikation der differenziell regulierten Gene zwischen den chronisch und akut hypoxischen bzw. normoxischen Zelllinien wurde der n-fache Expressionsunterschied einer Probe bezogen auf die Vergleichsprobe, d.h. der "Fold change" (FC) für alle Transkripte berechnet. Ein FC-Wert über 2,5 wurde als differenziell reguliert gewertet. Daher wurde der Datensatz auf diejenigen Transkripte reduziert, die einen FC-Wert von mindestens 2,5-fach aufwiesen. Der FC-Wert konnte dabei sowohl einer Hochregulation als auch einer Herunterregulation entsprechen. Beispielsweise zeigte der Quotient aus $GS^{N\to H}/GS^N$ von $\geq 2,5$ eine Hochregulation der Expression unter akuter Hypoxie an, wohingegen der Quotient aus $GS^{N/GS^{N\to H}}$ von $\geq 2,5$ eine Herunterregulation der Expression durch akute Hypoxie widerspiegelte.

Zur Identifikation von Transkripten, die in mindestens 3 von 4 Zelllinien durch die entsprechende Bedingung gleichermaßen differenziell reguliert waren, wurde ein quantitatives Teilmengen-Diagramm (4-fach Venn-Diagramm) erstellt. In Abbildung 22 sind die Venn-Diagramme für alle Bedingungen dargestellt.



Abbildung 22: Teilmengendiagramm mit 4 Mengen (4-faches Venn-Diagramm) für alle Transkripte, die mindestens 2,5-fach in den GS-Linien durch akute Hypoxie gegenüber Normoxie hochreguliert (A) bzw. herunterreguliert (B), durch chronische Hypoxie gegenüber Normoxie hochreguliert (C) bzw. herunterreguliert (D), oder durch akute Oxygenierung gegenüber chronischer Hypoxie hochreguliert (E) bzw. herunterreguliert (F) waren. ↑ steht für eine Hochregulation, ♦ steht für eine Herunterregulation der Genexpression unter der entsprechenden Bedingung.

Aus den Überschneidungen der Mengenfelder kann die Anzahl der Transkripte abgelesen werden, die in 2, 3 oder allen 4 Zelllinien gleichermaßen differenziell reguliert waren. So wurden beispielsweise 202 Transkripte in allen 4 Linien und 715 Transkripte in mindestens 3 Linien durch akute Hypoxie induziert (Abbildung 22).

Um zu überprüfen, inwieweit sich die differenzielle Genregulation zwischen akuter und chronischer Hypoxie ähnelte, wurde anschließend ein Teilmengendiagramm derjenigen Transkripte gemacht, die unter akuter und chronischer Hypoxie in mindestens 3 Zelllinien hochreguliert (Abbildung 23) bzw. herunterreguliert waren (Abbildung 24).



Abbildung 23: 2-faches Venn-Diagramm für alle Transkripte, die durch akute Hypoxie und chronische Hypoxie in mindestens 3 GS-Linien \geq 2,5-fach hochreguliert waren (\clubsuit). In der Tabelle sind jeweils die Transkripte angegeben, die unter akuter und chronischer Hypoxie gleichermaßen reguliert waren.



Abbildung 24: 2-faches Venn-Diagramm für alle Transkripte, die durch akute Hypoxie und chronische Hypoxie in mindestens 3 GS-Linien \geq 2,5-fach herunterreguliert waren (ψ). In der Tabelle sind jeweils die Transkripte angegeben, die unter akuter und chronischer Hypoxie gleichermaßen reguliert waren.

Aus Abbildung 23 geht hervor, dass lediglich 15 Transkripte sowohl durch akute als auch durch chronische Hypoxie hochreguliert wurden. Auch die Anzahl an Transkripten, die sowohl durch akute als auch durch chronische Hypoxie herunterreguliert wurden, war mit 16 sehr gering (Abbildung 24). Dieses Ergebnis zeigte, dass sich die Adaptionsmechanismen an akute und chronische Hypoxie erheblich unterscheiden. Unter den sowohl unter akuter als auch unter chronischer Hypoxie induzierten Genen (Abbildung 23) waren neben dem Monocarboxylattransporter (SLC16A3, bekannt als MCT4), der den Transport von Laktat und Pyruvat über die Zellmembran ermöglicht, vor allem Gene hochreguliert, die die Struktur der Extrazellulären Matrix (LOX) und die Migration (PPFIA4 und FN1, bekannt als Fibronektin 1) beeinflussen. Demgegenüber zeigte sich eine konsistente Herunterregulation von Genen unter akuter und chronischer Hypoxie, die spannungsabhängige Kaliumkanäle kodieren (KCNF1 und KCNQ5) (Abbildung 24).

Um Informationen über die biologische Relevanz der differenziell regulierten Gene zu erhalten, wurden die Online-Ressource "Babelomics"²²¹ zum Vergleich der differenziell exprimierten Gene gegenüber einer Referenzgruppe und das Online-Tool "DAVID"²¹⁹ zum Vergleich der differenziell exprimierten Gene gegenüber dem humanen Gesamtgenom verwendet (Kapitel 2.2.2.5.1.4). Mit beiden Tools besteht die Möglichkeit, differenziell regulierte Transkripte bzw. Gene hinsichtlich ihrer Annotation in der "Gene Ontology" Datenbank zu untersuchen. Die Gene Ontology Datenbank beinhaltet die Beschreibung einzelner Gene hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen (Gene Ontology Kategorie "biologische Prozesse"), ihrer molekularen Funktionen (Gene Ontology Kategorie "zelluläre Komponente")²¹⁴. Im Fall der vorliegenden Arbeit wurden die differenziell regulierten Gene mit Hilfe dieser Datenbank anhand der biologischen Beschreibung speziellen Gene Ontology Bedeutungsgruppen (GO Terms) der drei beschriebenen Kategorien zugeordnet. Die nachfolgende Analyse der Annotation erfolgte ausschließlich in
der Gene Ontology Kategorie "biologische Prozesse", da diese Kategorie die aussagekräftigsten Informationen bezüglich der biologischen Relevanz einzelner Gene gibt. Parallel zu der GO Term-Analyse konnten differenziell exprimierte Gene mittels der beiden Online-Tools zudem unter Verwendung der KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)-Datenbank Netzwerken von interagierenden Molekülen und Signalwegen zugeordnet werden (KEGG Terms)^{215,216}. Unter Verwendung von KEGG war es somit möglich, Signalwege zu identifizieren, die zwischen den untersuchten Gengruppen differenziell reguliert waren.

Zunächst konnten unter Verwendung der Online-Ressource "Babelomics" signifikante Unterschiede hinsichtlich der Annotation differenziell regulierter Gene unter akuter und chronischer Hypoxie ermittelt werden. In Abbildung 25 ist das Ergebnis der bioinformatischen Analyse mittels "Babelomics" graphisch dargestellt.



Abbildung 25: Ergebnisse der Babelomics-Analyse der signifikanten Assoziation von differenziell regulierten Genen in mindestens drei Zelllinien unter akuter Hypoxie (\geq 2.5-fach in GS^{N→H} gegenüber GS^N) gegenüber chronischer Hypoxie (\geq 2.5-fach in GS^H gegenüber GS^N) in der Gene Ontology Kategorie "biologische Prozesse" (p-value < 0.05). Die Angabe L3 bis L7 steht für die GO Terminterne Hierarchie, die aufsteigend anhand ihrer detaillierten Beschreibung von wenig präzise aber umfangreich (Level 1) bis sehr präzise aber wenig umfangreich (Level 9) definiert ist. Gene, die unter chronischer Hypoxie (blauer Text), im Speziellen zu neuraler und neuronaler Entwicklung sowie zu Gehirnentwicklung (hellblauer Text), zudem zu Adhäsion, Migration und Zellkommunikation (grüner Text). Transkripte, die unter akuter Hypoxie eine Hochregulation aufwiesen (rote Balken), waren hingegen überwiegend mit metabolischen Prozessen assoziiert (roter Text).

Bei dem Vergleich der signifikant hochregulierten Transkripte unter akuter Hypoxie gegenüber hochregulierten Transkripten unter chronischer Hypoxie wurde 9 signifikante GO Terms der Kategorie "biologische Prozesse" identifiziert (Abbildung 25). Von diesen 9 GO

Terms waren 6 mit metabolischen Prozessen assoziiert. Auf der anderen Seite konnten 22 GO Terms identifiziert werden, die signifikant mit chronischer Hypoxie gegenüber akuter Hypoxie assoziiert waren. Davon waren wiederum 11 GO Terms mit Entwicklung, neuraler Entwicklung und Morphogenese, sowie weitere 5 mit Prozessen der Zelladhäsion, der Zellkommunikation und der Zellmigration assoziiert.

Demnach induziert akute Hypoxie hauptsächlich die Expression von Genen, die für eine metabolische Adaptation in GS-Zellen sorgen, wohingegen es unter chronischer Hypoxie zu einer Adaptation über eine hohe Expression von Genen kommt, die mit neuraler Entwicklung, Migration und Zelladhäsion assoziiert sind.

Zum Vergleich der differenziell regulierten Gene gegenüber dem humanen Transkriptom wurde die DAVID Plattform verwendet. Bei dieser Analyse zeigte sich, dass es bei den unter akuter Hypoxie hochregulierten Genen zu einer signifikanten Überrepräsentation in GO Terms kam, die mit RNA-Prozessierung/Splicing und Metabolismus assoziiert sind (Tabelle A2). Letzteres bestätigt die Beobachtungen der Babelomics-Analyse, die bereits auf diese Assoziation hindeutete. Zudem konnte die KEGG Pathway-Analyse, die der Identifikation der Zugehörigkeit der differenziell regulierten Gene zu spezifischen Signalwegen dient, die GO Term-Analyse bestätigen. So zeigte sich auch hier unter akuter Hypoxie eine Überrepräsentation von Transkripten in Signalwegen, die mit Splicing assoziiert sind (Tabelle A8). Demgegenüber konnte mittels der DAVID-Plattform gezeigt werden, dass akute Hypoxie zu einer Herunterregulation von Genen führte, die mit der Regulation des Zellzyklus und der Zellteilung in Verbindung stehen (Tabelle A3). Die KEGG-Analyse zeigte ebenfalls eine signifikante Assoziation von unter akuter Hypoxie supprimierten Genen mit Signalwegen, die mit dem Zellzyklus und der Replikation assoziiert sind (Tabelle A8).

Im Gegensatz dazu führte chronische Hypoxie gemäß der DAVID Analyse zu einer Induktion von Genen, die unter anderem in den GO Terms für Morphogenese annotiert sind (Tabelle A4), sowie zu einer Herunterregulation von Genen, die mit der Induktion von Apoptose assoziiert sind (Tabelle A5).

Oxygenierung (bzw. akute Normoxie) von chronisch hypoxischen Linien führte zu einer Hochregulation von Transkripten, die in GO Terms mit einer pro-apoptotischen Funktion annotiert sind (Tabelle A6) sowie zu einer Herunterregulation von Genen, die mit metabolischen Prozessen assoziiert sind, wie der Glykolyse (Tabelle A7). Letzteres konnte auch durch die KEGG-Analyse bestätigt werden, die eine signifikante Assoziation der unter Oxygenierung herunterregulierten Gene mit KEGG-Terms wie "Fructose and mannose metabolism", "Glycolysis/Gluconeogenesis" und "Pentose phosphate pathway" (PPP) zeigte. Bei näherer Betrachtung der Gene, die in dem KEGG Pathway "PPP" annotiert waren, stellte sich allerdings heraus, dass diese Annotation zu Fehlinterpretationen führen konnte. So handelte es sich bei den im KEGG Pathway "PPP" annotierten Transkripten ausschließlich um Enzyme, die Reaktionen der Glykolyse (Glucose-6-Phosphatisomerase (GPI), Phosphofructokinase Liver (PFKL), Phosphofructokinase Platelet (PFKP), Aldolase C (ALDOC). Aldolase A (ALDOA) und Phosphoglucomutase-1 (PGM1)) oder der Glykogensynthese katalysieren, und die nicht direkt in den PPP involviert sind. Weder Gene ((Glucose-6-Phosphatdehydrogenase des oxidativen Teil des PPP (G6PD), 6-Phosphogluconolactonase (PGL), 6-Phosphogluconatdehydrogenase (PGD)) noch Gene des nicht-oxidativen Teils des PPP (Ribulose-5-Phosphatepimerase (RPE), Ribulose-5-Phosphatisomerase (RPI), Transketolase (TKT), Transaldolase (TAL)) waren unter den im KEGG Pathway "PPP" annotierten Genen vertreten.

Um das offenbar inkorrekte Ergebnis der KEGG-Analyse bezüglich einer Herunterregulation des PPP durch Oxygenierung zu überprüfen und zu widerlegen, wurde im Anschluss der Mittelwert des FC-Werts ($GS^{N \rightarrow H}/GS^{N}$ bzw. $GS^{H \rightarrow N}/GS^{H}$) aller 4 Zelllinien für alle Enzyme der Glykolyse und des PPP berechnet (Abbildung 26). Bei dieser detaillierten Untersuchung der Regulation der Expression von Genen der Glykolyse und des PPP lag der Fokus auf denjenigen Isoformen, die in der Literatur als wichtigste Isoformen im Gehirn und/oder in Tumoren beschrieben wurden (u. a. HK2, PFKP, ALDOC und PKM2 anstatt HK1, PFKL, ALDOA und PKM1)^{231–234}.



Abbildung 26: Darstellung des Mittelwerts der n-fachen Regulation \pm Standardabweichung bzw. von Enzymen der Glykolyse und des PPP in allen 4 Zelllinien durch akute Hypoxie (GS^{N \rightarrow H/GS^N) und akute Normoxie (GS^{H \rightarrow N/GS^H).}}

Aus dieser Analyse ging hervor, dass entgegen dem Ergebnis der KEGG-Analyse, die eine Herunterregulation der Expression von PPP-Enzym-kodierenden Genen unter akuter Normoxie aufzeigte, die Expression von Enzymen des PPP unter akuter Normoxie stattdessen tatsächlich hochreguliert war, wohingegen es unter akuter Hypoxie zu einer Herunterregulation der Expression von PPP-Enzym-kodierenden Genen kam (Abbildung 26). Ein genau entgegengesetztes Expressionsmuster ergab sich für Gene, die Enzyme der Glykolyse kodieren (Abbildung 26).

Die Expressionsanalyse zeigte zudem, dass die Expression von Enzymen der Vorbereitungsphase der Glykolyse (HK2 bis TPI) stärker durch Veränderungen der Sauerstoffkonzentration reguliert war als die Expression von Enzymen der Ertragsphase (GAPDH bis PKM2) (Abbildung 26). Als Vorbereitungsphase der Glykolyse wird die erste Phase der Glykolyse bezeichnet, in der Glucose unter Verbrauch von ATP zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat umgesetzt wird. Daran schließt sich die ATP-produzierende Ertragsphase an, in der die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Pyruvat erfolgt.

Aus dieser Auswertung lässt sich ableiten, dass

- 1. akute Hypoxie zur Inhibition des Zellzyklus und der Zellteilung führt, wohingegen chronische Hypoxie Prozesse moduliert, die das Zellüberleben fördern,
- 2. dass die Adaptation an chronische Hypoxie im hohen Maße mit Prozessen assoziiert ist, die für die neurale Entwicklung, Migration, Zellkommunikation und -adhäsion relevant sind, wohingegen die Adaptation an akute Hypoxie vor allem über metabolische Veränderungen verläuft, und vor allem
- dass zwischen der Expression von Genen der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg eine sauerstoffkonzentrationsabhängige reziproke Regulation vorliegt, die sich am stärksten bei Enzymen der Vorbereitungsphase der Glykolyse ausprägt.

3.2.2 Validierung der Genexpressionsdaten aus den Mikroarray-Analysen

Die Genexpressionsanalyse mittels Mikroarrays zeigte, dass zwischen den beiden parallelen Stoffwechselwegen, Glykolyse und PPP, eine sauerstoffkonzentrationsabhängige reziproke Regulation der Expression vorherrscht (Abbildung 26), die bislang in der Literatur noch nie beschrieben wurde. Zur Validierung der Mikroarray-Ergebnisse hinsichtlich dieses hochgradig interessanten, bidirektionalen Switches der Genexpression von Enzymen der Glykolyse und des PPP wurden zunächst quantitative Real-Time PCR (qPCR) und Western Blot Analysen durchgeführt. Exemplarisch sind in Abbildung 27 und 28 die Ergebnisse der Validierungsexperimente für die GS-11^N und GS-11^H anhand dreier Enzyme der Vorbereitungsphase der Glykolyse (HK2, PFKP, ALDOC), eines Enzyms der Ertragsphase der Glykolyse (PKM2) und jeweils eines Enzyms aus dem oxidativen Teil (G6PD) und dem nicht-oxidativen Teil des PPP (TKT bzw. Transketolase-like Protein 1, TKTL1) zusammengestellt. Bei TKTL1 handelt es sich um eine Isoform der Transketolase, die in Glioblastomen überexprimiert ist²³⁵.



Abbildung 27: Quantifizierung der Genexpression von exemplarischen Genen, die Enzyme der Glykolyse bzw. des PPP kodieren, in der GS-11^N, in der GS-11^N unter akuter Hypoxie (GS-11^{N→H}) sowie in der GS-11^H und in der GS-11^H unter akuter Normoxie (GS-11^{H→N}) mittels qPCR. Zur Normalisierung der Expressionsdaten wurde RPL-13A als interne Kontrolle mitgeführt. Die relativen Quantitätswerte (n-fache Genexpression) wurden nach der $\Delta\Delta$ CT Methode berechnet. Als Kalibrator für die $\Delta\Delta$ C_T-Methode wurde jeweils die GS^N-Linie verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von Triplikaten. * Signifikanzniveau p ≤ 0,05

Die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen konnten durch qPCR-Analysen bestätigt werden. Auch in diesen Validierungsexperimenten, in Abbildung 27 exemplarisch für die GS-11-Zelllinien dargestellt, konnte gezeigt werden, dass es unter akuter Hypoxie zu einer Induktion der Expression von Glykolyseenzymen in den GS^N-Zellen kam. Beispielsweise führte akute Hypoxie in der GS-11^N zu einer 25,4-fachen Steigerung der Expression von HK2 und einer 2,7-fachen Steigerung von ALDOC, wohingegen es unter akuter Normoxie der chronisch hypoxischen GS-11^H zu einer Herunterregulation der Expression dieser Gene kam (HK2: 6,7-fach, ALDOC: 21,0-fach). Für die Gene des PPP zeigte sich ein entgegengesetztes Expressionsmuster mit einer Herunterregulation unter akuter Hypoxie (in der GS-11^N z.B. G6PD: um 15,1%, TKT: um 34,8%) und einer Induktion der Expression unter akuter Normoxie (in der GS-11^H z.B. G6PD: um 69,6%, TKT: 2-fach).

Die reziproke Regulation war zudem auf Proteinebene nachweisbar (Abbildung 28).



Abbildung 28: Analyse der Expression von exemplarischen Enzymen der Glykolyse bzw. des PPP. Exemplarisch dargestellt ist die Untersuchung der Proteinmenge der entsprechenden Enzyme in der Zelllinie GS-11^N und in der GS-11^N unter akuter Hypoxie (GS-11^{N→H}) sowie in der GS-11^H und in der GS-11^H unter akuter Normoxie (GS-11^{H→N}) mittels Western Blot Analysen. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin verwendet (A). Zur Quantifizierung der Western Blot Banden wurde eine densitometrische Analyse durchgeführt (B). Für die Normalisierung wurde der Quotient aus den Pixelintensitäten der Enzyme mit der Pixelintensitäten von Tubulin gebildet. Als Referenzwert diente jeweils der Wert unter Normoxie (N). Änderungen wurden als relative n-fache Veränderungen ausgedrückt.

Auch hier war deutlich eine Induktion der Expression von Glykolyseenzymen unter akuter Hypoxie und eine Herunterregulation durch akute Normoxie in der korrespondierenden chronisch hypoxischen GS-Linie zu verzeichnen, wie exemplarisch für die GS-11 Zelllinien gezeigt. Für Enzyme des PPP ergab sich das entgegengesetzte Expressionsmuster mit einer Herunterregulation durch akute Hypoxie und eine Induktion der Expression durch Oxygenierung der chronisch hypoxischen Linien.

Um zu überprüfen, ob die sauerstoffkonzentrationsabhängige Verschiebung des Glucosestoffwechsels vom PPP zur Glykolyse unter akuter Hypoxie in GS-Zelllinien auch über 48 h hinaus stabil erhalten bleibt und sich diese Beobachtung auch auf weitere Enzyme der beiden parallelen Stoffwechselwege übertragen lässt, wurden zwei GS-Linien, GS-11^N und GS-12^N, über 96 h Hypoxie ausgesetzt, und anschließend die Expression der einzelnen

Gene der Glykolyse und des PPP gegenüber der normoxischen Kontrolle an verschiedenen Zeitpunkten verglichen (Abbildung 29).



Abbildung 29: Analyse der Expressionsregulation unter Hypoxie auf RNA-Ebene. Quantifizierung von Gentranskripten, die Glykolyseenzyme, Enzyme des PPP oder Enzyme des an die Glykolyse anschließenden Pyruvatmetabolismus kodieren in den Zelllinien GS-11^N und GS-12^N unter akuter Hypoxie mittels qPCR. Die relativen Quantitätswerte (n-fache Genexpression, RQ-Werte) wurden nach der $\Delta\Delta$ CT Methode berechnet. Zur Normalisierung wurde für jeden Zeitpunkt der RQ-Wert der normoxischen Kontrolle subtrahiert. Zum Zweck der Übersichtlichkeit wurden Signifikanzen nicht markiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von Triplikaten. Das *TKTL1*-Transkript konnte in der Zelllinie GS-12^N nicht detektiert werden (Werte fehlen).

Es zeigte sich, dass für alle Glykolyseenzyme sowie für die Laktatdehydrogenase (LDHA) eine erhöhte Expression unter Hypoxie zu verzeichnen war (Abbildung 29). Im Gegensatz dazu kam es tendenziell zu einer leichten Herunterregulation der Expression von PPP-Enzymen und der Expression der Pyruvatdehydrogenase (PDHA).

Dieses Ergebnis konnte auch auf Proteinebene mittels Western Blot Analysen bestätigt werden (Abbildung 30). Auch hier war eine starke hypoxische Induktion der HK2-, PFKP-, ALDOC- und LDHA-Expression und ein leichter Anstieg der Proteinkonzentration von PKM2 zu verzeichnen. Für Enzyme des PPP (G6PD, PGD und TKTL1) konnte hingegen eine Herunterregulation beobachtet werden.



Abbildung 30: Analyse der Expressionsregulation unter Hypoxie auf Proteinebene. Untersuchung der relativen Enzymmengen von Glykolyseenzymen und Enzymen des PPP unter Hypoxie (H) und Normoxie (N) in GS-11^N über 96 h. Zur Quantifizierung der Western Blot Banden wurde eine densitometrische Analyse durchgeführt. Für die Normalisierung wurde der Quotient aus den Pixelintensitäten der Enzyme mit der Pixelintensitäten von Tubulin gebildet. Als Referenzwert diente jeweils der Wert zum Zeitpunkt 0 h und Änderungen wurden als relative n-fache Veränderungen ausgedrückt. Die Werte unter Normoxie wurden von den Hypoxiewerten subtrahiert, um hypoxie-induzierte relative Veränderungen der Enzymmengen zu verdeutlichen (rechte Spalte).

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit zeigten, dass *in vitro* die Glykolyse und der PPP in GS-Zellen sauerstoffkonzentrationsabhängig reziprok reguliert sind. Akute Hypoxie führt demnach zu einer signifikanten Induktion der Expression von Glykolyseenzymen und der Laktatdehydrogenase. Demgegenüber bleibt die Expression von PPP-Enzymen und der

Pyruvatdehydrogenase konstant oder nimmt sogar leicht ab. Das umgekehrte Expressionsmuster ist durch akute Normoxie bei chronisch hypoxischen Linien festzustellen. Akute Normoxie führt zu einer Induktion der Expression von PPP-Enzymen, wohingegen die Expression von Glykolyseenzymen abnimmt.

3.3 Untersuchungen des metabolischen Flusses unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Auf der Basis der Expressionsergebnisse ließ sich postulieren, dass sich die beobachtete sauerstoffkonzentrationsabhängige reziproke Regulation der Expression von PPP- und Glykolyseenzymen auch in der Aktivität der Stoffwechselwege, d.h. in dem metabolischen Fluss (Flux), widerspiegelt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Flux-Analysen mit [1,2-¹³C₂]-D-Glucose-substituiertem Kulturmedium durchgeführt (Kapitel 2.2.7.1). Die direkte zelluläre, katabole Verstoffwechselung der markierten [1,2-13C2]-D-Glucose über die Glykolyse resultiert dabei in der Synthese von zweifach markiertem Laktat, m2 Laktat (Abbildung 11). Eine Verstoffwechselung über den oxidativen und nicht-oxidativen Teil des PPP führt hingegen zur Produktion von Laktat mit lediglich einer ¹³C-Substitution, sogenanntes m1 Laktat. Anhand des massenspektrometrisch bestimmten Isotopologverhältnisses (m1 zu m2) des sekretierten Laktat in den Kulturüberständen kann anschließend die relative Aktivität des PPP der Zellen bezogen auf die Glykolyseaktivität bestimmt werden^{227,236}. Für die Flux-Analyse wurden die Zelllinien GS-11^N und GS-12^N über 48 h parallel unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen mit [1,2-¹³C₂]-D-Glucosesubstituiertem Medium kultiviert und jeweils nach 8, 12, 16, 24 und 48 h die relative Laktat-Isotopologmenge in den zellfreien Überständen mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) bestimmt (Abbildung 31).



Abbildung 31: Absolute Laktatkonzentrationen (Summe aus allen Isotopologen m_0 , m_1 , m_2 , m_3) wurden für die Zellinien GS-11^N und GS-12^N unter normoxischen (GS^N) und akut hypoxischen Bedingungen (GS^{N→H}) unter Verwendung von [1,2-¹³C₂]-D-Glucose-haltigem Medium mittels LC-MS zu den aufgeführten Zeitpunkten quantifiziert. * Signifikanzniveau p ≤ 0,05

Generell war bei beiden Linien zu allen Zeitpunkten unter Hypoxie eine signifikant höhere Laktatkonzentration in den Überständen zu verzeichnen. Nach 48 h war die Laktatkonzentration in den Überständen der unter akuter Hypoxie kultivierten GS- 11^{N} -Zellen (GS- $11^{N \rightarrow H}$) um 72,2% und in der unter akuter Hypoxie kultivierten GS- 12^{N} (GS- $12^{N \rightarrow H}$) um 122,9% gegenüber den normoxischen Kontrollen erhöht.

Das hier gemessene Laktat spiegelte die Summe aus den Signalen der 4 möglichen Isotopologe, *m0* bis *m3* wider (*m0*: unmarkiertes Laktat, das ausschließlich ¹²C-Atome enthält, *m1*: einfach markiertes Laktat aus der Verstoffwechselung über den PPP, *m2*: zweifach markiertes Laktat aus der Verstoffwechselung über die anaerobe Glykolyse und *m3*: Laktat, bei dem es durch das natürliche Isotopenvorkommen zur Markierung des dritten Kohlenstoffatoms gekommen ist). Bei der Betrachtung der prozentualen Anteile der einzelnen Laktat-Isotopologe am Gesamtlaktat zeigte sich, dass an nahezu allen Zeitpunkten der Anteil von "glykolytischem" *m2* Laktat in beiden Zelllinien unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie signifikant erhöht war, wohingegen der Anteil von "PPP" *m1* Laktat unter Hypoxie tendenziell geringer war als unter Normoxie (Abbildung 32).



Abbildung 32: Darstellung der Laktatisotopologverteilung in den Zelllinien GS-11^N und GS-12^N nach Kultivierung unter normoxischen (GS^N) und akut hypoxischen Bedingungen (GS^{N→H}) mit [1,2-¹³C₂]-D-Glucose-haltigem Medium. A) Prozentualer Anteil des Laktatisotopologs m_2 (glykolytisches Laktat) am Gesamtlaktat. B) Prozentualer Anteil des Laktatisotopologs m_1 (PPP-Laktat) am Gesamtlaktat. Alle Werte sind Dreifach-Bestimmungen ± Standardabweichungen.* Signifikanzniveau p ≤ 0,05.

Anhand des Verhältnisses aus einfach markiertem zu zweifach markierten Laktat (m1/m2) war es möglich mit Hilfe der Formel

den relativen metabolischen Flux über den PPP gegenüber der Glykolyse zu berechnen²²⁷. Durch diese Berechnung konnte eine bis zu 2,06-fach höhere PPP-Aktivität unter Normoxie als unter Hypoxie für die GS-11 (nach 8 h), und eine 2,25-fach höhere PPP-Aktivität für die GS-12 (nach 24 h) ermittelt werden (Abbildung 33).



Abbildung 33: Darstellung der relativen PPP-Aktivität in den Zelllinien GS-11^N und GS-12^N unter normoxischen (GS^N) und akut hypoxischen Bedingungen (GS^{N→H}). Unter Verwendung der relativen Isotopologkonzentrationen von *m1*- und *m2*-Laktat wurde mit Hilfe der Formel PPP=(*m1/m2*)/[3+(*m1/m2*)] die relative PPP-Aktivität unter Normoxie und Hypoxie berechnet. Alle Werte sind Dreifach-Bestimmungen ± Standardabweichungen.* Signifikanzniveau p ≤ 0,05.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die erhöhte Expression von Glykolyseenzymen bzw. die herunterregulierte Expression von PPP-Enzymen unter Hypoxie mit einer Aktivitätssteigerung der Glykolyse bzw. einer verminderten Aktivität des PPP einhergeht und demnach aktiv mit einer Verschiebung des Glucosemetabolismus zur direkten Glykolyse assoziiert ist.

3.4 Expressionsanalysen in Glioblastomgewebe

Glioblastome sind hypoxische Tumore (Kapitel 1.2.4), in denen die Glykolyserate gegenüber Normalgewebe um mehr als das Dreifache gesteigert ist^{237,238}. Aus dem beobachteten sauerstoffkonzentrationsabhängigen Switch zwischen PPP und Glykolyse ergab sich die Frage, ob Glioblastome ebenfalls eine starke Expression von Glykolyseenzymen aufweisen und wie sich demgegenüber die Expression von PPP-Enzymen verhält. Daher wurde die Expression von Glykolyseenzymen sowie die Expression von Enzymen des parallel verlaufenden PPP sowohl *in silico* als auch mittels immunhistologischer Untersuchung eines Gewebearrays und von Glioblastomparaffinschnitten durchgeführt.

3.4.1 In silico Genexpressionsanalyse

Zur Analyse der Genexpression wurde zunächst die REMBRANDT (Repository of Molecular Brain Neoplasia Data) Datenbank verwendet. In dieser öffentlichen Datenbank sind Affymetrix Mikroarray-generierte Genexpressionsdaten von Gliomen aller WHO Grade und von Normalhirngewebe sowie deren Korrelation mit dem Überleben von Patienten abrufbar. Bei dem Vergleich der Expressionsdaten von Glykolyseenzymen in Glioblastomen und Normalgewebe zeigte sich unerwarteterweise, dass ausschließlich die Expression von HK2 und den Enzymen der Ertragsphase der Glykolyse (GAPDH, PGK1, ENO1 und PKM2) in Glioblastomen gegenüber Normalhirn erhöht war (Abbildung 34). Interessanterweise war dagegen die Expression der Enzyme aus der Vorbereitungsphase der Glykolyse (GPI, PFK1 und ALDOC) in Glioblastomen gegenüber Normalhirn herunterreguliert (Abbildung 34A), obwohl im Rahmen dieser Arbeit für diese Enzyme in GS-Zellen eine signifikante Induktion unter Hypoxie nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.2).



Abbildung 34: Analyse der Expression von Enzymen der Glykolyse (A), des PPP (B) und des Pyruvatstoffwechsels (C) in Glioblastomen (GBM) gegenüber Normalhirn (NH) anhand der REMBRANDT Datenbank. Rote Pfeile: Erhöhte Genexpression in Glioblastomen gegenüber Normalhirn. Blaue Pfeile: Verringerte Genexpression in Glioblastomen gegenüber Normalhirn.

Daraus resultierte die Frage, ob stattdessen eine erhöhte Expression der Enzyme des parallel verlaufenden PPP in Glioblastomen vorliegt. Weitere REMBRANDT-Analysen konnten in der Tat zeigen, dass in Glioblastomen eine Hochregulation der Expression von Genen, die Enzyme des PPP kodieren, vorlag (Abbildung 34B). Sowohl für Enzyme des oxidativen Teils (G6PD, PGLS und PGD) als auch für Enzyme des nicht-oxidativen Teils des PPP (TKT, TKTL1 und TALDO1) konnte eine Hochregulation der Expression festgestellt werden, obwohl Hypoxie experimentell zu einer Herunterregulation dieser Gene in GS-Zellen führte (Kapitel 3.2). Des Weiteren lag eine erhöhte Expression von LDHA und eine reduzierte Expression der Pyruvatdehydrogenase A1 (PDHA1), dem Bindeglied zwischen Glykolyse und Citratzyklus, in Glioblastomen gegenüber Normalhirn vor (Abbildung 34C). Anhand dieser *in silico*-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Expression der PPP-Enzym-kodierenden Gene in der Hauptmasse des Tumors hochreguliert ist und die Genexpression von Enzymen, die die parallelen Schritte der Vorbereitungsphase der Glykolyse katalysieren, entsprechend herunterreguliert ist.

3.4.2 Expressionsanalyse mittels Gewebe-Mikroarray

Da die REMBRANDT-Datenbank lediglich Aufschluss über die Expression von Genen auf mRNA-Ebene gibt, sollte mit Hilfe eines Gewebe-Mikroarrays (Tissue Microarray, TMA) in situ auf Proteinebene die Expression von Enzymen der Glykolyse und des PPP in Glioblastomen im Vergleich zu Normalgewebe und niedriggradigen Gliomen untersucht werden. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie ein TMA konstruiert, auf dem Gewebestanzen von Astrozytomen aller vier WHO-Grade, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome der WHO-Grade Ш und III. sowie Normalhirnkontrollen vorhanden waren. Zur Validierung der REMBRANDT-Ergebnisse wurde im Anschluss repräsentativ die Proteinexpression von je einem Enzym der Glykolyse und einem Enzym des PPP immunhistologisch in den unterschiedlichen Gewebeproben auf dem TMA analysiert. Als Antigene wurden die auf mRNA-Ebene am stärksten regulierten Enzyme, ALDOC aus der Vorbereitungsphase der Glykolyse bzw. G6PD aus dem PPP, verwendet (Abbildung 26).

In der semiquantitativen Auswertung der Immunfärbung konnte für ALDOC eine deutlich geringere Expression in Glioblastomen im Vergleich zu Normalhirn und niedriger malignen Gliomen festgestellt werden (Abbildung 35A und B). Bei 52% der Glioblastome, die auf dem Array vorhanden waren, lag keine ALDOC-Expression vor (Abbildung 35C).



Abbildung 35: Untersuchung der ALDOC- und G6PD-Proteinexpression in Gliomen mittels TMA. A) Repräsentative histologische Beispiele der Immunfärbungen für ALDOC und G6PD in normalem Gehirngewebe (NH), Astrozytomen des WHO-Grads II (AII) und Glioblastomen (GBM). B) und C) Semiquantitative Analysis der TMA-Färbungsintensitäten. Die Färbungen wurden wie folgt in 5 Stufen bewertet: ungefärbt (0), schwach (1), moderat (2), stark (3), sehr stark (4). Die Proben beinhalteten Astrozytome (A) des WHO-Grads I (N = 6), II (N = 30), III (N = 48), GBM (N = 113), Oligoastrozytome WHO-Grad II (N = 18) und III (N = 23), Oligodendrogliome WHO-Grad II (N = 55) und III (N = 37) und NH (N = 19). B) Mittelwerte der Färbungsintensität auf der 5-stufigen Skala für ALDOC und G6PD. C) Verteilung der Färbungsintensitäten innerhalb der 5-stufigen Skala.

Demgegenüber zeigte G6PD in Glioblastomen die stärkste Immunreaktivität, dagegen nur eine schwache Expression in niedriggradigeren Gliomen und in Normalhirn. Dabei fand sich in 34% aller Glioblastome eine starke bzw. eine sehr starke Expression von G6PD, wohingegen in 53% aller Normalhirnproben und in 50% (AI) bis 63% (AII) aller niedriggradigeren Astrozytome keine G6PD-Expression nachgewiesen werden konnte.

Somit bestätigten die *in situ* Ergebnisse die Erkenntnis der REMBRANDT-Analyse einer erhöhten Expression von Enzymen des PPP aber einer schwächeren Expression von Enzymen aus der Vorbereitungsphase der Glykolyse in Glioblastomen gegenüber Normalhirn und niedriggradigen Gliomen.

3.4.3 Expressionsanalyse in Glioblastomgewebe

Da sich die Sauerstoffkonzentration in Tumoren regional zwischen gut vaskularisierten und nicht vaskularisierten hypoxischen Bereichen stark unterscheidet, sollte anschließend anhand von Glioblastomgewebsschnitten die exakte Gewebelokalisation von Glykolyseenzymen und Enzymen des PPP untersucht werden, um eine mögliche gewebsstrukturassoziierte Expression zu identifizieren.

Die am stärksten hypoxischen Bereiche in Glioblastomen sind die sogenannten Pseudopalisaden oder pseudopalisadenförmige Randwälle, hyperzelluläre Zonen, die nekrotische Bereiche umgeben und vermutlich durch Zellen gebildet werden, die aus dem stark hypoxischen Bereich weg migrieren²³⁹. Diese stark hypoxischen Zonen sind unter anderem durch die zelluläre Expression von HIF-1 α charakterisiert^{239,240}. Wie in Abbildung 36A zusammengestellt, konnte in immunhistologischen Untersuchungen zunächst

Ergebnisse

eine starke HIF-1α-Expression in den Pseudopalisaden bestätigt werden. Zudem wiesen diese hochgradig hypoxischen Zonen eine starke Expression von Enzymen der Vorbereitungsphase der Glykolyse (HK2, ALDOC, PFKP) auf. In dem umliegenden, besser oxygenierten Tumorgewebe konnte hingegen nur eine schwache Immunreaktivität für diese Enzyme festgestellt werden (Abbildung 36A). Ein exakt entgegengesetztes Expressionsmuster wurde für Enzyme des PPP detektiert. Hier zeigte sich eine schwache Expression von G6PD und PGD in den stark hypoxischen Pseudopalisaden und eine starke Immunreaktivität für diese Enzyme im umliegenden Tumorgewebe.



Abbildung 36: Immunhistologische Untersuchung von GBM-Gewebeschnitten. A) Hypoxische pseudopalisadenförmige Randwälle zeigten eine stark erhöhte Expression von HIF-1 α , HK2, ALDOC und PFKP, wohingegen die Expression von G6PD und PGD in diesen Arealen im Vergleich zum umliegenden Tumorgewebe erniedrigt war. B) Hochproliferative Knoten in GBMs zeigten eine hohe Expression von Ki-67 und G6PD, aber eine Herunterregulation der ALDOC-Expression im Vergleich zum umgebenden Tumorgewebe. Die Größenbalken entsprechen 200 μ m.

In manchen Glioblastomen finden sich zudem hochgradig proliferative Knoten, die sich vermutlich aus Klonen mit zusätzlichen genetischen Veränderungen und/oder Klonen eines anderen Differenzierungsstatus bilden, die aufgrund eines erworbenen Selektionsvorteils bezüglich der Zellteilung umliegende Zellen überwachsen²⁴¹. In immunhistologischen Untersuchungen zeigte sich, dass diese hochproliferativen Knoten, die durch eine starke Expression von Ki-67⁺ (Antigen in proliferativ aktiven Zellen) gekennzeichnet sind, im Vergleich zum umliegenden Tumorgewebe eine starke G6PD-Expression aber nur eine sehr geringe Expression von ALDOC aufwiesen (Abbildung 36B).

