

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

Direktor Prof. Dr. Manfred Westphal

**Der Einfluss hypoxischer Kulturbedingungen
auf Tumorstammzellen des Glioblastoms**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Lutz-Arnim Krawinkel
aus Heppenheim (Bergstraße)

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 04.07.2012

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. K. Lamszus

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. C. Hagel

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. N. O. Schmidt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	- 1 -
1.1	Das Glioblastom.....	- 1 -
1.2	Das Konzept der Tumorstammzelle.....	- 4 -
1.2.1	Stammzellen.....	- 4 -
1.2.2	Stammzellmarker.....	- 6 -
1.2.3	Tumorstammzellen.....	- 7 -
1.2.4	Marker für Tumorstammzellen.....	- 10 -
1.3	Tumorstammzellen und Hypoxie.....	- 12 -
1.4	Zielsetzung.....	- 16 -
2	Material und Methoden.....	- 18 -
2.1	Methoden.....	- 18 -
2.1.1	Methoden der Zellbiologie.....	- 18 -
2.1.2	Molekularbiologische Methoden.....	- 21 -
2.1.3	Proteinbiochemische Methoden.....	- 27 -
2.1.4	Tierexperimente und HE-Färbung der Schnitte.....	- 31 -
2.2	Material.....	- 34 -
2.3	Geräte.....	- 35 -
3	Ergebnisse.....	- 36 -
3.1	CD133 in der konventionellen Gliomlinie U251 in kurzzeitiger Hypoxie.....	- 36 -
3.2	CD133 in den Linien GS-11 und GS-12 in kurzzeitiger Hypoxie.....	- 37 -
3.3	CD133 in den Linien GS-2 und GS-7 in kurzzeitiger Hypoxie.....	- 41 -
3.4	Oct-4 in den Linien GS-11 und GS-12 in kurzzeitiger Hypoxie.....	- 43 -
3.5	Verhalten von Stammzellmarkern in dauerhafter Hypoxie.....	- 45 -
3.6	Untersuchungen weiterer GS-Linien.....	- 47 -
3.7	Untersuchung weiterer Marker.....	- 49 -
3.8	shRNA gegen HIF1 α	- 51 -
3.9	Funktionelle Unterschiede zwischen GS-12 und GS-12H.....	- 55 -

4	Diskussion	- 61 -
4.1	Stammzellmarker und kurzzeitige Hypoxie	- 61 -
4.2	Stammzellmarker in dauerhafter Hypoxie	- 66 -
4.3	Molekulare Grundlagen der Regulation des Tumorstammzellphänotyps	- 73 -
4.4	Funktionelle Änderungen des Tumorstammzellphänotyps in Hypoxie	- 77 -
5	Zusammenfassung	- 80 -
6	Anhang	- 82 -
6.1	FACS-Rohdaten	- 82 -
6.2	Abkürzungsverzeichnis	- 89 -
6.3	Literaturverzeichnis	- 91 -
6.4	Danksagung	- 100 -
6.5	Lebenslauf	- 101 -
6.6	Publikationen	- 102 -
6.7	Eidesstattliche Erklärung	- 103 -

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom

Mit einer mittleren Überlebensrate von 14,6 Monaten und einer fünf-Jahres Überlebensrate von nur 3% stellt das Glioblastom eine der malignesten Tumorentitäten des Menschen dar. Da bei dieser Erkrankung gängige onkologische Therapien kaum wirksam sind, müssen dringend neue therapeutische Ziele identifiziert und innovative Behandlungskonzepte entwickelt werden. Da das Glioblastom zudem mit einem Anteil von 22,6% der häufigste der hirneigenen Tumore ist, nimmt es eine herausragende Stellung in der neuroonkologischen Versorgung ein (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie – Gliome, 2008, Stupp et al. 2005).

Das Glioblastom gehört zu der Gruppe der Gliome. Als Gliome werden die Tumore bezeichnet, die vom Stützgewebe (Glia) des Hirns ausgehen. Zu ihnen gehören Oligodendrogliome, Oligoastrozytome, Ependymome und die große Gruppe der Astrozytome, deren häufigster Vertreter wiederum das Glioblastom ist. Die Tabelle 1.1. gibt eine Übersicht zu den astrozytären Gliomen. Die angegebenen WHO-Grade bezeichnen histologische Einteilungen der Malignität (Louis et al. 2007).