Aus den Expressionsanalysen in Glioblastomgewebe geht hervor, dass ähnlich der Genexpressionsregulation *in vitro* auch innerhalb des Glioblastomgewebes eine sauerstoffkonzentrationsabhängige Verschiebung des Expressionsmusters zu beobachten ist, mit einer starken Expression von PPP-Enzymen in dem größten Teil der Tumorzellen, vor allem in hochproliferativen Arealen, aber einer Herunterregulation in stark hypoxischen Arealen zugunsten einer Hochregulation der Expression von Glykolyseenzymen.

3.5 Funktionelle Analysen der GS-Zelllinien

Aus der Erkenntnis, dass in GS-Zellen ein sauerstoffkonzentrationsabhängiger Switch zwischen Glykolyse und dem PPP vorliegt ergab sich die Frage, inwieweit diese Regulation des Stoffwechsels Einfluss auf zelluläre Prozesse von GS-Zellen hat. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Auswirkung von akuter Hypoxie in chronisch normoxischen GS-Linien und von akuter Normoxie in chronisch hypoxischen GS-Linien auf drei wichtige Prozesse der Tumorgenese untersucht, Proliferation, Migration und Apoptose.

3.5.1 Untersuchung der Proliferation unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bereits für adaptierte, chronisch hypoxische Linien (GS^H) gegenüber chronisch normoxischen Linien (GS^N) eine signifikant langsamere Proliferation nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.3). Aus den Mikroarray-Analysen ging außerdem hervor, dass akute Hypoxie in chronisch normoxischen Zellen zu einer Herunterregulation von zellzyklus- und zellteilungsassoziierten Signalwegen führte (Kapitel 3.2.1 und Tabelle A8). Zudem zeigte sich, dass akute Hypoxie eine Herunterregulation der Expression von PPP Enzymen und folglich eine Verschiebung der Glucoseverstoffwechselung mit einer verringerten Aktivität des PPP verursacht (Kapitel 3.2.2 und 3.3). Die Funktion des PPP, NADPH als essentielles Reduktionsäquivalent für anabole Prozesse und Ribose-5-Phosphat für die DNA- und RNA-Synthese bereitzustellen, lässt vermuten, dass der PPP direkt prolifersationsfördernd wirkt¹⁷⁵. Die Ergebnisse aus den genannten Experimenten (Kapitel 3.1.3, 3.2.2 und 3.3) deuten darauf hin, dass vor allem akute Hypoxie zu einer verminderten Proliferation in GS-Zellen führten könnte.

Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte der Einfluss von akuten Veränderungen der Sauerstoffkonzentration auf chronisch adaptierte Zellen untersucht werden. Dazu wurden chronisch normoxische Zellen (GS^N) und chronisch hypoxische Zellen (GS^H) der Zelllinien GS-11 und der GS-12 für 17 Tage parallel unter normoxischen und unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und die Zellzahl der parallelen Ansätze zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 37).

Es zeigte sich, dass in beiden GS^N-Linien unter Hypoxie die Proliferation gegenüber unveränderten Kulturbedingungen signifikant reduziert war (Abbildung 37, linke Seite). So lag die Verdopplungszeit unter Hypoxie bei 12,2 Tagen für die GS-11 und bei 3,3 Tagen für die GS-12, unter Normoxie allerdings bei nur 3,5 Tagen für die GS-11 und 3,1 Tagen für die GS-12.



Abbildung 37: Effekt von "akuter" Hypoxie (N \rightarrow Hypoxie) bzw. "akuter" Normoxie (H \rightarrow Normoxie) auf die Proliferation der Zelllinien GS-11 und GS-12. Die Zellzahl wurde an den angegebenen Zeitpunkten für die parallelen Ansätze manuell bestimmt. Auf die Verwendung der Standardnomenklatur N \rightarrow H für akute Hypoxie und H \rightarrow N für akute Normoxie wurde verzichtet, da hier mit "akut" nicht eine Inkubation über 48 h gemeint ist. Die Zellzahlen sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von sechsfach Bestimmungen. * Signifikanzniveau p ≤ 0,05

Auch im umgekehrten Fall, der Oxygenierung von chronisch hypoxischen Zellen (GS^H), konnte unter Normoxie eine höhere Proliferationsrate nachgewiesen werden als unter der Weiterkultivierung unter Hypoxie (Abbildung 37, rechte Seite). Hier lag die Verdopplungszeit für die GS-11 bei 3,8 Tagen unter Normoxie und 10,7 Tagen unter Hypoxie, und für die GS-12 bei 8,9 Tagen unter Normoxie und 11,9 Tagen unter Hypoxie.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Hypoxie unabhängig von der zellulären Adaptation an chronische Kulturbedingungen generell zu einer Reduktion der Proliferationsrate führt. Das Ergebnis einer adaptationsunabhängigen verringerten Proliferation unter Hypoxie bestätigt die Ergebnisse der Mikroarray-Analyse, der Validierungsexperimente und der Expressionsanalysen in Glioblastomen und setzt alle Ergebnisse in einen kausale Zusammenhang: Unter akuter Hypoxie kommt es zu einer Herunterregulation der Expression

von Genen, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind (Kapitel 3.2.1) und von Genen, die Enzyme des pro-proliferativen PPP kodieren (Kapitel 3.2 und 3.4), was in einer reduzierten PPP-Aktivität (Kapitel 3.3) und einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate der GS-Zellen resultiert. Im Gegensatz dazu führt akute Normoxie über eine Steigerung der PPP-Aktivität zu einer erhöhten Proliferation.

3.5.2 Untersuchung der Migration unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Aus den Mikroarray-Analysen ging hervor, dass chronische Hypoxie zur Expression von Genen führt, die mit einer erhöhten Migration assoziiert sind (Kapitel 3.2.1). Um *in vitro* die Hypothese einer gesteigerten Migration unter chronischer aber auch akuter Hypoxie zu untersuchen, wurden modifizierte Boyden Kammer Migrationsassays durchgeführt.



Abbildung 38: Der Effekt von akuter Hypoxie (N \rightarrow H) auf chronisch normoxische GS-Linien (GS-11^N und GS-12^N, A) und akuter Normoxie (H \rightarrow N) auf chronisch hypoxische GS-Linien (GS-11^H und GS-12^H, B) auf die Zellmigration wurde in modifizierten Boyden Kammer Assays untersucht. Nach jeweils 24-stündiger Inkubation unter den angegebenen Bedingungen wurde die Anzahl an migrierten Zellen in 10 "high power fields" (hpf) unter Verwendung eines 40x Objektivs bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von sechsfach Bestimmungen. * Signifikanzniveau p \leq 0,05

Aus Abbildung 38 geht hervor, dass sowohl akute als auch chronische Hypoxie zu einer gesteigerten Zellmotilität führten. In GS^N-Linien war unter akuter Hypoxie ein Anstieg der Migration von 37,3% in der GS-11^N und von 111,7% in der GS-12^N zu detektieren. Dagegen resultierte akute Normoxie von GS^H-Linien in einer Verringerung der Migration um 49,0% in der GS-11^H und um 54,6% in der GS-12^H. Hypoxie führt demnach unabhängig von der Adaptation an die jeweilige Kulturbedingung generell zu einer Steigerung der Migration.

Aus den Kapiteln 3.5.1 und 3.5.2 kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass Hypoxie die Proliferation reduziert aber die Migration erhöht, und dies unabhängig von einer Präadaptation an normoxische oder hypoxische Kulturbedingungen. Demnach ist die gesteigerte Aktivität des PPP unter Normoxie mit einer erhöhten Proliferation assoziiert, wohingegen es unter Hypoxie zu einem Switch zur direkten Glykolyse kommt, der mit einem Anstieg der Migrationsfähigkeit der Zellen assoziiert ist.

3.5.3 Untersuchung der Apoptose unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Weitere bioinformatische Analysen der Daten aus dem Mikroarray ergaben, dass akute Hypoxie in GS^N-Zellen aber auch akute Oxygenierung von GS^H-Zellen die Expression von Genen hochregulieren, die mit pro-apoptotischen Signalwegen assoziiert sind (Kapitel 3.2.1 und Tabelle A2 und A6).

Um den Anteil an apoptotischen Zellen innerhalb einer Population unter den verschiedenen Kulturbedingungen zu bestimmen, wurden durchflusszytometrische Analysen unter Verwendung von Annexin V durchgeführt.



Abbildung 39: Der Effekt von akuter Hypoxie (N \rightarrow H) und akuter Normoxie (H \rightarrow N) auf den Anteil an apoptotischen Zellen in den chronisch normoxischen (N) (A) bzw. chronisch hypoxischen (H) (B) GS-11 und GS-12 wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin-Färbung nach einer 72-stündigen Inkubation unter den angegebenen Bedingungen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von Quintuplikaten. * Signifikanzniveau p ≤ 0,05

Diese Untersuchungen ergaben, dass akute Hypoxie den Anteil von apoptotischen Zellen in der Gesamtpopulation um das 1,97-fache in der GS-11^N und um das 2,56-fache in der GS-12^N erhöhte (Abbildung 39). Unter akuter Normoxie konnte ein Anstieg des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen in der Gesamtpopulation um das 5-fache in der GS-11^H und um das 1,57-fache in der GS-12^H festgestellt werden.

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass akute Veränderungen der Sauerstoffkonzentration (sowohl eine Erhöhung als auch eine Reduktion) generell ein pro-apoptotischer Stressfaktor sind. Diese Ergebnisse bestätigen damit die Mikroarray-Analysen.

3.6 Funktionelle Analyse der Glykolyse und des PPP

Die bisher dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Teilaspekt der Adaptation von GS-Zellen an sich verändernde Sauerstoffkonzentrationen die reziproke Regulation der Glykolyse und des PPP ist. Aus diesen Erkenntnissen leiten sich folgende Fragen ab:

- 1. Was sind die phänotypischen und funktionellen Konsequenzen einer Inhibition bzw. Herunterregulation der Glykolyse und des PPP in GS-Zellen?
- 2. Hat eine Inhibition bzw. eine Herunterregulation der Glykolyse aber auch des PPP Auswirkungen auf den Stammzellphänotyp in GS-Linien?

Um dies zu untersuchen, wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt:

- 1. der stabile Knockdown von den zwei am stärksten expressionell regulierten Genen der Glykolyse (ALDOC) und des PPP (G6PD) mittels shRNA
- die spezifische Inhibition der Stoffwechselwege durch synthetische Inhibitoren (Ornidazol als Inhibitor f
 ür die Glykolyse und 6-Aminonicotinamid (6-AN) als Inhibitor f
 ür den PPP).

3.6.1 Funktionelle Analyse der Glykolyse und des PPP mittels shRNAvermittelter Herunterregulation von ALDOC und G6PD

Um zu untersuchen, welche funktionelle Bedeutung die metabolische Adaptation, d.h. die sauerstoffkonzentrationsabhängige reziproke Regulation der Glykolyse und des PPP, für GS-Zellen hat, wurden in diesem Teil der Arbeit die beiden durch akute Veränderungen der Sauerstoffkonzentration am stärksten regulierten Enzyme der beiden Stoffwechselwege (ALDOC als Enzym der Glykolyse und G6PD als Schlüsselenzym des PPP) in der chronisch normoxischen Zelllinie GS-11 mittels shRNA stabil herunterreguliert (Kapitel 2.2.2.6). Anschließend sollte der Einfluss der Herunterregulation auf den Stammzellphänotyp sowie auf die Proliferation und die Migration überprüft werden. Dazu wurden pro Zielgen drei spezifische shRNA-Sequenzen (shALDOC 1 bis 3 und shG6PD 1 bis 3) und zur Kontrolle des knockdownspezifischen Effekts eine Negativkontrolle (non-silencing control) mit einer unspezifischen shRNA-Sequenz (alle in Form von lentiviralen shRNA Vektoren) verwendet. Als weitere Kontrolle diente die entsprechende untransduzierte Wildtyp-Linie (wt). Erfolgreich transduzierte Zellen exprimierten GFP (Abbildung 40A), welches auf dem lentiviralen Vektor kodiert war, und konnten über die lentiviral vermittelte Puromycinresistenz selektiert werden. Zur Überprüfung, ob die beobachteten Effekte genereller Natur oder GS-zellspezifisch waren, wurde das Knockdown-Experiment parallel auch in einer konventionellen, hochtumorigenen Gliomzelllinie (G55T2, Abbildung 40B) durchgeführt, die mit Serum kultiviert wurde, adhärent wuchs und keine Stammzelleigenschaften aufwies.



Abbildung 40: Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der GFP⁺ transduzierten GS-11 (A) und G55T2 (B) Linien.

3.6.1.1 Validierung der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD

Nach erfolgreicher Transduktion und Selektion der GFP-positiven, transduzierten Zellen wurde die Effizienz des Knockdowns in den Zelllinien GS-11 und G55T2 sowohl auf RNAals auch auf Proteinebene überprüft.

Für beide Zelllinien konnte mittels qPCR eine signifikante Herunterregulation der Expression von ALDOC bzw. G6PD durch die spezifischen shRNAs, aber nicht durch die unspezifische shRNA (Negativkontrolle) detektiert werden (Abbildung 41). Lediglich in der Zelllinie GS-11 shG6PD 1 konnte keine Herunterregulation der G6PD-Expression gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Linie wurde daher von den weiteren Analysen ausgeschlossen.



Abbildung 41: Nachweis der Herunterregulation von ALDOC und G6PD in den transduzierten Zelllinien GS-11 (A) und G55T2 (B) mittels qPCR. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der n-fachen Expressionsänderungen bezogen auf die Negativkontrolle in Triplikaten. * Signifikanzniveau p \leq 0,05

Relativ zur Negativkontrolle konnte in der GS-11, transduziert mit den ALDOC-spezifischen shRNAs, eine signifikante Herunterregulation von 90,2% (shALDOC 1) bis 96,5% (shALDOC 3) (Abbildung 41A) bzw. in der G55T2 eine signifikante Herunterregulation von 94,4% (shALDOC 1) bis 97,6% (shALDOC 3) (Abbildung 41B) festgestellt werden. Die lentivirale Transduktion von G6PD-spezifischen shRNAs führte in der GS-11 zu einer signifikanten Herunterregulation von 73,1% (shG6PD 2) bis 81,85% (shG6PD 3) und in der G55T2 von 60,8% (shG6PD 2) bis 86,3% (shG6PD 3) gegenüber der Negativkontrolle.

Bei der Untersuchung der Proteinmengen in den Zelllysaten der Knockdown-Linien und den Kontrolllinien (wt und Negativkontrolle) zeigte sich sowohl in den G6PD-Knockdown-Linien der G5-11 als auch in den G6PD-Knockdown-Linien der G55T2 eine deutlich geringere G6PD-Proteinmenge bezogen auf die Kontrolllinien und die ALDOC-Knockdown-Linien (Abbildung 42A, oberer Blot).



Abbildung 42: Nachweis der Herunterregulation von ALDOC und G6PD in den transduzierten Zelllinien GS-11 und G55T2. A) Darstellung der Western Blot Analyse. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin verwendet. Der Pfeil deutet auf die ALDOC-spezifischen Banden. B) Densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse für ALDOC.

Zudem konnte die erfolgreiche Herunterregulation von ALDOC in der GS-11 für alle drei shRNA-Konstrukte (shALDOC) bezogen auf die Negativkontrollen und die G6PD-Knockdown-Linien nachgewiesen werden, wobei die Transduktion mit shALDOC 3 den stärksten Effekt hatte (Abbildung 42A und B, linke Seite). Auch die Verwendung aller drei ALDOC-spezifischen shRNAs in der G55T2 führte zu einer signifikanten Herunterregulation von ALDOC gegenüber den Negativkontrollen und den G6PD-Knockdown-Linien, bei denen wiederum die shALDOC 3 die stärkste Herunterregulation aufwies (Abbildung 42A und B, rechte Seite).

Zusammenfassend konnte für alle genspezifischen shRNAs eine Herunterregulation der Genexpression des Zielgens nachgewiesen werden.

Nachfolgend sollte der Effekt der Herunterregulation von G6PD bzw. ALDOC auf zelluläre Prozesse (Proliferation, Migration und *in vivo* Wachstumsverhalten) untersucht werden. Zudem sollte überprüft werden, welchen Effekt die Herunterregulation der beiden Enzyme aus der Glykolyse bzw. dem PPP auf Stammzelleigenschaften (Differenzierbarkeit und Klonogenität) der GS-11 hat.

3.6.1.2 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die Proliferation

Es ist bekannt, dass die Aktivität des anabolen PPP aufgrund der Synthese von NADPH und Ribose-5-Phosphat für die Proliferation von Zellen unerlässlich ist¹⁷⁵. Auch das Ergebnis, dass die höhere PPP-Aktivität unter Normoxie mit einer erhöhten Proliferation assoziiert ist (Kapitel 3.3 und 3.5.1) deutet darauf hin, dass die PPP-Aktivität ein wichtiger Faktor für die Proliferation ist.

Um zu überprüfen, welchen Effekt die Herunterregulation von G6PD, dem Schlüsselenzym des PPP, bzw. von ALDOC, ein Glykolyseenzym, auf die Zellteilung hat, wurden sowohl für die GS-11-Knockdown-Linien (Abbildung 43A) als auch für die G55T2-Knockdown-Linien (Abbildung 43B) Proliferationsassays unter normoxischen Bedingungen durchgeführt. Im Fall der GS-11-Linien wurde die Zellzahl manuell und im Fall der G55T2 indirekt mittels Kristallviolett bestimmt (Kapitel 2.2.1.6.2 und 2.2.1.6.3).



Abbildung 43: Effekt der Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die Proliferation der Zelllinien GS-11 (A) und G55T2 (B). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von sechsfach Bestimmungen. * Signifikanzniveau $p \le 0.05$

Nach 7 Tagen konnte für die verschiedenen GS-11-Knockdown-Linien festgestellt werden, dass eine Herunterregulation von G6PD zu einer signifikant reduzierten Proliferation um maximal 74,7% (shG6PD 2) bis 56,6% (shG6PD 3) führte, wohingegen die Herunterregulation von ALDOC in einer signifikant erhöhten Proliferation um das 1,3-fache (shALDOC 2) bis 2,7-fache (shALDOC 1) bezogen auf die Negativkontrolle resultierte (Abbildung 43A). Die erhöhte Zellzahl der Negativkontrolle gegenüber der wt-Linie deutet auf einen generellen proliferationsaktivierenden Effekt durch die Transduktion in der GS-11 hin. Die Herunterregulation von G6PD in G55T2 Zellen führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation zwischen 31,5% (shG6PD 1) und 22,4% (shG6PD 2, Abbildung 43B). In dieser Zelllinie hatte die Herunterregulation von ALDOC allerdings keine konsistente Veränderung der Proliferation zur Folge.

Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass eine Herunterregulation des Schlüsselenzyms des anabolen PPP die Proliferation von Zellen verlangsamt, wohingegen die Herunterregulation eines Enzyms der parallel verlaufenden Vorbereitungsphase der Glykolyse in GS-Zellen einen proliferationssteigernden Effekt hat.

3.6.1.3 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die Migration

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die hypoxieinduzierte Verschiebung des Stoffwechsels in Richtung direkter Glykolyse mit einer Steigerung der Migration einhergeht (Kapitel 3.3 und 3.5.2), wohingegen eine normoxieinduzierte Verschiebung des Glucosestoffwechsels zum PPP in einer verringerten Motilität der Zellen resultierte. Zudem ist bekannt, dass der Prozess der Migration über die ATP-abhängige Umstrukturierung des Zytoskeletts verläuft²⁴². Zudem wurde beschrieben, dass ATP chemotaktische Funktionen ausübt²⁴³. Eine gesteigerte ATP-Synthese unter Hypoxie durch die Induktion der Expression von Glykolyseenzymen könnte daher die Ursache für die beschriebene erhöhte Migration von GS-Zellen unter Hypoxie sein.

Zur Überprüfung des Einflusses der Glykolyse und des PPP auf die migratorischen Eigenschaften von GS-11 und G55T2-Zellen wurden modifizierte Boyden Kammer Assays mit den Knockdown-Linien unter normoxischen und akut hypoxischen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 44).



Abbildung 44: Der Effekt der Herunterregulation von ALDOC (A) und G6PD (B) auf die Zellmigration in der Zelllinie GS-11 unter Normoxie (N) und akuter Hypoxie (N \rightarrow H) wurde mittels modifizierten Boyden Kammer Assays untersucht. Nach jeweils 24-stündiger Inkubation unter den angegebenen Bedingungen wurde die Zahl migrierter Zellen in 10 "high power fields" (hpf) unter Verwendung eines 40x Objektivs bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von sechsfach Bestimmungen. * Signifikanzniveau p \leq 0,05

Es konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von ALDOC zu einer signifikanten Verringerung der Migrationsfähigkeit um $43,33\% \pm 10,91\%$ (shALDOC 1) bis 70,89% \pm 5,78% (shALDOC 3) unter normoxischen und 47,75% \pm 12,98% (shALDOC 1) bis 72,07% \pm 12,50% (shALDOC 3) unter akut hypoxischen Bedingungen gegenüber der Negativkontrolle führte (Abbildung 44A). Hierbei ist festzustellen, dass die Herunterregulation von ALDOC unter hypoxischen Bedingungen keinen signifikant stärkeren Effekt auf die Migration hat als unter normoxischen Bedingungen.

Die Herunterregulation von G6PD führte hingegen zu einer signifikanten Steigerung der Migration von GS-11-Zellen unter normoxischen Bedingungen um durchschnittlich 56,48% ± 6,99% gegenüber der Negativkontrolle (Abbildung 44B). Dieser Effekt war unter hypoxischen Bedingungen mit einer durchschnittlich 2,5-fach höheren Migration noch deutlicher ausgeprägt als unter Normoxie.

Für die G55T2 konnte der Effekt einer signifikant verringerten migratorischen Fähigkeit durch Herunterregulation von ALDOC ebenfalls detektiert werden, wobei hier der Effekt unter akuter Hypoxie mit einer durchschnittlichen Reduktion um 35,67% \pm 12,25% geringer war als



unter Normoxie mit einer Verringerung um durchschnittlich $64,03\% \pm 15,31\%$ (Abbildung 45A).

Abbildung 45: Der Effekt der Herunterregulation von ALDOC (A) und G6PD (B) auf die Zellmigration in der Zelllinie G55T2 unter Normoxie und akuter Hypoxie wurde mittels modifizierten Boyden Kammer Assays untersucht. Nach jeweils 42-stündiger Präinkubation und 6-stündiger Inkubation in den Boyden-Kammern unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen wurde die Anzahl migrierter Zellen in 10 "high power fields" (hpf) unter Verwendung eines 40x Objektivs bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von sechsfach Bestimmungen. * Signifikanzniveau p \leq 0,05

Im Gegensatz zur GS-11 konnte in der G55T2 allerdings keine Erhöhung der Migration durch Herunterregulation von G6PD beobachtet werden (Abbildung 45B). Stattdessen lag unter Normoxie eine signifikante Verringerung der Migration vor, wohingegen kein signifikanter Effekt auf die Migration unter akuter Hypoxie beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass die Herunterregulation von ALDOC und G6PD in der GS-11 gegensätzliche Auswirkungen auf die Migration und die Proliferation hatte. Die Herunterregulation von ALDOC hatte einen Anstieg der Proliferation aber eine Reduktion der Migration zur Folge, wohingegen die Herunterregulation von G6PD eine Steigerung der Migration bei Verringerung der Proliferation bewirkte. Diese Effekte konnten teilweise auch in der G55T2 festgestellt werden. Auch hier zeigte sich, dass eine Herunterregulation von G6PD zu einer Verringerung der Proliferation führte und eine Herunterregulation von ALDOC die Migration reduzierte. Um zu untersuchen, ob der Knockdown von ALDOC bzw. G6PD auch Auswirkungen auf das Tumorwachstum *in vivo* und den Stammzellphänotyp hat, wurden die Knockdown-Linien im Anschluss hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens *in vivo* sowie hinsichtlich ihrer Kapazität *in vivo* Tumore zu initiieren und der Ausprägung der Tumorstammzelleigenschaften Klonogenität und Differenzierbarkeit überprüft.

3.6.1.4 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf das Wachstumsverhalten *in vivo*

Aus den bisherigen Ergebnissen der Knockdown-Experimente formulierte sich die Hypothese, dass der Knockdown von ALDOC bzw. G6PD und somit die Herunterregulation des jeweiligen Stoffwechselweges signifikanten Einfluss auf die Tumorprogression haben könnte. Ziel dieses Abschnitts war es daher, die Bedeutung des hypoxieregulierten Wechselspiels zwischen Glykolyse und PPP auf die Tumorinitiierung und das Tumorwachstum *in vivo* durch einen zellulären Knockdown von G6PD bzw. ALDOC mittels *in vivo*-Tumorigenitätstestung zu untersuchen.

Glioblastome bestehen zum einen aus einer hochproliferativen soliden Haupttumormasse und zum anderen aus hochinvasiven Anteilen, die das Hirn diffus infiltrieren. Da es weltweit kein einziges Xenograft-Glioblastommodell gibt, das diese beiden charakteristischen Anteile des Glioblastoms gemeinsam repräsentiert, wurde für den *in vivo* Versuch sowohl die G55T2- als auch die GS-11-Zelllinie verwendet. Hierbei diente die G55T2, die *in vivo* solide, hochproliferative, scharf begrenzte Knoten bildet und nicht invasiv wächst, als Modell für die Haupttumormasse^{229,244}. Die GS-11, die keine soliden, knotenartigen Tumore bildet, sondern das Gehirn diffus infiltriert, wurde hingegen als Modell für den hochinvasiven Anteil in Glioblastomen verwendet^{125,245}.

In diesem Versuch wurde je eine der Knockdown-Linien für ALDOC (shALDOC 1) bzw. G6PD (shG6PD 2) sowie die wt-Linie und die unspezifische Negativkontrolle intrakraniell in das Hirn von Nacktmäusen injiziert. Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass G55T2-tragende Mäuse nach etwa 20 Tagen symptomatisch werden^{229,244} und makroskopisch detektierbare Tumore aufweisen. Für GS-Linien hingegen war bekannt, dass die Tumore sehr viel langsamer wachsen^{125,245}. Für die GS-11 im Speziellen zeigte die Erfahrung, dass die Mäuse erst nach ca. 8 Monaten (ca. 240 Tage) symptomatisch werden. Dieser Unterschied bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit der beiden untersuchten Zelllinien (GS-11 und G55T2) führte dazu, dass bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit noch kein Tier der GS-11-Knockdown-Gruppen symptomatisch war. Daher wird im Folgenden nur das Ergebnis der G55T2 Xenotransplantation beschrieben.



Abbildung 46: Kaplan-Meier-Überlebenskurven. Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Versuchstiere nach der Injektion der G55T2-Linien shALDOC 1 (A) bzw. shG6PD 2 (B) im Vergleich zur Negativkontrolle. (Kaplan-Meier Analyse, log-rank test, N = 8 für die G55T2 shALDOC 1 und Negativkontroll-Zelllinie, N = 9 für die G55T2 shG6PD und Negativkontroll-Zelllinie).

Wie aus Abbildung 46 hervorgeht, hatte der Knockdown von ALDOC bzw. G6PD einen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum und damit auf das Überleben der Mäuse. So führte die Injektion der ALDOC-Knockdown-Linie mit einem durchschnittlichen Überleben von 17 Tagen zu einem signifikant schnelleren Tumorwachstum gegenüber der Negativkontrolle mit einem durchschnittlichen Überleben von 19 Tagen. Im Gegensatz dazu überlebten Mäuse, denen die G6PD-Knockdown-Linie intrakraniell injiziert wurde, mit durchschnittlich 20,5 Tagen signifikant länger als Mäuse, die parallel dazu die Negativkontrolle injiziert bekamen und durchschnittlich 18,5 Tage überlebten.

Die histologischen Untersuchungen zeigten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Linien bezüglich eines invasiven Wachstumsmusters (Abbildung 47). So wies weder die Knockdown-Linien für ALDOC, noch die Knockdown-Linie für G6PD Zeichen einer vermehrten Invasion gegenüber den Kontrolllinie auf.



Abbildung 47: Mikroskopische Darstellung der durch die G55T2 wt-Linie (A), Negativkontroll-Linie (B), shALDOC1 Knockdown-Linie (C) und shG6PD2 Knockdown-Linie generierten soliden Tumore *in vivo*. Dargestellt sind HE-Präparate der Coronar-Schnitte repräsentativ von jeweils einem Gehirn einer Nacktmaus pro Versuchsgruppe am jeweiligen Endpunkt des Versuchs.

Aus den Ergebnissen dieses Versuchsteils kann abgeleitet werden, dass der *in vitro* beobachtete proliferationsreduzierende Effekt der Herunterregulation von G6PD in G55T2-Zellen *in vivo* zu einem langsameren Tumorwachstum führt, wohingegen die Herunterregulation von ALDOC *in vivo* in einem schnelleren Tumorwachstum resultiert.

3.6.1.5 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die Klonogenität

Die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern, ist ein Kriterium von Tumorstammzellen. In diesem Abschnitt sollte überprüft werden, ob sich eine Modulation der Expression der beiden Glucosestoffwechselenzyme auf die Klonogenität der Glioblastomstammzelllinie GS-11 auswirkt.

Die Auswertung des Klonogenitätsassays zeigte, dass die Herunterregulation von G6PD keine Auswirkungen auf die Klonogenität der GS-11-Zellen hatte (Abbildung 48). Allerdings konnte in den drei ALDOC-Knockdown-Linien eine signifikant verringerte Klonogenität detektiert werden. Diese Linien zeigten eine zu 79% (shALDOC 1), 84% (shALDOC 2) bzw. 94% (shALDOC 3) geringere Sphärenbildung pro Platte gegenüber der Negativkontrolle.



Abbildung 48: Klonogenität der verschiedenen Knockdown- und Kontroll-Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifach-Bestimmung \pm Standardabweichungen. * Signifikanzniveau p \leq 0,05

3.6.1.6 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die Differenzierbarkeit

Ein weiteres Kriterium von Tumorstammzellen ist die Differenzierbarkeit. Um zu analysieren, ob eine Herunterregulation von ALDOC bzw. G6PD die Differenzierbarkeit von GS-11-Zellen beeinflusste, wurden die Zellen über 3 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert und die Expression von den Differenzierungsmarkern GFAP (astrozytäre Differenzierung) und MAP2 (neuronale Differenzierung) sowie die Expression des Glioblastomstammzellmarkers CD133 mittels quantitativer Real-time PCR analysiert.



Abbildung 49: Untersuchung der Differenzierbarkeit anhand der Expression der Differenzierungsmarker GFAP und MAP2 und des Stammzellmarkers CD133 in den verschiedenen Knockdown- und Kontroll-Zelllinien mittel qPCR. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifach-Bestimmung ± Standardabweichungen.

Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen genspezifischen Knockdown-Linien ebenso wie die Kontrollzelllinien generell differenzierbar waren (Abbildung 49). So war nach 3-tägiger Inkubation in Differenzierungsmedium in allen Zelllinien eine signifikant geringere Expression des Stammzellmarker CD133 und eine signifikant höhere Expression des astrozytären Differenzierungsmarkers GFAP zu verzeichnen. Für alle shG6PD-Linien konnte zudem anhand einer signifikant erhöhten Expression von MAP2 die Differenzierung in neuronale Richtung nachgewiesen werden. In den shALDOC-Linien war hingegen keine signifikante Expressionssteigerung von MAP2 nach der Differenzierung zu verzeichnen, was darauf hindeutet, dass eine Herunterregulation von ALDOC eine Differenzierung in astrozytäre Richtung nicht beeinflusst, jedoch das Potential zur neuronalen Differenzierung beeinträchtigt.

Zusammenfassend konnte in diesem Versuchsteil gezeigt werden, dass eine Herunterregulation der G6PD, und somit des PPP, keine Auswirkungen auf die beiden Stammzelleigenschaften Klonogenität und Differenzierung hatte, allerdings zu einer Verlangsamung des *in vivo* Tumorwachstums führte. Das steht im Einklang mit der beobachteten niedrigeren Proliferationsrate von G6PD-Knockdown-Linien aus den *in vitro* Versuchen. Eine Herunterregulation von ALDOC führte hingegen zu einer geringeren Klonogenität, einer verminderten Differenzierbarkeit in neuronale Richtung und zu einem deutlich schnelleren Tumorwachstum.

3.6.2 Funktionelle Analyse der Glykolyse und des PPP mittels Inhibitoren

Die Ergebnisse der Knockdown-Experimente (Kapitel 3.6.1) deuteten darauf hin, dass eine Modulation des Glucosestoffwechsels die Proliferation, die Migration und vor allem das in vivo Tumorwachstum beeinflusst und somit möglicherweise therapeutisches Potenzial hat. So könnten durch die Verringerung der Proliferation durch Inhibition des PPP und durch die Reduktion der Zellmigration durch Inhibition der Glykolyse in einer kombinierten Therapie sowohl die hochgradig proliferative Haupttumormasse als auch die diffus infiltrierenden Anteile von Glioblastomen potentiell therapeutisch angreifbar werden. Da ein gentherapeutischer Ansatz in der klinischen Behandlung von Glioblastompatienten keine kurzfristig zu realisierende Behandlungsstrategie ist, stellte sich die Frage, ob die Inhibition der Glykolyse bzw. des PPP mittels synthetischer Inhibitoren vergleichbare Resultate erzielen kann. Aus diesem Grund sollten der Einfluss von den Substanzen 6-Aminonicotinamid (6-AN) und Ornidazol auf die Proliferation und die Migration, d.h. Zellfunktionen, die für die Tumorentstehung in vivo und die Progression eine wichtige Rolle spielen, sowohl in Glioblastomstammzelllinien (GS-11 und GS-12) als auch in der konventionellen Gliomzelllinie G55T2 untersucht werden. 6-AN ist ein G6PD-spezifischer Inhibitor²⁴⁶. Ornidazol hingegen ist ein spezifischer Inhibitor der Triosephosphatisomerase (TPI), einem Enzym aus der Vorbereitungsphase der Glykolyse, und der GAPDH, einem Enzym aus der Ertragsphase der Glykolyse²⁴⁷.

3.6.2.1 Einfluss der Inhibition der Glykolyse und des PPP auf die Proliferation

Zur Analyse des Effektes der Inhibitoren auf die Proliferation wurden 2,5 x 10^4 (GS-11 und GS-12) bzw. 5 x 10^2 (G55T2) Zellen in 96-Well-Platten ausgesät, mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt und die Proliferation durch manuelles Auszählen nach sieben Tagen (GS-11 und GS-12) bzw. durch Kristallviolett-Färbung nach vier Tagen (G55T2) bestimmt.

In allen Zelllinien konnte für die Inhibition des PPP mittels 6-AN eine konzentrationsabhängige Abnahme der proliferativen Aktivität in den untersuchten Zelllinien beobachtet werden (Abbildung 50). Dabei zeigte sich, dass für die GS-11 bereits eine Konzentration von 5 µM 6-AN ausreichend war, um die Zellzahl nach 7 Tagen signifikant um 45% gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu senken (Abbildung 50A).

Für die G55T2 konnte dagegen erst bei einer Konzentration von 10 µM 6-AN eine signifikante Reduktion der Proliferation um 22,6% detektiert werden (Abbildung 50B).



Abbildung 50: Effekt der Inhibition des PPP mittels 6-AN auf die Proliferation der Zelllinien GS-11 (A) und G55T2 (B). Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Sechsfach- Bestimmungen. * Signifikanzniveau p \leq 0,05

In einem Parallelversuch mit einer weiteren Glioblastomstammzelllinie (GS-12) konnte das Ergebnis der GS-11 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), sodass sich generell ableiten lässt, dass Glioblastomstammzelllinien offensichtlich empfindlicher auf eine Inhibition des PPP reagieren und bereits bei geringeren Konzentrationen eine deutliche Reduktion der Proliferation aufweisen als eine konventionelle Gliomzelllinie ohne Stammzelleigenschaften. Auch unter Einsatz von Ornidazol konnte in den untersuchten Zelllinien eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation detektiert werden (Abbildung 51). Dabei zeigte sich, dass für die GS-11 bereits eine Konzentration von 5 µM Ornidazol ausreichend war, um die Zellzahl signifikant um 25% zu senken (Abbildung 51A).



Abbildung 51: Der Effekt der Inhibition der Glykolyse mittels Ornidazol auf die Proliferation der Zelllinien GS-11 (A) und G55T2 (B). Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Sechsfach-Bestimmungen. * Signifikanzniveau p \leq 0,05

Demgegenüber war für die G55T2 wiederum erst bei einer höheren Ornidazolkonzentration von 100 µM erstmals die Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant reduziert (ca. 37%) (Abbildung 51B).

Da sich auch hier für eine weitere Glioblastomstammzelllinie (GS-12) das Ergebnis der GS-11 bestätigen ließ (Daten nicht gezeigt), konnte geschlossen werden, dass Glioblastomstammzelllinien auch auf eine Inhibition der Glykolyse bereits bei geringeren Konzentrationen mit einer Reduktion der Proliferation reagieren als konventionelle Glioblastomzelllinien.

Diese Ergebnisse belegen, dass ebenso wie durch die spezifische shRNA-vermittelte Herunterregulation von G6PD, auch durch die Inhibition des PPP mittels 6-AN eine Verringerung der proliferativen Aktivität erzielt werden kann. Im Gegensatz zur Modulation der Glykolyse durch ALDOC-spezifische shRNA, die keinen negativen Effekt auf die Proliferation von GS-11-Zellen hatte, sondern vielmehr proliferationsstimulierend wirkte, konnte für die Inhibition der Glykolyse durch Ornidazol eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferation detektiert werden.

3.6.2.2 Einfluss der Inhibition der Glykolyse und des PPP auf die Migration

Eine Herunterregulation von ALDOC durch spezifische shRNAs resultierte in einer signifikant geringeren Migration sowohl von GS-11- als auch von G55T2-Zellen (Kapitel 3.6.1.3). Im Gegensatz dazu führte ein G6PD-Knockdown in der GS-11 tendenziell zu einer Erhöhung der migratorischen Fähigkeit. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich dieser Effekt auch durch Inhibition der beiden Stoffwechselwege reproduzieren lässt.

Im Einklang mit der migrationssteigernden Wirkung der Herunterregulation von G6PD zeigte sich auch bei der Verwendung des PPP-Inhibitors 6-AN in den untersuchten Zelllinien eine

starke Modulationen der Migration. In den beiden Glioblastomstammzelllinien GS-11 und GS-12 (Daten nicht gezeigt) kam es in einem 6-AN-Konzentrationsspektrum von 1 μ M bis 10 μ M zu einer signifikant erhöhten Zahl an migrierten Zellen (Abbildung 52A).



Abbildung 52: Der Effekt der Inhibition des PPP mittels 6-AN auf die Zellmigration in den Zelllinien GS-11 (A) und G55T2 (B) wurde mittels modifizierten Boyden Kammer Assays untersucht. Nach jeweils 24-stündiger (GS-11) bzw. 48-stündiger (G55T2) Inkubation unter den angegebenen Bedingungen wurde die Anzahl an migrierten Zellen in 10 hpf unter Verwendung eines 40x Objektivs bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Sechsfach-Bestimmungen. * Signifikanzniveau p $\leq 0,05$

In der GS-11 führte die Inkubation mit 2 μ M 6-AN beispielsweise zu einer Erhöhung an migrierten Zellen um 46% gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Eine Konzentration von 50 μ M bis 100 μ M führte hingegen zu einer Reduktion der migratorischen Fähigkeit der Zellen. So lag die Anzahl migrierter Zellen bei einer 6-AN-Konzentration von 50 μ M nur noch bei 50% gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Die konzentrationsabhängige Induktion der Migration bei geringen Konzentrationen und Reduktion der Migration bei hohen Konzentrationen konnte auch in der G55T2 Zelllinie verzeichnet werden, wobei es erst ab einer 6-AN-Konzentration von 5 μ M zu einer signifikanten Zunahme an migrierten Zellen um ca. 80% gegenüber der unbehandelten Kontrolle kam (Abbildung 52B). Allerdings zeigte sich auch hier eine deutliche Reduktion der Migrationsfähigkeit bei höheren 6-AN-Konzentrationen (um 43% bei 50 μ M 6-AN).

Die Behandlung der Zelllinien mit dem Glykolyseinhibitor Ornidazol zeigte in dem verwendeten Konzentrationspektrum nur bei sehr hohen Konzentrationen Effekte auf die Migration. So konnte in der Glioblastomstammzelllinie GS-11 erst bei sehr hohen Konzentrationen von 5 mM bis 10 mM ein signifikanter Effekt auf die Migration nachgewiesen werden (Abbildung 53A). Hier kam es bei einer Inkubation der Zellen mit 5 mM Ornidazol zu einer Reduktion der Anzahl migrierter Zellen um 22% und bei einer Konzentration von 10 mM sogar zu einer signifikanten Reduktion um ca. 75% gegenüber der unbehandelten Kontrolle.



Abbildung 53: Der Effekt der Inhibition der Glykolyse mittels Ornidazol auf die Zellmigration in den Zellinien GS-11 (A) und G55T2 (B) wurde mittels modifizierten Boyden Kammer Assays untersucht. Nach jeweils 24-stündiger (GS-11) bzw. 48-stündiger (G55T2) Inkubation unter den angegebenen Bedingungen wurde die Anzahl an migrierten Zellen in 10 "high power fields" (hpf) unter Verwendung eines 40x Objektivs bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen von Sechsfach-Bestimmungen. * Signifikanzniveau p \leq 0,05

In der G55T2-Zelllinie konnte ebenfalls erst ab einer Konzentration von 5 mM eine signifikante Reduktion der Anzahl an migrierten Zellen um 71,7%, und bei 10 mM sogar um 97% detektiert werden (Abbildung 53B). Da dieser starke Effekt in den Zelllinien erst bei sehr hohen Konzentrationen auftrat, war dieser möglicherweise mit der Zytotoxizität von Ornidazol zu erklären²⁴⁸. So wurde bereits gezeigt, dass Ornidazol *in vitro* zytotoxische Eigenschaften beispielsweise auf humane Lymphozyten hat²⁴⁹.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibition des PPP durch 6-AN, analog zur Herunterregulation **PPP-Aktivität** die shRNA-vermittelte der durch spezifische Herunterregulation von G6PD, konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der Migrationsfähigkeit in den Glioblastomstammzelllinien GS-11 und GS-12 führte. Dieser Effekt einer konzentrationsabhängigen gesteigerten Migration durch 6-AN konnte auch in der konventionellen Gliomzelllinie G55T2 gezeigt werden, die nach der Herunterregulation von G6PD mittels shRNA tendenziell allerdings eher eine leichte Abnahme der Migration aufwies. Im Gegensatz zu der Herunterregulation der Glykolyse mittels ALDOC-spezifischen shRNA konnte durch die Verwendung des Glykolyseinhibitors Ornidazol allerdings erst bei sehr hohen Konzentrationen eine Reduktion der Migrationsfähigkeit der Zelllinien beobachtet werden.
4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf der Basis des Adaptationsmodell der Tumorstammzellhypothese zu untersuchen, inwieweit der Stammzellphänotyp von Glioblastomstammzellen durch Variation der Sauerstoffbedingungen modulierbar ist und wie sich diese Modulation auf die Genexpressionsprofile der GS-Zelllinien auswirkt. Die aus den bioinformatischen Analysen der Genexpressionsdaten gewonnenen Hinweise auf eine reziproke Regulation der Glykolyse und des PPP durch akute Veränderungen der Sauerstoffbedingungen führten zu einer Fokussierung der Zielsetzung der Arbeit auf die Validierung und Verifizierung dieses sauerstoffkonzentrationsabhängigen metabolischen Switches.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes auf dem Gebiet der Glioblastomstammzellbiologie und des Tumorzellmetabolismus diskutiert.

4.1 Charakterisierung normoxischer und hypoxischer Glioblastomstammzelllinien

Aus zahlreichen Publikationen unterschiedlicher Arbeitsgruppen haben sich Kriterien herauskristallisiert, die Glioblastomstammzellen definieren. Dazu gehören die *in vivo* Tumorigenität, die Fähigkeit zur glialen und neuronalen Differenzierung, das Potential zur Selbsterneuerung sowie die Expression von Stammzellmarkern¹⁴⁵. Zudem ist das *in vitro* Wachstum als Neurosphäre charakteristisch. In der vorliegenden Arbeit wurden die etablierten normoxischen und hypoxischen Langzeitkulturen (GS^N- und GS^H-Zelllinien) bezüglich dieser Kriterien überprüft.

4.1.1 Morphologie

Morphologisch zeigten die untersuchten Linien ein heterogenes Bild. Die normoxischen und hypoxischen Linienpaare GS-10^N und GS-10^H, GS-12^N und GS-12^H, sowie GS-13^N und GS-13^H wuchsen als Neurosphären, wohingegen die Linien GS-11^N und GS-11^H ein semiadhärentes Wachstum aufwiesen.

In den ersten Veröffentlichungen zu Glioblastomstammzellen wurde ausschließlich von einem sphärischen Wachstum berichtet, was dem Wachstumsmuster von neuralen Stammzellen entsprach^{94,118,120,121,127,250,251}. Erst in späteren Arbeiten wurde die Assoziation der Wachstumsmorphologie mit dem Vorhandensein von CD133-positiven Zellen sowie mit einer erhöhten Tumorigenität und einem gesteigerten Potential zur multilinearen Differenzierbarkeit beschrieben^{125,252}. So zeigten Günther et al. beispielsweise, dass alle

sphärisch wachsenden Zelllinien eine signifikante CD133-positive Subpopulation enthielten, wohingegen semi-adhärent wachsenden Linien diese Population fehlte¹²⁵. Da in allen untersuchten Linien der vorliegenden Arbeit CD133-positive Zellen detektiert werden konnten, ist das Fehlen einer CD133-positiven Subpopulation als Begründung für das semi-adhärente Wachstums der GS-11-Zelllinien auszuschließen. Allerdings sind die GS-11-Zelllinien als einzige aus einem Glioblastomrezidiv, nach zweimaliger Operation und strahlen- und chemotherapeutischer Behandlung, etabliert worden. Durch Strahlen- und Chemotherapie erworbene genetische Veränderungen könnten somit das veränderte Wachstumsverhalten dieser Linie erklären.

4.1.2 Expression von Stammzellmarkern

Zur Charakterisierung der GS-Zelllinien wurde die Expression des embryonalen Stammzellmarkers SOX-2^{253,254}, des Intermediärfilaments und Markers für neurale Stammzellen, Nestin^{254,255}, sowie des Markers für neurale und Glioblastomstammzellen, CD133²⁵⁴, unter normoxischen und unter hypoxischen Bedingungen untersucht. In den durchflusszytometrischen Analysen konnte für alle Zelllinien die Expression der drei beschriebenen Stammzellmarker nachgewiesen werden, wobei die Expression in den hypoxischen Linien signifikant höher war als in den normoxischen GS-Linien.

Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien, die zeigten, dass Hypoxie die Expression von Stammzellmarkern erhöht^{152–154,161}. So konnten McCord et al. in Western Blot Analysen zeigen, dass Hypoxie die Expression von SOX-2 und Nestin, aber auch von CD133 in CD133-positiven Tumorstammzellen aus humanen Glioblastomen steigerte¹⁵⁴. Des Weiteren stellten Bar et al. fest, dass Hypoxie den Anteil an CD133-exprimierenden Zellen in etablierten Glioblastomneurosphärenzelllinien um das 2-fache erhöhte¹⁶¹.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der in früheren Studien postulierte hypoxievermittelte Anstieg der Stammzellmarkerexpression in Glioblastomstammzellinien bestätigt werden konnte.

4.1.3 Wachstumsverhalten in vivo

Die Tumorinitiierungsfähigkeit sowie das Wachstumsverhalten der GS-Zelllinien *in vivo* wurde mittels Xenotransplantation in das Hirn von Nacktmäusen untersucht. In dieser systematischen Vergleichsstudie des *in vivo* Wachstums von chronisch normoxischen gegenüber chronisch hypoxischen GS-Zelllinien konnte weltweit erstmals gezeigt werden, dass hypoxische Linien *in vivo* ein schnelleres Wachstum aufwiesen als die parallelen normoxischen Linien. In dem Zelllinienpaar der GS-13 konnte sogar ausschließlich für die hypoxische Linie ein signifikantes Tumorwachstum bis zur Beendigung des Versuchs

detektiert werden, was auf eine höhere Tumorinitiierungsfähigkeit der hypoxischen Linien hindeutete.

Schlussfolgernd lässt sich aus diesem Teil der Arbeit ableiten, dass hypoxische GS-Linien, die über eine erhöhte Anzahl an CD133-positive Zellen gegenüber normoxischen Zelllinien verfügen, ein schnelleres *in vivo* Wachstum aufweisen. Dieses Erkenntnis geht über Ergebnisse früherer Studien hinaus, die lediglich in *in vitro* Assays eine erhöhte Proliferations- und Klonogenitätsrate von Glioblastomstammzelllinien unter hypoxischen Bedingungen nachweisen konnten^{154,160–162,165}.

4.1.4 Wachstumsverhalten in vitro

Zur Ermittlung der Proliferationsrate der chronisch normoxischen und hypoxischen GS-Zellen wurde der EdU-Zellproliferationsassay verwendet. Es zeigte sich, dass die chronisch normoxischen Linien schneller proliferierten als die parallelen chronisch hypoxischen GS-Linien. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu Ergebnissen beispielsweise von McCord et al. und Grayson et al., die zeigten, dass Hypoxie eine Steigerung der Zellteilung zur Folge hat^{154,165}. Allerdings ist ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Studien nur eingeschränkt möglich, da es sich bei den untersuchten Zellen in den Studien von Grayson et al. um humane mesenchymale Stammzellen handelte, die akut für 7 Tage unter 2% O₂ statt 1% O₂ inkubiert wurden und somit nicht dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Glioblastomstammzellmodell unter chronischer Kultivierung bei 1% O₂ entsprechen¹⁶⁵. Die Ergebnisse bezüglich der Proliferation von McCord et al. beruhen wiederum auf einer Kultivierung der Zellen bei 7% O₂ und auf der Verwendung einer gesorteten CD133-positiven Subpopulation¹⁵⁴, die möglicherweise aufgrund der Herausselektion bzw. Anreicherung von Glioblastomzellen mit Stammzelleigenschaften, wie einer erhöhten Klonogenität und einer erhöhten metabolischen Adaptationsfähigkeit an ungünstige Kulturbedingungen, per se einen Wachstumsvorteil unter hypoxischen Bedingungen hatte, wohingegen in der vorliegenden Arbeit GS-Zellkulturen verwendet wurde, die Mischkulturen aus CD133positiven und CD133-negativen Zellen darstellten.

Unterstützt wird die Beobachtung einer verringerten Proliferationsrate chronisch hypoxischer GS-Zelllinien aus dieser Arbeit durch eine Studie von Eliasson et al., in der gezeigt wurde, dass die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) gegenüber einer Kultivierung unter normoxischen Bedingungen bereits nach 4 Tagen signifikant verringert war²⁵⁶.

4.1.5 Klonogenität

Die Klonogenität, das heißt die Fähigkeit einer Stammzelle sich selbst zu erneuern, wird oft als *in vitro* Korrelat für die Tumorinitiierung verwendet. So wird hier das Potenzial einer Zelle

in vitro eine Neurosphären zu bilden als Fähigkeit angesehen, dass diese Zelle in der Lage ist, einen Tumor in vivo zu initiieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Klonogenität anhand der Koloniebildungseffizienz in vitro überprüft. Für alle untersuchten Zelllinien konnte eine Klonogenitätsfrequenz zwischen 9,36% und 17,69% ermittelt werden. Dabei zeigte sich allerdings, im Gegensatz zu früheren Studien^{154,160–162} in denen beispielsweise Bar et al. und Heddleston et al. einen Anstieg der Klonogenität unter Hypoxie feststellen konnten, kein konsistenter Unterschied zwischen der klonogenen Kapazität hypoxischer und normoxischer GS-Linien. Die in diesen Studien genannte Annahme, dass der hypoxieinduzierte prozentuale Anstieg der CD133-, SOX-2- und Nestin-positiven Zellen innerhalb der Gesamtpopulation und das beobachtete erhöhte Wachstum hypoxischer GS-Zelllinien in vivo mit einer erhöhten Klonogenität der Zellen assoziiert sind¹⁶¹, konnte somit nicht bestätigt werden. Allerdings wurde in der Studie von Bar et al. die Klonogenität von Glioblastomneurosphärenlinien nach einer 24-stündigen Inkubation unter 1% O2 und anschließender Kultivierung unter normoxischen Bedingungen für 10 Tage durchgeführt. Daher wurde nicht der Effekt von chronischer Hypoxie, sondern vielmehr der Effekt von transienter akuter Hypoxie auf die Klonogenität von Glioblastomneurosphären untersucht. Zudem beruhen die Ergebnis einer erhöhten Klonogenität unter Hypoxie von Heddleston et al. auf der Verwendung einer gesorteten CD133-positiven GS-Zellsubpopulation, wohingegen die verwendeten Linien in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenermaßen Mischkulturen aus CD133-positiven und CD133-negativen GS-Zellen sind. Aufgrund dieser Tatsachen ist ein Vergleich der ermittelten Klonogenität der normoxischen und hypoxischen

Demgegenüber stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Einklang mit früheren Studien von Günther et al., in denen keine Korrelation zwischen Klonogenität *in vitro* und Tumorinitiierung *in vivo* in Glioblastomstammzelllinien nachgewiesen werden konnte¹²⁵. Eine Studie von Barrett et al. zeigte in einem transgenen Mausmodell zudem, dass die Fähigkeit zur Selbsterneuerung einer Gliomzelle kein Indiz für ein hohes tumorigenes Potenzial ist²⁵⁷. Demnach stellen das Fehlen einer erhöhten Klonogenität von hypoxischen GS-Zellen und das erhöhte Wachstums *in vivo* in dieser Arbeit keine sich ausschließenden Erkenntnisse dar.

Linien mit den Ergebnissen der genannten Studien nur eingeschränkt möglich.

4.1.6 Differenzierbarkeit

Die Differenzierbarkeit, das heißt die Fähigkeit einer Stammzelle, differenziertere, reifere Zellen zu bilden, ist ein weiteres Kriterium von Stammzellen und wurde in der vorliegenden Arbeit durch Differenzierungsinduktion mittels FCS, cAMP und Retinsäure *in vitro* untersucht. Für alle GS-Zelllinien konnte eine Differenzierbarkeit in neuronale und gliale Richtung nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine konsistent stärkere Differenzierbarkeit der

normoxischen Linien in neuronale und oligodendrogliale Richtung, die durchflusszytometrisch anhand des Anteils an NF-positiven Zellen bzw. des Anteils an GalC-positiven Zellen ermittelt wurde. Allerdings ergaben sich keine konsistenten Ergebnisse bezüglich einer verstärkten oder verringerten astrozytären Differenzierung (GFAP-positive Zellen) unter Hypoxie innerhalb der untersuchten hypoxischen und normoxischen Zelllinienpaare, was die Heterogenität zwischen Glioblastomen widerspiegelt.

Das Ergebnis, dass Normoxie die oligodendrogliale und neuronale Differenzierung gegenüber Hypoxie begünstigt und Hypoxie gegenüber Normoxie somit tendenziell den undifferenzierten Zustand der GS-Zellen erhält, steht im Einklang mit einer Studie von Soeda et al., in der mittels Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte, dass nach Serumstimulation (Differenzierungsinduktion) unter Normoxie ein höherer Anteil an CD133-positiven Glioblastomstammzellen den neuronalen Differenzierungsmarker Tuj1 exprimierte, als unter Hypoxie¹⁶⁰.

Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse der Charakterisierung der normoxischen und hypoxischen GS-Zelllinien zum einen frühere Studien zu Glioblastomstammzelllinien, zum anderen gehen sie über diese hinaus. So führte Hypoxie nicht nur zu einer Anreicherung stammzellmarkerexprimierender Zellen sondern auch, wie in dieser Arbeit erstmalig gezeigt, zu einem erhöhten Tumorwachstum *in vivo*. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass chronische Hypoxie die *in vitro* Proliferation verringert, wohingegen kein Einfluss auf die Klonogenität von GS-Zelllinien festgestellt werden konnte.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass Hypoxie offensichtlich eine Population von langsam proliferierenden, zur Tumorinitiierung befähigten Zellen aufrechterhält bzw. anreichert und/oder Hypoxie diese Zellen gegenüber wachstumsstimulierenden, mitogenen Signalen aus der Mikroumgebung *in vivo* sensibilisiert, ohne die intrinsischen Proliferationsmechanismen per se zu aktivieren.

4.2 Genexpressionsanalysen

Um den Einfluss von chronischer und akuter Hypoxie auf die Genexpression in Glioblastomstammzellen zu analysieren, wurden Genexpressionsanalysen mittels Mikroarrays durchgeführt. Aus den Genexpressionsprofilen und Signalweganalysen ging hervor, dass sich die zellulären Antworten auf akute und chronische Hypoxie grundlegend unterscheiden. So zeigte sich, dass lediglich 9 Gene sowohl durch akute als auch durch chronische Hypoxie um mehr als das 2,5-fache induziert waren.

Gene bzw. Transkripte, die unter chronischer Hypoxie hochreguliert wurden, waren vor allem in den GO Terms "Neurale Entwicklung" und "Migration" annotiert. Bereits in präklinischen und klinischen Studien konnte eine Assoziation zwischen chronischer Hypoxie und Zellmigration beobachtet werden. Diese Studien zeigten, dass anti-angiogenetische Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab) oder den Rezeptor VEGFR-2 (DC101) zwar einerseits die VEGF-vermittelte Induktion von Tumorangiogenese verhinderten und das Tumorwachstum inhibierten, es dabei jedoch andererseits infolge der verstärkten intratumoralen Hypoxie zu einer vermehrten Invasion der Tumorzellen kam^{258–261}. Darüber hinaus zeigte eine aktuelle Studie, dass Glioblastome nach anti-angiogenetischer (hypoxieinduzierender) Therapie mit Bevacizumab dazu tendierten. Gene zu überexprimieren, die mit der neuralen Entwicklung assoziiert sind (proneuraler Expressionsphänotyp)²⁶². Dies ist im Einklang mit der Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass chronische Hypoxie zu einer Überrepräsentation von Genen führte, die im GO Term "Neurale Einwicklung" annotiert sind.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass chronische Tumorhypoxie, die durch anti-angiogenetische Therapie verstärkt werden kann, in Glioblastomen pro-neurale und pro-invasive Genexpressionsprogramme aktiviert.

Akute Hypoxie führte im Gegensatz zu chronischer Hypoxie zu einer Induktion von Genen, die mit der RNA-Prozessierung/Splicing und dem Glucosemetabolismus assoziiert sind. Interessanterweise besteht in der Tat eine Verbindung zwischen alternativem Splicing und der metabolischen Regulation. So ist bekannt, dass von dem Glykolyseenzym Pyruvatkinase zwei alternative Splicevarianten existieren, PKM1 ist überwiegend in adulten Zellen exprimiert, wohingegen PKM2 in embryonalen Zellen und Krebszellenexprimiert ist¹⁸⁶. Aus einer Studie von Christofk et al. an verschiedenen humanen Karzinomzelllinien (z.B. Bronchalkarzinom) geht zudem hervor, dass die Expression der PKM2-Isoform, gegenüber der Expression der PKM1-Isoform, mit einer höheren Laktatproduktion bei gleichzeitig verringertem Sauerstoffverbrauch, den beiden typischen Merkmalen des Warburg-Effekts²⁶³, assoziiert ist. Dies deutet darauf hin, dass PKM2 den Warburg-Effekt, d.h. eine Verstoffwechselung von Glucose zu Laktat unter aeroben Bedingungen unterstützt und so zu einer Verschiebung des Glucosestoffwechsels beiträgt²⁶⁴.

Das bedeutsamste Array-Ergebnis im Hinblick auf die Stoffwechselregulation durch Hypoxie ist, dass akute Hypoxie zu einer Herunterregulation der Expression von PPP-Enzymen, besonders von G6PD und PGD, führte, wohingegen es unter akuter Oxygenierung zu einer Induktion der Expression dieser Enzyme kam. Enzyme der Glykolyse, die zum größten Teil ein Hypoxie-responsives Element in ihren Promotoren besitzen und somit direkte HIF-1-Zielgene sind, sowie die Laktatdehydrogenase zeigten dagegen das exakt umgekehrte Induktions- und Suppressionsverhalten. Dabei wiesen die Enzyme der Vorbereitungsphase der Glykolyse (HK2, GPI, PFKP und ALDOC) die stärkste Regulation auf. Dies deutet darauf hin, dass der PPP, welcher alternativ zu der Vorbereitungsphase der Glykolyse von der Glucose durchlaufen werden kann und so eine Art Umgehungsreaktion der enzymatischen Schritte der Vorbereitungsphase darstellt, offensichtlich unter normoxischen Bedingungen eine relative Dominanz über die parallelen Schritte der Glykolyse hat, aber unter akuter Hypoxie zugunsten der direkten Glucoseverstoffwechselung über die Glykolyse herunterreguliert wird (Abbildung 54).



Abbildung 54: Schematische Darstellung der sauerstoffabhängigen Regulation der Glykolyse und des PPP in GS-Zellen. Schwarze Pfeile repräsentieren Reaktionen der Glykolyse. Graue Pfeile repräsentieren pyruvatkonsumierende Reaktionen. Grüne Pfeile repräsentieren Reaktionen des nicht-oxidativen Teils des PPP, gestrichelte grüne Pfeile repräsentieren Reaktionen des nicht-oxidativen Teils des PPP. Enzyme, die irreversible Reaktionen katalysieren sind in fetter Schrift gedruckt. Abkürzungen: HK, Hexokinase; GPI, Glucosephosphatisomerase; PFK, Phosphofruktokinase; ALDO, Aldolase; TPI, Triosephosphatisomerase; GAPDH, Glycerinaldehyde-3-phosphatdehydrogenase; PGK, Phosphoglyceratkinase; PGM, Phosphoglyceratmutase; PK, Pyruvatkinase; LDH, Lactat-dehydrogenase; PDH, Pyruvatdehydrogenase; G6PD, Glucose-6-phosphatdehydrogenase; PGL, Phosphogluconolaktonase; PGD1, Phosphogluconatdehydrogenase 1; RPE, Ribulose-5-phosphat-epimerase; RPI, Ribulose-5-phosphat-isomerase; TKT, Transketolase; TAL, Transaldolase; NADPH, Nicotinamidadenindinucleotidphosphat.

In anderen Studien, die Genexpressionsprofile unter akuter Hypoxie untersuchten, konnte sowohl für humane Adipozyten²⁶⁵ als auch für humane Brustkrebszelllinien²⁶⁶ und murine cerebrale corticale Neurone²⁶⁷ ebenfalls eine Anreicherung von Genen verzeichnet werden, die in dem GO Terms "Glykolyse" annotiert sind. Diese Resultate stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Allerdings konnte bislang in keiner Studie gezeigt werden, dass akute Hypoxie zu einer Herunterregulation und akute Oxygenierung zu einer Induktion der Expression von PPP-Enzym-kodierenden Genen führte, der somit reziprok

gegenüber der Glykolyse durch die Sauerstoffkonzentration reguliert wird (Abbildung 54). Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass die KEGG-Analyse bei nur oberflächlicher Betrachtung ein inkorrektes Ergebnis bezüglich einer Herunterregulation des PPP durch Oxygenierung liefert (Kapitel 3.2). Somit stellten diese Ergebnisse neue Erkenntnisse dar, die in der Literatur noch nicht beschrieben wurden.

4.3 Validierung der Genexpressionsdaten aus den Mikroarray-Analysen

Zur Validierung der auf Basis der Mikroarray-Daten beobachteten reziproken Regulation des PPP und der Glykolyse wurden qPCR und Western Blot Analysen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die sauerstoffkonzentrationsabhängige Verschiebung des Glucosestoffwechsels in Richtung Glykolyse und Laktatproduktion unter akuter Hypoxie bzw. in Richtung PPP durch akute Oxygenierung sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bestätigt werden konnte.

Wie bereits erwähnt, wurde die sauerstoffkonzentrationsabhängige Regulation des PPP in Tumorzellen bislang in keiner anderen Studie untersucht. Zudem liegen auch nur sehr wenige Studien zur Regulation des PPP unter Hypoxie in anderen Zelltypen vor²⁶⁸. Aus dieser überschaubaren Sammlung von Studien ergibt sich ein kontroverses Bild bezüglich der Regulation des PPP unter Hypoxie. So wird auf der einen Seite postuliert, dass die PPP-Aktivität durch Hypoxie aktiviert wird²⁶⁸⁻²⁷⁰. Begründet wird diese Hypothese mit der Tatsache, dass der PPP unter anderem NADPH für die Glutathion-Regeneration produziert²⁷¹ und dadurch Zellen vor oxidativem Stress in Form von reaktiven Sauerstoffradikalen ("reactive oxygen species", ROS) schützt, die in Folge von Entzündungsreaktionen, Ischämie aber auch Hypoxie gebildet werden^{272,273}. Beispielsweise zeigten Amaral et al., dass der Glucosefluss über den PPP in Astrozyten nach kombiniertem Sauerstoff- und Glucosemangel (als Modell für zerebrale Ischämie) erhöht war²⁶⁹. Bei dieser Studie ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Messungen des Glucoseflusses in den Astrozyten nicht in der akuten hypoxischen Phase durchgeführt wurden, sondern vielmehr in der frühen Phase der Wiederherstellung der normoxischen Bedingungen nach der akuten Hypoxie, wohingegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf einer direkten Messung während akuter Hypoxie beruhen. Auf der anderen Seite gibt es Studien, die gegen diese Hypothese eines erhöhten Glucoseflusses über den PPP zur Bereitstellung von NADPH für die Glutathionsynthese unter Hypoxie sprechen. So konnten beispielsweise Kim et al. zeigen, dass die hypoxieinduzierte Expression von Pyruvatdehydrogenasekinase 1 (PDK1) eine vermehrte Bildung von ROS unter Hypoxie verhindert. In ihrer Studie führte die Überexpression der PDK1 in HIF-1a-Knockout Mausembryofibroblasten zu einer Herunterregulation des Citratzyklus und der oxidative Phosphorylierung. Infolge dieser

Herunterregulation des mitochondrialen Stoffwechsels konnte in diesen Zellen eine signifikant reduzierte Bildung von mitochondrialem ROS unter Hypoxie nachgewiesen werden¹⁹⁴. Demnach wäre ein erhöhter Glucoseflusses über den NADPH-produzierenden PPP zur Glutathion-Regeneration, welche der Detoxifizierung von ROS dient, unter Hypoxie nicht erforderlich und würde keinen Vorteil für die Zelle bieten.

Aber auch in vivo Studien bezüglich des Glucoseflusses unter Hypoxie lieferten kontroverse Ergebnisse. Während in einer Studie von Hakin et al. eine erhöhte Glucoseverstoffwechselung über den PPP in den Hirnen hypoxischer Ratten festgestellt wurde²⁷⁴, zeigten Domanska-Janik et al. eine verringerte PPP-Aktivität unter Hypoxie in Rattenhirnen²⁷⁵. Aus dieser Beobachtung leiteten Domanska-Janik et al. ab, dass der Glucosemetabolismus unter Hypoxie auf Kosten des PPP in Richtung energieproduzierender Stoffwechselwege (Glykolyse) neu ausgerichtet wird, wobei diese Neuausrichtung nicht direkt durch eine ATP-Defizienz ausgelöst wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass akute Hypoxie in GS-Zelllinien zu einer Herunterregulation der Expression von PPP-Enzymen und parallel zu einer HIF-1-vermittelten Induktion der Expression von Glykolyseenzymen führt, wohingegen akute Oxygenierung in dem genau umgekehrten Expressionsmuster resultiert (Abbildung 54).

4.4 Untersuchungen des metabolischen Flusses unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Zur Überprüfung der Frage, ob die sauerstoffkonzentrationsabhängige, reziproke Regulation der Expression von Glykolyse- und PPP-Enzymen mit Aktivitätsveränderungen der beiden Stoffwechselwege assoziiert war, wurde der metabolische Fluss von Glucose in GS-Zellen mittels [1,2-¹³C]-D-Glucose als einziger Glucosequelle unter Normoxie und akuter Hypoxie analysiert. Diese Untersuchung ergab, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten (8 bis 48 h) die Konzentration von Gesamtlaktat unter Hypoxie gegenüber Normoxie signifikant erhöht war. Dieses Ergebnis steht beispielsweise im Einklang mit einer Studie von Serganova et al., die zeigen konnten, dass bei dem Vergleich zweier muriner Brustkrebszelllinien (67NR und 4T1) im *in vivo* Xenograft-Modell die detektierte erhöhten Laktatproduktion sowohl *in vivo*, als auch der isogenen Zelllinie *in vitro* assoziiert war²⁷⁶. Auch für Gliome konnte nachgewiesen werden, dass die hypoxievermittelte Stabilisierung von HIF-1 die metabolische Verschiebung von der oxidativen Phosphorylierung zur Glykolyse verstärkt, was in erhöhter Laktatproduktion resultiert²⁷⁷ (Abbildung 54).

Zudem zeigte die Analyse der Laktatisotopologverteilung, dass unter Hypoxie die relative PPP-Aktivität gegenüber der Glykolyseaktivität in den GS-Zellen um über 50% abnimmt. Das deutet darauf hin, dass die metabolische Verschiebung, die bereits auf RNA- und Proteinebene identifiziert werden konnte, mit einer analogen Verschiebung der Metabolitenkonzentrationen bzw. der Stoffwechselaktivität einhergeht. Der berechnete Gesamtfluss über den PPP in GS-Zellen lag bei 1,3 bis 2,0% des gesamten Glucoseflusses. Diese Werte liegen im Bereich früherer veröffentlichter Werte des Glucoseflusses im normalen Gehirn unter der Verwendung anderer Methoden (0.5% bis 5%)²⁷⁸. In C6 und 9L Gliomzellen aus Ratten wurde allerdings ein relativer Glucosefluss über den PPP von 5,1 bis 7,5% beschrieben^{278,279}. Diese erhöhten Werte könnten darauf zurückzuführen sein, dass die verwendeten Rattenzellen adhärent wuchsen und aufgrund von Serumstimulation schnell proliferierten, wohingegen die GS-Zellen in serumfreiem Medium wuchsen, folglich nur einem gering proliferationsstimulierenden Milieu ausgesetzt waren und daher eine geringere proliferative Aktivität aufwiesen. Angesichts dessen, dass der PPP wichtige Funktionen für den zellulären Anabolismus hat und Metabolite für die Biomasseproduktion bereitstellt, kann man vermuten, dass der relativ niedrige Glucosefluss über den PPP in den GS-Zellen mit ihrer geringen Zellteilungsrate und somit ihrem geringeren Bedarf an Makromolekülen für die Biomasseproduktion zu begründen ist.

4.5 Expressionsanalysen in Glioblastomgewebe

Aus den bisherigen Erkenntnissen der *in vitro* Experimente ließ sich ableiten, dass in GS-Zellen der PPP und die Glykolyse sauerstoffkonzentrationsabhängig reziprok reguliert sind. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Glioblastomen um hypoxische Tumore handelt, stellte sich daher die Frage, ob Glioblastome ebenfalls eine starke Expression von Glykolyseenzymen aufweisen und wie sich demgegenüber die Expression von PPP-Enzymen verhält. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass die Sauerstoffkonzentration innerhalb der komplexen Glioblastomgewebsstruktur nicht einheitlich ist. So ist beschrieben, dass die Sauerstoffkonzentration von 0,1% in stark hypoxischen bis zu 10% in gut durchbluteten Bereichen schwanken kann, und im Median etwa 7% beträgt^{154,169}. Insofern sollte untersucht werden, wie die Expressionen von Glykolyse- und PPP-Enzymen innerhalb des Glioblastomgewebes verteilt ist.

Die *in silico* Analyse der Expression von Glykolyse und PPP-Enzymen in Glioblastomen gegenüber Normalhirnproben mittels der REMBRANDT Datenbank zeigte, dass die Expression von HK2 und den meisten Genen, die Enzyme der Ertragsphase der Glykolyse kodieren, ebenso wie von LDHA in Glioblastomen gegenüber Normalhirn hochreguliert war. Demgegenüber war die Expression von PDHA1 herunterreguliert. Diese Ergebnisse waren

erwartet, da die Expression von Glykolyseenzymen hypoxieinduziert ist und durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert wird. Zudem wurde bereits in früheren Studien in hypoxischen Tumoren eine Verschiebung der Pyruvatverstoffwechselung in Richtung Laktatproduktion beobachtet²⁷⁷. Somit bestätigten diese Ergebnisse Warburgs Beobachtung einer erhöhten Laktatsynthese in Tumoren (Kapitel 1.3). Überraschend war jedoch, dass die Expression von drei Enzymen der Vorbereitungsphase der Glykolyse, GPI, PFKP und ALDOC, in Glioblastomen gegenüber Normalhirn, trotz ihrer HIF-1-vermittelten Induzierbarkeit unter Hypoxie, herunterreguliert und stattdessen die Expression von Enzymen des parallel verlaufenden PPP hochreguliert war. Die Validierung dieser Beobachtung mittels eines Gliom TMAs zeigte, dass G6PD als (gemäß der Mikroarray-Analysen am stärksten regulierter) Repräsentant des PPP tatsächlich in Glioblastomen im Vergleich zu Normalhirn und niedriggradigen Astrozytomen die stärkste Expression aufwies, wohingegen ALDOC als (gemäß der Mikroarray-Analysen am stärksten hypoxieregulierter) Repräsentant der Glykolyse in Glioblastomen eine deutlich schwächere Expression gegenüber Normalhirn und niedriggradigen Astrozytomen zeigte. Dieses Ergebnis bestätigte die inverse Regulation von G6PD und ALDOC auf Proteinebene und führte zu der Hypothese, dass in der Hauptmasse von Glioblastomen, d.h. in relativ schnell proliferierenden Zellen, der PPP über die parallele Vorbereitungsphase der Glykolyse dominiert (Abbildung 55).

Zur Beantwortung der Frage nach der Sublokalisation der Enzymexpression innerhalb von Glioblastomgewebe wurden in der vorliegenden Arbeit immunhistologische Analysen an Glioblastomparaffinschnitten durchgeführt. In diesen Analysen zeigte sich eine starke Expression von Glykolyseenzymen aus der Vorbereitungsphase (ALDOC, HK2 und PFKP) in den hypoxischen, HIF-1α-positiven Pseudopalisaden, aber nur eine sehr schwache Expression in dem umliegenden Tumorgewebe. Im Gegensatz dazu fand sich eine starke Expression von PPP-Enzymen (G6PD und PGD) in dem umliegenden Tumorgewebe, aber nur eine schwache Immunreaktivität in den hypoxischen Pseudopalisaden.

In der Literatur ist beschrieben, dass in Glioblastomen gelegentlich extrem stark proliferierende Areale (Knoten) vorkommen, die wahrscheinlich einen Überwuchs eines hoch malignen Subklones darstellen²⁴¹. In der vorliegenden Arbeit konnte in solchen Arealen eine starke Überexpression von G6PD aber eine Herunterregulation von ALDOC gegenüber dem umliegenden Tumorgewebe detektiert werden.

Zusammenfassend bestätigten diese *in situ* Ergebnisse die Hypothese einer inversen Regulation der Glykolyse und des PPP durch Hypoxie und das Konzept, dass in den meisten Tumorzellen der Glucosemetabolismus zugunsten einer optimierten Biomasseproduktion für die schnelle Zellteilung über den anabolen PPP verläuft, es unter starkem hypoxischen Stress allerdings zu einer tendenziellen Verschiebung der Stoffwechselwege zur direkten Glykolyse kommt. In anderen Worten scheint die anabole PPP-Aktivität in wenig proliferativ aktiven, stark hypoxischen Bereichen zugunsten der anaeroben Glykolyse herunterreguliert, aber in Bereichen einer hohen proliferativen Aktivität und physiologischen Sauerstoffkonzentration hochreguliert zu sein (Abbildung 55).

4.6 Funktionelle Analysen der GS-Zelllinien

Um den funktionellen Einfluss des beobachteten sauerstoffkonzentrationsabhängigen Switches zwischen Glykolyse und PPP auf GS-Zellen zu untersuchen, wurden Migrationsund Proliferationsassays durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sowohl chronische als auch akute Hypoxie in GS-Zellen die Migration erhöhte, wohingegen chronische Normoxie und akute Oxygenierung zu einer gesteigerten Proliferation führten.

Mikroarray-Analysen anderer Gruppen deuten bereits darauf hin, dass akute Hypoxie in humanen Adipozyten die Expression migrationsassoziierter Gene induzierte²⁶⁵. Des Weiteren deutete sich in früheren Studien an, dass akute Hypoxie die Zellmotilität von Glioblastomzellen erhöht^{239,280}. Allerdings wurden dabei stets Zellen verwendet, die dauerhaft bei 21% O₂ kultiviert und anschließend akuter Hypoxie ausgesetzt wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gehen insofern hierüber hinaus, als dass hier erstmals gezeigt werden konnte, dass Hypoxie, unabhängig von der vorherigen Adaptation der Zellen an chronisch normoxische oder hypoxische Bedingungen generell zu einem Anstieg der Migration führt. Die erhöhte Migration unter hypoxischen Bedingungen unterstützt zudem die Hypothese, dass Pseudopalisaden eine "Welle" migrierender Zellen darstellen, die von einem zentralen hypoxischen (nekrotischen) Fokus fortwandern²⁸¹. Die erhöhte Motilität unter akuter und chronischer Hypoxie stellt vermutlich einen protektiven Prozess dar, der Zellen eine räumliche Entfernung von dem hypoxischen Areal ermöglicht und sie somit vor hypoxieinduzierten Zellschädigungen schützt.

Bezüglich der Proliferation zeigte sich das umgekehrte Bild mit einer reduzierten Proliferation sowohl unter akuter als auch unter chronischer Hypoxie und einer erhöhten Zellteilung unter normoxischen Bedingungen. Die chronische Präadaption an Hypoxie oder Normoxie verändert demnach nicht die Sensibilität von GS-Zellen für mitogene und motogene Stimulation.

Eine Gegensätzlichkeit zwischen Gliomzell-Proliferation und -Migration deutete sich bereits in früheren Studien an. So wurden in einer Studie von Giese et al. humane Astrozyten auf Kulturschalen ausgesät, die entweder mit Merosin (migrationsfördernde Beschichtung) oder mit Vitronectin (proliferationsfördernde Beschichtung) beschichtet waren^{282,283}. Dabei zeigte sich, dass Zellen, die auf Merosin-beschichteten Schalen wuchsen eine höhere Migration und eine geringere Proliferation auswiesen, wohingegen Zellen, die auf Vitronectin wuchsen,

schlechter migrierten und schneller proliferierten. Daraus schlossen Giese et al, dass migrationsstimulierende, motogene Substanzen einen anti-proliferativen Effekt aufweisen und Substanzen, die die Migration reduzieren zu einer Steigerung der Proliferation führen^{282,283}.

Die vorliegenden Arbeit erweitert dieses Konzept der Gegensätzlichkeit dahingehend, dass offenbar die hypoxieinduzierte Migration von GS-Zellen mit einem metabolischen Umschalten auf die direkte Glykolyse assoziiert ist, wohingegen eine normoxieinduzierte erhöhte Proliferation mit einer relativen Dominanz des PPP über die Glykolyse einhergeht (Abbildung 55).