Tabelle 1.1. Übersicht über die Gliome (WHO Grade I-IV) astrozytärer Entität. Zusammengestellt nach den Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie – Gliome 2008 (WHO Grade II-IV) sowie nach Burkhard et al. 2003 (WHO Grad I).

WHO Grad	Tumorentität	Häufigkeit (in % der hirneigenen Tumore)	Inzidenz pro 100.000 / Jahr	5-Jahres-Überleben (in %)
I	Pilozytisches Astrozytom	6,6 ⁽¹⁾	0,83 ⁽²⁾	100 ⁽³⁾
II	Diffuses Astrozytom	1,3	0,17	49
III	Anaplastisches Astrozytom	4,3	0,54	31
IV	Glioblastom	22,6	2,94	3

⁽¹⁾ in Bezug auf Astrozytome; ⁽²⁾ innerhalb der unter 15-Jährigen; ⁽³⁾ 95,8% 10-Jahres-Überleben

Das Glioblastom stellt mit dem WHO-Grad IV die maligneste Form des Astrozytoms dar. Es kann sich, wie in den meisten Fällen, *de novo* als primäres Glioblastom entwickeln oder aus einem anaplastischen oder diffusen Astrozytom durch fortschreitenden Malignisierung hervorgehen (sekundäres Glioblastom).

Therapeutisch erfolgt nach Diagnose eines Glioblastoms in der Regel zunächst die operative Versorgung. Hier stellt sich das Problem, dass zum Zeitpunkt der Diagnose die Tumoren meist bereits weit in das Hirnparenchym invadiert sind und sich somit Anteile des Tumors der chirurgischen Resektion entziehen, wie Abbildung 1.1. zeigt.

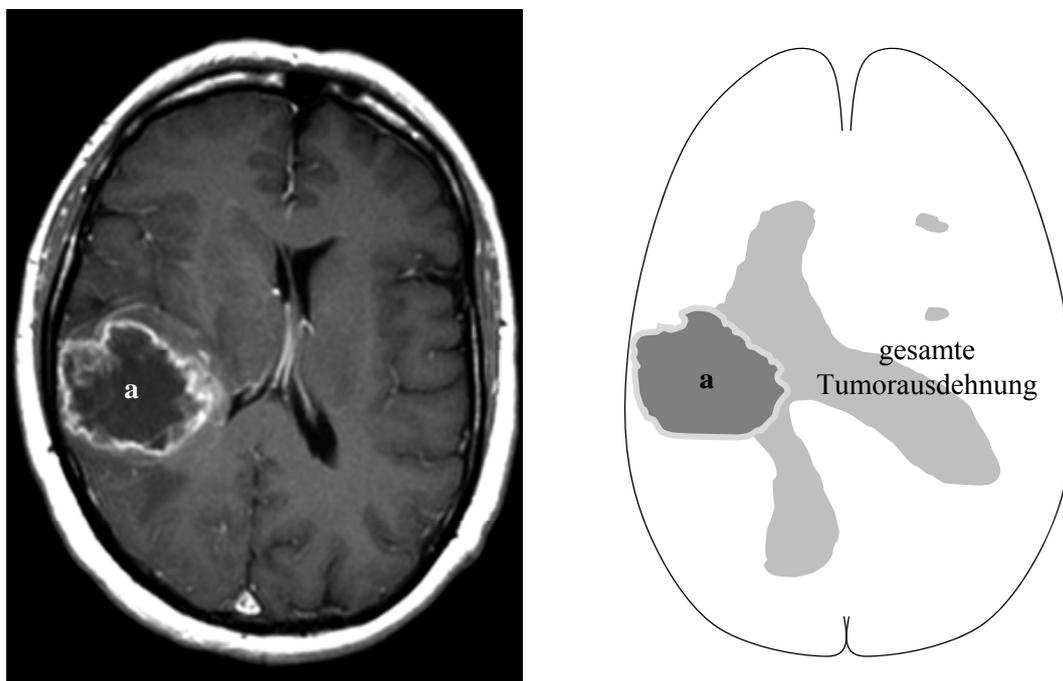


Abb. 1.1. Darstellung der Ausdehnung eines Glioblastoms im menschlichen Hirn bei klinischer Diagnose. Links ist ein MRT-Bild eines Glioblastoms in der rechten Hemisphäre zu sehen. Mit a ist der der operativen Versorgung zugängliche, im Randsaum Kontrastmittel-anreichernde Anteil gekennzeichnet. Rechts ist schematisch die mögliche Ausbreitung des Glioblastoms bei klinischer Diagnose dargestellt. Da die Tumoren bis zur ersten manifesten klinischen Symptomatik meist bereits große Teile des Hirns infiltriert haben, bleiben Anteile der chirurgischen Versorgung unzugänglich. (Das MRT-Bild wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Heese (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des UKE) zur Verfügung gestellt.)