Eine Verbindung zwischen einer erhöhten PPP-Aktivität und einer gesteigerten Proliferation lässt sich damit begründen, dass der PPP wichtige Metabolite (Ribose-5-Phosphat) für die Synthese von DNA und RNA und zudem NADPH als Reduktionsäquivalent für anabole Prozesse wie die Fettsäure- und Nukleotidsynthese liefert²⁸⁴. Der PPP stellt folglich Substrate für die Biomassesynthese bereit und ermöglicht somit die Zellteilung²⁸⁴.

Auch zwischen der Glykolyse und der Migration besteht ein direkter Zusammenhang. So ist zum einen bekannt, dass glykolytisches ATP die Hauptenergiequelle für die Remodellierung des Zytoskeletts ist²⁸⁵ und somit eine entscheidende Rolle für die Zellmigration spielt. Zum anderen ist beschrieben, dass freigesetztes, extrazelluläres ATP chemotaktische Wirkungen hat²⁴³. Außerdem ist das hypoxieinduzierte Glykolyseenzym GPI (auch bekannt als autokriner Motilitätsfaktor, AMF) mit einer erhöhten Tumorzellmigration, -invasion und Metastasierung assoziiert^{286,287}. Darüber hinaus bewirkt Laktat eine Azidifizierung der Zellumgebung¹⁸⁶, wodurch es infolge der pH-abhängige Aktivierung von Cathepsin und Metalloproteinasen zur Matrixdegradation kommt²³⁷, die die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen *in vivo* begünstigt^{288–290}. Die Glykolyse begünstigt demnach nicht nur durch die Bereitstellung von ATP für die Remodellierung des Zytoskeletts, sondern auch durch die Azidifizierung der Mikroumgebung und durch die chemotaktische Wirkung an der Glykolyse beteiligter Enzyme die Zellmigration.



Abbildung 55: Schematische Darstellung der Regulation der Glykolyse und des PPP in Glioblastomen sowie der Assoziation der Stoffwechselwege mit zellulären Funktionen. In der Haupttumormasse führt die erhöhte PPP-Aktivität zu einer erhöhten Biomasseproduktion und Proliferation. Unter schwerer Hypoxie kommt es hingegen zur Aktivitätssteigerung der Glykolyse, einer erhöhten ATP-Produktion und Migration. Die Enzym- und Intermediatbeschriftungen, sowie die Reaktionspfeile sind blass dargestellt, da es sich lediglich um eine Erweiterung der Abbildung 54 handelt und nicht im Fokus dieser Abbildung steht.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der Expressionsanalysen und der funktionellen Analysen abgeleitet werden, dass in den meisten, schnell proliferierenden Tumorzellen die Glucoseverstoffwechselung über den PPP gegenüber den parallelen Schritten der Vorbereitungsphase der Glykolyse bevorzugt wird, um den zellulären Bedarf an Makromolekülen für die Biomasseproduktion zu decken (Abbildung 55). Unter Bedingungen akuter Hypoxie, wie in den stark hypoxischen Pseudopalisaden, wird der PPP hingegen supprimiert, die Proliferation stark reduziert und die Glucoseverstoffwechselung über die Vorbereitungsphase der Glykolyse hochreguliert, um die ATP-Versorgung zu sichern und eine protektive Zellantwort (beispielsweise durch eine erhöhte Migration) auf den hypoxischen Stress zu ermöglichen (Abbildung 55). Unter Hypoxie findet demnach in den Zellen eine Verlagerung von einer maximalen Biomasseproduktion hin zu einer maximalen Energieproduktion und Zellprotektion statt.

4.7 Funktionelle Analyse der Glykolyse und des PPP mittels shRNA-vermittelter Herunterregulation von ALDOC und G6PD

Um zu untersuchen, welche funktionelle Bedeutung die Glykolyse und der PPP für die GS-Zellen hinsichtlich der metabolischen Adaptation an veränderte Sauerstoffbedingungen (Normoxie gegenüber Hypoxie) und den Stammzellphänotyp haben, wurden die durch akute Veränderungen der Sauerstoffkonzentration am stärksten regulierten Enzyme dieser beiden Stoffwechselwege (ALDOC der Glykolyse und G6PD des PPP) mittels spezifischer shRNAs in der chronisch normoxischen Zelllinie GS-11 sowie in der konventionellen Gliomzelllinie G55T2 stabil herunterreguliert. Anschließend wurden die Auswirkungen des Knockdowns auf die Proliferation, die Migration, das Tumorwachstum *in vivo* und in der GS-11 auch auf die Stammzellkriterien, Klonogenität und Differenzierbarkeit, untersucht.

4.7.1 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die Proliferation

Bezüglich der Auswirkungen des Knockdowns auf die Proliferation zeigte sich, dass eine Herunterregulation von ALDOC zu einer 1,3- bis 2,7-fachen Steigerung der Proliferation in der GS-11 führte, wohingegen es durch die Herunterregulation von G6PD zu einer signifikant verringerten Proliferationsrate (56-75% ige Reduktion) gegenüber den Kontrolllinien kam.

Bereits in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass eine siRNA- bzw. shRNA-vermittelte Herunterregulation von G6PD eine verringerte Proliferation von humanen β-Zellen aus dem Pankreas (MIN6) sowie von einer humanen Melanomzelllinie (A375) zur Folge hatte^{291,292}. Des Weiteren konnte in G6PD-mutierten embryonalen Stammzellen²⁹³ und G6PD-defizienten Vorhaut-Fibroblasten von Neugeborenen²⁹⁴ eine verringerte Proliferationsrate beobachtet werden. Sowohl diese Studien als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine kausale Rolle von G6PD bzw. des PPP für die Zellproliferation hin.

Der Einfluss einer ALDOC-Herunterregulation auf die Proliferation wurde bislang in keiner Studie untersucht. Ritterson Lew und Tolan beschrieben lediglich, dass ein Knockdown von Aldolase A, der embryonalen und Muskel-spezifischen Aldolase-Isoform, in Rattenzelllinien die Proliferation durch eine nicht-glykolytische Funktion in der Zytokinese inhibierte²⁹⁵. Das Ergebnis der vorliegenden Studie deutet im Gegensatz dazu darauf hin, dass eine Herunterregulation von ALDOC einen pro-proliferativen Effekt in den sich generell langsam teilenden GS-Zellen hat. Dieser proliferationssteigernde Effekt könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass es aufgrund der Herunterregulation von ALDOC zur Akkumulation von frühen Glykolyseintermediaten wie Glucose-6-Phosphat kommt, welches dann vermehrt anabolen PPP verstoffwechselt werden kann und potentiell über den die Biomasseproduktion fördert.

Teilweise konnten diese Ergebnisse auch in der konventionellen Gliomzelllinie G55T2 bestätigt werden, bei der es durch die Herunterregulation von G6PD ebenfalls zu einer verminderten Proliferation kam. Allerdings konnte hier kein pro-proliferativer Effekt durch eine Herunterregulation von ALDOC erzielt werden. Dies könnte mit der generell hohen proliferativen Aktivität der G55T2 zu begründen sein, in der möglicherweise ein Substratzutrag in den PPP durch Abschaltung der Glykolyse zu keiner weiteren Steigerung der Zellteilungsaktivität führt. Denkbar wäre, dass hier durch Serumstimulation und andere Signaltransduktionswege bereits die maximale Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) des PPP erreicht, und eine weitere Steigerung der PPP-Aktivität nicht möglich ist.

4.7.2 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die Migration

Die Untersuchung der Auswirkungen des Knockdowns auf die Migration zeigte, dass eine Herunterregulation von ALDOC sauerstoffkonzentrationsunabhängig zu einer verringerten Migrationsfähigkeit der GS-Zellen um 43-71% führte. In der Literatur wird ALDOC eine duale Funktion zugesprochen, in der dieses Enzym neben der Funktion in der Glykolyse auch als F-Aktin-Bindeprotein fungiert und eine entscheidende Rolle bei der ATP-abhängigen Remodellierung des Zytoskeletts während der Zellmigration spielt^{295,296,297,298}. Aufgrund der Aktin-Bindungsaktivität von ALDOC kommt es in vivo zur Lokalisation von ALDOC entlang von hochpolymerisierten Aktin-Strukturen ("stress fibers") in guieszenten Zellen und hinter aktiven "Ruffles" im Leitsaum von migrierenden Zellen²⁹⁹. Diese spezifische Assoziation mit dem Zytoskelett ermöglicht die räumliche Kopplung von ATP-generierenden (Glykolyse) und ATP-verbrauchenden (Remodellierung des Zytoskeletts) Prozessen, was die Effizienz der beiden Prozesse entscheidend steigert³⁰⁰. Des Weiteren konnten Ducan und Storey mittels dreier unabhängiger Methoden (Verdünnungsmethode nach Clarke et al.³⁰¹, Airfuge Methode und Titrationsmethode nach Lowery et al.³⁰²) nachweisen, dass in Süßwasserschildkröten die kontinuierliche 5- bis 20-stündige Anoxie-Exposition (in der Publikation definiert als eine Sauerstoffkonzentration von unter 1,3% bzw. 10 Torr im Schwimmwasser der Schildkröten) die Bindung von ALDOC an Aktin in den Hirnen der Tiere erhöhte³⁰⁰. Hierdurch wurde die Kopplung zwischen ATP-generierenden und ATP-verbrauchenden Prozessen weiter verstärkt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung von ALDOC an F-Aktin die kinetischen Parameter v_{max} und K_m (Michaelis-Menten-Konstante) von ALDOC, um eine Potenz erhöht³⁰³ und die dadurch gesteigerte glykolytische ATP-Synthese die Remodellierung des Zytoskeletts begünstigt³⁰⁴. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Studien schlussfolgern, dass sich eine Herunterregulation von ALDOC negativ auf die Remodellierung des Zytoskeletts und damit die Zellmotilität auswirken, was im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht. Der Effekt einer reduzierten Migration durch

Herunterregulation von ALDOC konnte auch in der konventionellen Gliomzelllinie G55T2 festgestellt werden. In der G55T2 zeigte sich zudem, dass die Verringerung der Migration durch die Herunterregulation von ALDOC unter Hypoxie schwächer ausgeprägt war. Dies könnte wiederum durch den generellen migrationssteigernden Effekt der hypoxieinduzierten Expression von Glykolyseenzymen (Kapitel 3.5.2) zu erklären sein, der hier die verringerte Glykolyseaktivität als Folge des ALDOC-Knockdown kompensiert. So könnte beispielsweise die hypoxische Expressionsinduktion der chemotaktisch wirkenden GPI (AMF) die Migration unter Hypoxie unterstützen³⁰⁵.

Interessanterweise führte eine Herunterregulation von G6PD in der Zelllinie GS-11 zu einer signifikanten Migrationssteigerung um durchschnittlich 56% gegenüber den Kontrolllinien, ein Effekt der durch Hypoxie verstärkt wurde. Eine Steigerung der Migration durch Herunterregulation von G6PD bzw. der PPP-Aktivität konnte bislang in keiner Studie nachgewiesen werden. Dieser Effekt könnte damit erklärt werden, dass durch die Herunterregulation des PPP möglicherweise mehr Glucose-6-Phosphat über die Glykolyse verstoffwechselt wird und es folglich zu einer höheren ATP-Synthese kommt. Durch einen Anstieg der ATP-Konzentration könnte wiederum die ATP-abhängige Remodellierung des Zytoskeletts vermehrt stattfinden, was in einer erhöhten Migration resultieren könnte. Die zusätzliche Verstärkung des migrationssteigernde Effekt der Herunterregulation von G6PD unter Hypoxie könnte, wie bereits beschrieben, durch die hypoxieinduzierte Expression von chemotaktisch wirkenden Glykolyseenzymen wie GPI verursacht werden³⁰⁵.

Der Effekt einer erhöhten Migration in den G6PD-Knockdown-Linien konnte in der G55T2 allerdings nicht festgestellt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass es sich bei dem migrationssteigernden Effekt der G6PD-Herunterregulation entweder um einen GS-Zell-spezifischen Effekt handelt, oder aber, dass in der verwendeten konventionellen Gliomzelllinie G55T2 entweder keine Erhöhung des Glucoseflusses über die Glykolyse als Folge der Herunterregulation des PPP erfolgt oder das Ausmaß des erhöhten Glucoseflusses über die Glykolyse in dieser Zelllinie zu keiner signifikanten Steigerung der ATP-Synthese und damit auch keine Erhöhung der Migration führt.

Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse der shRNA-Knockdown-Analysen die postulierte Hypothese einer funktionellen Assoziation zwischen dem PPP und der Proliferation, sowie zwischen der Glykolyse und der Migration. So führt die Herunterregulation des anabolen PPP zu einer Verringerung der Proliferation, wohingegen eine Herunterregulation der ATP-produzierenden Glykolyse mit einer Verringerung der Migrationsfähigkeit assoziiert ist (Abbildung 55). Da die Ergebnisse sowohl in der GS-11 als auch in der konventionellen Gliomzelllinie nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen möglicherweise um einen generellen, Zelltyp-unabhängigen Effekt handelt.

Interessanterweise konnte in der GS-11-Zelllinie darüber hinaus nachgewiesen werden, dass die Herunterregulation der Glykolyse bzw. des PPP die verstärkte Ausprägung der jeweils mit dem parallelen Stoffwechselweg assoziierten funktionellen Eigenschaft zur Folge hat (Abbildung 56). So senkt eine Herunterregulation des PPP mittels shRNA nicht nur die Proliferation, sondern erhöht zugleich die Glykolyse-assoziierte Migrationsfähigkeit der Zellen, wohingegen eine Herunterregulation der Glykolyse eine Verringerung der Migrationsfähigkeit und überraschenderweise zugleich eine Steigerung der PPP-assoziierten Proliferation zur Folge hat.



Abbildung 56: Schematische Darstellung des Effekts der Modulation der Stoffwechselaktivität der Glykolyse und des PPP in GS-Zellen. Eine Herunterregulation bzw. Inhibition des PPP (gekennzeichnet durch den blassen, gestrichelten blauen Pfeil) führt zu einer verringerten Biomasseproduktion und Proliferation (A) bei gleichzeitiger Aktivitätssteigerung der Glykolyse, einer erhöhten ATP-Produktion und Migration. Eine Herunterregulation bzw. Inhibition der Glykolyse (gekennzeichnet durch den blassen, gestrichelten roten Pfeil) führt hingegen zu einer verringerten ATP-Synthese und Proliferation bei gleichzeitiger Steigerung der PPP-Aktivität, Biomasseproduktion und Proliferation. Diese Effekte werden möglicherweise durch die veränderte Verfügbarkeit von Glucose-6-Phosphat ausgelöst. Die Pfeile symbolisieren eine Steigerung (↑) bzw. eine Reduktion (♦) des entsprechenden Prozesses, und ⊥ symbolisiert eine Inhibition/Herunterregulation des Stoffwechselwegs. Die Enzymund Intermediatbeschriftungen, sowie die Reaktionspfeile sind blass dargestellt, da es sich lediglich um eine Erweiterung der Abbildung 54 handelt und nicht im Fokus dieser Abbildung steht.

Da dieses Phänomen ausschließlich in der GS-Zelllinie beobachtet werden konnte deutet sich an, dass es sich hierbei möglicherweise um einen GS-Zell-spezifischen Effekt handelt. In früheren Studien wurde postuliert, dass GS-Zellen besser das genomische Profil der Ursprungstumoren erhalten als konventionelle Gliomzelllinien und, dass die

Langzeitkultivierung von Zellen in serumhaltigem, mitogenem Medium zu Veränderungen des Genoms führen kann^{122,245,306}. Darüber hinaus stellten Janiszewska et al. fest, dass isogene Glioblastomzellen, die entweder unter serumfreien Bedingungen als Neurosphäre oder serumstimuliert als adhärente Kultur wuchsen, metabolische Unterschiede aufwiesen³⁰⁷. So führte eine Inhibition der Glykolyse mittels Oxalsäure lediglich in der adhärent wachsenden Linie zu einem verringerten ATP-Gehalt in der Zelle sowie zu einer reduzierten Proliferation, wohingegen eine Inhibition der oxidativen Phosphorylierung nur den ATP-Gehalt in der als Neurosphären wachsenden Kultur reduzierte. Somit könnte der beobachtete GS-Zell-spezifische Effekt damit zu erklären sein, dass akkumulierte stoffwechselverändernde Mutationen während der langen Kultivierung der serumstimulierten, schnell proliferierenden G55T2 (mindestens 5-fach länger gegenüber der GS-11) den Nachweis des beschriebenen Phänomens nicht zulassen.

4.7.3 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf das Tumorwachstum *in vivo*

Für die Untersuchung des Effekts der Herunterregulation der beiden Zielgene auf das Tumorwachstum in vivo wurden repräsentativ als Modell für die Haupttumormasse je eine der G55T2 Knockdown-Linien und für das Modell des hochinvasiven Anteils von Glioblastomen ie eine der GS-11-Knockdown-Linien sowie die entsprechende Negativkontrolle und die wt-Linie intrakraniell in Nacktmäuse injiziert. Eine Auswertung des in vivo Experiments konnte nur für die G55T2-Zelllinie durchgeführt werden, da bis zur Fertigstellung dieser Arbeit bei den Tiergruppen, denen die GS-11-Knockdown-Linien injiziert wurden noch keine Symptome festzustellen waren. Aus den Kaplan-Meier-Überlebenskurven ging hervor, dass sich die Herunterregulation von ALDOC und G6PD in vivo unterschiedlich auf die Wachstumsgeschwindigkeit der G55T2-Zellen auswirkte. So führte eine Herunterregulation von ALDOC zu einem signifikant schnelleren Tumorwachstum und folglich einem früheren Auftreten von abbruchrelevanten Symptomen, wohingegen die Herunterregulation von G6PD in einem langsameren Wachstum gegenüber der Negativkontrolle resultierte.

Das Ergebnis eines langsameren Tumorwachstums der G55T2-G6PD-Knockdown-Linien war erwartet, da *in vitro* eine verringerte Proliferation nach Herunterregulation von G6PD detektiert wurde und angenommen wurde, dass die G55T2, die *in vivo* hochproliferativ wächst, im hohen Maße von der Aktivität des PPP abhängig ist. Bereits in früheren Studien wurde postuliert, dass G6PD zur unkontrollierten Zellproliferation in Tumoren beiträgt²⁹². So konnten Ku et al. zeigen, dass nach subkutaner Injektion von murinen Embryofibroblasten (NIH 3T3 Zellen), die nach der Transfektion mit humaner G6PD-cDNA G6PD überexprimierten, im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen ein schnelleres

Tumorwachstum in NOD/SCID Mäuse zu beobachten war und die Tumorgröße positiv mit der G6PD-Aktivität korrelierte³⁰⁸. Aufgrund dieser Studie postulierten Kuo et al., dass G6PD möglicherweise ein potenzielles Onkogen ist, dessen Überexpression eine entscheidende Rolle in der neoplastischen Transformation spielt³⁰⁸. Eine Herunterregulation von G6PD würde dieser Studie zufolge zu einem langsameren Tumorwachstum führen. Diese Hypothese konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstmalig auch für Gliomzellen bestätigt werden.

Über den Einfluss von ALDOC auf das Tumorwachstum *in vivo* ist bislang nichts bekannt. Da die verwendete Zelllinie G55T2 kein invasives, sondern ein expansives Wachstumsverhalten aufweist. wurde angenommen, dass diese Zelllinie von der Aktivität der migrationssteigernden Glykolyse relativ unabhängig ist und eine Herunterregulation von ALDOC somit möglicherweise keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum hat. Das Ergebnis eines schnelleren Wachstums der ALDOC-Knockdown-Linie in vivo ging demnach über diese Annahme hinaus. Als Erklärung für das schnellere Wachstum ist ein erhöhter Glucosefluss über den PPP durch die ALDOC-Knockdown-vermittelte Inhibition der Glykolyse denkbar, der eine erhöhte Bereitstellung von Metaboliten für anabole Prozesse zur Folge hat.

Für das Ergebnis des in vivo-Versuchs mit den GS-11-Knockdown-Linien, die als wt-Linie hochgradig invasiv wächst, wird im Gegenzug angenommen, dass diese Zelllinie im hohen Maße von der Aktivität der Glykolyse abhängig ist. Daher wird erwartet, dass sich die Herunterregulation von ALDOC negativ auf das Tumorwachstum auswirkt. Durch die ALDOC-Knockdown-vermittelte verringerte Motilität der Zellen, die bereits in vitro nachgewiesen werden konnte, könnte dem charakteristischen invasiven Wachstumsverhalten der GS-Zellen entgegengewirkt werden. Im Vergleich zur G55T2 ist die GS-11 allerdings nur gering proliferativ aktiv, so dass vermutet wird, dass die Herunterregulation von G6PD in der GS-11 möglicherweise nur einen geringen inhibitorischen Effekt auf das Tumorwachstum in vivo hat.

4.7.4 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die Klonogenität

Um die Auswirkungen der Herunterregulation der Glykolyse bzw. des PPP auf den Stammzellphänotyp zu untersuchen, wurden die Knockdown-Linien bezüglich des Kriteriums der Selbsterneuerung analysiert. Im Klonogenitätsassay zeigte sich, dass die Herunterregulation von G6PD keine Auswirkungen auf die Kapazität zur Selbsterneuerung der GS-11-Zelllinie hatte, eine Herunterregulation von ALDOC hingegen zu einer signifikant reduzierten Klonogenität um bis zu 94% führte. Die Erkenntnis einer verringerten Klonogenität durch Herunterregulation von ALDOC bei gleichzeitig gesteigerter Proliferation

(Kapitel 3.6.1.2) verdeutlicht, dass zwischen der Proliferation und der Klonogenität kein kausaler Zusammenhang besteht. Durch die Herunterregulation von ALDOC ist demnach die Fähigkeit einer einzelnen Zelle eine neue Neurosphäre zu bilden reduziert, ohne dass die Proliferation gleichermaßen beeinträchtigt ist.

Die Auswirkung einer Herunterregulation von Enzymen des PPP und der Glykolyse auf die Klonogenität von Tumorstammzellen im Allgemeinen und auf Glioblastomzellen im Speziellen wurden bislang in noch keiner anderen Studie untersucht und stellt eine neue Erkenntnis dar.

4.7.5 Auswirkungen der shRNA-vermittelten Herunterregulation von ALDOC und G6PD auf die Differenzierbarkeit

Ein weiteres Stammzellkriterium ist die Differenzierbarkeit in gliale und neuronale Richtung. Bei dieser Untersuchung der Differenzierbarkeit der GS-Zellen anhand der Expression von Stammzell- und Differenzierungsmarkern mittels qPCR zeigte sich, dass sich das Differenzierungspotential der Zellen nach G6PD-Herunterregulation nicht von dem Differenzierungspotential der Negativkontrollen unterschied. Auch eine Herunterregulation der Glykolyse über den Knockdown von ALDOC beeinflusste das Differenzierungspotential in astrozytäre Richtung nicht. Dies zeigte sich in der verringerten Expression des Stammzellmarkers CD133 und der erhöhten Expression des astrozytären gegenüber Differenzierungsmarkers GFAP den undifferenzierten Kontrollen. Interessanterweise war in den differenzierten Zellen der GS-11-ALDOC-Knockdown-Linien allerdings kein Anstieg der MAP2-Expression (neuronaler Differenzierungsmarker) gegenüber den undifferenzierten Kontrollen zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass eine Herunterregulation von ALDOC eine Differenzierung in neuronale Richtung möglicherweise erschwert.

In der Literatur ist bislang kein Einfluss von G6PD auf die Differenzierbarkeit von Tumorstammzellen oder adulten Stammzellen beschrieben. Auch für ALDOC gibt es bisher nur vereinzelte Veröffentlichungen, die zeigen, dass die ALDOC-Expression beispielsweise im neonatalen Großhirn von Ratten scheinbar ein früher Marker für eine astrozytäre, aber nicht für eine oligodendrozytäre Differenzierung ist³⁰⁹. In der vorliegenden Arbeit konnten keine Auswirkungen einer ALDOC-Herunterregulation auf die Expression von GFAP als astrozytären Differenzierungsmarker detektiert werden. Vielmehr scheint eine Herunterregulation von ALDOC die neuronale Differenzierung zu beeinflussen, was eine bislang nicht bekannte Erkenntnis darstellt.

Zusammenfassend konnte durch die shRNA-Studien gezeigt werden, dass der ALDOC-Knockdown in der G55T2 ein schnelleres Tumorwachstum *in vivo* zur Folge hatte, wohingegen eine Herunterregulation des anabolen PPP das Überleben der Versuchstiere verlängerte. Bezüglich der Stammzellkriterien konnte in der GS-11 eine verringerte Klonogenität und eine reduzierte Differenzierbarkeit in neuronale Richtung in Folge einer Herunterregulation von ALDOC nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Glykolyse möglicherweise eine entscheidende Rolle für den Erhalt des Stammzellphänotyps spielt.

4.8 Funktionelle Analyse der Glykolyse und des PPP mittels Stoffwechselinhibitoren

Die Ergebnisse der Knockdown-Experimente zeigten, dass eine Modulation des Glucosestoffwechsels die Proliferation, die Migration und vor allem das *in vivo* Tumorwachstum beeinflusst. Anschließend sollte überprüft werden, ob die Inhibition der Glykolyse bzw. des PPP mittels synthetischer Inhibitoren vergleichbare Resultate erzielen kann und, ob eine medikamentöse Inhibition der Stoffwechselwege somit einen möglichen therapeutischen Ansatz für Glioblastompatienten darstellt. Daher wurden die beiden funktionellen Eigenschaften (Proliferation und Migration), die für die Tumorentstehung und Progression eine wichtige Rolle spielen, unter Einsatz von 6-Aminonicotinamid (6-AN) (Inhibitor der G6PD) und Ornidazol (Inhibitor der GAPDH und der TPI) in den Zelllinien GS-11, GS-12 und der G55T2 überprüft.

4.8.1 Einfluss der Inhibitoren auf die Proliferation

Der Einsatz von 6-AN hatte in allen Zelllinien eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferation zur Folge, die sich in den GS-Zelllinien bereits bei einer geringeren Konzentration (bei 5 μ M um ca. 45%) auswirkte als in der konventionellen Gliomzelllinie G55T2 (erst bei 10 μ M um ca. 23%). Dieser Effekt einer verringerten Proliferation durch die Inhibition der G6PD mittels 6-AN war erwartet, da sich bereits in den shRNA-Studien zeigte, dass eine Herunterregulation der G6PD zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation in beiden Zelllinien (GS-11 und G55T2) führte.

Auch in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der G6PD durch eine Behandlung mit 6-AN zu einer Reduktion des Tumorwachstums in einem murinen Brustkrebsmodell führte³¹⁰. Dieses Ergebnis einer geringeren Proliferation der Zellen durch 6-AN steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Es ist zu vermuten, dass durch die Inhibition des PPP die Proliferationsgeschwindigkeit durch die geringere Verfügbarkeit von Makromolekülen und NADPH herabgesetzt ist.

Die Verwendung von Ornidazol als Glykolyseinhibitor hatte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferation zur Folge. In der GS-11 konnte bereits bei einer Konzentration von 5 µM Ornidazol eine signifikant Reduktion um 25% detektiert werden. Demgegenüber war für die G55T2 erst bei einer höheren Ornidazolkonzentration von 100 µM die Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant reduziert (ca. 37%). Der anti-proliferative Effekt von Ornidazol steht im Kontrast zu dem Ergebnis der Knockdown-Experimente, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Herunterregulation der Glykolyse in der GS-11 durch den Knockdown von ALDOC zu einer Proliferationssteigerung führte. Als ein möglicher Grund für diesen entgegengesetzten Effekt ist der veränderte Angriffsort von Ornidazol gegenüber der verwendeten shRNAs zu nennen. So hemmt Ornidazol nicht ALDOC aus der Vorbereitungsphase, sondern zwei Enzyme, die nachfolgende Schritte der Glykolyse katalysieren (TPI und GAPDH, das erste Enzym der Ertragsphase), was möglicherweise einen anderen Effekt auf die Zellen hat als eine Inhibition von ALDOC. Eine andere Ursache könnte die in der Literatur beschriebene Zytotoxizität von Ornidazol sein²⁴⁸. So wurde bereits gezeigt, dass Ornidazol beispielsweise auf humane Lymphozyten in vitro zytotoxisch wirkt und die Zellzahl signifikant reduziert²⁴⁹. Demnach wäre der beobachtete Effekt von Ornidazol auf die Proliferation nicht auf eine inhibitorischen Wirkung von Ornidazol auf die Glykolyse zurückzuführen, sondern vielmehr auf die Zytotoxizität des Inhibitors.

Das frühere Auftreten eines inhibitorischen Effekts bei niedrigeren Konzentrationen in den GS-Linien gegenüber der Nicht-Tumorstammzelllinie G55T2 kann mit einer höheren Empfindlichkeit von Stammzellen im Allgemeinen gegenüber pharmakologischer Inhibition erklärt werden. So konnten beispielsweise Candelario et al. zeigen, dass murine neurale Stamm- und Progenitorzellen empfindlicher gegenüber der Inhibition des PPP sind und eine deutlich verringerte Viabilität nach Behandlung mit 6-AN aufweisen als primäre Neurone³¹¹.

4.8.2 Einfluss der Inhibitoren auf die Migration

Unter Verwendung von 6-AN kam es in allen Zelllinien zu einem Anstieg der Migration bei einer Konzentration zwischen 2 und 10 µM 6-AN. Dieses Ergebnis bestätigt die beobachtete gesteigerte Migrationsfähigkeit der GS-Zellen nach shRNA-vermittelter Herunterregulation von G6PD. Das Resultat steht allerdings im Widerspruch zu einer Studie von Beckner et al., in der nachgewiesen werden konnte, dass eine Behandlung der metastasenbildenden humanen Melanomzelllinie (A2058) mit 6-AN keinen Einfluss auf die Zellmotilität hatte²⁸⁵. Eine Begründung für den beobachteten migrationssteigernden Effekt von 6-AN könnte wiederum ein erhöhter Glucosefluss über die Glykolyse sein, der zu einer erhöhten ATP-Synthese beiträgt.

Hinsichtlich der Motilität konnte in den GS-Zelllinien unter Verwendung von Ornidazol eine konzentrationsabhängige Reduktion verzeichnet werden. Dieses Ergebnis bestätigt nicht nur die Ergebnisse der shRNA-Studien sondern steht zudem im Einklang mit den Ergebnissen von Bone et al, in denen durch Ornidazolbehandlung ebenfalls eine Reduktion der Motilität

von Rattenspermatozonen *in vitro* festgestellt werden konnte³¹². Der Grund für die geringere Motilität könnte möglicherweise eine verringerte ATP-Synthese sein. Da glykolytisches ATP die Hauptenergiequelle für die Remodellierung des Zytoskeletts ist²⁸⁵, resultiert aus der Inhibition der Glykolyse eine Abnahme der glykolytischen ATP-Produktion und folglich eine Abnahme der migratorischen Aktivität der Zellen. Da der anti-migratorische Effekt von Ornidazol erst bei sehr hohen Konzentrationen auftrat ist allerdings denkbar, dass der beobachtete Effekt auf die Zytotoxizität von Ornidazol zurückzuführen ist, die die Zahl vitaler, potentiell migrationsfähiger Zellen in dem jeweiligen Ansatz reduziert.

Zusammenfassend stehen die Ergebnisse bezüglich der Inhibition des PPP durch 6-AN mit den Ergebnissen des Knockdowns von G6PD bzw. der Herunterregulation des PPP in der GS-11 im Einklang. In beiden Ansätzen konnte nachgewiesen werden, dass eine Inaktivierung des PPP in einer Reduktion der Proliferation und einer Steigerung des migratorischen Potenzials der Zellen resultierte.

Die Verwendung des Glykolyseinhibitors Ornidazol konnte hingegen nur teilweise die Ergebnisse der ALDOC-Knockdown-Experimente reproduzieren. Wie in den shRNA-Studien war auch unter Verwendung von Ornidazol eine Verringerung der Migration in den GS-Linien zu beobachten, die allerdings möglicherweise nicht durch einen tatsächlichen inhibitorischen Effekt auf die Glykolyse hervorgerufen worden sein könnte. Im Gegensatz zur Herunterregulation der Glykolyse durch den ALDOC-Knockdown war zudem kein Anstieg der Proliferation zu verzeichnen. Vielmehr fand sich eine konzentrationsabhängige Abnahme, eventuell hervorgerufen durch den zytotoxischen Effekt von Ornidazol in hohen Konzentrationen. Neben der potenziellen zytotoxischen Wirkung von Ornidazol, wirken sich noch weitere Faktoren einschränkend auf den Vergleich der Ergebnisse aus den shRNAund den Inhibitorexperimenten bezüglich der Modulation der Glykolyseaktivität aus. Zum einen unterscheiden sich in diesen beiden Ansätzen die Angriffspunkte für die potenzielle Herunterregulation/Inhibition der Glykolyseaktivität. Durch die shRNA wird spezifisch ALDOC aus der Vorbereitungsstufe herunterreguliert, wohingegen Ornidazol TPI aus der Vorbereitungsphase und GAPDH aus der Ertragsphase der Glykolyse inhibiert. Zum anderen kann durch die Inhibition der GAPDH, welche einen Verknüpfungspunkt zwischen Glykolyse und dem nicht-oxidativen Teils des PPP darstellt, ein retrograder Effekt von Ornidazol auch auf den PPP nicht ausgeschlossen werden. Unter Verwendung von Ornidazol ist somit keine endgültige Differenzierung des Einflusses des PPP bzw. der Glykolyse auf zelluläre Funktionen möglich. Derzeit ist allerdings kein kommerzieller, hochspezifischer Inhibitor für ALDOC verfügbar, der einen uneingeschränkten Vergleich mit den shRNA-Studien zulassen ALDOCwürde pro-proliferativen und anti-migratorischen Effekt der und den Herunterregulation potenziell reproduzieren könnte.

Zur finalen Klärung der Nutzbarkeit und Effektivität von synthetischen Glykolyse- und PPP-Inhibitoren in der Therapie von Glioblastompatienten sind *in vivo* Versuche zwingend erforderlich, da es derzeit kein adäquates *in vitro*-Modell gibt, das das dreidimensionale Wachstum und die Komplexität des auf den Tumor einwirkenden Milieus *in vivo* ausreichend nachbilden würde.

4.9 Ausblick

Auf der Basis des aktuellen Kenntnisstandes und der Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit eröffnen sich potenzielle therapeutische Perspektiven. In bereits veröffentlichten Studien wurde die Kenntnis des ausgeprägten glykolytischen Phänotyps von Tumorzellen genutzt, um durch Inhibition der Glykolyse beispielsweise mittels 2-Deoxyglucose oder 3-Bromopyruvat (HK2-Inhibitoren), in vitro die Proliferation und in vivo das Tumorwachstums von Zellen verschiedene Krebsentitäten zu reduzieren^{234,313–315}. Und auch die Inhibition des anabolen, pro-proliferativen PPP wurde als möglicher Ansatz für eine Therapie untersucht. So zeigte beispielsweise die Behandlung mit Dehydroepiandrosteron (Steroidhormon, unspezifischer Inhibitor der G6PD) einen anti-tumorigenen Effekt bei Hepatomzellen von Ratten (JM2)³¹⁶. Effektive therapeutische Strategien für den Einsatz bei Patienten fehlen derzeit aber noch^{187,246}. Bislang werden Glykolyseinhibitoren (z.B. 2-DG oder Lonidamine) beispielsweise in Phase II und Phase III Studien lediglich in Kombination mit anderen Zytostatika gegen Brust- und Lungenkrebs oder Glioblastomen verwendet, da sie Tumore gegenüber anderen chemotherapeutischen Agenzien und Radiotherapie resensitivieren³¹⁷⁻ ³¹⁹. Ein kombinierter Therapieansatz aus paralleler Inhibition von Glykolyse und PPP wurde jedoch noch nie diskutiert. Aus der vorliegenden Arbeit geht jedoch hervor, dass die Zellen innerhalb eines Tumors in Abhängigkeit der lokalen Sauerstoffkonzentration metabolisch heterogen sind, weshalb eine parallele Therapie, die gegen beide Stoffwechselwege gerichtet ist, sinnvoll erscheint und weiter verfolgt werden sollte.

Neben diesen potenziellen therapeutischen Perspektiven ergibt sich aus den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen eine Reihe von mechanistischen Fragen, die zum Teil im Labor für Hirntumorbiologie derzeit weiter beforscht werden.

Zunächst stellt sich die Frage, ob es sich bei dem beobachteten sauerstoffkonzentrationsabhängigen Switch zwischen PPP und Glykolyse um einen zelltypspezifischen Effekt handelt, der ausschließlich in Gliomzelllinien zu beobachten ist oder ob es sich um ein generelles Phänomen handelt, das sich auch in normalen Zellen (z.B. Endothelzellen, Mikroglia) sowie anderen Tumorzellen (z.B. Mammakarzinomzellen) nachweisen lässt. Ein weiterer offener Punkt ist, ob, sofern dieser metabolische Switch in anderen Zellllinien ebenfalls nachgewiesen werden kann, auch in diesen Modellen eine Assoziation zwischen

der Glykolyse und der Migration bzw. dem PPP und der Proliferation besteht. In der vorliegenden Arbeit konnte in der Glioblastomstammzelllinie GS-11 gezeigt werden, dass es infolge der Herunterregulation bzw. Inhibition der Glykolyse zur Steigerung der PPPassoziierten Proliferation bzw. infolge der Herunterregulation des PPP zur Steigerung der glykolyseassoziierten Migration kommt. Da sich dieser Effekt nicht in der konventionellen Gliomzelllinie G55T2 nachwiesen ließ, ergibt sich unmittelbare die Frage, ob das beobachtete Phänomen GS-Zell-spezifisch ist oder sich auch in anderen Tumorzelllinien sowie humanen Gliazellen wie Astrozyten und Neuronen nachweisen lässt. Eine Untersuchung dieser Fragen könnte zur Klärung der Generalisierbarkeit des sauerstoffkonzentrationsabhängigen metabolischen Switches sowie dessen Assoziation mit einer verstärkten Ausprägung konkreter funktioneller Eigenschaften beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zudem an, dass innerhalb von Glioblastomen eine metabolische Heterogenität vorliegt mit Synchronizität verschiedener präferenzieller metabolischer Zellphänotypen. Aufgrund der in vitro und in situ nachgewiesenen Assoziation zwischen Glykolyse und Migration bzw. PPP und Proliferation stellt sich die Frage, ob in in vitro selektierten stark proliferierenden gegenüber stark migrierenden Subpopulationen sauerstoffkonzentrationsunabhängig unterschiedliche metabolische Zellphänotypen und unterschiedliche Genexpressionsprofile nachgewiesen werden können, vor allem hinsichtlich der Expression von Genen, die Glykolyse- und PPP-Enzyme kodieren. Die Hypothese ist, dass in den hochproliferativen Subpopulationen eine höhere Expression von PPP-Enzymen vorliegt, wohingegen hochmigratorischen Subpopulationen eine vergleichsweise höhere Expression von Enzymen vor allem der präparatorischen Phase der Glykolyse aufweisen. Denkbar wäre zudem, dass hochproliferative und hochmigratorische/invasive Glioblastomstammzellen eine selektive Vulnerabilität gegenüber Inhibitoren des PPP bzw. der Glykolyse ausweisen. Auf der Basis der vorliegenden Arbeit lässt sich vermuten, dass Zellen der hochmigratorischen Subpopulation vulnerabler für eine Inhibierung der Glykolyse sind als hochproliferative Zellen, wohingegen Zellen der hochproliferativen Subpopulation besonders vulnerabel gegenüber einer Inhibierung des PPP sind.

Ein Merkmal von Glioblastomstammzellen ist die Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie. Aus der vorliegenden Arbeit ergaben sich Hinweise, dass eine Herunterregulation von ALDOC Auswirkungen auf dem Stammzellphänotyp hat, die Klonogenität von GS-Zellen verringert und das Differenzierungspotential in neuronale Richtung limitiert. Daher stellt sich die Frage, ob eine Modulation der Glykolyse per se möglicherweise den Stammzellphänotyp beeinflusst und zur Sensibilisierung der GS-Zellen gegenüber einer zytostatischen Therapie (z.B. mit Temozolomid) oder Radiotherapie beitragen kann.

5 Anhang

5.1 Zusammenfassung

Glioblastome, die häufigsten und malignesten humanen Hirntumore, sind hypoxische Tumore. Die Sauerstoffkonzentration fluktuiert jedoch lokal, was eine metabolische Herausforderung für Tumorzellen darstellt. Es wird angenommen, dass Tumorstammzellen des Glioblastoms über eine außergewöhnliche metabolische Flexibilität verfügen, die es ihnen ermöglicht das Tumorwachstum selbst unter ungünstigen Wachstumsbedingungen zu initiieren und aufrechtzuerhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen der Adaptation an akute und chronische Hypoxie sowie Oxygenierung in Glioblastomstammzellen (GS-Zellen) untersucht. Dazu wurden aus 4 Glioblastomen GS-Zelllinien parallel unter chronisch normoxischen (GS^N) und chronisch hypoxischen Bedingungen (GS^H) etabliert (GS-10^N und GS-10^H bis GS-13^N und GS-13^H). Diese Linien wurden anschließend zur Simulation fluktuierender Sauerstoffkonzentrationen akuter Normoxie (GS-10^{H \rightarrow N} bis GS-13^{H \rightarrow N}) bzw. akuter Hypoxie (GS-10^{N \rightarrow H} bis GS-13^{N \rightarrow H}) ausgesetzt. Die Charakterisierung der parallelen chronisch adaptierten Zelllinien zeigte, dass die Ausprägung von Stammzelleigenschaften wie Tumorinitiierung sowie die Expression von Stammzellmarkern in den GS^H-Linien gegenüber den GS^N-Linien verstärkt war. Genexpressionsanalysen mittels Mikroarrays ergaben, dass akute Hypoxie hauptsächlich zur Induktion von Genen führte, die mit metabolischen Prozessen und Prozessen der Zellzyklusinhibition assoziiert waren. Demgegenüber induzierte chronische Hypoxie vor allem die Expression von Genen, die in Prozesse der neuralen Entwicklung involviert waren. Anschließende detaillierte bioinformatische Analysen der Genregulation sowie konfirmatorische quantitative Real-Time PCR und Western Blot Analysen zeigten konsistent eine erhöhte Expression von Glykolyseenzymen, insbesondere Enzymen aus der Vorbereitungsphase der Glykolyse, unter akuter Hypoxie. Im Gegensatz dazu konnte für Enzyme des Pentosephosphatwegs (PPP) eine Herunterregulation unter akuter Hypoxie festgestellt werden. Das entgegengesetzte Expressionsmuster zeigte sich nach akuter Oxygenierung chronisch hypoxischer Linien. In silico Analysen unter Verwendung der REMBRANDT Datenbank ergaben überraschenderweise, dass die Expression von PPP-Enzymen, trotz ihrer Herunterregulation unter Hypoxie, in Glioblastomen gegenüber Normalhirn erhöht war. Demgegenüber konnte eine verringerte Expression von hypoxieinduzierten Glykolyseenzymen der parallelen Vorbereitungsphase festgestellt werden. Immunhistologische Untersuchungen an einem Gliom Gewebe-Mikroarray konnten dieses Expressionsmuster anhand der zwei am stärksten durch Hypoxie regulierten Enzyme (ALDOC der Glykolyse und G6PD des PPP) bestätigen. Nachfolgende immunhistologische Färbungen zeigten zudem eine besonders starke Expression von PPP-Enzymen in den Hauptanteilen von Glioblastomen, vor allem in hochproliferativen Bereichen, jedoch nur eine schwache Expression in den stark hypoxischen Pseudopalisaden. Für Glykolyseenzyme konnte das entgegengesetzte Expressionsmuster nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine starke Expression in Pseudopalisaden, aber nur eine sehr schwache Expression im umliegenden Tumorgewebe. Mittels massenspektrometrischer Analysen unter Verwendung von [1,2-¹³C₂]-D-Glucose konnte zudem unter akuter Hypoxie ein reduzierter Glucosefluss über den PPP zugunsten eines erhöhten Flusses über die Glykolyse festgestellt werden. Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass akute und chronische Hypoxie die Zellmigration erhöhten, aber die Zellproliferation reduzierten, wohingegen Normoxie entgegengesetzte Effekte hatte. Des Weiteren konnte mittels shRNA-vermittelter Herunterregulation von ALDOC bzw. G6PD und durch spezifische Inhibitoren gegen Enzyme der Glykolyse oder des PPP gezeigt werden, dass eine Inhibition der Glykolyse in GS-Zellen mit einer schnelleren Proliferation, einer verringerten Migration, aber einem schnelleren Tumorwachstum *in vivo* einherging, wohingegen die Inhibition des PPP den entgegengesetzten Effekt hatte.

Zusammenfassend erweitern die Ergebnisse dieser Arbeit Warburgs Beobachtungen, dass Tumorzellen bevorzugt die Glykolyse zur ATP-Produktion nutzen, denn es konnte gezeigt werden, dass in hochgradig proliferativ aktiven Glioblastomzellen der anabole PPP relativ stark aktiv ist, dieser allerdings unter akuter schwerer Hypoxie supprimiert wird, wodurch es zur Verschiebung der Stoffwechselwege hin zur direkten Glykolyse kommt. Diese Verschiebung stellt die zelluläre Antwort auf hypoxischen Stress dar, und es ist zu vermuten, dass die verstärkte direkte Glykolyse durch eine erhöhte ATP-Produktion, eine aktive Suppression der Zellatmung und eine Steigerung der Migrationsfähigkeit die Tumorzelle vor hypoxischen Zellschädigungen schützt.

5.2 Summary

Glioblastomas (GBM), the most frequent and most malignant human brain tumors, are hypoxic tumors. However, oxygen levels fluctuate during tissue remodelling, imposing a major metabolic challenge for cancer cells. Stem-like tumor cells in GBM are believed to possess extraordinary metabolic flexibility, enabling them to initiate growth even under nonpermissive conditions. In the presented dissertation mechanism of metabolic adaptation to acute and chronic hypoxia as well as oxygenation were analysed. For that purpose we established and propagated stem-like glioblastoma cell lines (GS-cell lines) either under normoxia (GS-10^N to GS-13^N) or hypoxia (GS-10^H to GS-13^H) and subsequently exposed these stable cell lines to acute normoxia (GS-10^{H \rightarrow N} to GS-13^{H \rightarrow N}) or hypoxia (GS-10^{N \rightarrow H} to GS-13^{$N \rightarrow H$}), respectively. The detailed characterisation of the chronically normoxic and hypoxic GS-cell lines showed that stem cell properties, such as tumor initiation and the expression of stem cell markers, were enhanced in the parallel hypoxic GS-cell lines (GS^H) compared to normoxic ones (GS^{N}) . Gene expression profiling (Affymetrix) revealed that acute hypoxia predominantly induced expression of genes associated with metabolic pathways and cell cycle arrest, whereas chronic hypoxia induced the expression of genes involved in neurodevelopmental processes. Bioinformatic analyses and subsequent confirmative qPCR and Western Blot studies consistently demonstrated increased expression of glycolytic enzymes, especially of the preparatory phase of glycolysis, under acute hypoxia, whereas pentose phosphate pathway (PPP) enzymes were downregulated. The opposite pattern was found for acute oxygenation. Unexpectedly, REMBRANDT database analysis showed that despite downregulation by hypoxia, expression of PPP enzymes was increased in GBM, whereas expression of hypoxia-inducible enzymes of the parallel preparatory phase of glycolysis was decreased. Immunhistolocal analyses using a glioma tissue microarray of the two most strongly regulated enzymes (ALDOC of glycolysis und G6PD of the PPP) confirmed the observed expression pattern. Furthermore, immunohistochemistry showed strong staining for PPP enzymes in most areas of GBM tissue, especially in highly proliferative regions, but only weak expression in hypoxic pseudopalisading cells. Glycolytic enzymes displayed an inverse pattern with increased expression in hypoxic pseudopalisades but only weak expression in the surrounding tumor tissue. Mass spectrometric analysis using [1,2-¹³C₂]-D-glucose showed reduced glucose flux through the PPP under hypoxia in favor of flux through glycolysis. Functionally, acute and chronic hypoxia increased cell migration but reduced proliferation, whereas normoxia had opposite effects. Subsequent analyses using shRNA-mediated downregulation of ALDOC and G6PD, respectively, or specific inhibitors against glycolytic or PPP enzymes indicated that inhibition of glycolysis was associated with increased proliferation, decreased migration but increased tumor growth *in vivo*, whereas the inhibition of the PPP had opposite effects. Collectively, the findings of this thesis extend Warburg's observation that tumor cells predominantly utilize the glycolytic pathway for energy production, by suggesting that the anabolic PPP is highly active in rapidly proliferating cells in order to meet the demand of macromolecules for the rapid cell division but is suppressed under acute severe hypoxic stress, switching to direct glycolysis. This switch most likely represents a cellular response to hypoxic stress and protects cells against hypoxic cell damage by increasing ATP production, suppressing cell respiration and enhancing cell migration.

5.3 Material und Methoden – Ergänzungen -

5.3.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller	Katalognummer
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt	1.00013
AlamarBlue [™]	Serotec, Düsseldorf	BUF012B
Alfazyme	PAA Laboratories GmbH,	L11-012
Ampiaillin Natriumaala lyanhiliaiart	Pasching, Osterreich	A0519
Ampiciliin, Nathumsaiz, Tyophilislen	Sigma Aldrich, Steinheim	A9010
Antibody Diluont Reagant Solution	Sigina-Alunch, Steinneim	A00203
	GmbH, Darmstadt	003218
Bacto [™] Tryptone	Becton, Dickson and Sparks, MD, USA	211705
Bacto [™] Yeast Extract	Becton, Dickson and Sparks, MD, USA	210934
Bench Mark Protein Ladder	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	10748-010
Blasticidin S HCL	Invitrogen, Life Technologies	R210-01
BSA, Fraction V. >99%	Sigma-Aldrich, Steinheim	A-3059
BSA. Faction V	PAA Laboratories / GE Healthcare	K41-001-100
	Europe GmbH, Velizy-	
	Villacoublay, Frankreich	
Carboxy-H2DCFDA	Invitrogen, Life Technologies	C400
	GmbH, Darmstadt	
Cell Dissociation Solution, Non-enzymatic	Sigma-Aldrich, Steinheim	C5914
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt	102445
Citronensäure-Monohydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz	27490
Citifluor Antifadent Mountant Solution AF1	Agar Scientific, Stansted, England	R1320
Complete Mini EDTA-free (Protease	Roche Diagnostics GmbH,	11 836 170 001
Inhibitor Cocktail Tablet)	Mannheim	
Coomassie Brilliant Blue, R-250	Bio-Rad, Hercules, CA, USA	161-0400
2-Deoxy-D-Glucose (2-DG)	Sigma-Aldrich, Steinheim	D8375
4´,6`-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim	D9542
Dichlormethan, Rotipuran®, \geq 99,5%, p.a., HPLC grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	6053.2
Diff Quik Stain Set	Medion Diagnostics AG.	130832
	Düdingen, Schweiz	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MP Biomedicals	196055
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim	D-9779
DNA-Längenstandard 1 Kb Plus Ladder	Invitrogen, Life Technologies GmbH. Darmstadt	10787-018
dNTP Set (100mM)	Invitrogen, Life Technologies GmbH. Darmstadt	10297-018
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim	E-4884
Recombinant Human Epithelial Growth	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA	AF-100-15
Factor (EGF)		-
Essigsäure (100%)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	2234.1000
Eosin (1%)	Sigma-Aldrich, Steinheim	45260
Ethanol (abs)	Merck KgaA, Darmstadt	1.00983
Ethanol (abs), Emplura, HPLC grade	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn	8.18760

Ethidiumbromid (1%)	Merck KgaA, Darmstadt	1.11608
Etoposide	Calbiochem, Merck Millipore,	341205
	Darmstadt	
Eukitt® Eindeckmedium	O. Kindler GmbH, Freiburg	
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH,	A15-151
	Pasching, Österreich	
Recombinant human Fibroblast Growth	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA	100-18B
Factor (FGF)-basic		
Fungizone® Amphotericin B	Gibco, Life Technologies GmbH,	15290-026
	Darmstadt	
Formalin Lösung (10%)	Sigma-Aldrich, Steinheim	HT501320
Gemcitacinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	G6423
Geneticin, G418 Sulfat	Invitrogen, Life Technologies	11811-023
	GmbH, Darmstadt	
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis GmbH,	23114
	Heidelberg	
GlutaMAX (100x)	Gibco, Life Technologies GmbH,	35050-038
	Darmstadt	
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim	G5516
Glycin, ≥99%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG,	3908.2
	Karlsruhe	
Heparin	Rotexmedica GmbH, Trittau	20283
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim	H-3375
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	24137-52-R
Kaiser's Glyceringelatine	Merck KGaA, Darmstadt	1.09242.0100
Kristallviolett	Merck KgaA, Darmstadt	115940
U ¹³ C-D-Glucose	Cambridge isotope Laboratories	CLM-1396-1
	Inc., Andover, MA, USA	
1,2- ¹³ C ₂ -D-Glucose	Cambridge isotope Laboratories	CLM-504-1
	Inc., Andover, MA, USA	
Magermilchpulver	Spinnrad GmbH, Bad Segeberg	2231018
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	M-1028
Hämalaun, Mayer's Hemaleum Solution	Merck KgaA, Darmstadt	109249
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	M3148
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	65548
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck KgaA, Darmstadt	6268.0250
Natriumazid	Merck KgaA, Darmstadt	106688
Natriumchlorid	Th. Geyer GmbH & Co. KG,	1367.5000
	Renningen	
Natriumcitrat Salz	Serva Electrophoresis GmbH,	38642
	Heidelberg	
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim	L-4390
Natriumorhtovanadat	ICN Biomedicals Inc., Aurora,	159564
	Ohio, USA	
Natriumpyruvat	Biochrom AG	L0473
Natronlauge, 1 mol/L (NaOH)	Merck KgaA, Darmstadt	1.09137
NovaRed Substrate Kit	Vector Labs, Burlingame, CA,	SK-4800
	USA	
Oligo-dT Primer (mM)	Eurofins MWG Operon,	
	Ebersberg, Germany	
Ornidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim	05879
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim	P6148
PBS Tabletten	ICN Biomedicals Inc., Aurora,	2810307
	Ohio, USA	
PEG-it Virus Precipitation Solution (5x)	System Biosciences, Mountain	LV810A-1
	View, CA, USA	
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Life Technologies GmbH,	15140-122
	Darmstadt	_
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim	P3504
	Sigmo Aldrich Stoinhoim	D0033

Restore [™] Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	21059
Retinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim	R2625
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim	R5000
RNase Out, Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	10777-019
Roti Block	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	A151.1
Salzsäure 1mol/L	Merck KgaA, Darmstadt	1.09057
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA	50004
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	34080
SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	34080
SuperScriptII Reverse Transcriptase	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	18064-014
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (10x)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	15558-026
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	10342-020
Temozolomid	Sigma-Aldrich, Steinheim	76899
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim	T1503
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt	
Topotecan hydrochlorid hydrate	Sigma-Aldrich, Steinheim	T2705
0,05% Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	25300-054
Tween-20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	37470
Collagen Solution	StemCell Technologies, Grenoble, France	04902
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (30%)	Merck KGaA, Darmstadt	107209
Ziegenserum	DakoDeutschland GmbH	X0907

Tabelle A1: Chemikalien

5.4 Ergebnisse der bioinformatischen Mikroarray-Auswertung

KEGG Term (Originalangabe)	Anzahl der differenziell regulierten Gene/KEGG Term	%-Anteil	P-Wert
GO:0001666~response to hypoxia	17	9,714	0,000
GO:0070482~response to oxygen levels	17	9,714	0,000
GO:0005996~monosaccharide metabolic process	18	10,286	0,000
GO:0019318~hexose metabolic process	17	9,714	0,000
GO:0006006~glucose metabolic process	15	8,571	0,000
GO:0006096~glycolysis	10	5,714	0,000
GO:0006007~glucose catabolic process	10	5,714	0,000
GO:0044275~cellular carbohydrate catabolic process	11	6,286	0,000
GO:0019320~hexose catabolic process	10	5,714	0,000
GO:0046365~monosaccharide catabolic process	10	5,714	0,000
GO:0046164~alcohol catabolic process	10	5,714	0,000
GO:0016052~carbohydrate catabolic process	11	6,286	0,000
GO:0006000~fructose metabolic process	6	3,429	0,000
GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	16	9,143	0,000

GO:0034637~cellular carbohydrate biosynthetic process	8	4,571	0,000
GO:0016051~carbohydrate biosynthetic process	8	4,571	0,000
GO:0001568~blood vessel development	11	6,286	0,000
GO:0048878~chemical homeostasis	16	9,143	0,000
GO:0001944~vasculature development	11	6,286	0,000
GO:0044057~regulation of system process	12	6,857	0,001
GO:0048514~blood vessel morphogenesis	10	5,714	0,001
GO:0046364~monosaccharide biosynthetic process	5	2,857	0,001
GO:0010033~response to organic substance	19	10,857	0,001
GO:0006090~pyruvate metabolic process	5	2,857	0,001
GO:0030388~fructose 1,6-bisphosphate metabolic	3	1,714	0,001
GO:0046165~alcohol biosynthetic process	5	2 857	0.001
GO:0009719~response to endogenous stimulus	13	7 429	0.002
GO:0044264~cellular polysaccharide metabolic process	5	2 857	0.002
GO:0006094~aluconeogenesis	4	2 286	0.003
GO:0051259~protein oligomerization	8	4 571	0.003
GO:0030005~cellular di- tri-valent inorganic cation	6	1,071	0,000
homeostasis	9	5,143	0,003
GO:0007595~lactation	4	2,286	0,004
GO:0006874~cellular calcium ion homeostasis	8	4,571	0,004
GO:0055074~calcium ion homeostasis	8	4.571	0.004
GO:0055066~di tri-valent inorganic cation homeostasis	9	5.143	0.004
GO:0019319~hexose biosynthetic process	4	2.286	0.005
GQ:0006875~cellular metal ion homeostasis	8	4,571	0.006
GO:0005977~glycogen metabolic process	4	2,286	0.006
GQ:0006073~cellular glucan metabolic process	4	2,286	0.006
GO:0044042~glucan metabolic process	4	2 286	0.006
GO:0001525~angiogenesis	7	4 000	0.006
GO:0030003~cellular cation homeostasis	9	5 143	0.006
GO:0055065~metal ion homeostasis	8	4 571	0.007
GO:0042592~homeostatic process	17	9 714	0.008
GO:0006873~cellular ion homeostasis	11	6 286	0.008
GO:0055082~cellular chemical homeostasis	11	6,286	0,000
GO:0051480~cvtosolic calcium ion homeostasis	6	3 4 2 9	0,000
GO:0006112~energy reserve metabolic process	4	2 286	0,000
GO:0000112~energy reserve metabolic process	4	2,200	0,010
GO:0050773 regulation of dendrite development	3	1 71/	0,011
GO:0055080-cation homeostasis	9	5 1/3	0,012
CO:0019725, cellular homeostasis	12	6 857	0,013
CO:0050801, ion homeostasis	11	6,007	0,013
	6	0,200	0,014
CO:0022504~regulation of cell morphogenesis	12	5,429	0,015
GO:0032504~Inditicendial organism reproduction	12	0,007	0,015
organism	12	6,857	0,015
GO:0010648~negative regulation of cell communication	8	4,571	0,018
GO:0048545~response to steroid hormone stimulus	7	4,000	0,019
GO:0055114~oxidation reduction	14	8,000	0,020
GO:0009725~response to hormone stimulus	10	5,714	0,021
GO:0008037~cell recognition	4	2,286	0,022
GO:0001765~membrane raft formation	2	1,143	0,022
GO:0001569~patterning of blood vessels	3	1,714	0,022
GO:0008643~carbohydrate transport	4	2,286	0,026
GO:0030879~mammary gland development	4	2,286	0,030

GO:0048167~regulation of synaptic plasticity	4	2,286	0,031
GO:0007204~elevation of cytosolic calcium ion	5	2,857	0,032
concentration	-	,	- ,
GO:0005976~polysaccharide metabolic process	5	2,857	0,032
GO:0042493~response to drug	7	4,000	0,032
GO:0009968~negative regulation of signal transduction	7	4,000	0,032
GO:0010243~response to organic nitrogen	4	2,286	0,033
GO:0030967~ER-nuclear sterol response pathway	2	1,143	0,033
GO:0033692~cellular polysaccharide biosynthetic	3	1.714	0.033
process	-	,	- ,
GO:0031345~negative regulation of cell projection	3	1,714	0,038
Organization			
development	4	2,286	0,041
GO:0051924~regulation of calcium ion transport	Δ	2 286	0.041
CO-0011724-regulation of calcium for transport		2,200	0,041
GO:0014706~striated muscle tissue development	5	2,857	0,042
GO:0045768~positive regulation of anti-apoptosis	3	1,714	0,043
GO:0006003~fructose 2,6-bisphosphate metabolic process	2	1,143	0,044
GO:0006991~response to sterol depletion	2	1,143	0,044
GO:0032933~SREBP-mediated signaling pathway	2	1,143	0,044
GO:0001936~regulation of endothelial cell proliferation	3	1,714	0,049
GO:0060537~muscle tissue development	5	2,857	0,049
GO:0008219~cell death	14	8,000	0,049

Tabelle A2: Zusammenfassung der Ergebnisse der GO Term-Analyse mittels der DAVID-Plattform aller unter akuter Hypoxie induzierten Gene. Angeben sind alle GO-Terms bis zu einerm Signifikanzniveau von $p \le 0,05$.

KEGG Term (Originalangabe)	Anzahl der differenziell	%-Anteil	P-Wert
	regulierten Gene/KEGG Term		
GO:0007049~cell cycle	133	14,119	0,000
GO:0022402~cell cycle process	106	11,253	0,000
GO:0022403~cell cycle phase	87	9,236	0,000
GO:0000278~mitotic cell cycle	78	8,280	0,000
GO:0000279~M phase	73	7,749	0,000
GO:000087~M phase of mitotic cell cycle	55	5,839	0,000
GO:0006259~DNA metabolic process	85	9,023	0,000
GO:0000280~nuclear division	54	5,732	0,000
GO:0007067~mitosis	54	5,732	0,000
GO:0048285~organelle fission	55	5,839	0,000
GO:0051301~cell division	59	6,263	0,000
GO:0006260~DNA replication	43	4,565	0,000
GO:0006281~DNA repair	46	4,883	0,000
GO:0006974~response to DNA damage stimulus	54	5,732	0,000
GO:0007051~spindle organization	17	1,805	0,000
GO:0000075~cell cycle checkpoint	23	2,442	0,000
GO:0007059~chromosome segregation	21	2,229	0,000
GO:0051726~regulation of cell cycle	45	4,777	0,000
GO:0033554~cellular response to stress	63	6,688	0,000
GO:0000070~mitotic sister chromatid segregation	13	1,380	0,000
GO:0000819~sister chromatid segregation	13	1,380	0,000
GO:0051329~interphase of mitotic cell cycle	21	2,229	0,000
GO:0007017~microtubule-based process	35	3,715	0,000

GO:0000226~microtubule cytoskeleton organization	25	2,654	0,000
GO:0051325~interphase	21	2,229	0,000
GO:0006261~DNA-dependent DNA replication	15	1,592	0,000
GO:0006302~double-strand break repair	15	1,592	0,000
GO:0006310~DNA recombination	19	2,017	0,000
GO:0006270~DNA replication initiation	8	0,849	0,000
GO:0007010~cytoskeleton organization	47	4,989	0,000
GO:0034621~cellular macromolecular complex subunit	40	1 246	0.000
organization	40	4,240	0,000
GO:0051276~chromosome organization	50	5,308	0,000
GO:0043933~macromolecular complex subunit	66	7 006	0 000
organization		.,	0,000
GO:0034622~cellular macromolecular complex assembly	36	3,822	0,000
GO:0065003~macromolecular complex assembly	62	6,582	0,000
GO:0051297~centrosome organization	10	1,062	0,000
GO:0000082~G1/S transition of mitotic cell cycle	13	1,380	0,000
GO:0009262~deoxyribonucleotide metabolic process	9	0,955	0,000
GO:0031570~DNA integrity checkpoint	12	1,274	0,000
GO:0007052~mitotic spindle organization	7	0,743	0,000
GO:0031023~microtubule organizing center organization	10	1,062	0,000
GO:0007093~mitotic cell cycle checkpoint	11	1,168	0,000
GO:0006323~DNA packaging	17	1,805	0,000
GO:0006396~RNA processing	51	5,414	0,000
GO:0051321~meiotic cell cycle	16	1,699	0,000
GO:0000724~double-strand break repair via homologous	7	0,743	0,000
recombination	7	0.740	0.000
	1	0,743	0,000
GO:0009394~2 -deoxynbonucleolide metabolic process	1	0,743	0,001
GO:0000203~cell prolleration	42	4,409	0,001
CO:0006461, protein complex procembly	47	4,909	0,001
CO:0007246, regulation of mitotic coll cycle	47	4,909	0,001
CO:0051227 M phase of moiotic cell cycle	20	2,123	0,001
GO:0051327~M phase of melotic cell cycle	15	1,592	0,001
GO.0007120~IIIelosis	15 F	1,592	0,001
GO:007060~millouc metaphase plate congression	5	0,531	0,001
nucleic acid biosynthetic process	23	2,442	0,001
GO:0034404~nucleobase, nucleoside and nucleotide			
biosynthetic process	23	2,442	0,001
GO:0050000~chromosome localization	6	0,637	0,001
GO:0051303~establishment of chromosome localization	6	0,637	0,001
GO:0000077~DNA damage checkpoint	10	1,062	0,001
GO:0051640~organelle localization	14	1,486	0,002
GO:0043623~cellular protein complex assembly	20	2,123	0,002
GO:000089~mitotic metaphase	4	0,425	0,002
GO:0010212~response to ionizing radiation	11	1,168	0,002
GO:0006397~mRNA processing	32	3,397	0,002
GO:0051225~spindle assembly	6	0,637	0,002
GO:0006297~nucleotide-excision repair, DNA gap filling	6	0,637	0,002
GO:0008380~RNA splicing	29	3,079	0,002
GO:0000377~RNA splicing, via transesterification	10	2 017	0.002
reactions with bulged adenosine as nucleophile	19	2,017	0,002
GO:0000375~RNA splicing, via transesterification	19	2,017	0,002
	10	_,,,	0.000
GO:0000398~nuclear mRNA splicing, via spliceosome	19	2,017	0,002
GO:0051310~metaphase plate congression	5	0,531	0,002
----------------------------------------------------------	----------	-------	---------
GO:0009116~nucleoside metabolic process	11	1,168	0,003
GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	32	3,397	0,003
GO:0006289~nucleotide-excision repair	10	1,062	0,003
GO:0065004~protein-DNA complex assembly	12	1,274	0,003
GO:0007098~centrosome cycle	6	0,637	0,003
GO:0009165~nucleotide biosynthetic process	21	2,229	0,003
GO:0006333~chromatin assembly or disassembly	15	1,592	0,004
GO:0009314~response to radiation	22	2,335	0,004
GO:0010564~regulation of cell cycle process	15	1,592	0,004
GO:0042770~DNA damage response, signal	10	1 074	0.005
transduction	12	1,274	0,005
GO:0009120~deoxyribonucleoside metabolic process	4	0,425	0,005
GO:0051323~metaphase	4	0,425	0,005
GO:0046112~nucleobase biosynthetic process	5	0,531	0,006
GO:0009264~deoxyribonucleotide catabolic process	5	0,531	0,006
GO:0031497~chromatin assembly	11	1,168	0,007
GO:0008033~tRNA processing	11	1,168	0,007
GO:0042455~ribonucleoside biosynthetic process	4	0,425	0,008
GO:0009163~nucleoside biosynthetic process	4	0,425	0,008
GO:0042451~purine nucleoside biosynthetic process	4	0,425	0,008
GO:0046129~purine ribonucleoside biosynthetic process	4	0,425	0,008
GO:0016071~mRNA metabolic process	33	3,503	0,009
GO:0030261~chromosome condensation	6	0,637	0,010
GO:0008360~regulation of cell shape	9	0,955	0,010
GO:0051052~regulation of DNA metabolic process	14	1,486	0,011
GO:0009161~ribonucleoside monophosphate metabolic	6	0.637	0.012
process	•	0,001	•,• · =
metabolic process	4	0,425	0,012
GO:0009113~purine base biosynthetic process	4	0,425	0,012
GO:0000731~DNA synthesis during DNA repair	4	0,425	0,012
GO:0051298~centrosome duplication	4	0,425	0,012
GO:0034728~nucleosome organization	11	1,168	0,012
GO:0006220~pyrimidine nucleotide metabolic process	7	0,743	0,012
GO:0051656~establishment of organelle localization	10	1,062	0,013
GO:0009119~ribonucleoside metabolic process	8	0,849	0,014
GO:0006334~nucleosome assembly	10	1,062	0,015
GO:0034470~ncRNA processing	19	2,017	0,015
GO:0031398~positive regulation of protein ubiquitination	11	1,168	0,015
GO:0032392~DNA geometric change	5	0,531	0,016
GO:0032508~DNA duplex unwinding	5	0,531	0,016
GO:0000320~re-entry into mitotic cell cycle	3	0,318	0,018
GO:0031396~regulation of protein ubiquitination	12	1,274	0,020
GO:0009219~pyrimidine deoxyribonucleotide metabolic	4	0,425	0,021
process	<u>^</u>	0.027	0.001
GO:0046128~purine ribonucleoside metabolic process	6	0,637	0,021
GO:0042278~purine nucleoside metabolic process	0	0,637	0,021
metabolic process	5	0,531	0,023
GO:0009126~purine nucleoside monophosphate	5	0,531	0,023
GO:0033261~regulation of S phase	5	0.531	0.023
GO:0006730~one-carbon metabolic process	13	1.380	0.023
GO:0006399~tRNA metabolic process	13	1,380	0,028

GO:0006271~DNA strand elongation during DNA replication	3	0,318	0,028
GO:0051642~centrosome localization	3	0,318	0,028
GO:0009155~purine deoxyribonucleotide catabolic process	3	0,318	0,028
GO:0009123~nucleoside monophosphate metabolic process	9	0,955	0,029
GO:0006163~purine nucleotide metabolic process	18	1,911	0,030
GO:0000079~regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	8	0,849	0,031
GO:0051437~positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	9	0,955	0,031
GO:0006221~pyrimidine nucleotide biosynthetic process	5	0,531	0,032
GO:0009112~nucleobase metabolic process	5	0,531	0,032
GO:0001556~oocyte maturation	4	0,425	0,033
GO:0006144~purine base metabolic process	4	0,425	0,033
GO:0031109~microtubule polymerization or depolymerization	4	0,425	0,033
GO:0007076~mitotic chromosome condensation	4	0,425	0,033
GO:0009259~ribonucleotide metabolic process	15	1,592	0,034
GO:0051443~positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity	9	0,955	0,036
GO:0009156~ribonucleoside monophosphate	5	0,531	0,037
GO:0010605~negative regulation of macromolecule	53	5,626	0,039
GO:0051439~regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	9	0,955	0,039
GO:0043414~biopolymer methylation	9	0,955	0,039
GO:0009628~response to abiotic stimulus	30	3,185	0,040
GO:0006268~DNA unwinding during replication	4	0,425	0,040
GO:0051294~establishment of spindle orientation	3	0,318	0,041
GO:0000132~establishment of mitotic spindle orientation	3	0,318	0,041
GO:0022616~DNA strand elongation	3	0,318	0,041
GO:0051351~positive regulation of ligase activity	9	0,955	0,045
GO:0009411~response to UV	8	0,849	0,047
GO:0051258~protein polymerization	7	0,743	0,047
GO:0010165~response to X-ray	4	0,425	0,049
GO:0000097~sulfur amino acid biosynthetic process	4	0,425	0,049
GO:0010948~negative regulation of cell cycle process	5	0,531	0,049

Tabelle A3: Zusammenfassung der Ergebnisse der GO Term-Analyse mittels der DAVID-Plattform aller unter akuter Hypoxie herunterregulierten Gene. Angeben sind alle GO-Terms bis zu einerm Signifikanzniveau von $p \le 0,05$.

KEGG Term (Originalangabe)	Anzahl der differenziell regulierten Gene/KEGG Term	%-Anteil	P-Wert
GO:0007155~cell adhesion	39	11,080	0,000
GO:0022610~biological adhesion	39	11,080	0,000
GO:0030182~neuron differentiation	29	8,239	0,000
GO:0048812~neuron projection morphogenesis	19	5,398	0,000
GO:0031175~neuron projection development	20	5,682	0,000
GO:0042127~regulation of cell proliferation	39	11,080	0,000
GO:0048666~neuron development	23	6,534	0,000
GO:0030030~cell projection organization	24	6,818	0,000