Bei Glioblastompatienten wird im Anschluss an die chirurgische Versorgung zumeist eine Radiochemotherapie durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um Roger Stupp hat eine Kombinationsbehandlung des alkylierenden Zytostatikums Temolozomid und einer Radiotherapie mit einer Gesamtdosis von 60 Gray vorgeschlagen, die sich als Standardtherapie durchgesetzt hat. (Stupp et al. 2005).

Jüngere Studien deuten auf Behandlungsfortschritte durch Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Avastin; Genentech, South San Francisco). So konnte gezeigt werden, dass bei rezidierten Glioblastomen die Behandlung mit Avastin und dessen Kombination mit Irinotecan den Patienten einen – wenngleich geringen - Vorteil verschaffte. Friedman et al. konnten zeigen, dass in einer Gruppe von 85 Patienten mit rezidiertem Glioblastom mittels der Behandlung mit Avastin bei ca. 42% der Patienten eine sechsmonatige Phase ohne Tumorprogression erreicht werden konnte. In einer weiteren Gruppe von 82 Patienten, die mit einer Kombination von Avastin und Irinotecan behandelt wurde, zeigten ca. 50% der behandelten Patienten eine sechsmonatige Phase ohne Tumorprogression. Diese Werte überschreiten dabei die in der Literatur angenommene Ansprechrate von 15% in Bezug auf sechsmonatiges Überleben ohne Tumorprogression (Friedman et al. 2009). Avastin wirkt antiangiogenetisch, indem es an einen für die in soliden Tumoren stattfindende vaskuläre Proliferation verantwortlichen Faktor, den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), bindet und diesen somit inhibiert. VEGF wird in Glioblastomen stark exprimiert, insbesondere in Bereichen, die an nekrotische, hochgradig hypoxische Bereiche grenzen. Der oben beschriebene Einsatz erscheint zudem sinnvoll, da eine hohe Expression VEGFs mit einer schlechten Prognose korreliert (Friedman et al. 2009).

Dennoch muss erwähnt werden, dass viele innovative Ansätze klinisch ohne Erfolg blieben. Zum einen ist dies der hohen Malignität des Glioblastoms geschuldet. Zum anderen könnte dies auch durch die Praxis der klinischen Forschung bedingt sein, da neue Therapien immer in Kombination mit der gängigen Therapie, zum Beispiel dem Temodalregime, kombiniert werden müssen und nie als eigenständige Option getestet werden. Dies könnte die Wirksamkeit innovativer Therapien verschleiern und deren Einsatz letztlich verhindern.

Trotz der Fortschritte in der Entwicklung von neuen chirurgischen Verfahren, der Entwicklung neuer Chemotherapeutika und den Fortschritten in der Strahlentherapie hat sich die Prognose von Glioblastompatienten seit Ende der fünfziger Jahre kaum maßgeblich verbessert. So lag in einer Studie von 1959 die mittlere Überlebenszeit bei ca. 10 Monaten im Vergleich zu 14,6 Monaten heute (Tönnis und Walter 1959, Stupp et al. 2005).

Vor dem Hintergrund dieser enorm schlechten Prognose und der mangelnden Aussagekraft bisheriger präklinischer experimenteller Modelle, die zum Beispiel den invasiven Charakter der Glioblastome *in vivo* nicht wiedergeben, ist es somit dringend erforderlich, geeignetere Modelle für die Entstehung und Progression der Glioblastome zu entwickeln, an denen dann versucht werden muss, wirkungsvollere therapeutische Optionen zu entwickeln.

Ein neues, hochinvasives Glioblastommodell entstand kürzlich auf der Basis des sogenannten Tumorstammzellkonzepts, das im folgenden Abschnitt 1.2. erläutert werden soll.

1.2 Das Konzept der Tumorstammzelle

Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden und die Erkenntnisse zu Tumorstammzellen des Glioblastoms auf den Erkenntnissen aus der Stammzellgrundlagenforschung aufbauen, sollen zunächst Grundlagen der Stammzellbiologie erläutert werden.