GO:0032990-cell part morphogenesis 19 5.398 0.000 GO:0001568-blood vessel development 18 5,114 0.000 GO:0001568-blood vessel development 18 5,114 0.000 GO:0001568-blood vessel development 18 5,114 0.000 GO:0001944-regulation of cell development 18 5,114 0.000 GO:0001944-vasculature development 18 5,114 0.000 GO:00051960-regulation of neuroagenesis 14 3,977 0.000 GO:00051960-regulation of neuroagenesis 14 3,977 0.000 GO:00051960-regulation of neuroagenesis 17 4,830 0.000 GO:0005026-cell morphogenesis 21 5,666 0.000 GO:000526-cell morphogenesis 12 3,409 0.000 GO:0004826-cell morphogenesis 15 4,281 0.000 GO:0004826-cell morphogenesis 12 3,409 0.000 GO:0004826-cell motion 18 5,114 0.000 GO:0004826-cell motion 18 5,114 0.000 G	GO:0048858~cell projection morphogenesis	19	5,398	0,000
GO:0007409-axonogenesis 16 4.545 0.000 GO:0061284-regulation of cell development 18 5.114 0.000 GO:0060284-regulation of cell development 18 5.114 0.000 GO:0060284-regulation of cell proliferation 24 6.818 0.000 GO:0005284-regulation of neurogenesis 14 3.977 0.000 GO:005076-regulation of neurogenesis 14 3.977 0.000 GO:005076-regulation of neurous system development 15 4.261 0.000 GO:0000902-rell morphogenesis involved in 17 4.830 0.000 GO:000092-cell motion 25 7.102 0.000 GO:0000828-cell motion 18 5.114 0.000 GO:0001666-response to hypoxia 12 3.409 0.000 GO:0004827-cell motility 18 5.114 0.000 GO:0004828-cell motility 18 5.114 0.000 GO:0004827-cell motility 18 5.114 0.000 GO:0004828-cell motility 18 5.114 0.000 GO:0004850-response to cargen tevels 12	GO:0032990~cell part morphogenesis	19	5,398	0,000
GC:0001568-blood vessel development 18 5,114 0,000 GO:0060284-regulation of cell proliferation 24 6,818 0,000 GO:0001944-vasculature development 18 5,114 0,000 GO:000267-cell morphogenesis involved in neuron 16 4,545 0,000 GO:0051967-regulation of neurogenesis 14 3,977 0,000 GO:0051967-regulation of neurogenesis 14 3,977 0,000 GO:0051967-regulation of neurogenesis 17 4,830 0,000 GO:0001501-skeletal system development 20 5,682 0,000 GO:0001902-cell morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:0001667-regulation of physia 12 3,409 0,000 GO:0001667-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:0001667-response to oxygen levels 12 3,409 0,000 GO:0001667-response to oxygen levels 12 3,409 0,000 GO:0001667-response to oxygen levels 12 3,409 0,000 GO:00070442-response to matphogenesis 21	GO:0007409~axonogenesis	16	4,545	0,000
GC:0060284-regulation of cell evelopment 16 4.545 0,000 GO:0001944-positive regulation of cell proliferation 24 6,818 0,000 GO:0001944-positive regulation of neuropenesis 14 5,114 0,000 GO:0001944-positive regulation of neurogenesis 14 3,977 0,000 GO:00050767-regulation of neurogenesis 14 3,977 0,000 GO:00050767-regulation of neurogenesis 14 3,977 0,000 GO:0005014-cell morphogenesis 17 4,830 0,000 GO:00050151-skeletal system development 20 5,682 0,000 GO:00050151-skeletal system development 20 5,682 0,000 GO:00050177-cell migration 18 5,114 0,000 GO:0004666-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:00051677-cell migration 8 5,114 0,000 GO:00046870-cell morphogenesis 11 3,125 0,001 GO:00051677-cell cealization of cell 18 5,114 0,000 GO:00051777-cell cealization of cell	GO:0001568~blood vessel development	18	5,114	0,000
GC:0008284-positive regulation of cell proliferation 24 6.818 0,000 GO:00048667-cell morphogenesis involved in neuron differentiation 16 4,545 0,000 GO:0050767-regulation of neurogenesis 14 3,977 0,000 GO:0050767-regulation of neurogenesis 14 4,800 0,000 GO:0050767-regulation of neurogenesis 17 4,830 0,000 GO:0000904-cell morphogenesis 17 4,830 0,000 GO:00001501-skeletal system development 20 5,882 0,000 GO:0001667-regponse to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:00048214-blood vessel morphogenesis 15 4,261 0,000 GO:00048516-neuron migration 18 5,114 0,000 GO:00048514-blood vessel morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:00048514-blood vessel morphogenesis 12 3,409 0,000 GO:00048514-blood vessel morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:00048514-blood vessel morphogenesis 21 5,966 0,001 GO:0001624-regulation of cell	GO:0060284~regulation of cell development	16	4,545	0,000
GC:0001944-vasculature development 18 5,114 0,000 GO:0048667-cell morphogenesis involved in neuron 16 4,545 0,000 GO:0050767-regulation of neurogenesis 14 3,977 0,000 GO:0059067-regulation of neurogenesis 14 3,977 0,000 GO:005160-regulation of nervous system development 15 4,261 0,000 GO:000510-skeletal system development 20 5,682 0,000 GO:0001501-skeletal system development 25 7,102 0,000 GO:0001666-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:0001667-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:0001667-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:0004827-esponse to hypoxia 18 5,114 0,000 GO:0048670-cell moliny 18 5,114 0,000 GO:004764-response to morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:0047671-embryonic cranial skeleton morphogenesis 11 3,125 0,001 GO:0047671-esponse to endogenous stimulus 21	GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	24	6,818	0,000
GC:0048667-cell morphogenesis involved in neuron differentiation 16 4,545 0.000 GC:0050767-regulation of neurogenesis 14 3.977 0.000 GC:0050767-regulation of neurogenesis involved in differentiation 17 4,830 0.000 GC:0000904-cell morphogenesis involved in differentiation 17 4,830 0.000 GC:0000922-cell morphogenesis 21 5,966 0.000 GC:0004524-cell morphogenesis 11 5,966 0.000 GC:0045612-response to hypoxia 12 3,409 0.000 GC:0045612-response to hypoxia 12 3,409 0.000 GC:0048514-blood vessel morphogenesis 15 4,261 0.000 GC:0048514-blood vessel morphogenesis 21 5,966 0.000 GC:004850-cell motility 18 5,114 0.000 GC:004767-regulation of cell 18 5,114 0.000 GC:004780-cell motility 18 5,114 0.000 GC:004780-regulation of neuron differentiation 11 3,125 0.001 GC:004780-sell advestor 8 <td>GO:0001944~vasculature development</td> <td>18</td> <td>5,114</td> <td>0,000</td>	GO:0001944~vasculature development	18	5,114	0,000
differentiation 10 4,3977 0,000 GC:0050767-regulation of neurogenesis 14 3,977 0,000 GC:0050960-regulation of neurogenesis 11 4,261 0,000 GC:0000904-cell morphogenesis 17 4,830 0,000 GC:0005028-cell morphogenesis 21 5,6682 0,000 GC:0001606-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GC:0007482-cell morphogenesis 15 4,261 0,000 GC:0004666-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GC:00070482-response to oxygen levels 12 3,409 0,000 GC:0001764hccalrzation of cell 18 5,114 0,000 GC:0001764-neuron migration 8 2,273 0,000 GC:0001764-neuron migration 11 3,125 0,001 GC:0007519-response to endogenous stimulus 21 5,966 0,001 GC:0007519-response to endogenous stimulus 21 5,966 0,001 GC:0007519-response to endogenous stimulus 21 5,966 0,001 </td <td>GO:0048667~cell morphogenesis involved in neuron</td> <td>16</td> <td>1 5 1 5</td> <td>0.000</td>	GO:0048667~cell morphogenesis involved in neuron	16	1 5 1 5	0.000
GC:0050767-regulation of neurogenesis 14 3.977 0.000 GC:0051960-regulation of neurous system development 15 4.261 0.000 GC:00050964-cell morphogenesis involved 17 4.830 0.000 GC:0001501-skeletal system development 20 5.682 0.000 GC:0001501-skeletal system development 20 5.682 0.000 GC:0001501-skeletal system development 21 5.966 0.000 GC:0004666-response to hypoxia 12 3.409 0.000 GC:00048514-blood vessel morphogenesis 15 4.261 0.000 GC:00048514-blood vessel morphogenesis 12 3.409 0.000 GC:004851A-blood vessel morphogenesis 21 5.966 0.000 GC:00048510-cell motility 18 5.114 0.000 GC:0001764-neuron migration 8 2.273 0.000 GC:00048701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1.420 0.001 GC:0007519-skeletal muscle organ development 8 2.273 0.001 GC:0005770-regulation of neuron differentiation 11 3.125 0.001 GC:0005770-regulation of axongenesis 7 1.98	differentiation	10	4,545	0,000
GO:0051960-regulation of nervous system development 15 4,261 0,000 GO:0000904-cell morphogenesis involved in 17 4,830 0,000 GO:0000922-cell morphogenesis 20 5,682 0,000 GO:0000922-cell morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:00016477-cell migration 18 5,114 0,000 GO:00016467-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:000486514-blood vessel morphogenesis 15 4,261 0,000 GO:00048670-cell motility 18 5,114 0,000 GO:0004870-cell motility 18 5,114 0,000 GO:0004870-cell motility 18 5,114 0,000 GO:0001674-localization of cell 18 5,114 0,000 GO:0001764-neuron migration 8 2,273 0,000 GO:0001764-neuron migration 11 3,125 0,001 GO:00048704-regulation of neuron differentiation 11 3,125 0,001 GO:0007519-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:00051592-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:00051592-response to calcium ion 7 1,989 </td <td>GO:0050767~regulation of neurogenesis</td> <td>14</td> <td>3,977</td> <td>0,000</td>	GO:0050767~regulation of neurogenesis	14	3,977	0,000
GO:3000904-cell morphogenesis involved in 17 4,830 0,000 GO:30001501-skeletal system development 20 5,682 0,000 GO:30006928-cell morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:30001666-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:30048514-blood vessel morphogenesis 15 4,261 0,000 GO:30048514-blood vessel morphogenesis 15 4,261 0,000 GO:30048514-blood vessel morphogenesis 12 3,409 0,000 GO:30048870-cell motility 18 5,114 0,000 GO:30051674-localization of cell 18 5,114 0,000 GO:3004289-cellular component morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:3004870-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 GO:3004971-empronic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 GO:3004701-empronic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 GO:3004701-empronic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001	GO:0051960~regulation of nervous system development	15	4,261	0,000
Construction 20 5,682 0,000 GC:0001501-skeletal system development 25 7,102 0,000 GC:0001501-skeletal system development 25 7,102 0,000 GC:0001667-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GC:001667-response to oxygen levels 12 3,409 0,000 GC:00051674-localization of cell 18 5,114 0,000 GC:0001664-response to oxygen levels 12 3,409 0,000 GC:00051674-localization of cell 18 5,114 0,000 GC:0001664-response to myponent morphogenesis 21 5,966 0,000 GC:0001664-response to metal ion 11 3,125 0,000 GC:0001764-response to metal ion 11 3,125 0,001 GC:00045664-regulation of neuron differentiation 111 3,125 0,001 GC:0007519-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GC:000538-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GC:00051592-response to enclonincin 7 1,989	GO:0000904~cell morphogenesis involved in differentiation	17	4,830	0,000
GC:0006928-cell motion 25 7,102 0,000 GO:000692-cell morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:001647-cell migration 18 5,114 0,000 GO:00048514-blood vessel morphogenesis 15 4,261 0,000 GO:0048870-cell motility 18 5,114 0,000 GO:0048870-cell motility 18 5,114 0,000 GO:0003298-cellular component morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:001038-response to metal ion 11 3,125 0,000 GO:0001764-neuron migration 8 2,273 0,000 GO:0001764-regulation of neuron differentiation 11 3,125 0,001 GO:00017619-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:0005139-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:00051592-response to aclaium ion 7 1,989 0,001 GO:0006038-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:00051592-response to aclaium ion 7 1,989 0,001	GO:0001501~skeletal system development	20	5,682	0,000
GC:0000902-cell morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:0016477-cell migration 18 5,114 0,000 GO:00048814-blood vessel morphogenesis 15 4,261 0,000 GO:0048814-blood vessel morphogenesis 12 3,409 0,000 GO:0048870-cell motility 18 5,114 0,000 GO:0051674-localization of cell 18 5,114 0,000 GO:00501674-localization of cell 18 5,114 0,000 GO:00501764-neuron migration 8 2,273 0,000 GO:0048701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 GO:0048701-embryonic skeletal muscle dissue development 8 2,273 0,001 GO:0051582-skeletal muscle dissue development 8 2,273 0,001 GO:0051582-response to calcium ion	GO:0006928~cell motion	25	7,102	0,000
GO:0016477-cell migration 18 5,114 0,000 GO:0001666-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:00048514-blood vessel morphogenesis 15 4,261 0,000 GO:0070482-response to oxygen levels 12 3,409 0,000 GO:0070482-response to oxygen levels 12 3,409 0,000 GO:0051674-localization of cell 18 5,114 0,000 GO:0003289-cellular component morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:0004088701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 GO:0040719-response to endogenous stimulus 21 5,966 0,001 GO:0040564-regulation of neuron differentiation 11 3,125 0,001 GO:0040564-regulation of neuron differentiation 11 3,125 0,001 GO:0006719-skeletal muscle dissue development 8 2,273 0,001 GO:00051532-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:0005070-regulation of axonogenesis 7 1,989 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system de	GO:0000902~cell morphogenesis	21	5,966	0.000
GO:0001666-response to hypoxia 12 3,409 0,000 GO:0001666-response to morphogenesis 15 4,261 0,000 GO:00048514-blood vessel morphogenesis 12 3,409 0,000 GO:0048870-cell motility 18 5,114 0,000 GO:00051674-localization of cell 18 5,114 0,000 GO:0001764-neuron migration 8 2,273 0,000 GO:001038-response to metal ion 11 3,125 0,000 GO:00009719-response to metal ion 11 3,125 0,001 GO:00009719-response to endogenous stimulus 21 5,966 0,001 GO:0001638-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:0007519-skeletal muscle tissue development 8 2,273 0,001 GO:00060538-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:00061592-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:0006348-bone development 8 2,273 0,001 GO:00048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989	GO:0016477~cell migration	18	5.114	0.000
G0:0048514-blood vessel morphogenesis 12 1,261 0,000 G0:0048514-blood vessel morphogenesis 12 3,409 0,000 G0:0048870-cell motility 18 5,114 0,000 G0:0048870-cellular component morphogenesis 21 5,966 0,000 G0:0001764-neuron migration 8 2,273 0,000 G0:00048701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 G0:00048701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 G0:00048701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 G0:0006038-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 G0:0005192-response to calcium ion 7 1,989 0,001 G0:0006038-bone development 8 2,273 0,001 G0:0006038-bone development 10 2,841 0,001 G0:0006038-bone development 10 2,841 0,001 G0:0006376-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 G0:0001525-angiogenesis 11	GO:0001666~response to hypoxia	12	3,409	0.000
Display 10 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 <t< td=""><td>GO:0048514~blood vessel morphogenesis</td><td>15</td><td>4 261</td><td>0,000</td></t<>	GO:0048514~blood vessel morphogenesis	15	4 261	0,000
Display and the set of the set o	GO:0070482~response to oxygen levels	12	3 409	0,000
00:0000000000000000000000000000000000	GO:0048870~cell motility	12	5 114	0,000
GO:000107 10 3,114 0,000 GO:00022989-cellular component morphogenesis 21 5,966 0,000 GO:0001764neuron migration 8 2,273 0,000 GO:0002989-cellular component morphogenesis 5 1,420 0,001 GO:0048701embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 GO:004564regulation of neuron differentiation 111 3,125 0,001 GO:004633skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:0016337-cell-cell adhesion 16 4,545 0,001 GO:0050770-regulation of axonogenesis 7 1,989 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,002 GO:	GO:0051674-localization of cell	18	5 11/	0,000
00:0002503 21 0,000 00:0001764-neuron migration 8 2,273 0,000 00:0010038-response to metal ion 11 3,125 0,000 00:001764-neuron migration 11 3,125 0,000 00:0048701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 00:0009719-response to endogenous stimulus 21 5,966 0,001 00:0007519-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 00:000538-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 00:00050770-regulation of axonogenesis 7 1,989 0,001 00:00060348-bone development 10 2,841 0,001 00:0006348-bone development 8 2,273 0,001 00:0048704-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 00:0043627-response to organic substance 29 8,239 0,002 00:001033-response to organic substance 29 8,239 0,002 00:001034607-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002	GO:0032989~cellular component morphogenesis	21	5 966	0,000
00:0001038-response to metal ion 01 3,125 0,000 GO:0010038-response to metal ion 11 3,125 0,000 GO:001038-response to metal ion 11 3,125 0,001 GO:001038-response to endogenous stimulus 21 5,9666 0,001 GO:0000719-response to endogenous stimulus 21 5,9666 0,001 GO:0000538-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:0005538-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:0005079-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:00050770-regulation of axonggenesis 7 1,989 0,001 GO:0000348-bone development 10 2,841 0,001 GO:0001256-angiogenesis 7 1,989 0,001 GO:0001262-response to organic substance 29 8,233 0,002 GO:0001527-response to organic substance 29 8,233 0,002 GO:00012604-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0001272-response to organic nitrogen 7 1	GO:0001764~neuron migration	8	2 273	0,000
GO:001003701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 1 3,125 0,000 GO:0048701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 GO:0048701-embryonic cranial skeleton morphogenesis 5 1,420 0,001 GO:0048664-regulation of neuron differentiation 11 3,125 0,001 GO:0048664-regulation of neuron differentiation 11 3,125 0,001 GO:0045664-regulation of neuron differentiation 8 2,273 0,001 GO:0016337-cell-cell adhesion 16 4,545 0,001 GO:0051592-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:0050770-regulation of axonogenesis 7 1,989 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:0001525-angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:0001525-angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:0001525-angiogenesis 11 3,693 0,002 GO:0001624-response to organ	CO:0010038, response to metal ion	11	2,275	0,000
GO:0045061	CO:0018701, embryonic cranial skeleton morphogenesis	5	1 /20	0,000
GO:0043004-regulation of neuron interferintation 11 3,125 0,001 GO:0009719-response to endogenous stimulus 21 5,966 0,001 GO:0007519-skeletal muscle tissue development 8 2,273 0,001 GO:0007519-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:0016337-cell-cell adhesion 16 4,545 0,001 GO:00050770-regulation of axonogenesis 7 1,989 0,001 GO:0009612-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:0048706-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,002 GO:001625-angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:0007517-muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0007517-muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0010243-response	GO:0045664 regulation of neuron differentiation	J 11	2 1 2 5	0,001
GO: 00097 19-response to endogenous stimulus 21 3,966 0,001 GO:0007519skeletal muscle tissue development 8 2,273 0,001 GO:0060538skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:0016337-cell-cell adhesion 16 4,545 0,001 GO:0051592-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:0009612-response to mechanical stimulus 7 1,989 0,001 GO:0048706-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,002 GO:0010033-response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:0017517-muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:001023-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0010243-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0010243-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0010243-r		21	5,125	0,001
GO:0007519-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:0060538-skeletal muscle organ development 8 2,273 0,001 GO:0016337-cell-cell adhesion 16 4,545 0,001 GO:0051592-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:00050770-regulation of axonogenesis 7 1,989 0,001 GO:00060348-bone development 10 2,841 0,001 GO:0048706-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:001525-angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:0007517~muscle organ development 9 2,557 0,002 GO:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:001024607-response to estrogen stimulus 9 2,557 0,002 GO:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0010243-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0048605-cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:0048598-embryonic morphogenesis 16 4,545 <td>GO:0009719~response to endogenous stimulus</td> <td>21</td> <td>0,900</td> <td>0,001</td>	GO:0009719~response to endogenous stimulus	21	0,900	0,001
GO:0000336-skeletal muscle organ development 6 2,273 0,001 GO:0016337-cell-cell adhesion 16 4,545 0,001 GO:0051592-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:0050770-regulation of axonogenesis 7 1,989 0,001 GO:0009612-response to mechanical stimulus 7 1,989 0,001 GO:00048706-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:001525-angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:001633-response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:001632-response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:001033-response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:00103427-response to estrogen stimulus 9 2,557 0,002 GO:0007517-muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0010243-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0010243-response to heat 4 1,136 0,003 GO:0048598-embryonic morphogenesis 16 4	CO:0007519~Skeletal muscle tissue development	0	2,273	0,001
GO:0015357-celliceli adhesion 16 4,545 0,001 GO:0051592-response to calcium ion 7 1,989 0,001 GO:0050770-regulation of axonogenesis 7 1,989 0,001 GO:0009612-response to mechanical stimulus 7 1,989 0,001 GO:0048706-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GO:001525-angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:00043627-response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:0007517-muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0010243-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0034605-cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:00048598-embryonic morphogenesis 16 4,545 0,003 GO:00048598-embryonic morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:00048705-skeletal system morphogenesis <t< td=""><td></td><td>0</td><td>2,213</td><td>0,001</td></t<>		0	2,213	0,001
GO:0061392-response to Calcium for 7 1,969 0,001 GO:0050770-regulation of axonogenesis 7 1,989 0,001 GO:0009612-response to mechanical stimulus 7 1,989 0,001 GO:0060348-bone development 10 2,841 0,001 GO:0048706-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:0001525-angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:00048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GO:0001525-angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:0010033-response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:0007517-muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0010243-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:00048598-embryonic morphogenesis 16 4,545 0,003 GO:00048598-embryonic morphogenesis 11 3,125 0,003 GO:0048598-embryonic morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0048705-skeletal system morphogenesis 9 2,557 <td>CO:0016337~cell-cell adhesion</td> <td>16</td> <td>4,040</td> <td>0,001</td>	CO:0016337~cell-cell adhesion	16	4,040	0,001
GC:0050770~regulation of axonogenesis 7 1,889 0,001 GO:0009612~response to mechanical stimulus 7 1,989 0,001 GO:0006348~bone development 10 2,841 0,001 GO:0048706~embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GO:001525~angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:0048627~response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:00048698~cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:0048698~cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:0009795~response to oxidative stress 11 3,125 0,003 GO:0048545~response to steroid hormone stimulus 12 3,409 0,003 GO:0048545~response to steroid hormone stimulus 12 3,409 0,003 GO:0048545~response to steroid hormone sti	GO:0051592~response to calcium ion	/	1,989	0,001
GC:0009612~response to mechanical stimulus 7 1,889 0,001 GC:00060348~bone development 10 2,841 0,001 GC:0048706~embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GC:00048704~embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GC:0010033~response to organic substance 29 8,239 0,002 GC:00048627~response to estrogen stimulus 9 2,557 0,002 GC:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GC:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GC:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GC:00084605~cellular response to heat 4 1,136 0,003 GC:00084598~embryonic morphogenesis 16 4,545 0,003 GC:00048598~embryonic morphogenesis 11 3,125 0,003 GC:00048598~embryonic morphogenesis 9 2,557 0,003 GC:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GC:0048705~skeletal system morphogenesis	GO:0050770~regulation of axonogenesis	/	1,989	0,001
GC:0060348~bone development 10 2,841 0,001 GC:0048706~embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GC:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GC:001525~angiogenesis 11 3,125 0,002 GC:0010033~response to organic substance 29 8,239 0,002 GC:00048627~response to estrogen stimulus 9 2,557 0,002 GC:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0048605~cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:0048598~embryonic morphogenesis 16 4,545 0,003 GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:00048705~skeletal system morphogenesis <td< td=""><td>GO:0009612~response to mechanical stimulus</td><td>1</td><td>1,989</td><td>0,001</td></td<>	GO:0009612~response to mechanical stimulus	1	1,989	0,001
GO:0048706-embryonic skeletal system development 8 2,273 0,001 GO:0048704-embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GO:001525-angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:0010033-response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:0043627-response to estrogen stimulus 9 2,557 0,002 GO:002604-regulation of cell morphogenesis 10 2,841 0,002 GO:0010243-response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0044659-cellular response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0048598-embryonic morphogenesis 16 4,545 0,003 GO:0048598-embryonic morphogenesis 16 4,545 0,003 GO:0048598-embryonic morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0048705-skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0048705-skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:001503-ossification 9 2,557 0,003 GO:0001503-ossification 9 <	GO:0060348~bone development	10	2,841	0,001
GO:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis 7 1,989 0,001 GO:0001525~angiogenesis 11 3,125 0,002 GO:0010033~response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:00043627~response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0048605~cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:0009725~response to oxidative stress 16 4,545 0,003 GO:0048508~embryonic morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0048705~skeletal system morphogenesis 11 3,125 0,003 GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:001503~ossification 9 2,557 0,003 GO:0001503~ossification 9 2,557 0,004 GO:0048568~embryonic organ development 11 3,125	GO:0048706~embryonic skeletal system development	8	2,273	0,001
GO:0001525~anglogenesis 11 3,125 0,002 GO:0010033~response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:0043627~response to estrogen stimulus 9 2,557 0,002 GO:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0022604~regulation of cell morphogenesis 10 2,841 0,002 GO:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0048605~cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:0009725~response to norphogenesis 16 4,545 0,003 GO:0048598~embryonic morphogenesis 11 3,125 0,003 GO:0009725~response to hormone stimulus 18 5,114 0,003 GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0001503~ossification 9 2,557 0,003 GO:0001503~ossification 9 2,557 0,004 GO:0048568~embryonic organ development 10 2,841 0,004 GO:0048568~embryonic organ development 11 3,125 <td< td=""><td>GO:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis</td><td>1</td><td>1,989</td><td>0,001</td></td<>	GO:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis	1	1,989	0,001
GO:0010033~response to organic substance 29 8,239 0,002 GO:0043627~response to estrogen stimulus 9 2,557 0,002 GO:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0034605~cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:0009725~response to heat 4 1,136 0,003 GO:0006979~response to oxidative stress 11 3,125 0,003 GO:0048545~response to steroid hormone stimulus 12 3,409 0,003 GO:0001503~ossification 9 2,557 0,003 GO:0051129~negative regulation of cellular component organization 10 2,841 0,004 GO:0048568~embryonic organ development 11 3,125 0,004	GO:0001525~anglogenesis	11	3,125	0,002
GO:0043627~response to estrogen stimulus 9 2,557 0,002 GO:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0022604~regulation of cell morphogenesis 10 2,841 0,002 GO:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0034605~cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:0009725~response to hormone stimulus 18 5,114 0,003 GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0048545~response to steroid hormone stimulus 18 5,114 0,003 GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0001503~ossification 9 2,557 0,003 GO:0051129~negative regulation of cellular component organization 10 2,841 0,004 GO:0048568~embryonic organ development 11 3,125 0,004	GO:0010033~response to organic substance	29	8,239	0,002
GO:0007517~muscle organ development 13 3,693 0,002 GO:0022604~regulation of cell morphogenesis 10 2,841 0,002 GO:0010243~response to organic nitrogen 7 1,989 0,002 GO:0034605~cellular response to heat 4 1,136 0,003 GO:0009725~response to heat 16 4,545 0,003 GO:0006979~response to oxidative stress 11 3,125 0,003 GO:0048545~response to oxidative stress 11 3,125 0,003 GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0001503~ossification 9 2,557 0,003 GO:0051129~negative regulation of cellular component organization 10 2,841 0,004 GO:0048568~embryonic organ development 11 3,125 0,004	GO:0043627~response to estrogen stimulus	9	2,557	0,002
GO:0022604~regulation of cell morphogenesis10 $2,841$ $0,002$ GO:0010243~response to organic nitrogen7 $1,989$ $0,002$ GO:0034605~cellular response to heat4 $1,136$ $0,003$ GO:0048598~embryonic morphogenesis16 $4,545$ $0,003$ GO:0009725~response to hormone stimulus18 $5,114$ $0,003$ GO:0006979~response to oxidative stress11 $3,125$ $0,003$ GO:0048705~skeletal system morphogenesis9 $2,557$ $0,003$ GO:0048545~response to steroid hormone stimulus12 $3,409$ $0,003$ GO:00051129~negative regulation of cellular component organization10 $2,841$ $0,004$ GO:0048568~embryonic organ development11 $3,125$ $0,004$	GO:000/51/~muscle organ development	13	3,693	0,002
GO:0010243~response to organic nitrogen71,9890,002GO:0034605~cellular response to heat41,1360,003GO:0048598~embryonic morphogenesis164,5450,003GO:0009725~response to hormone stimulus185,1140,003GO:0006979~response to oxidative stress113,1250,003GO:0048705~skeletal system morphogenesis92,5570,003GO:0048545~response to steroid hormone stimulus123,4090,003GO:001503~ossification92,5570,003GO:0051129~negative regulation of cellular component organization102,8410,004GO:0048568~embryonic organ development113,1250,004	GO:0022604~regulation of cell morphogenesis	10	2,841	0,002
GO:0034605~cellular response to heat41,1360,003GO:0048598~embryonic morphogenesis164,5450,003GO:0009725~response to hormone stimulus185,1140,003GO:0006979~response to oxidative stress113,1250,003GO:0048705~skeletal system morphogenesis92,5570,003GO:0048545~response to steroid hormone stimulus123,4090,003GO:001503~ossification92,5570,003GO:0051129~negative regulation of cellular component organization102,8410,004GO:0048568~embryonic organ development113,1250,004GO:0010720~positive regulation of cell development71,9890,004	GO:0010243~response to organic nitrogen	/	1,989	0,002
GO:0048598~embryonic morphogenesis16 $4,545$ $0,003$ GO:0009725~response to hormone stimulus18 $5,114$ $0,003$ GO:0006979~response to oxidative stress11 $3,125$ $0,003$ GO:0048705~skeletal system morphogenesis9 $2,557$ $0,003$ GO:0048545~response to steroid hormone stimulus12 $3,409$ $0,003$ GO:001503~ossification9 $2,557$ $0,003$ GO:0051129~negative regulation of cellular component organization10 $2,841$ $0,004$ GO:0048568~embryonic organ development11 $3,125$ $0,004$ GO:0010720~positive regulation of cell development7 $1,989$ $0,004$	GO:0034605~cellular response to heat	4	1,136	0,003
GO:0009725~response to hormone stimulus18 $5,114$ $0,003$ GO:0006979~response to oxidative stress11 $3,125$ $0,003$ GO:0048705~skeletal system morphogenesis9 $2,557$ $0,003$ GO:0048545~response to steroid hormone stimulus12 $3,409$ $0,003$ GO:0001503~ossification9 $2,557$ $0,003$ GO:0051129~negative regulation of cellular component organization10 $2,841$ $0,004$ GO:0048568~embryonic organ development11 $3,125$ $0,004$ GO:0010720~positive regulation of cell development7 $1,989$ $0,004$	GO:0048598~embryonic morphogenesis	16	4,545	0,003
GO:0006979~response to oxidative stress 11 $3,125$ $0,003$ GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 $2,557$ $0,003$ GO:0048545~response to steroid hormone stimulus 12 $3,409$ $0,003$ GO:0001503~ossification 9 $2,557$ $0,003$ GO:0051129~negative regulation of cellular component organization 10 $2,841$ $0,004$ GO:0048568~embryonic organ development 11 $3,125$ $0,004$ GO:0010720~positive regulation of cell development 7 1.989 0.004	GO:0009725~response to hormone stimulus	18	5,114	0,003
GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0048705~skeletal system morphogenesis 9 2,557 0,003 GO:0048545~response to steroid hormone stimulus 12 3,409 0,003 GO:0001503~ossification 9 2,557 0,003 GO:0051129~negative regulation of cellular component organization 10 2,841 0,004 GO:0048568~embryonic organ development 11 3,125 0,004 GO:0010720~positive regulation of cell development 7 1,989 0,004	GO:0006979~response to oxidative stress	11	3,125	0,003
GO:0048545~response to steroid hormone stimulus 12 3,409 0,003 GO:0001503~ossification 9 2,557 0,003 GO:0051129~negative regulation of cellular component organization 10 2,841 0,004 GO:0048568~embryonic organ development 11 3,125 0,004 GO:0010720~positive regulation of cell development 7 1,989 0,004	GO:0048705~skeletal system morphogenesis	9	2,557	0,003
GO:0001503~ossification 9 2,557 0,003 GO:0051129~negative regulation of cellular component organization 10 2,841 0,004 GO:0048568~embryonic organ development 11 3,125 0,004 GO:0010720~positive regulation of cell development 7 1,989 0,004	GO:0048545~response to steroid hormone stimulus	12	3,409	0,003
GO:0051129~negative regulation of cellular component organization102,8410,004GO:0048568~embryonic organ development113,1250,004GO:0010720~positive regulation of cell development71,9890,004	GO:0001503~ossification	9	2,557	0,003
GO:0048568~embryonic organ development113,1250,004GO:0010720~positive regulation of cell development71,9890,004	GO:0051129~negative regulation of cellular component	10	2,841	0,004
GO:0010720~positive regulation of cell development 7 1 989 0.004	GO:0048568~embryonic organ development	11	3 125	0.004
	GQ:0010720~positive regulation of cell development	7	1 989	0.004

development 1 1,000 1,000 60:0016044-membrane organization 18 5,114 0,004 60:0016044-membrane organization 18 5,114 0,004 60:0016044-membrane organization 18 13,636 0,005 60:0007166-cell surface receptor linked signal 48 13,636 0,005 60:00007267-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 60:00007267-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 60:00007267-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 60:00045562-megonase to inorganic substance 12 3,409 0,006 60:00045652-embryonic organ morphogenesis 9 2,557 0,007 60:0035295-tube development 12 3,409 0,008 60:00053295-tube development 12 3,409 0,008 60:00010324-membrane invagination 12 3,409 0,009 60:000742312-regulation of neurogenesis 6 1,705 0,001 60:000769-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,001	GO:0010975~regulation of neuron projection	7	1 989	0 004
GO:0016044-membrane organization 18 5,114 0,004 GO:0014706-cell surface receptor linked signal transduction 9 2,557 0,004 GO:0007166-cell surface receptor linked signal transduction 4 1,136 0,005 GO:0007657-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 GO:0007267-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 GO:000769-regulation of cell morphogenesis involved 7 1,889 0,006 GO:000769-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 GO:0005267-muscle tissue development 9 2,557 0,007 GO:00010769-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 GO:0010326-metyonic organ morphogenesis 9 2,557 0,007 GO:0032626-metyonic organ transport 7 1,989 0,008 GO:00032194-positive regulation of metal in transport 7 1,989 0,008 GO:000324-membrane invagination 12 3,409 0,009 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:00072742-sensory organ d	development	,	1,000	0,004
GO:0014706-striated muscle tissue development 9 2,557 0.004 GO:0007166-cell surface receptor linked signal 48 13,636 0,005 GO:0007166-cell signal 4 1,136 0,005 GO:0007267-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 GO:0010357-response to inorganic substance 12 3,409 0,006 GO:0010357-resplate to inorganic substance 9 2,557 0,007 GO:0010359-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 GO:00103516-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 GO:0010359-regulation of axon extension 12 3,409 0,008 GO:0010359-regulation of metal in transport 7 1,989 0,008 GO:00035295-tube development 12 3,409 0,009 GO:00035749-regulation of neurogenesis 6 1,706 0,009 GO:0003742-regulation of neurogenesis 6 1,706 0,009 GO:000769-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,001 <t< td=""><td>GO:0016044~membrane organization</td><td>18</td><td>5,114</td><td>0,004</td></t<>	GO:0016044~membrane organization	18	5,114	0,004
GO:0007166-cell surface receptor linked signal 48 13,636 0,005 GO:0048639-positive regulation of developmental 4 1,136 0,005 GO:0007267-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 GO:0010035-response to inorganic substance 12 3,409 0,006 GO:00010769-regulation of cell morphogenesis involved in differentiation 7 1,989 0,006 GO:00010769-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 GO:00010959-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 GO:00010959-regulation of metal ion transport 7 1,989 0,008 GO:00010959-regulation of netal ion transport 7 1,989 0,008 GO:00005285undocrytosis 12 3,409 0,009 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,001 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,001 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,001 GO:0007584-response to nutrient 9 <td< td=""><td>GO:0014706~striated muscle tissue development</td><td>9</td><td>2,557</td><td>0,004</td></td<>	GO:0014706~striated muscle tissue development	9	2,557	0,004
transaction transaction GC:0046839-positive regulation of developmental growth 4 1,136 0,005 GC:0040787-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 GC:0010035-response to inorganic substance 12 3,409 0,006 GC:0010769-regulation of cell morphogenesis involved in differentiation 7 1,989 0,006 GC:00105169-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 GC:00051614-regulation of metal ion transport 7 1,989 0,008 GC:00051094-positive regulation of metal ion transport 7 1,989 0,008 GC:00053295-rube development 12 3,409 0,008 GC:00010324-membrane invagination 12 3,409 0,009 GC:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GC:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GC:0007684-response to nutrient 9 2,557 0,011 GC:00070745-selfetal anchoring at plasma 3 0,852 0,012 GC:00070745-selfetal anchoring at plasma 3 0,852 <td>GO:0007166~cell surface receptor linked signal</td> <td>48</td> <td>13.636</td> <td>0.005</td>	GO:0007166~cell surface receptor linked signal	48	13.636	0.005
GO:0048639-positive regulation of developmental growth 4 1,136 0,005 GO:0007267-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 GO:00007267-cell-cell signaling 24 6,818 0,005 GO:0000537-muscle tissue development 9 2,557 0,006 GO:00010769-regulation of cell morphogenesis involved in differentiation 7 1,989 0,006 GO:00051034-positive regulation of developmental process 9 2,557 0,007 GO:00051094-positive regulation of developmental process 12 3,409 0,008 GO:00051095-regulation of metal ion transport 7 1,988 0,008 GO:0005097-endocytosis 12 3,409 0,009 GO:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:0007544-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:000764-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GO:000764-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,011 GO:000764-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0	transduction		,	-,
grown 24 6.818 0.005 GC:0007267-cell-cell signaling 24 6.818 0.005 GC:0010035-response to inorganic substance 12 3.409 0.005 GC:0010769-regulation of cell morphogenesis involved 7 1.989 0.006 GC:00107562-regulation of axon extension 4 1.136 0.008 GC:0010552-embryonic organ morphogenesis 9 2.557 0.007 GC:0035126-regulation of axon extension 4 1.136 0.008 GC:0010552-regulation of metal ion transport 7 1.989 0.008 GC:00035295-tube development 12 3.409 0.009 GC:0010324-membrane invagination 12 3.409 0.009 GC:00050769-positive regulation of neurogenesis 6 1.705 0.001 GC:00070742-response to nutrient 9 2.557 0.011 GC:0000764-regulation of cell projection organization 7 1.989 0.011 GC:00070764-regulation of cell projection organization 7 1.989 0.012 GC:00070764-regulation of developmental growth	GO:0048639~positive regulation of developmental	4	1,136	0,005
00:001207-cell-cell signaling 24 0,813 0,005 00:0010032-response to inorganic substance 12 3,409 0,005 00:0010032-response to inorganic substance 12 3,409 0,005 00:0010032-regulation of cell morphogenesis involved in differentiation 7 1,989 0,006 00:0045562-embryonic organ morphogenesis 9 2,557 0,007 00:003255-tube development 12 3,409 0,008 00:0010559-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 00:0010559-regulation of metal ion transport 7 1,989 0,008 00:0010592-regulation of vasodilation 12 3,409 0,009 00:0007423-membrane invagination 12 3,409 0,009 00:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 00:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 00:000768-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 00:000716-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 00:0007718-cyt	GO:0007267, coll coll signaling	24	6 9 1 9	0.005
GO:0010035-response to inforganic substance 12 3,409 0,005 GO:0060537-muscle tissue development 9 2,557 0,006 GO:0010768-regulation of cell morphogenesis involved in differentiation 1,136 0,008 GO:00105562-embryonic organ morphogenesis 9 2,557 0,007 GO:0030516-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 GO:001035295-tube development 12 3,409 0,008 GO:0004689-regulation of metal ion transport 7 1,988 0,008 GO:00050769-regulation of metal ion transport 12 3,409 0,009 GO:0007824-regulation of neurogenesis 6 1,705 0,009 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:0007016-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:0007016-cytoskeletal anchoring at plasma 3 0,852 0,012 GO:0007268-spnaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0007268-protexine/cstrate junction assembly 4 1,136 0,012 GO:0007268-prostive r		24	0,010	0,005
CO-00005/S7-Induster issue development 9 2.557 0.006 CO-0010769-regulation of cell morphogenesis involved in differentiation 7 1,989 0.006 CO-0030516-regulation of axon extension 4 1,136 0.008 CO-0030516-regulation of axon extension 4 1,136 0.008 CO-00305199-regulation of axon extension 14 3,977 0.008 CO-00305295-rubue development 12 3,409 0.009 CO-000697-rendocytosis 12 3,409 0.009 CO-000597-rendocytosis 12 3,409 0.009 CO-000597-regulation of vasodilation 4 1,136 0.009 CO-0005783-sensory organ development 12 3,409 0.009 CO-0005784-response to nutrient 9 2,557 0,011 CO-0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 CO-0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 CO-0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 CO-000764-velsvelsetat gunction organization 7 1,989		12	3,409	0,005
GC:0010763-regulation of cell morphogenesis 7 1,989 0,006 GC:0048562-embryonic organ morphogenesis 9 2,557 0,007 GC:0051094-positive regulation of developmental process 14 3,977 0,008 GC:0051094-positive regulation of metal ion transport 7 1,989 0,008 GC:00510959-regulation of metal ion transport 7 1,989 0,008 GC:0010324-membrane invagination 12 3,409 0,009 GC:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 GC:0007424-regulation of vasodilation 4 1,136 0,009 GC:0007424-regulation of cell differentiation 12 3,409 0,009 GC:0007424-response to nutrient 9 2,557 0,011 GC:000764-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GC:00070424-regouve transmission 14 3,977 0,013 GC:00070424-regouve transmission 14 3,977 0,013 GC:00070424-seponse to nutrient 9 2,557 0,011 GC:0007268-synaptic tra	GO:0060537~muscle tissue development	9	2,557	0,006
GO:0048562-embryonic organ morphogenesis 9 2,557 0,007 GO:0030516-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 GO:0051094-positive regulation of developmental 14 3,977 0,008 GO:0051094-positive regulation of metal ion transport 7 1,989 0,008 GO:0006897-endocytosis 12 3,409 0,009 GO:0007042-membrane invagination 12 3,409 0,009 GO:000723-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:000763-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:000763-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:000763-sensory organ development 12 3,409 0,011 GO:000768-regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GO:000716-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,011 GO:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0007268-regulation of eurogenesis 6 1,705 0,014 GO:0007044-cell-substrate junction assembly	in differentiation	7	1,989	0,006
G0:0030516-regulation of axon extension 4 1,136 0,008 G0:0051094-positive regulation of developmental process 14 3,977 0,008 G0:0035295-tube development 12 3,409 0,009 G0:0010959-regulation of metal ion transport 7 1,989 0,009 G0:0010324-membrane invagination 12 3,409 0,009 G0:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 G0:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 G0:0005784-response to nutrient 9 2,557 0,011 G0:0048597-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 G0:000716-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 G0:000706-synaptic transmission 14 3,977 0,013 G0:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 G0:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 G0:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,014 G0:000768-negative regulation of axon extension	GO:0048562~embryonic organ morphogenesis	9	2.557	0.007
GC:0051094-positive regulation of developmental process 14 3,977 0,008 GC:001035295-tube development 12 3,409 0,008 GC:001035295-tube development 12 3,409 0,009 GC:0010324-membrane invagination 12 3,409 0,009 GC:0006897-endocytosis 12 3,409 0,009 GC:0004212-regulation of vasodilation 4 1,136 0,009 GC:00050769-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,001 GC:0004257-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:004589-developmental growth 7 1,989 0,012 GC:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:004597-positive regulation of cell projection organization 7 1,989 0,012 GO:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0007268-synaptic transmission 14 1,136 0,014 GO:0007268-regulation of neurogenesis 6 1,705 0,014 GO:0005773-postive regulation of neurogenesis 5 1	GO:0030516~regulation of axon extension	4	1,136	0.008
process 14 3,977 0,008 GO:0035295-tube development 12 3,409 0,008 GO:0010959-regulation of metal ion transport 7 1,989 0,009 GO:0006897-endocytosis 12 3,409 0,009 GO:0006897-endocytosis 12 3,409 0,009 GO:0007823-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:000768-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,009 GO:000768-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,011 GO:0045897-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GO:0007069-positive regulation of cell projection organization 7 1,989 0,011 GO:0045897-positive regulation of cell projection organization 7 1,989 0,012 GO:0007064-cellsa anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:0007064-spingenesis 6 1,705 0,014 0,013 0,014 0,013 0,014 0,004263-gingenesis 6 1,705 0,014	GO:0051094~positive regulation of developmental		.,	0,000
GC:0035295-tube development 12 3,409 0,008 GO:0010959-regulation of metal ion transport 7 1,989 0,009 GO:0000689-rendocytosis 12 3,409 0,009 GO:0000689-rendocytosis 12 3,409 0,009 GO:00010324-membrane invagination 12 3,409 0,009 GO:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:0005769-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,009 GO:0005769-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,001 GO:0005769-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GO:000716-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0007268-synaptic transmission 14 1,136 0,014 GO:0005768-negative regulation of neurogenesis 6 1,705 0,014 GO:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0004263-response to abiotic stimulus 16 </td <td>process</td> <td>14</td> <td>3,977</td> <td>0,008</td>	process	14	3,977	0,008
GO:0010959-regulation of metal ion transport 7 1,989 0,008 GO:0006897-endocytosis 12 3,409 0,009 GO:0010324-membrane invagination 12 3,409 0,009 GO:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:00050769-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,009 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:0045597-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GO:0007166-cytoskeletal anchoring at plasma 3 0,852 0,012 GO:0007166-cytoskeletal anchoring at plasma 3 0,852 0,012 GO:0007166-cytoskeletal anchoring at plasma 3 0,852 0,012 GO:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0007268-sponati/distal pattern formation 4 1,136 0,013 GO:000954-proximal/distal pattern formation 4 1,136 0,014 GO:0009628-response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 <tr< td=""><td>GO:0035295~tube development</td><td>12</td><td>3,409</td><td>0,008</td></tr<>	GO:0035295~tube development	12	3,409	0,008
GO:0006897-endocytosis 12 3,409 0,009 GO:0010324-membrane invagination 12 3,409 0,009 GO:00042312-regulation of vasodilation 4 1,136 0,009 GO:0007823-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:000768-opositive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GO:000716-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:000716-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:000714-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,014 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,014 GO:0007268-synaptic transmission 10 2,841 0,014 GO:0007268-regulation of developmental growth 10 2,841 0,015 GO:00051259-prote	GO:0010959~regulation of metal ion transport	7	1,989	0,008
GO:0010324-membrane invagination 12 3,409 0,009 GO:0042312-regulation of vasodilation 4 1,136 0,009 GO:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:0045597-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,009 GO:000716c-vtoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:000716c-vtoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:0007016c-vtoskeletal anchoring at plasma 3 0,852 0,012 GO:0007046-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0007268-repositive regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:000262-respones to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:0042063-glitogenesis 5 1,420 0,015 GO:00468-regulation of axonogenesis<	GO:0006897~endocytosis	12	3,409	0,009
GO:0042312-regulation of vasodilation 4 1,136 0,009 GO:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:0050769-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,009 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:0045587-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GO:000716-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:00071344-regulation of cell projection organization 7 1,989 0,012 GO:000744-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:000744-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:000744-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,014 GO:000768-negative regulation of neurogenesis 6 1,705 0,014 GO:00050768-negative regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:004268-regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:0050768-negative regulation of axon extension 3 0,852 0,017	GO:0010324~membrane invagination	12	3,409	0,009
GO:0007423-sensory organ development 12 3,409 0,009 GO:00050769-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,009 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:0048589-developmental growth 7 1,989 0,011 GO:0048589-developmental growth 12 3,409 0,012 GO:0007016-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:0007144-regulation of cell projection organization 7 1,989 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,014 GO:0007084-proximal/distal pattern formation 4 1,136 0,014 GO:0009628-response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:00050768-negative regulation of axon ogenesis 5 1,420 0,017 GO:00045	GO:0042312~regulation of vasodilation	4	1,136	0,009
GO:0050769-positive regulation of neurogenesis 6 1,705 0,009 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:0007016-cytoskeletal growth 7 1,989 0,012 GO:0007016-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:0007016-cytoskeletal anchoring at plasma membrane 3 0,852 0,012 GO:0007044-cell-substrate junction organization 7 1,989 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0042063-gliogenesis 6 1,705 0,014 GO:0005078-nepative regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:0004683-regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:00450773-positive regulation of cellular component of axonogenesis 4 1,136 0,017 G	GO:0007423~sensory organ development	12	3,409	0,009
GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:0007584-response to nutrient 9 2,557 0,011 GO:00045597-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GO:0007016-cytoskeletal anchoring at plasma 3 0,852 0,012 GO:000716-cytoskeletal anchoring at plasma 3 0,852 0,012 GO:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,014 GO:00072529-proximal/distal pattern formation 4 1,136 0,014 GO:00042063-gliogenesis 6 1,705 0,014 GO:000528-response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:0004268-response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:0004768-negative regulation of axongenesis 5 1,420 0,015 GO:00446537-regulation of strong extension 3 0,852 0,017 GO:00	GO:0050769~positive regulation of neurogenesis	6	1,705	0.009
Construction Construction<	GO:0007584~response to nutrient	9	2,557	0.011
Construction Construction Construction GO:0045597-positive regulation of cell differentiation 12 3,409 0,012 GO:0045597-positive regulation of cell projection organization 7 1,989 0,012 GO:0045597-positive regulation of cell projection organization 7 1,989 0,012 GO:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0007264-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:00042063-gliogenesis 6 1,705 0,014 GO:00051259-protein oligomerization 10 2,841 0,014 GO:00050768-negative regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:0045773-positive regulation of axon extension 3 0,852 0,017 GO:0045773-positive regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0042660-regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:00446773-positive regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0044660-regulation of smooth muscle cell 5 1,420 0,018 <t< td=""><td>GO:0048589~developmental growth</td><td>7</td><td>1 989</td><td>0.011</td></t<>	GO:0048589~developmental growth	7	1 989	0.011
Openation Desire of generation of cell projection organization The Openation Openation GO:0007016~cytoskeletal anchoring at plasma 3 0,852 0,012 GO:0007016~cytoskeletal anchoring at 1,136 0,013 0,013 GO:0007044~cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,014 0,013 GO:0009854~proximal/distal pattern formation 4 1,136 0,014 0,0014 GO:0009628~response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 0,0005 0,015 0,0015 0,0015 0,0015 0,0015 0,0015 0,0015 0,0015 0,0017 0,0015 0,0017 0,0017 0,0017 0,0017 0,000505172~positive regulation of cellular componen	GO:0045597~positive regulation of cell differentiation	12	3 409	0.012
Solution of a product product of a	GO:0007016~cvtoskeletal anchoring at plasma	12	0,100	0,012
GO:0031344-regulation of cell projection organization 7 1,989 0,012 GO:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:000954-proximal/distal pattern formation 4 1,136 0,013 GO:0042063-gliogenesis 6 1,705 0,014 GO:0051259-protein oligomerization 10 2,841 0,015 GO:0009628-response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:0009628-regulation of developmental growth 5 1,420 0,015 GO:0042063-gliation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:0042072-positive regulation of axon extension 3 0,852 0,017 GO:0045773-positive regulation of cellular component 1 1,705 0,017 GO:0040657-regulation of cellular component 10 2,841 0,017 GO:0040660-regulation of smooth muscle cell 5 1,420 0,018 GO:0042660-regulation of cell development 4 1,136 0,017 GO:0048660-regul	membrane	3	0,852	0,012
GO:0007268-synaptic transmission 14 3,977 0,013 GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0009954-proximal/distal pattern formation 4 1,136 0,013 GO:0042063-gliogenesis 6 1,705 0,014 GO:000958-protein oligomerization 10 2,841 0,014 GO:0009628-response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:0050768-negative regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:0048638-regulation of developmental growth 5 1,420 0,017 GO:0044057-regulation of axon extension 3 0,852 0,017 GO:0050772-positive regulation of axonogenesis 4 1,136 0,017 GO:0050772-positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0048660-regulation of smooth muscle cell 5 1,420 0,018 GO:001772-negative regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0048660-regulation of smooth muscle cell 5 1,420 0,018 <tr< td=""><td>GO:0031344~regulation of cell projection organization</td><td>7</td><td>1,989</td><td>0,012</td></tr<>	GO:0031344~regulation of cell projection organization	7	1,989	0,012
GO:0007044-cell-substrate junction assembly 4 1,136 0,013 GO:0009954-proximal/distal pattern formation 4 1,136 0,013 GO:0042063-gliogenesis 6 1,705 0,014 GO:0009528-response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:0050768-negative regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:0048638-regulation of developmental growth 5 1,420 0,015 GO:0045773-positive regulation of axon extension 3 0,852 0,017 GO:0044057-regulation of axon extension 3 0,852 0,017 GO:0044057-regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:0044057-regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0044660-regulation of smooth muscle cell proliferation 5 1,420 0,018 GO:0021782-glial cell development 5 1,420 0,018 GO:0021782-regulation of smooth muscle cell proliferation 1 1,366 0,019 GO:001721-negative regulation of cell development 5 1,420 0,019 </td <td>GO:0007268~synaptic transmission</td> <td>14</td> <td>3,977</td> <td>0,013</td>	GO:0007268~synaptic transmission	14	3,977	0,013
GO:0009954~proximal/distal pattern formation 4 1,136 0,013 GO:0042063~gliogenesis 6 1,705 0,014 GO:0051259~protein oligomerization 10 2,841 0,014 GO:0009628~response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:005768~negative regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:0048638~regulation of developmental growth 5 1,420 0,015 GO:0048638~regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:004773~positive regulation of axonogenesis 4 1,136 0,017 GO:00405772~positive regulation of axonogenesis 4 1,136 0,017 GO:00405772~regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:00405772~regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:00405772~regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0051130~positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,018 GO:001721~negative regulation of cell development 5 1,420 0,019	GO:0007044~cell-substrate junction assembly	4	1,136	0,013
GO:0042063~gliogenesis 6 1,705 0,014 GO:0051259~protein oligomerization 10 2,841 0,014 GO:009628~response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:0050768~negative regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:0048638~regulation of developmental growth 5 1,420 0,015 GO:0045773~positive regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:0045773~positive regulation of axon extension 3 0,852 0,017 GO:0045773~positive regulation of axonogenesis 4 1,136 0,017 GO:0044057~regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:0051924~regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0048660~regulation of smooth muscle cell 5 1,420 0,018 GO:0021782~glial cell development 5 1,420 0,019 GO:001971~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:003239~	GO:0009954~proximal/distal pattern formation	4	1,136	0,013
GO:0051259~protein oligomerization 10 2,841 0,014 GO:009628~response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:0050768~negative regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:0048638~regulation of developmental growth 5 1,420 0,015 GO:0045773~positive regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:0050772~positive regulation of axon extension 3 0,852 0,017 GO:0044057~regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:0051924~regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0051130~positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0021782~glial cell development 5 1,420 0,018 GO:001721~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0043660~regulation of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:001721~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,202 </td <td>GO:0042063~gliogenesis</td> <td>6</td> <td>1,705</td> <td>0,014</td>	GO:0042063~gliogenesis	6	1,705	0,014
GO:0009628~response to abiotic stimulus 16 4,545 0,015 GO:0050768~negative regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:0048638~regulation of developmental growth 5 1,420 0,015 GO:0045773~positive regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:0045773~positive regulation of axon extension 3 0,852 0,017 GO:0040772~positive regulation of axonogenesis 4 1,136 0,017 GO:004057~regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:0051924~regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0051130~positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,018 GO:0019721~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 <td>GO:0051259~protein oligomerization</td> <td>10</td> <td>2,841</td> <td>0,014</td>	GO:0051259~protein oligomerization	10	2,841	0,014
GO:0050768-negative regulation of neurogenesis 5 1,420 0,015 GO:0048638-regulation of developmental growth 5 1,420 0,015 GO:0048638-regulation of developmental growth 5 1,420 0,015 GO:0045773-positive regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:0050772-positive regulation of axonogenesis 4 1,136 0,017 GO:0051924-regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:0051924-regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0051924-regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:005130-positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0021782-gial cell development 4 1,136 0,018 GO:0010721-negative regulation of cell development 5 1,420 0,019 GO:0019226-transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0035239-tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0043269-regulation of ion transport 7 1,989 0,021	GO:0009628~response to abiotic stimulus	16	4,545	0,015
GO:0048638~regulation of developmental growth 5 1,420 0,015 GO:0045773~positive regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:0045773~positive regulation of axon extension 3 0,852 0,017 GO:0044057~regulation of system process 4 1,136 0,017 GO:0051924~regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0051130~positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,018 GO:001721~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 7 1,989 0,021 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,022 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,022 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 <t< td=""><td>GO:0050768~negative regulation of neurogenesis</td><td>5</td><td>1,420</td><td>0,015</td></t<>	GO:0050768~negative regulation of neurogenesis	5	1,420	0,015
GO:0045773~positive regulation of axon extension 3 0,852 0,015 GO:0050772~positive regulation of axonogenesis 4 1,136 0,017 GO:0044057~regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:0051924~regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0051130~positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,018 GO:001924~regulation of cell development 5 1,420 0,018 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,019 GO:001953~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:001953~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022	GO:0048638~regulation of developmental growth	5	1,420	0,015
GO:0050772~positive regulation of axonogenesis 4 1,136 0,017 GO:0044057~regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:0051924~regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0051130~positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation 5 1,420 0,018 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,019 GO:0010721~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:001923~negative regulation of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:00	GO:0045773~positive regulation of axon extension	3	0,852	0,015
GO:0044057~regulation of system process 14 3,977 0,017 GO:0051924~regulation of calcium ion transport 6 1,705 0,017 GO:0051130~positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation 5 1,420 0,018 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,019 GO:0010721~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:001926~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:00051216~cartilage development 6 1,705 0,022	GO:0050772~positive regulation of axonogenesis	4	1.136	0.017
GO:0051924~regulation of calcium ion transport61,7050,017GO:0051130~positive regulation of cellular component organization102,8410,017GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation51,4200,018GO:0021782~glial cell development41,1360,019GO:0019721~negative regulation of cell-matrix adhesion30,8520,019GO:001926~transmission of nerve impulse154,2610,020GO:0035239~tube morphogenesis82,2730,020GO:0043269~regulation of ion transport71,9890,021GO:0051216~cartilage development61,7050,022GO:000991~response to extracellular stimulus113,1250,022	GO:0044057~regulation of system process	14	3.977	0.017
GO:0051130~positive regulation of cellular component organization 10 2,841 0,017 GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation 5 1,420 0,018 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,019 GO:0010721~negative regulation of cell development 5 1,420 0,019 GO:001953~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022	GO:0051924~regulation of calcium ion transport	6	1.705	0.017
organization 10 2,841 0,017 GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation 5 1,420 0,018 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,018 GO:0010721~negative regulation of cell development 5 1,420 0,019 GO:001953~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022	GO:0051130~positive regulation of cellular component			
GO:0048660~regulation of smooth muscle cell 5 1,420 0,018 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,018 0,018 0,018 0,018 0,018 0,018 0,018 0,018 0,018 0,018 0,019 0,018 0,019 0,019 0,019 0,019 0,019 0,019 0,019 0,019 0,019 0,020 0,019 0,020 0,020 0,020 0,020 0,020 0,020 0,020 0,021 0,020 0,021 0,021 0,021 0,021 0,021 0,021 0,021 0,022 0,021 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022 0,022	organization	10	2,841	0,017
proliferation 5 1,420 0,018 GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,018 GO:0010721~negative regulation of cell development 5 1,420 0,019 GO:0001953~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022	GO:0048660~regulation of smooth muscle cell	E	1 400	0.010
GO:0021782~glial cell development 4 1,136 0,018 GO:0010721~negative regulation of cell development 5 1,420 0,019 GO:0001953~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022	proliferation	Э	1,420	0,018
GO:0010721~negative regulation of cell development 5 1,420 0,019 GO:0001953~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022	GO:0021782~glial cell development	4	1,136	0,018
GO:0001953~negative regulation of cell-matrix adhesion 3 0,852 0,019 GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022	GO:0010721~negative regulation of cell development	5	1,420	0,019
GO:0019226~transmission of nerve impulse 15 4,261 0,020 GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022	GO:0001953~negative regulation of cell-matrix adhesion	3	0,852	0,019
GO:0035239~tube morphogenesis 8 2,273 0,020 GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022	GO:0019226~transmission of nerve impulse	15	4,261	0,020
GO:0043269~regulation of ion transport 7 1,989 0,021 GO:0051216~cartilage development 6 1,705 0,022 GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022 CO:0001762 membragenergia of a branching attracture 0 4.705 0.022	GO:0035239~tube morphogenesis	8	2,273	0,020
GO:0051216~cartilage development61,7050,022GO:0009991~response to extracellular stimulus113,1250,022CO:0001762membergenesis of a branching structure04,7050,022	GO:0043269~regulation of ion transport	7	1,989	0,021
GO:0009991~response to extracellular stimulus 11 3,125 0,022	GO:0051216~cartilage development	6	1,705	0,022
	GO:0009991~response to extracellular stimulus	11	3,125	0,022
0.000 r r os~morphogenesis or a branching structure 6 1,705 0,023	GO:0001763~morphogenesis of a branching structure	6	1,705	0,023

GO:0010812~negative regulation of cell-substrate	3	0.852	0.023
adhesion	5	0,002	0,023
GO:0060173~limb development	7	1,989	0,023
GO:0048736~appendage development	7	1,989	0,023
GO:0051050~positive regulation of transport	11	3,125	0,024
GO:0007411~axon guidance	7	1.989	0.024
GO:0030199~collagen fibril organization	4	1 136	0.025
GO:0010522~regulation of calcium ion transport into		.,	0,010
cvtosol	4	1,136	0,025
GO:0016192~vesicle-mediated transport	21	5.966	0.026
GO:0051270~regulation of cell motion	10	2.841	0.026
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	15	4,261	0.026
GO:0043062~extracellular structure organization	9	2 557	0.027
GO:0050877~neurological system process	29	8 239	0.027
GO:0048878~chemical homeostasis	10	5 308	0,027
	10	2,530	0,027
GO:0031667~lesponse to nutrient levels	10	2,041	0,020
	8	2,273	0,028
GO:0010001~glial cell differentiation	5	1,420	0,028
GO:0044092~negative regulation of molecular function	14	3,977	0,029
GO:0022406~membrane docking	4	1,136	0,029
GO:0044087~regulation of cellular component	8	2 273	0.030
biogenesis	0	2,210	0,000
GO:0008037~cell recognition	5	1,420	0,030
GO:0009100~glycoprotein metabolic process	10	2,841	0,031
GO:0050801~ion homeostasis	16	4,545	0,031
GO:0006873~cellular ion homeostasis	15	4,261	0,031
GO:0050974~detection of mechanical stimulus involved	3	0.852	0.032
in sensory perception	5	0,032	0,032
GO:0007194~negative regulation of adenylate cyclase	5	1 420	0.032
activity	6	1,120	0,002
GO:0051350~negative regulation of lyase activity	5	1,420	0,032
GO:0031280~negative regulation of cyclase activity	5	1,420	0,032
GO:0055082~cellular chemical homeostasis	15	4,261	0,035
GO:0009611~response to wounding	19	5,398	0,035
GO:0009408~response to heat	5	1,420	0,036
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling	1/	3 077	0.036
pathway	14	3,977	0,030
GO:0045859~regulation of protein kinase activity	14	3,977	0,036
GO:0030728~ovulation	3	0,852	0,036
GO:0032330~regulation of chondrocyte differentiation	3	0,852	0,036
GO:0009266~response to temperature stimulus	6	1,705	0,037
GO:0032844~regulation of homeostatic process	7	1,989	0,037
GO:0019229~regulation of vasoconstriction	4	1.136	0.037
GO:0051606~detection of stimulus	7	1,989	0.039
GO:0007398~ectoderm development	9	2 557	0.039
GO:0042325~regulation of phosphorylation	17	4 830	0.041
GO:0051279~regulation of release of sequestered		4,000	0,041
calcium ion into cytosol	3	0,852	0,041
GO:0035113~embryonic appendage morphogenesis	6	1,705	0,042
GO:0030326~embryonic limb morphogenesis	6	1.705	0.042
GO:0051480~cvtosolic calcium ion homeostasis	7	1.989	0.042
GO:0001765~membrane raft formation	2	0.568	0.043
GO:0007160~cell-matrix adhesion	6	1 705	0.043
GO:0033043~regulation of organelle organization	10	2 8/1	0.043
GO:0043549~regulation of kinase activity	1/	3 077	0.040
OO.0070070~10901au011 01 Killast aulivily	14	5,311	0,044

GO:0030100~regulation of endocytosis	5	1,420	0,044
GO:0045596~negative regulation of cell differentiation	10	2,841	0,044
GO:0007507~heart development	10	2,841	0,044
GO:0007156~homophilic cell adhesion	7	1,989	0,045
GO:0031644~regulation of neurological system process	8	2,273	0,045
GO:0050982~detection of mechanical stimulus	3	0,852	0,047
GO:0043583~ear development	6	1,705	0,049

Tabelle A4: Zusammenfassung der Ergebnisse der GO Term-Analyse mittels der DAVID-Plattform aller unter chronischer Hypoxie induzierten Gene. Angeben sind alle GO-Terms bis zu einerm Signifikanzniveau von $p \le 0,05$.

KEGG Term (Originalangabe)	Anzahl der differenziell regulierten Gene/KEGG Term	%-Anteil	P-Wert
GO:0043065~positive regulation of apoptosis	10	5,682	0,017
GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	10	5,682	0,018
GO:0010942~positive regulation of cell death	10	5,682	0,018
GO:0051240~positive regulation of multicellular organismal process	7	3,977	0,024
GO:0006917~induction of apoptosis	8	4,545	0,027
GO:0070365~hepatocyte differentiation	2	1,136	0,028
GO:0012502~induction of programmed cell death	8	4,545	0,028
GO:0032675~regulation of interleukin-6 production	3	1,705	0,044
GO:0030335~positive regulation of cell migration	4	2,273	0,049

Tabelle A5: Zusammenfassung der Ergebnisse der GO Term-Analyse mittels der DAVID-Plattform aller unter chronischer Hypoxie herunterregulierten Gene. Angeben sind alle GO-Terms bis zu einerm Signifikanzniveau von $p \le 0,05$.

KEGG Term (Originalangabe)	Anzahl der differenziell regulierten Gene/KEGG Term	%-Anteil	P-Wert
GO:0051789~response to protein stimulus	4	7,273	0,004
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	5	9,091	0,008
GO:0043433~negative regulation of transcription factor activity	3	5,455	0,008
GO:0001816~cytokine production	3	5,455	0,009
GO:0043065~positive regulation of apoptosis	6	10,909	0,009
GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	6	10,909	0,010
GO:0010942~positive regulation of cell death	6	10,909	0,010
GO:0042981~regulation of apoptosis	8	14,545	0,010
GO:0043067~regulation of programmed cell death	8	14,545	0,010
GO:0010941~regulation of cell death	8	14,545	0,011
GO:0043392~negative regulation of DNA binding	3	5,455	0,011
GO:0051100~negative regulation of binding	3	5,455	0,014
GO:0044092~negative regulation of molecular function	5	9,091	0,018
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	7	12,727	0,021
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA- dependent	5	9,091	0,022
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	5	9,091	0,024

GO:0045927~positive regulation of growth	3	5,455	0,025
GO:0048514~blood vessel morphogenesis	4	7,273	0,027
GO:0007507~heart development	4	7,273	0,028
GO:0051240~positive regulation of multicellular organismal process	4	7,273	0,037
GO:0007178~transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	3	5,455	0,039
GO:0001568~blood vessel development	4	7,273	0,040
GO:0051090~regulation of transcription factor activity	3	5,455	0,040
GO:0001944~vasculature development	4	7,273	0,042
GO:0016481~negative regulation of transcription	5	9,091	0,050
GO:0051604~protein maturation	3	5,455	0,050

Tabelle A6: Zusammenfassung der Ergebnisse der GO Term-Analyse mittels der DAVID-Plattform aller unter akuter Normoxie induzierten Gene. Angeben sind alle GO-Terms bis zu einerm Signifikanzniveau von $p \le 0,05$.

KEGG Term (Originalangabe)	Anzahl der differenziell regulierten	%-Anteil	P-Wert
	Gene/KEGG Term		
GO:0001666~response to hypoxia	17	9,714	0,000
GO:0070482~response to oxygen levels	17	9,714	0,000
GO:0005996~monosaccharide metabolic process	18	10,286	0,000
GO:0019318~hexose metabolic process	17	9,714	0,000
GO:0006006~glucose metabolic process	15	8,571	0,000
GO:0006096~glycolysis	10	5,714	0,000
GO:0006007~glucose catabolic process	10	5,714	0,000
GO:0044275~cellular carbohydrate catabolic process	11	6,286	0,000
GO:0019320~hexose catabolic process	10	5,714	0,000
GO:0046365~monosaccharide catabolic process	10	5,714	0,000
GO:0046164~alcohol catabolic process	10	5,714	0,000
GO:0016052~carbohydrate catabolic process	11	6,286	0,000
GO:0006000~fructose metabolic process	6	3,429	0,000
GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	16	9,143	0,000
GO:0034637~cellular carbohydrate biosynthetic process	8	4,571	0,000
GO:0016051~carbohydrate biosynthetic process	8	4,571	0,000
GO:0001568~blood vessel development	11	6,286	0,000
GO:0048878~chemical homeostasis	16	9,143	0,000
GO:0001944~vasculature development	11	6,286	0,000
GO:0044057~regulation of system process	12	6,857	0,001
GO:0048514~blood vessel morphogenesis	10	5,714	0,001
GO:0046364~monosaccharide biosynthetic process	5	2,857	0,001
GO:0010033~response to organic substance	19	10,857	0,001
GO:0006090~pyruvate metabolic process	5	2,857	0,001
GO:0030388~fructose 1,6-bisphosphate metabolic	3	1,714	0,001
GO:0046165~alcohol biosynthetic process	5	2.857	0.001
GO:0009719~response to endogenous stimulus	13	7.429	0.002
GO:0044264~cellular polysaccharide metabolic process	5	2.857	0.002
GO:0006094~aluconeoaenesis	4	2.286	0.003
GO:0051259~protein oligomerization	8	4,571	0,003
GO:0030005~cellular di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	9	5,143	0,003
GO:0007595~lactation	4	2,286	0,004

GO:0006874~cellular calcium ion homeostasis	8	4,571	0,004
GO:0055074~calcium ion homeostasis	8	4,571	0,004
GO:0055066~di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	9	5,143	0,004
GO:0019319~hexose biosynthetic process	4	2,286	0,005
GO:0006875~cellular metal ion homeostasis	8	4,571	0,006
GO:0005977~glycogen metabolic process	4	2,286	0,006
GO:0006073~cellular glucan metabolic process	4	2,286	0,006
GO:0044042~glucan metabolic process	4	2,286	0,006
GO:0001525~angiogenesis	7	4,000	0,006
GO:0030003~cellular cation homeostasis	9	5,143	0,006
GO:0055065~metal ion homeostasis	8	4,571	0,007
GO:0042592~homeostatic process	17	9,714	0,008
GO:0006873~cellular ion homeostasis	11	6,286	0,008
GO:0055082~cellular chemical homeostasis	11	6,286	0,009
GO:0051480~cvtosolic calcium ion homeostasis	6	3,429	0,009
GO:0006112~energy reserve metabolic process	4	2,286	0.010
GO:0014070~response to organic cvclic substance	6	3.429	0.011
GO:0050773~regulation of dendrite development	3	1,714	0.012
GO:0055080~cation homeostasis	9	5,143	0.013
GO:0019725~cellular homeostasis	12	6.857	0.013
GO:0050801~ion homeostasis	11	6.286	0.014
GO:0022604~regulation of cell morphogenesis	6	3.429	0.015
GO:0032504~multicellular organism reproduction	12	6.857	0.015
GO:0048609~reproductive process in a multicellular	40	0.057	0.045
organism	12	6,857	0,015
GO:0010648~negative regulation of cell communication	8	4,571	0,018
GO:0048545~response to steroid hormone stimulus	7	4,000	0,019
GO:0055114~oxidation reduction	14	8,000	0,020
GO:0009725~response to hormone stimulus	10	5,714	0,021
GO:0008037~cell recognition	4	2,286	0,022
GO:0001765~membrane raft formation	2	1,143	0,022
GO:0001569~patterning of blood vessels	3	1,714	0,022
GO:0008643~carbohydrate transport	4	2,286	0,026
GO:0030879~mammary gland development	4	2,286	0,030
GO:0048167~regulation of synaptic plasticity	4	2,286	0,031
GO:0007204~elevation of cytosolic calcium ion	5	2,857	0,032
GO:0005976~polysaccharide metabolic process	5	2 857	0.032
GO:0042493~response to drug	7	4 000	0.032
GO:0009968~negative regulation of signal transduction	7	4,000	0.032
GO:0010243~response to organic nitrogen	<u>г</u> Д	2 286	0,002
GO:0030967~ER-nuclear sterol response pathway	2	1 143	0,000
GO:0033692~cellular polysaccharide biosynthetic	۲	1,140	0,000
process	3	1,714	0,033
GO:0031345~negative regulation of cell projection	2	4 74 4	0.000
organization	3	1,714	0,038
GO:0010975~regulation of neuron projection	4	2,286	0,041
GO:0051924~regulation of calcium ion transport	4	2,286	0.041
GO:0014706~striated muscle tissue development	5	2.857	0.042
GO:0045768~positive regulation of anti-apoptosis	3	1.714	0,043
GO:0006003~fructose 2.6-bisphosphate metabolic	2	4.440	0.044
process	2	1,143	0,044
GO:0006991~response to sterol depletion	2	1,143	0,044
GO:0032933~SREBP-mediated signaling pathway	2	1,143	0,044

GO:0001936~regulation of endothelial cell proliferation	3	1,714	0,049
GO:0060537~muscle tissue development	5	2,857	0,049
GO:0008219~cell death	14	8,000	0,049

Tabelle A7: Zusammenfassung der Ergebnisse der GO Term-Analyse mittels der DAVID-Plattform aller unter akuter Normoxie herunterregulierten Gene. Angeben sind alle GO-Terms bis zu einerm Signifikanzniveau von $p \le 0,05$.

	K500 Tam	Anzahl der		Distant
Regulation	(Originalangabe)	differenziell	%-Anteil	P-Wert
		Gene/KEGG Term		
	hsa03040:Spliceosome	12	2,256	0,001
Akute	hsa04710:Circadian rhythm	4	0,752	0,005
	hsa04910:Insulin signaling pathway	10	1,880	0,021
(')	hsa00051:Fructose and mannose metabolism	4	0,752	0,085
	hsa04110:Cell cycle	30	3,185	0,000
	hsa03030:DNA replication	16	1,699	0,000
	hsa04115:p53 signaling pathway	14	1,486	0,000
	hsa04114:Oocyte meiosis	18	1,911	0,000
	hsa00240:Pyrimidine metabolism	16	1,699	0,000
	hsa03040:Spliceosome	16	1,699	0,005
	hsa00230:Purine metabolism	18	1,911	0,006
Akute	hsa03430:Mismatch repair	6	0,637	0,007
Hypoxie	hsa03410:Base excision repair	7	0,743	0,010
(🔻)	hsa00280:Valine, leucine and isoleucine			
	degradation	8	0,849	0,012
	hsa00310:Lysine degradation	7	0,743	0,039
	hsa03420:Nucleotide excision repair	7	0,743	0,039
	hsa00903:Limonene and pinene degradation	4	0,425	0,043
	hsa00450:Selenoamino acid metabolism	5	0,531	0,059
	hsa00670:One carbon pool by folate	4	0,425	0,061
	hsa03440:Homologous recombination	5	0,531	0,074
	hsa04510:Focal adhesion	16	4,545	0,000
chronische	hsa04360:Axon guidance	9	2,557	0,012
Hypoxie	hsa00532:Chondroitin sulfate biosynthesis	4	1,136	0,015
(🕈)	hsa00900:Terpenoid backbone biosynthesis	3	0,852	0,049
	hsa05210:Colorectal cancer	6	1,705	0,051
chronische Hypoxie (♥)	hsa04810:Regulation of actin cytoskeleton	5	2,841	0,073
akute	hsa04350:TGF-beta signaling pathway	3	5,455	0,048
Normoxie	hsa04660:T cell receptor signaling pathway	3	5,455	0,074
(🕈)	hsa00410:beta-Alanine metabolism	2	3,636	0,089
	hsa00051:Fructose and mannose metabolism	9	5,143	0,000
akute	hsa00010:Glycolysis / Gluconeogenesis	10	5,714	0,000
	hsa00030:Pentose phosphate pathway	6	3,429	0,000
Normoxie	hsa00500:Starch and sucrose metabolism	5	2,857	0,002
(♥)	hsa00052:Galactose metabolism	4	2,286	0,004
	hsa05211:Renal cell carcinoma	5	2,857	0,014
	hsa00520:Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	4	2,286	0,021

Tabelle A8: Zusammenfassung der Ergebnisse der KEGG-Analyse mittels der DAVID-Plattform. Die Pfeile symbolisieren eine Heraufregulation (♠) bzw. eine Herunterregulation (♦) der Gene in den aufgeführten KEGG Terms unter akuter und chronischer Hypoxie, sowie akuter Normoxie.

5.5 Publikationsverzeichnis

Zeitschriftenbeiträge:

- Annegret Kathagen, Alexander Schulte, Gerd Balcke, Heidi S. Phillips, Tobias Martens, Jakob Matschke, Hauke S. Günther, Robert Soriano, Zora Modrusan, Carsten Kuhl, Alain Tissier, Mareike Holz, Lutz Krawinkel, Markus Glatzel, Manfred Westphal, Katrin Lamszus: Hypoxia and oxygenation induce a metabolic switch between the pentose phosphate pathway and glycolysis in glioma stem cells. *Brain* (submitted)
- 2. Alexander Schulte, Katrin Liffers, **Annegret Kathagen**, Sabine Riethdorf, Svenja Zapf, Adrian Merlo, Katharina Kolbe, Manfred Westphal, Katrin Lamszus: Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with up-regulation of EGFRvIII and PI3K p110delta. *Neuro-Oncology*

Vorträge und Posterpräsentationen:

- Annegret Kathagen, Alexander Schulte, Hauke Günther, Heidi Phillips, Manfred Westphal, Katrin Lamszus: Gene regulation by short-term and long-term hypoxia in glioblastoma stem cell lines. 62. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 7. – 11. Mai 2011, Hamburg (Vortrag)
- Annegret Kathagen, Alexander Schulte, Hauke Günther, Heidi Phillips, Manfred Westphal, Katrin Lamszus: Short-term and long-term hypoxia-regulated genes in glioblastoma stem cell lines. Brain Tumor 2011, 16. – 17. Juni 2011, Berlin (Posterpräsentation)
- 3. **Annegret Kathagen**, Alexander Schulte, Hauke Günther, Heidi Phillips, Manfred Westphal, Katrin Lamszus: Tumor hypoxia results in a characteristic pattern of glycolytic and pentose phosphate pathway enzyme regulation in glioblastomas. Brain Tumors 2012, 28. 30. Mai 2012, Warschau (Posterpräsentation)
- 4. Annegret Kathagen, Alexander Schulte, Hauke Günther, Heidi Phillips, Manfred Westphal, Katrin Lamszus: Genes regulated by short-term versus long-term hypoxia in glioblastoma stem cell lines. 63. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 13. 16. Juni 2012, Leipzig (Vortrag)
- 5. **Annegret Kathagen**, Alexander Schulte, Gerd Balcke, Carsten Kuhl, Hauke S. Günther, Heidi S. Phillips, Manfred Westphal, Katrin Lamszus: Hypoxia and oxygenation induce a metabolic switch between the pentose phosphate pathway and glycolysis in glioma stem-like cells. Brain Tumor 2013, 23. 24. Mai 2013, Berlin (Posterpräsentation)
- Annegret Kathagen, Alexander Schulte, Gerd Balcke, Carsten Kuhl, Hauke Günther, Heidi Phillips, Manfred Westphal, Katrin Lamszus: A reciprocal metabolic switch between the pentose phosphate pathway and glycolysis is induced by hypoxia versus oxygenation. 64. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 26. - 29. Mai 2013, Düsseldorf (angenommen als Vortrag)

5.6 Abkürzungsverzeichnis

% (\//\)	Prozent auf das Volumen bezogen
$\frac{9}{2}$	Prozent auf das Gewicht bezogen
2 DC	
2-DG	2-Deoxy-D-Glucose
hð	Mikroliter
hi	
Abb.	Abbildung
ALDOC	Aldolase C
AMF	Autokriner Motilitätsfaktor
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP ^r	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cvclisches Adenosin Monophosphat
CD133 ⁺	CD133-positive
CD Marker	Cluster of Differentiation
CDNA	"complementary DNA"
	Kohlenstoffdioxid
CSC	Tumorstammzelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
dest	destilliert
d.h.	das heißt
DHEA	Dehvdroepiandrosteron
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium"
DMSO	"Danbeede e meanea eagle e meanam Dimethylsulfoxid
	Desexyribenukleineäure
	Desoxyribonukieosiatripnosphat
	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal Growth Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activates Cell Sorter
FC	Fold Change
FCS (FACS)	Forward Scatter
FCS	Fötales Kälberserum
FCF	Fibroblact Crowth Eactor
	Flueresseinisethisevenet
FILC	
FINI	
g	Gramm
G6PD	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
GalC	Galaktosylceramidase
GBM	Glioblastom, Glioblastoma Multiforme
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GFP	Green fluorescent protein
aaf	gegebenenfalls
60 39	Gene Ontology
	Clucosophosphatisomoraso
	Clichlostomatormacillinia
H	Hypoxie, chronische Hypoxie
H→N	akute Normoxie, Oxygenierung
h	Stunde
HCI	Salzsäure

HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF-1	Hypoxia-inducible Factor 1
HIF-1α	Hypoxia-inducible Factor 1 Alpha
HIF-2α	Hypoxia-inducible Factor 2 Alpha
H₂O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HK2	Hexokinase 2
Hnf	high-power field
	Isocitratdebydrogenase 1
IgG Ish	Kilehaaannaara
KD	
KCNF1	Spannungsabhangiger Kalium-Kanal Subfamilie F
	Mitglied 1
KCNQ5	Spannungsabhängiger Kalium-Kanal Subfamilie Q
	Mitglied 5
kDa	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC-MS	Flüssigchromatographie mit
	Massenspektrometrischer Kopplung
IDHA	Laktatdehvdrogenase
LOH	Loss of Heterozyaoty / Velust der Heterozyaotie
M	Molarität (Einhait Staffmangankanzantration)
	Mikrotubulin opportion Protoin 2
	Mikrolubulin-assozilertes Protein 2
MC14	Monocarboxylattransporter 4 (auch SLC16A3 genannt)
Mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
MGMT	Methylguanin-DNA Methyltransferase
MIB-1	Mindbomb Homolog 1
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-RNA
ms	Millisekunden
N	Normaxie, chronische Normaxie
N→H	akute Hypoxie
NaCl	Natriumeblarid
	Niestinomidadenindinuklastid
	Nicolinamidadenindinukieolid Nicolinamidadenindinukieolid
NADPH	Nicotinamidadenindinukieotidphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NBM	Neurobasalmedium
NCI	National Cancer Institute
NF	Neurofilament
Nf1	Neurofibromatose 1
ng	Nanogramm
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic, Severe Combined
	Immunideficiency
NTP	Nukleosidtriphosphate
02	Sauerstoff
0074	Octamer binding transcriptionfactor 4
	Ontische Dichte
	Drotoin 52
	FIULEIII 33 Debre en de rei de els la la la rei els
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PR2	Phosphatgeputterte Salziosung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDHB	Pyruvatdehydrogenase B

PFA	Paraformaldehyd
PFKP	Phosphofruktokinase P
PGD1	Phosphogluconatdehydrogenase 1
PGK	Phosphoglyceratkinase
PGI	Phosphogluconolaktonase
PGM	Phosphoglyceratmytase
	Phoenhatidulinaaital 2 Kinaaa
PIJK	Phosphalidyinositoi-3-Kinase
PRM2	Pyruvatekinase M2
PIEN	Phosphatase ans Tensin Homolog
Primer	Oligonukleotid für die PCR
PPFIA4	Proteintyrosinphosphatase, Rezeptortyp, F Polypeptid
PPP	Pentosephosphatweg
PVDF	Polyvinylidendifluorid
aPCR	quantitative Real-Time PCR
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
PNacoOut	Pibonukloscojnhibitor
	Dibulace 5 phoenhotenimerace
RPE	Ribulose-5-phosphalepimerase
RPI	Ribulose-5-phosphatisomerase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RQ-Wert	Relativer Quantitätswert
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	"Reverse Transcription" PCR
S.C.	subkutan
SDS	Natriumdodecvlsulfat
SG7	Subgranuläre Zone
shALDOC	short hairnin RNA gegen ALDOC
shG6PD	short hairpin RNA gegen G6PD
	short hairpin RNA gegen Oor D
	Shuthalipin KNA
SUX-2	SRY-related HIVIG-box Protein
SSC	Sideward Scatter
SVZ	Subventrikulare Zone
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	Transaldolase
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Template	Matrize
ткт	Transketolase
TKTL1	Transketolase-like 1
TMZ	Temozolomid
TPI	Triosenhosnhatisomerase
	unter anderem
u. a.	
U/IN	
V	
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGER	Vascular Ebndothelial Growth Factor eceptor
V _{max}	Maximale enzymatische Umsatzgeschwindigkeit
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
-	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

5.7 Literaturverzeichnis

- 1. Ferlay, J. *et al.* GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. *Lyon Fr. Int. Agency Res. Cancer* (2010). doi:10.1002/ijc.27711
- 2. Tonn, J.-C., Westphal, M. & Rutka, J. T. Oncology of CNS Tumors. (Springer, 2010).
- 3. Universitätsklinikum Regensburg Hirntumoren. at <http://www.uniklinikumregensburg.de/zentren/zentrum-fuer
 - hirntumoren/Informationen_f_r_Patienten/Hirntumoren/index.php>
- Dolecek, T., Propp, J., NE Stroup & Kruchko, C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-Oncol.* v1 – v49 (2012).
- 5. Marumoto, T. & Saya, H. Molecular biology of glioma. Adv Exp Med Biol 2–11 (2012).
- 6. CBTRUS Central Brain Tumor Registry of the United States. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2005. *Web Publ.* (2009).
- 7. Louis, D. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 97–109 (2007).
- 8. Maher, E. *et al.* Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 1311–33 (2001).
- 9. Westphal, M. & Herrmann, H.-D. in *Prax. Neurol.* 571–575 (Klaus Kunze, 1999).
- 10. Radner, H., Blümcke, I., Reifenberger, G. & Wiestler, O. D. [The new WHO classification of tumors of the nervous system 2000. Pathology and genetics]. *Pathol.* **23**, 260–283 (2002).
- 11. Surawicz, T. S., Davis, F., Freels, S., Laws, E. R., Jr & Menck, H. R. Brain tumor survival: results from the National Cancer Data Base. *J. Neurooncol.* **40**, 151–160 (1998).
- 12. Hamilton, R. L. & Pollack, I. F. The molecular biology of ependymomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **7**, 807–822 (1997).
- 13. Hirntumor Ependymome optimal therapieren | hirntumorhilfe.de. at http://www.hirntumorhilfe.de/hirntumor/tumorarten/ependymom/
- 14. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 479–489 (2005).
- 15. Kleihues, P. *et al.* The WHO classification of tumors of the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 215–225; discussion 226–229 (2002).
- 16. Davis, F. G., McCarthy, B. J., Freels, S., Kupelian, V. & Bondy, M. L. The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors: surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. *Cancer* **85**, 485–491 (1999).
- 17. Xu, X., Stockhammer, F. & Schmitt, M. Cellular-based immunotherapies for patients with glioblastoma multiforme. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 764213 (2012).
- 18. Anton, K., Baehring, J. M. & Mayer, T. Glioblastoma multiforme: overview of current treatment and future perspectives. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **26**, 825–853 (2012).
- 19. Westermark, B. Glioblastoma a moving target. Ups. J. Med. Sci. 251–256 (2012).
- 20. Chen, J., McKay, R. & Parada, L. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. **Cell**, 36–47 (2012).
- 21. Ohgaki, H. Genetic Pathways to Glioblastomas. *Neuropathology* 1–7 (2005).
- 22. Burger, P. & Green, S. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1617–25 (1987).
- 23. Öhgaki, H., Reifenberger, G., Nomura, K. & Kleihues, P. Gliomas in: Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, O'Sullivan B, Sobin LH, Wittekind C. *Progn. Factors Cancer* Wiley-Liss, New York, 725–743 (2001).
- 24. Simmons, M. *et al.* Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res* 1122–8 (2001).
- 25. Ulutin, C. *et al.* Primary glioblastoma multiforme in younger patients: a single-institution experience. *Tumori* **92**, 407–411 (2006).
- 26. Kesari, S. Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Semin. Oncol.* **38 Suppl 4,** S2–10 (2011).
- 27. Lantos, P., VnndenBerg, S. & Kleihues, P. Tumours of the Nervous System. In Graham, D.I., and Lantos, P.L. (Eds). *Greenfields Neuropathol. Lond. Arnold* 583–879 (1996).
- 28. Kleihues, P. & Cavenee, W. in (IARC Press, 2000).
- 29. Dropcho, E. & Soong, S. The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology* 684–90 (1996).