1.2.1 Stammzellen

Als Stammzellen werden unreife Zellen bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen, sich in spezialisierte Zellen zu differenzieren. Dabei müssen Stammzellen je nach ihrer Differenzierungskapazität unterschieden werden. So verfügt die sogenannte embryonale Stammzelle über die Möglichkeit sich mesodermal, ektodermal und entodermal, also in alle drei Keimblätter zu differenzieren (Pluripotenz). Die adulte Stammzelle ist noch in der Lage, sich in Zellen eines Keimblatts zu differenzieren (Multipotenz), wie zum Beispiel die hämatopoetische Stammzelle des Knochenmarks. Unipotente Stammzellen haben dann nur noch die Fähigkeit, sich in eine bestimmte Zelle zu differenzieren. Ein Beispiel ist die Spermatogonie, die sich nur noch in Spermatozoen differenzieren kann. Darüber hinaus können Stammzellen zum einen eine symmetrische Teilung durchlaufen. Dies bedeutet, dass sie sich in zwei gleiche Zellen teilen. Zum anderen können sie sich in zwei unterschiedliche Zellen teilen, nämlich zum einen in eine identische Kopie ihrer selbst, was auch als „self-renewal“ bezeichnet wird, und zum anderen in eine reifere Zelle (Jaenisch und Young 2008).

Erstmalig wurden 1996 adulte neurale Stammzellen aus dem thorakalen Rückenmark der Maus isoliert. Unter Kultivierung mit dem Epidermal-Growth-Factor (EGF) wuchsen diese Zellen als für Stammzellen typische Sphären (vgl. Abschnitt 2.1.1.3.)

und ließen sich in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren (Weiss et al. 1996). Wie fötale neurale Stammzellen besaßen diese Zellen also das Potential, sich sowohl neuronal als auch glial zu differenzieren. Auch für den Menschen wurde ein Reservoir an adulten neuralen Stammzellen beschrieben. Eine Zone des adulten Hirns, in der auch beim Erwachsenen Neurogenese stattfindet, ist die subventrikuläre Zone, ein Areal zwischen dem Seitenventrikel und dem Striatum. Einen weiteren neurogenetisch aktiven Bereich stellt die subgranuläre Zone des Gyrus dentatus des Hippokampus dar. In beiden beschriebenen Regionen wurden Zellen identifiziert, die die Fähigkeit zum self-renewal besitzen und aus denen sich reife Zellen des Hirns differenzieren ließen. (Vescovi et al. 2006).

Vor dem Hintergrund der bewiesenen Existenz von neuralen Stammzellen ist Gegenstand der aktuellen Forschung, inwieweit Umgebungsfaktoren das Verhalten der Stammzellen beeinflussen können. Zum Beispiel wird intensiv untersucht, welche Faktoren in Stammzellen die self-renewal Kapazität und deren Proliferation verstärken und welche diese Fähigkeiten hemmen (Sneddon und Werb 2007). Die Summe der die Eigenschaften der Stammzellen bestimmenden Umgebungsfaktoren wird dabei als Stammzellnische bezeichnet (Quinones-Hinojosa et al. 2006, Sneddon und Werb 2007). Die Nische adulter neuraler Stammzellen wird zum einen von zellulären Bestandteilen gebildet. So wird die humane subventrikuläre Zone als eine Region mit vier Schichten beschrieben. Die auf der Seite des Ventrikels befindliche Schicht 1 wird von Ependymzellen gebildet, Schicht 2 von Fortsätzen des Ependyms und von Fortsätzen der Astrozyten, welche auch Schicht 3 bilden. Schicht 4 stellt die Übergangszone zum Hirnparenchym dar (Quinones-Hinojosa et al. 2006). Neben den zellulären Bestandteilen gehören zur Nische aber auch metabolische Faktoren. Ein wichtiger Faktor der Umgebung, der das Verhalten neuraler Stammzellen beeinflusst, ist der Sauerstoffgehalt. So konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung neuraler Vorläuferzellen der Ratte in hypoxischen Verhältnissen (3% O₂) zur Steigerung von deren Proliferationsrate und deren Differenzierungsfähigkeit in dopaminerge Neuronen führte (Studer et al. 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass fötale neurale Stammzellen des Menschen bei Kultivierung in hypoxischen Verhältnissen (3% O₂) eine gesteigerte Proliferationsrate gegenüber der Kultivierung in Normoxie (21% O₂) aufweisen (Storch et al. 2001).