- 30. Von Deimling, A. *et al.* Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol* 19–26 (1993).
- 31. Watanabe, K. *et al.* Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 217–23 (1996).
- 32. Kleihues, P. & Ohgaki, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 44–51 (1999).
- 33. Newcomb, E. W. *et al.* Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **8**, 655–667 (1998).
- 34. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* **100**, 2235–2241 (2009).
- 35. Ohgaki, H., Dessen, P. & Jourde, B. Genetic Pathways to Glioblastoma. *Cancer Res* 6892–6899 (2004).
- 36. Kleihues, P. & Ohgaki, H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol* 164–70 (2000).
- 37. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 1445–53 (2007).
- 38. TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 1061–1068 (2008).
- 39. Parsons, D. *et al.* An integrated genomic alanysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 1807–1812 (2008).
- 40. Hegi, M., Rajakannu & Weller, M. Epidermal growth factor receptor: a re-emerging target in glioblastoma. *Curr Opin Neurol* 774–9 (2012).
- 41. Ekstrand, A., Sugawa, N., James, C. & Collins, V. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci Usa* 4309–13 (1992).
- 42. Libermann, T. *et al.* Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 144–7
- 43. Huang, H. *et al.* The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 2927–35 (1997).
- 44. Nishikawa, R. *et al.* A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci Usa* 7727–31 (1994).
- 45. Wong, A. *et al.* Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci Usa* 2965–9 (1992).
- 46. Mellinghoff, I. K. *et al.* Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2012–2024 (2005).
- 47. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 489–501 (2002).
- 48. Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231–241 (1997).
- 49. Rubinfeld, H. & Seger, R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol* 151–74 (2005).
- 50. Wilkinson, M. & Millar, J. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *Faseb J* 2147–57 (2000).
- 51. Nagane, M. *et al.* A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 5079–86 (1996).
- 52. Boström, J. *et al.* Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res* 29–33 (1998).
- 53. Duerr, E. *et al.* PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 2259–64 (1998).
- 54. Tohma, Y. *et al.* PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 684–9 (1998).
- 55. Carico, C. *et al.* Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *Plos One* **7**, e33684 (2012).
- 56. Rasheed, B. *et al.* Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 2243–6 (1995).

- 57. Karlbom, A. *et al.* Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet* 169–74 (1993).
- 58. Ichimura, K., Schmidt, E., Miyakawa, A., Goike, H. & Collins, V. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes. Chromosomes Cancer* 9–15 (1998).
- 59. Fujisawa, H. *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **80**, 65–72 (2000).
- 60. Nakamura, M. *et al.* p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **11**, 159–168 (2001).
- 61. Biernat, W., Tohma, Y., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 303–9 (1997).
- 62. Biernat, W., Kleihues, P., Yonekawa, Y. & Ohgaki, H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 180–5 (1997).
- 63. Reifenberger, G., Liu, L., Ichimura, K., Schmidt, E. & Collins, V. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 2736–9 (1993).
- 64. Watanabe, K. *et al.* Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 523–30 (1997).
- 65. Yan, H. et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N. Engl. J. Med. 360, 765–773 (2009).
- 66. Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P. & Ohgaki, H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am. J. Pathol.* **174**, 1149–1153 (2009).
- 67. Cairncross, J. G. *et al.* Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1473–1479 (1998).
- 68. Bauman, G. S. *et al.* Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **48**, 825–830 (2000).
- 69. Felsberg, J. *et al.* Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **14**, 121–130 (2004).
- 70. Jenkins, R. B. *et al.* A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* **66**, 9852–9861 (2006).
- 71. Kreisl, T. N. Chemotherapy for malignant gliomas. *Semin. Radiat. Oncol.* **19**, 150–154 (2009).
- 72. Sarkaria, J. N. *et al.* Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 2900–2908 (2008).
- 73. Engelhard, H. H. The role of interstitial BCNU chemotherapy in the treatment of malignant glioma. *Surg. Neurol.* **53**, 458–464 (2000).
- 74. Dumenco, L. L., Allay, E., Norton, K. & Gerson, S. L. The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science* **259**, 219–222 (1993).
- 75. Gerson, S. L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 20, 2388–2399 (2002).
- 76. Baer, J. C. *et al.* Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *Br. J. Cancer* **67**, 1299–1302 (1993).
- 77. Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S. & Coquerelle, T. Transfection and expression of human O6methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* **12**, 1857–1867 (1991).
- 78. Wemmert, S. *et al.* Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment. *Neoplasia New York N* **7**, 883–893 (2005).
- 79. Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* **63**, 5821–5828 (2003).
- 80. Matos Rojas, I. A., Bertholdo, D. & Castillo, M. [Stem cells: implications in the development of brain tumors]. *Radiologia* **54**, 221–230 (2012).
- 81. Van der Kooy, D. & Weiss, S. Why stem cells? *Science* **287**, 1439–1441 (2000).
- 82. Jaenisch, R. & Young, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**, 567–582 (2008).

- 83. Martens, D. J., Tropepe, V. & van Der Kooy, D. Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 1085–1095 (2000).
- 84. Watt, F. M. & Hogan, B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287**, 1427–1430 (2000).
- 85. Gilbertson, R. J. & Rich, J. N. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 733–736 (2007).
- 86. Smith, A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* **441**, 1060–1060 (2006).
- 87. Gage, F. H. Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433–1438 (2000).
- 88. Darabi, R., Santos, F. N. C. & Perlingeiro, R. C. R. The therapeutic potential of embryonic and adult stem cells for skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Rev.* **4**, 217–225 (2008).
- 89. Young, H. E. *et al.* Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 753–769 (2005).
- 90. Young, H. E. & Black, A. C., Jr. Adult stem cells. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **276**, 75–102 (2004).
- 91. Weiss, S. *et al.* Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci.* **19**, 387–393 (1996).
- 92. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–111 (2001).
- 93. THOMAS, E. D., LOCHTE, H. L., Jr, LU, W. C. & FERREBEE, J. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **257**, 491–496 (1957).
- 94. Uchida, N. *et al.* Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97,** 14720–14725 (2000).
- 95. Blanco-Bose, W. E., Yao, C. C., Kramer, R. H. & Blau, H. M. Purification of mouse primary myoblasts based on alpha 7 integrin expression. *Exp. Cell Res.* **265**, 212–220 (2001).
- 96. Abraham, E. J. *et al.* Human pancreatic islet-derived progenitor cell engraftment in mmunocompetent mice. *Am. J. Pathol.* **164,** 817–830 (2004).
- 97. Dekaney, C. M., Rodriguez, J. M., Graul, M. C. & Henning, S. J. Isolation and characterization of a putative intestinal stem cell fraction from mouse jejunum. *Gastroenterology* **129**, 1567–1580 (2005).
- 98. Vourc'h, P. *et al.* Isolation and characterization of cells with neurogenic potential from adult skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 893–901 (2004).
- 99. Young, H. E. *et al.* Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals. II. Pluripotent epiblastic-like stem cells. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **277**, 178–203 (2004).
- 100. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
- 101. Lillge, W. & Cherry, D. The Case for Adult Stem Cell Research. Fusion,
- 102. Lagasse, E. *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* **6**, 1229–1234 (2000).
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. & Vescovi, A. L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534–537 (1999).
- 104. Woodbury, D., Reynolds, K. & Black, I. B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* **69**, 908–917 (2002).
- 105. Clarke, D. L. *et al.* Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **288**, 1660–1663 (2000).
- 106. Kondo, T. & Raff, M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* **289**, 1754–1757 (2000).
- 107. Taupin, P. & Gage, F. H. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J. Neurosci. Res.* **69**, 745–749 (2002).
- 108. Raff, M. C., Miller, R. H. & Noble, M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* **303**, 390–396 (1983).
- 109. Reynolds, B. A., Tetzlaff, W. & Weiss, S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **12**, 4565–4574 (1992).
- 110. Reynolds, B. A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707–1710 (1992).
- 111. Weiss, S. *et al.* Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 7599–7609 (1996).

- 112. Yin, A. H. *et al.* AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**, 5002–5012 (1997).
- 113. Miraglia, S. *et al.* A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* **90**, 5013–5021 (1997).
- 114. Zhao, C., Deng, W. & Gage, F. H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **132**, 645–660 (2008).
- 115. Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2074–2077 (1993).
- 116. Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 2027–2033 (1996).
- 117. Westphal, M. & Lamszus, K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 495–508 (2011).
- 118. Ignatova, T. N. *et al.* Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* **39**, 193–206 (2002).
- 119. Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396–401 (2004).
- 120. Galli, R. *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* **64**, 7011–7021 (2004).
- 121. Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T. & Dirks, P. B. Cancer stem cells in nervous system tumors. Oncogene 23, 7267–7273 (2004).
- 122. Lee, J. *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**, 391–403 (2006).
- 123. Chen, J. *et al.* A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* **488**, 522–526 (2012).
- 124. Zaidi, H. A., Kosztowski, T., DiMeco, F. & Quiñones-Hinojosa, A. Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis. *J. Neurooncol.* **93**, 49–60 (2009).
- 125. Günther, H. S. *et al.* Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* **27**, 2897–2909 (2008).
- 126. Bao, S. *et al.* Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* **66**, 7843–7848 (2006).
- 127. Hemmati, H. D. *et al.* Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15178–15183 (2003).
- 128. Venere, M., Fine, H. A., Dirks, P. B. & Rich, J. N. Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy. *Glia* **59**, 1148–1154 (2011).
- 129. Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* **5**, 67 (2006).
- 130. BRUCE, W. R. & VAN DER GAAG, H. A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO. *Nature* **199**, 79–80 (1963).
- 131. Wodinsky, I., Swiniarski, J. & Kensler, C. J. spleen colony studies of leukemia L1210 I growth kinetics of lymphocytic L1210 cells in vivo as determined by spleen colony assay. *Cancer Chemother Rep* 415–421 (1967).
- 132. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).
- 133. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–648 (1994).
- 134. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3983–3988 (2003).
- 135. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106–110 (2007).
- 136. Eramo, A. *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* **15**, 504–514 (2008).
- 137. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. & Maitland, N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* **65**, 10946–10951 (2005).
- 138. Sanai, N., Alvarez-Buylla, A. & Berger, M. S. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med.* **353**, 811–822 (2005).
- 139. Temple, S. The development of neural stem cells. *Nature* **414**, 112–117 (2001).

- 140. Hambardzumyan, D., Squatrito, M., Carbajal, E. & Holland, E. C. Glioma formation, cancer stem cells, and akt signaling. *Stem Cell Rev.* **4**, 203–210 (2008).
- 141. Jiang, Y. & Uhrbom, L. On the origin of glioma. Ups. J. Med. Sci. 117, 113–121 (2012).
- 142. Alcantara Llaguno, S. *et al.* Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* **15**, 45–56 (2009).
- 143. Ding, H. *et al.* Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res.* **61**, 3826–3836 (2001).
- 144. Holland, E. C. *et al.* Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat. Genet.* **25**, 55–57 (2000).
- 145. Vescovi, A. L., Galli, R. & Reynolds, B. A. Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 6, 425–436 (2006).
- 146. Quintana, E. *et al.* Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**, 593–598 (2008).
- 147. Zheng, X., Shen, G., Yang, X. & Liu, W. Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res.* **67**, 3691–3697 (2007).
- 148. Beier, D. *et al.* CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* **67**, 4010–4015 (2007).
- 149. Joo, K. M. *et al.* Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **88**, 808–815 (2008).
- 150. Wang, J. *et al.* CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **122**, 761–768 (2008).
- 151. Blazek, E. R., Foutch, J. L. & Maki, G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **67**, 1–5 (2007).
- 152. Platet, N. *et al.* Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett.* **258**, 286–290 (2007).
- 153. Griguer, C. E. *et al.* CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *Plos One* **3**, e3655 (2008).
- 154. McCord, A. M. *et al.* Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol. Cancer Res. Mcr* **7**, 489–497 (2009).
- 155. Sakariassen, P. Ø., Immervoll, H. & Chekenya, M. Cancer stem cells as mediators of treatment resistance in brain tumors: status and controversies. *Neoplasia New York N* **9**, 882–892 (2007).
- 156. Ezashi, T., Das, P. & Roberts, R. M. Low O2 tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4783–4788 (2005).
- 157. Gustafsson, M. V. *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev. Cell* **9**, 617–628 (2005).
- 158. Chen, H.-L. *et al.* Oxygen tension regulates survival and fate of mouse central nervous system precursors at multiple levels. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 2291–2301 (2007).
- 159. Covello, K. L. *et al.* HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* **20**, 557–570 (2006).
- 160. Soeda, A. *et al.* Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* **28**, 3949–3959 (2009).
- 161. Bar, E. E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W. & Eberhart, C. G. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am. J. Pathol.* **177**, 1491–1502 (2010).
- 162. Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B. & Rich, J. N. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 3274–3284 (2009).
- 163. Borovski, T., De Sousa E Melo, F., Vermeulen, L. & Medema, J. P. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* **71**, 634–639 (2011).
- 164. Seidel, S. *et al.* A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain J. Neurol.* **133**, 983–995 (2010).
- 165. Grayson, W. L., Zhao, F., Bunnell, B. & Ma, T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 948–953 (2007).
- 166. Semenza, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* **8**, S62–67 (2002).
- 167. Zhou, B.-B. S. *et al.* Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 806–823 (2009).

- 168. Keith, B. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* **129**, 465–472 (2007).
- 169. Evans, S. M. *et al.* Comparative measurements of hypoxia in human brain tumors using needle electrodes and EF5 binding. *Cancer Res.* **64**, 1886–1892 (2004).
- 170. Matsumoto, S., Yasui, H., Mitchell, J. B. & Krishna, M. C. Imaging cycling tumor hypoxia. *Cancer Res.* **70**, 10019–10023 (2010).
- 171. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **23**, 537–548 (2009).
- 172. Warburg, O., Posener, K. & Negelein, E. Über den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochem. Z.* 319–344 (1924).
- 173. Ferreira, L. M. R. Cancer metabolism: the Warburg effect today. *Exp. Mol. Pathol.* **89,** 372–380 (2010).
- 174. Racker, E. & Spector, M. Warburg effect revisited: merger of biochemistry and molecular biology. *Science* **213**, 303–307 (1981).
- 175. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
- 176. Weinberg, F. & Chandel, N. S. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1177**, 66–73 (2009).
- 177. WENNER, C. E. & WEINHOUSE, S. Metabolism of neoplastic tissue. III. Diphosphopyridine nucleotide requirements for oxidations by mitochondria of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Cancer Res.* **13**, 21–26 (1953).
- 178. Rossignol, R. *et al.* Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 985–993 (2004).
- 179. Griguer, C. E., Oliva, C. R. & Gillespie, G. Y. Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines. *J. Neurooncol.* **74**, 123–133 (2005).
- 180. Wallace, D. C. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **70**, 363–374 (2005).
- 181. Dang, C. V. & Semenza, G. L. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24, 68–72 (1999).
- 182. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
- 183. Ward, P. S. & Thompson, C. B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* **21**, 297–308 (2012).
- 184. Bartrons, R. & Caro, J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 223–229 (2007).
- 185. Kim, J. & Dang, C. V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res.* **66**, 8927–8930 (2006).
- 186. Ferreira, L. M. R., Hebrant, A. & Dumont, J. E. Metabolic reprogramming of the tumor. *Oncogene* **31**, 3999–4011 (2012).
- 187. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95 (2011).
- Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899 (2004).
- 189. Méneret, A. *et al.* A serine synthesis defect presenting with a Charcot-Marie-Tooth-like polyneuropathy. *Arch. Neurol.* **69**, 908–911 (2012).
- 190. Garber, A. J., Karl, I. E. & Kipnis, D. M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. II. The precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis. *J. Biol. Chem.* **251**, 836–843 (1976).
- 191. Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**, 703–707 (2008).
- 192. Hsieh, C.-H., Lee, C.-H., Liang, J.-A., Yu, C.-Y. & Shyu, W.-C. Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity. *Oncol. Rep.* **24**, 1629–1636 (2010).
- 193. Semenza, G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 993–998 (2002).
- 194. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**, 177–185 (2006).
- 195. Kim, S.-G., Manes, N. P., El-Maghrabi, M. R. & Lee, Y.-H. Crystal structure of the hypoxiainducible form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3): a possible new target for cancer therapy. *J. Biol. Chem.* **281**, 2939–2944 (2006).

- 196. Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. Cell Metab. 3, 187-197 (2006). 197. Bui, T. & Thompson, C. B. Cancer's sweet tooth. Cancer Cell 9, 419-420 (2006). 198. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. Cancer Cell 13, 472-482 (2008). 199. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab. 7, 11-20 (2008). 200. Gillies, R., Didier, N. & Denton, M. Determination of cell number in monolayer cultures. Anal Biochem 109–113 (1986). 201. Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A. & Kalnins, V. I. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. J. Cell Biol. 94, 253-262 (1982). 202. Jones-Villeneuve, E. M., Rudnicki, M. A., Harris, J. F. & McBurney, M. W. Retinoic acidinduced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. Mol. Cell. Biol. 3, 2271-2279 (1983).203. Van Inzen, W. G., Peppelenbosch, M. P., van den Brand, M. W., Tertoolen, L. G. & de Laat, S. W. Neuronal differentiation of embryonic stem cells. Biochim. Biophys. Acta 1312, 21-26 (1996).204. Das, A., Banik, N. L. & Ray, S. K. Retinoids induced astrocytic differentiation with down regulation of telomerase activity and enhanced sensitivity to taxol for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. J. Neurooncol. 87, 9-22 (2008). 205. Raible, D. W. & McMorris, F. A. Oligodendrocyte differentiation and progenitor cell proliferation are independently regulated by cyclic AMP. J. Neurosci. Res. 34, 287-294 (1993). 206. Home | Affymetrix. at <http://www.affymetrix.com/estore/index.jsp> Lockhart, D. J. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide 207. arrays. Nat. Biotechnol. 14, 1675-1680 (1996). 208. Tamames, J. et al. Bioinformatics methods for the analysis of expression arrays: data clustering and information extraction. J. Biotechnol. 98, 269-283 (2002). 209. Wu, Z., Irizarry, R., Gentleman, R., Murillo, F. & Spencer, F. A model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. J Amer Stat Assoc 909-917 (2004). 210. Warren, P., Taylor, D., Martini, P., Jackson, J. & Beinkowska, J. PANP - a New Method of Oligonucleotide Gene Detection on Expression Arrays. (2005). at <http://people.brandeis.edu/~dtaylor/Taylor Papers/BIBE07 PANP.pdf> 211. Sneath, P. & Sokal, R. in (Freeman, 1973). 212. De Hoon, M. J. L., Imoto, S., Nolan, J. & Miyano, S. Open source clustering software. Bioinforma. Oxf. Engl. 20, 1453–1454 (2004). 213. Oliveros, J. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html. (2007).at <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> 214. Ashburner, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat. Genet. 25, 25-29 (2000). Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG for integration and 215. interpretation of large-scale molecular data sets. Nucleic Acids Res. 40, D109–114 (2012). 216. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 28, 27-30 (2000). 217. Dopazo, J. Functional interpretation of microarray experiments. Omics J. Integr. Biol. 10, 398-410 (2006). 218. Khatri, P. & Drăghici, S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. Bioinforma. Oxf. Engl. 21, 3587-3595 (2005). Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large 219. gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat. Protoc. 4, 44-57 (2008). 220. DAVID Functional Annotation **Bioinformatics** Microarray Analysis. at <http://david.abcc.ncifcrf.gov/> Al-Shahrour, F. et al. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional 221. annotation of genome-scale experiments. Nucleic Acids Res. 34, W472-476 (2006). 222. pgipz_technical_manual_4_1_10.pdf. at <http://www.bmgc.umn.edu/prod/groups/ahc/@pub/@ahc/@bmgc/documents/asset/pgipz tec hnical manual 4 1 10.pdf>
- Andree, H. *et al.* Clustering of Lipid-bound Annexin V May Explain Its Anticoagulant Effect. *J. Biol. Chem.* 17907–17912 (1992).

- 224. Fadok, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207–2216 (1992).
- 225. Creutz, C. E. The annexins and exocytosis. Science 258, 924–931 (1992).
- 226. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **184**, 39–51 (1995).
- 227. Lee, W. N. *et al.* Mass isotopomer study of the nonoxidative pathways of the pentose cycle with [1,2-13C2]glucose. *Am. J. Physiol.* **274**, E843–851 (1998).
- 228. Balcke, G. U. *et al.* Linking energy metabolism to dysfunctions in mitochondrial respiration--a metabolomics in vitro approach. *Toxicol. Lett.* **203**, 200–209 (2011).
- 229. Lamszus, K. *et al.* Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 4934–4940 (2005).
- 230. Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* **17**, 126–140 (2003).
- 231. Makeh, I. *et al.* Analysis of a brain-specific isozyme. Expression and chromatin structure of the rat aldolase C gene and transgenes. *J. Biol. Chem.* **269**, 4194–4200 (1994).
- 232. Staal, G. E., Kalff, A., Heesbeen, E. C., van Veelen, C. W. & Rijksen, G. Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas. *Cancer Res.* **47**, 5047–5051 (1987).
- 233. Vander Heiden, M. G. *et al.* Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* **329**, 1492–1499 (2010).
- 234. Wolf, A. *et al.* Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J. Exp. Med.* **208**, 313–326 (2011).
- 235. Völker, H.-U. *et al.* Expression of transketolase-like 1 and activation of Akt in grade IV glioblastomas compared with grades II and III astrocytic gliomas. *Am. J. Clin. Pathol.* **130**, 50–57 (2008).
- 236. Boros, L. G., Cascante, M. & Lee, W. N. P. Metabolic profiling of cell growth and death in cancer: applications in drug discovery. *Drug Discov. Today* **7**, 364–372 (2002).
- 237. Wolf, A., Agnihotri, S. & Guha, A. Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* **1**, 552–562 (2010).
- 238. Oudard, S. *et al.* High glycolysis in gliomas despite low hexokinase transcription and activity correlated to chromosome 10 loss. *Br. J. Cancer* **74**, 839–845 (1996).
- 239. Brat, D. J. *et al.* Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res.* **64**, 920–927 (2004).
- 240. Zagzag, D. *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* **88**, 2606–2618 (2000).
- 241. McLendon, R. E. & Rich, J. N. Glioblastoma Stem Cells: A Neuropathologist's View. *J. Oncol.* **2011**, 397195 (2011).
- 242. Le Clainche, C. & Carlier, M.-F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* **88**, 489–513 (2008).
- 243. Honda, S. *et al.* Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 1975–1982 (2001).
- 244. Martens, T. *et al.* A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 6144–6152 (2006).
- 245. Schulte, A. *et al.* A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target. *Glia* **59**, 590–602 (2011).
- 246. Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R.-H. & Huang, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* **25**, 4633–4646 (2006).
- 247. Bone, W. & Cooper, T. G. In vitro inhibition of rat cauda epididymal sperm glycolytic enzymes by ornidazole, alpha-chlorohydrin and 1-chloro-3-hydroxypropanone. *Int. J. Androl.* **23**, 284–293 (2000).
- 248. Zahoor, A., Lafleur, M. V. M., Knight, R. C., Loman, H. & Edwards, D. I. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 3299–3304 (1987).
- 249. Ikbal, M., Yilmaz, G., Dogan, H., Alp, M. Y. & Cebi, A. H. The evaluation of genotoxic potential of ornidazole, nitroimidazole, in lymphocyte culture of patients with amebiasis. *Drug Chem. Toxicol.* **34**, 162–166 (2011).

- 250. Yuan, X. *et al.* Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**, 9392–9400 (2004).
- 251. Dirks, P. B. Brain tumor stem cells. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **11**, 12–13 (2005).
- 252. Beier, D. *et al.* CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **18**, 370–377 (2008).
- 253. Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G. & Muhr, J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat. Neurosci.* **6**, 1162–1168 (2003).
- 254. Dell'Albani, P. Stem cell markers in gliomas. Neurochem. Res. 33, 2407–2415 (2008).
- 255. Ellis, P. *et al.* SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev. Neurosci.* **26**, 148–165 (2004).
- 256. Eliasson, P. *et al.* Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp. Hematol.* **38**, 301–310.e2 (2010).
- 257. Barrett, L. E. *et al.* Self-renewal does not predict tumor growth potential in mouse models of high-grade glioma. *Cancer Cell* **21**, 11–24 (2012).
- 258. Hattingen, E. *et al.* Bevacizumab impairs oxidative energy metabolism and shows antitumoral effects in recurrent glioblastomas: a 31P/1H MRSI and quantitative magnetic resonance imaging study. *Neuro-Oncol.* **13**, 1349–1363 (2011).
- 259. Keunen, O. *et al.* Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3749–3754 (2011).
- 260. Kunkel, P. *et al.* Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 61, 6624–6628 (2001).
- 261. Rubenstein, J. L. *et al.* Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia New York N* **2**, 306–314 (2000).
- 262. DeLay, M. *et al.* Microarray analysis verifies two distinct phenotypes of glioblastomas resistant to antiangiogenic therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 2930–2942 (2012).
- 263. WARBURG, O. On the origin of cancer cells. Science 123, 309–314 (1956).
- 264. Christofk, H. R. *et al.* The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452**, 230–233 (2008).
- 265. Geiger, K. *et al.* Identification of hypoxia-induced genes in human SGBS adipocytes by microarray analysis. *Plos One* **6**, e26465 (2011).
- 266. Hedenfalk, I. *et al.* Microarray-Based Analyses of Hypoxia-Induced Transcriptional Changes in Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Genomics Proteomics* 83–96 (2005).
- 267. Jin, K. *et al.* cDNA microarray analysis of changes in gene expression induced by neuronal hypoxia in vitro. *Neurochem. Res.* **27**, 1105–1112 (2002).
- 268. Wamelink, M. M. C., Struys, E. A. & Jakobs, C. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J. Inherit. Metab. Dis.* **31**, 703–717 (2008).
- 269. Amaral, A. I. *et al.* Metabolic alterations induced by ischemia in primary cultures of astrocytes: merging 13C NMR spectroscopy and metabolic flux analysis. *J. Neurochem.* **113**, 735–748 (2010).
- 270. Husain, J. & Juurlink, B. H. Oligodendroglial precursor cell susceptibility to hypoxia is related to poor ability to cope with reactive oxygen species. *Brain Res.* **698**, 86–94 (1995).
- 271. Dringen, R., Gutterer, J. M. & Hirrlinger, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem. Febs* **267**, 4912–4916 (2000).
- 272. Kaur, C., Foulds, W. S. & Ling, E.-A. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin. Ophthalmol. Auckl. Nz* **2**, 879–889 (2008).
- 273. Jaeschke, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26 Suppl 1,** 173–179 (2011).
- 274. Hakim, A. M., Moss, G. & Gollomp, S. M. The effect of hypoxia on the pentose phosphate pathway in brain. *J. Neurochem.* **26**, 683–688 (1976).
- 275. Domańska-Janik, K. Hexose monophosphate pathway activity in normal and hypoxic rat brain. *Resuscitation* **16**, 79–90 (1988).
- 276. Serganova, I. *et al.* Metabolic imaging: a link between lactate dehydrogenase A, lactate, and tumor phenotype. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 6250–6261 (2011).
- 277. Brahimi-Horn, M. C., Bellot, G. & Pouysségur, J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 67–72 (2011).

- 278. Ben-Yoseph, O., Camp, D. M., Robinson, T. E. & Ross, B. D. Dynamic measurements of cerebral pentose phosphate pathway activity in vivo using [1,6-13C2,6,6-2H2]glucose and microdialysis. *J. Neurochem.* **64**, 1336–1342 (1995).
- 279. Kingsley-Hickman, P. B., Ross, B. D. & Krick, T. Hexose monophosphate shunt measurement in cultured cells with [1-13C]glucose: correction for endogenous carbon sources using [6-13C] glucose. *Anal. Biochem.* **185**, 235–237 (1990).
- 280. Eckerich, C. *et al.* Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGFinduced cell migration. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **121**, 276–283 (2007).
- 281. Rong, Y., Durden, D. L., Van Meir, E. G. & Brat, D. J. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 529–539 (2006).
- 282. Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. E. & Westphal, M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 1624–1636 (2003).
- 283. Giese, A. *et al.* Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **67**, 275–282 (1996).
- 284. Feron, O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **92**, 329–333 (2009).
- 285. Beckner, M. E., Stracke, M. L., Liotta, L. A. & Schiffmann, E. Glycolysis as primary energy source in tumor cell chemotaxis. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1836–1840 (1990).
- 286. Watanabe, H., Takehana, K., Date, M., Shinozaki, T. & Raz, A. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Res.* **56**, 2960–2963 (1996).
- 287. Niinaka, Y., Paku, S., Haga, A., Watanabe, H. & Raz, A. Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer Res.* **58**, 2667–2674 (1998).
- 288. Moellering, R. E. *et al.* Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 411–425 (2008).
- 289. Rofstad, E. K. Microenvironment-induced cancer metastasis. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 589–605 (2000).
- 290. Rofstad, E. K., Mathiesen, B., Kindem, K. & Galappathi, K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res.* 66, 6699–6707 (2006).
- 291. Zhang, Z. *et al.* High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 1497–1505 (2010).
- 292. Li, D. *et al.* A new G6PD knockdown tumor-cell line with reduced proliferation and increased susceptibility to oxidative stress. *Cancer Biother. Radiopharm.* **24**, 81–90 (2009).
- 293. Pandolfi, P. P. *et al.* Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *Embo J.* **14**, 5209–5215 (1995).
- 294. Ho, H. Y. *et al.* Enhanced oxidative stress and accelerated cellular senescence in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 156–169 (2000).
- 295. Ritterson Lew, C. & Tolan, D. R. Targeting of several glycolytic enzymes using RNA interference reveals aldolase affects cancer cell proliferation through a non-glycolytic mechanism. *J. Biol. Chem.* **287**, 42554–42563 (2012).
- 296. Clarke, F. M., Stephan, P., Morton, D. J. & Weidemann, J. glycolytic enzyme organization via the cytoskeleton and its role in metabolic regulation. In Regulation of Carbohydrate Metabolism. R. Beitner, editor. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1–31 (1985).
- 297. Pagliaro, L. & Taylor, D. L. 2-Deoxyglucose and cytochalasin D modulate aldolase mobility in living 3T3 cells. *J. Cell Biol.* **118**, 859–863 (1992).
- 298. Stossel, T. P. On the crawling of animal cells. Science 260, 1086–1094 (1993).
- 299. Wang, J., Tolan, D. R. & Pagliaro, L. Metabolic compartmentation in living cells: structural association of aldolase. *Exp. Cell Res.* **237**, 445–451 (1997).
- 300. Duncan, J. A. & Storey, K. B. Subcellular enzyme binding and the regulation of glycolysis in anoxic turtle brain. *Am. J. Physiol.* **262**, R517–523 (1992).
- 301. Clarke, F. M., Stephan, P., Huxham, G., Hamilton, D. & Morton, D. J. Metabolic dependence of glycolytic enzyme binding in rat and sheep heart. *Eur. J. Biochem. Febs* **138**, 643–649 (1984).

- 302. Lowery, M. S., Roberts, S. J. & Somero, G. N. Effects of Starvation on the Activities and Localization of Glycolytic Enzymes in the White Muscle of the Barred Sand Bass Paralabrax nebulifer. *Physiol. Zool.* **60**, 538–549 (1987).
- 303. Arnold, H. & Pette, D. Binding of aldolase and triosephosphate dehydrogenase to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase. *Eur. J. Biochem. Febs* **15**, 360–366 (1970).
- 304. Buscaglia, C. A., Penesetti, D., Tao, M. & Nussenzweig, V. Characterization of an aldolasebinding site in the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 1324–1331 (2006).
- 305. Liotta, L. A. *et al.* Tumor cell autocrine motility factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 3302–3306 (1986).
- 306. Ernst, A. *et al.* Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 6541–6550 (2009).
- 307. Janiszewska, M. *et al.* Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells. *Genes Dev.* **26**, 1926–1944 (2012).
- 308. Kuo, W., Lin, J. & Tang, T. K. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **85**, 857–864 (2000).
- 309. Staugaitis, S. M., Zerlin, M., Hawkes, R., Levine, J. M. & Goldman, J. E. Aldolase C/zebrin II expression in the neonatal rat forebrain reveals cellular heterogeneity within the subventricular zone and early astrocyte differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 6195–6205 (2001).
- 310. Koutcher, J. A. *et al.* Effect of 6-aminonicotinamide on the pentose phosphate pathway: 31P NMR and tumor growth delay studies. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med.* Soc. Magn. Reson. Med. **36**, 887–892 (1996).
- 311. Candelario, K. M., Shuttleworth, C. W. & Cunningham, L. A. Neural stem/progenitor cells display a low requirement for oxidative metabolism independent of hypoxia inducible factor-1alpha expression. *J. Neurochem.* **125**, 420–429 (2013).
- 312. Bone, W., Yeung, C. H., Skupin, R., Haufe, G. & Cooper, T. G. Toxicity of ornidazole and its analogues to rat spermatozoa as reflected in motility parameters. *Int. J. Androl.* **20**, 347–355 (1997).
- 313. Simons, A. L., Ahmad, I. M., Mattson, D. M., Dornfeld, K. J. & Spitz, D. R. 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 3364–3370 (2007).
- 314. Geschwind, J.-F. H., Ko, Y. H., Torbenson, M. S., Magee, C. & Pedersen, P. L. Novel Therapy for Liver Cancer Direct Intraarterial Injection of a Potent Inhibitor of ATP Production. *Cancer Res.* **62**, 3909–3913 (2002).
- 315. Pedersen, P. L. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the 'Warburg Effect', i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 211–222 (2007).
- 316. Vaughn, A. E. & Deshmukh, M. Glucose Metabolism Inhibits Apoptosis in Neurons and Cancer Cells by Redox Inactivation of Cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1477–1483 (2008).
- 317. Tennant, D. A., Durán, R. V. & Gottlieb, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 267–277 (2010).
- 318. Singh, D. *et al.* Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgengesellschaft Al* **181**, 507–514 (2005).
- 319. Cao, X. *et al.* Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **59**, 495–505 (2007).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Katrin Lamszus danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle für die intensive Unterstützung und konstruktive Zusammenarbeit während meiner Dissertationsarbeit bedanken.

Prof. Dr. Udo Wienand am Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg danke ich für die Übernahme der weiteren Begutachtung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Manfred Westphal danke ich für die fortwährende Unterstützung und Förderung während meiner Arbeit.

Dr. Alexander Schulte möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung, die zahlreichen interessanten und konstruktiven Diskussionen und die Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Problemen danken. Insbesondere möchte ich mich auch für die technische Unterstützung bei den tierexperiementellen Arbeiten, die immer motivierende und aufmunternde Arbeitsatmosphäre und sein immer "offenes Ohr" bedanken.

Ein großes Dankeschön geht besonders auch an Mareike Holz, Anna Schöttler, Regina Peters, Svenja Zapf, Hildegard Meißner und Katharina Kolbe, ohne deren Tatkraft, Erfahrung und Unterstützung im Labor sicher kein so effektives Arbeiten möglich gewesen wäre, sowie für die äußerst angenehme und harmonische Arbeitsatmosphäre.

Dr. Tobias Martens danke ich für die Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern, insbesondere bei Dr. Gerd Balcke aus dem Institut für Stoffwechsel- und Zellbiologie des Leibnitz-Instituts in Halle für das große Engagement bezüglich der massenspektrometrischen Analysen und Carsten Kuhl für die Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung der massenspektrometrischen Daten. Ein großer Dank geht zudem an die Mitarbeiter der FACS Core Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Hilfe bei den durchflußzytometrischen Analysen. Meinen ehemaligen und aktuellen Laborkollegen, Hauke Günther, Katrin Liffers und Martin Zamykal danke ich für die Tipps, Anregungen und den wissenschaftlichen Austausch während meiner Dissertsationsarbeit, das entspannte Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit in allen Lebenslagen.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Konrad-Adenauer-Stiftung für die Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums.

Der größte Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die mir viele Türen geöffnet haben und auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte, sowie Arne und meinen Freunden für die Unterstützung während der vergangenen 3 Jahre.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 25.5.2013

Annegret Kathagen