Neben den exemplarisch dargestellten Forschungen zur Stammzellnische wird aber auch intensiv nach Charakterisierungs- und Identifikationsmöglichkeiten von Stammzellen gesucht. Hierzu haben sich in jüngerer Vergangenheit bestimmte Marker durchgesetzt, die im folgenden Abschnitt vorgestellt werden sollen.

1.2.2 Stammzellmarker

Als Marker mit großer Spezifität für neurale Stammzellen gilt das Protein CD133. Das Schlüsselexperiment für die Bedeutung von CD133 als neuraler Stammzellmarker führte 2000 die Arbeitsgruppe von Uchida et al. durch, nachdem bereits 1997 vermutet wurde, dass das glykosylierte Epitop AC133 des CD133 Proteins von Zellen mit Stammzeleigenschaften exprimiert wird (Yin et al. 1997). Mittels Magnetseparierung wurden von Uchida et al. CD133 positive Zellen aus humanem Hirngewebe gewonnen. Diese CD133 positiven Zellen konnten anschließend klonal vermehrt und in Glia und Neuronen differenziert werden. Erstmals konnte so eine Isolation neuraler Stammzellen über einen Marker durchgeführt werden. (Uchida et al. 2000). Untersuchungen zur Proteinbiochemie von CD133 zeigten, dass es das erste entdeckte Protein der Gruppe von Oberflächenproteinen mit fünf transmembranen Domänen darstellt. Seine Funktion ist weitgehend unbekannt, es finden sich aber Hinweise, dass CD133 eine Rolle in der Organisation der Plasmamembran spielt und wichtig für Zell-Zell-Interaktionen ist (Bauer et al. 2008, Marzesco et al. 2005).

Die Transkriptionsfaktoren Oct-4 und SOX2 gelten als Marker für embryonale Stammzellen. Beide Proteine werden in diesem Zelltyp exprimiert (Deb et al. 2008). Takahashi und Yamanaka konnten 2006 zudem deren Funktion zur Herstellung pluripotenter Stammzellen nutzen. Mittels viraler Transduktion von Oct-4, SOX2 sowie c-myc und Klf4 wurden aus adulten Fibroblasten pluripotente Stammzellen hergestellt (Takahashi und Yamanaka 2006). Darüber hinaus konnte 2009 die Arbeitsgruppe von Kim et al. adulte neurale Stammzellen nur mit Hilfe von Oct-4 zu pluripotenten Stammzellen reprogrammieren (Kim et al. 2009). Diese Versuche deuten daraufhin, dass der zur POU-Familie gehörende Transkriptionsfaktor Oct-4 ein hochpotenter Induktor des Stammzellphänotyps ist. Zum anderen unterstreichen die Versuche von Kim et al., wie die Arbeiten von Shimosaki et al., die den Einfluss der Oct-4 Expression auf die Differenzierungsfähigkeit neuraler Stammzellen zeigen konnten, die Bedeutung von Oct-4 für neurale Stammzellen (Shimosaki et al. 2003). Ferner zeigten Ferri et al.,

dass der Verlust von Oct-4 im Tiermodell zu Neurodegeneration und einer Beeinträchtigung der Neurogenese in erwachsenen Tieren führte (Ferri et al. 2004).

Als weiterer Marker für neurale Stammzellen gilt das Intermediärfilament Nestin. So ist bekannt, dass die in Abschnitt 1.2.1. beschriebenen neuronalen adulten Stammzellen Nestin exprimieren (Cattaneo und McKay 1990). Zudem finden sich Hinweise, dass nach Verletzungen des zentralen Nervensystems der Anteil an Nestin positiven Zellen mit Stammzeleigenschaften im adulten Hirn wieder zunimmt (Michalczyk und Ziman 2005). Die hier dargestellten Stammzellmarker werden in Abschnitt 1.2.4. in Tabelle 1.2. zusammenfassend dargestellt.

Neben der Entdeckung neuraler adulter Stammzellen ist es in jüngerer Vergangenheit gelungen, aus Tumoren Zellen mit Stammzeleigenschaften zu isolieren. Diese als Tumorstammzellen bezeichnete Population wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

1.2.3 Tumorstammzellen

Erstmals wurde auf das Vorhandensein von Tumorstammzellen durch die Schlüsselexperimente der Arbeitsgruppe von Bonnet und Dick hingewiesen. Nach dem Separieren von Zellen einer akuten myeloischen Leukämie fiel auf, dass eine Zellpopulation mit einem bestimmten Oberflächenproteinexpressionsmuster (CD34 positiv, CD38 negativ) im Tiermodell ein starkes Tumorentstehungspotential zeigte. 100 Zellen mit dem genannten Expressionsmuster waren in der Lage, im Tiermodell eine AML auszulösen, wohingegen die weiteren Leukämiezellen auch in tausendfach höherer Anzahl nicht tumorentstehend waren (Bonnet und Dick, 1997). Ausgehend von dieser Entdeckung wurde das Konzept der Tumorstammzelle postuliert. Dieses besagt, dass nur eine kleine Subpopulation von Tumorstammzellen in der Lage ist, sich sowohl selbst zu regenerieren als auch neue Tumoren zu bilden. In einem Tumor findet sich somit nach diesem Konzept eine hierarchische Struktur, in der wenige Zellen den Tumor initiieren. Bisher wurde in der Betrachtung eines Tumors eine andere Ansicht favorisiert, nämlich dass prinzipiell jede zufällig gewählte Zelle einen Tumor generieren kann. Dieses Modell wird aufgrund dieses Zufallsprinzips auch stochastisches Modell genannt. Die beiden Konzepte sind in der Abbildung 1.2. schematisch gegenübergestellt.

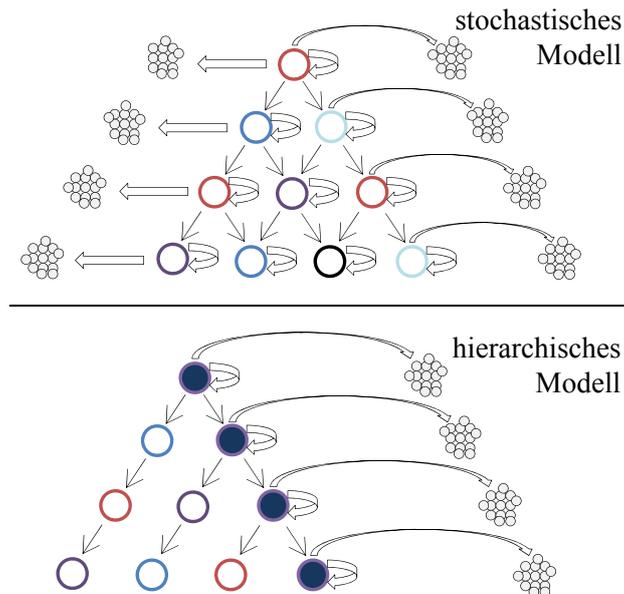


Abb. 1.2. Gegenüberstellung des stochastischen Modells (oben) und des hierarchischen Modells des Tumorwachstums (unten). Nach dem stochastischen Modell ist prinzipiell jede Zelle in der Lage, sich sowohl selbst zu regenerieren, als auch jeweils neue Tumoren zu bilden. Nach dem hierarchischen Prinzip ist nur eine kleine Subpopulation von Tumorstammzellen (dunkelblau gefärbt) in der Lage, sich selbst zu regenerieren und neue Tumoren zu bilden (nach Reya et al. 2001).

Tumorstammzellen wurden bereits für zahlreiche solide Tumorentitäten identifiziert, zum Beispiel für das Mammakarzinom, das Prostatakarzinom, die kolorektalen Karzinome, das Pankreaskarzinom und das Lungenkarzinom (Al-Hajj et al. 2003, Collins et al. 2005, O'Brien et al. 2007, Hermann et al. 2007, Eramo et al. 2008). Das Vorhandensein von Tumorstammzellen in Glioblastomen konnte 2004 durch die Experimente von Singh et al. gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe isolierte aus Glioblastomen Zellen, die für den neuronalen Stammzellmarker CD133 positiv waren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Injektion von nur 100 Zellen dieser Subpopulation genügte, um im Tiermodell Tumore auszulösen. Dagegen verursachte die Injektion von 10000 CD133 negativen Zellen aus denselben Glioblastomen keine Tumore (Singh et al. 2004). Die genauere Untersuchung dieser CD133 positiven Zellen und die Arbeit weiterer Arbeitsgruppen führte zu der heutigen Ansicht, dass Tumorstammzellen des Glioblastoms durch bestimmte Eigenschaften charakterisiert sind. Neben der beschriebenen *in vivo* Tumorigenitätsfähigkeit handelt es sich dabei um die Fähigkeit dieser Zellen zum „self-renewal“ sowie um die Fähigkeit, sich wie neurale Stammzellen sowohl in gliale als auch in neuronale Richtung differenzieren zu können. Außerdem wachsen die Glioblastomtumorstammzellen in serumfreien Bedingungen und

bestimmten Wachstumsfaktorbedingungen als typische Neurosphären (Vescovi et al. 2006).

Tumorstammzellen des Glioblastoms zeigen zudem wie die Tumorstammzellen anderer Entitäten eine Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie. Über ATP-binding-cassette-Transporter sind sie in der Lage, Chemotherapeutika auszuschleusen und über die Hochregulation von DNA-Reparaturmechanismen Strahlenschäden im Erbgut zu beseitigen (Bleau et al. 2009, Liu et al. 2006). Neben dem hohen Tumorigenitätspotential dieser Zellpopulation mit der Fähigkeit zur Initiierung von Tumoren und Metastasen sind es diese Resistenzmechanismen, die das hohe Potential für Forschung und Therapie des Glioblastoms ausmachen. So könnten gezielte therapeutische Strategien gegen Tumorstammzellen zu einer Verbesserung der Behandlungsoptionen des hochmalignen Glioblastoms führen.

Zur Untersuchung der Tumorstammzellen müssen diese zunächst identifiziert werden. Dies kann analog zu den neuronalen Stammzellen über Marker erfolgen. Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche von Singh et al. zeigten, dass Tumorstammzellen des Glioblastoms ebenso wie neurale Stammzellen auch über CD133 isoliert werden konnten (Uchida et al. 2000, Singh et al. 2004). Auf CD133 in seiner Bedeutung als Tumorstammzellmarker sowie auf weitere Marker für Tumorstammzellen soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

1.2.4 Marker für Tumorstammzellen

Die folgende Tabelle 1.2. zeigt zunächst eine Auswahl von Markern, die in Glioblastomtumorstammzellen sowie anderen Tumorentitäten exprimiert werden.

Tabelle 1.2. In bestimmten Zelltypen oder Tumorgeweben exprimierte Stammzellmarker (+ = exprimiert).

	Embryonale Stammzellen	Neurale Stammzellen	Glioblastom-Tumor-Stammzellen	Andere Tumoren
CD133		+	+	+
		Uchida et al. 2000	Singh et al. 2004,	O'Brien et al. 2007 (Kolorektales Karzinom), Monzani et al. 2007 (Melanom), Collins et al. 2005 (Prostatakarzinom* ¹)
Oct-4	+	+	+	+
	Deb et al. 2008, Kim et al. 2009, Takahashi und Yamanaka 2006	Shimozaki et al. 2003	McCord et al. 2009 Seidel et al. 2010	Cheng et al. 2007 (Keimzelltumore)
SOX2	+	+	+	+
	Deb et al. 2008, Takahashi und Yamanaka 2006	Episkopou 2005	Hemmati et al. 2003 (* ²), Gangemi et al. 2009,	Vescovi et al. 2006 (Medulloblastome)
Nestin		+	+	
		Cattaneo und McKay 1990, Michalczyk und Ziman 2005	Ignatova et al. 2002, Hemmati et al. 2003 (* ²)	
CD44				+
				Al-Hajj et al. 2003 (Mammakarzinom* ³), Huang und Wicha 2008 (Kolorektales Karzinom)

*¹ beim Prostatakarzinom zeigt die Expression von CD133 in Verbindung mit einer Expression von CD44 Tumorstammzellen an; *² nachgewiesen an pädiatrischen Hirntumoren; *³ beim Mammakarzinom zeigt eine hohe CD44 Expression in Kombination mit einer niedrigen CD24 Expression Tumorstammzellen an.

Seit den Arbeiten von Singh et al. wird CD133 als Marker für Tumorstammzellen des Glioblastoms angesehen, da CD133 positive Zellen des Glioblastoms im Gegensatz zu CD133 negativen Zellen hohe Tumorentität und Resistenz gegenüber Radiochemotherapie zeigten (Bleau et al. 2009, Liu et al. 2006, Singh et al. 2004; vgl.

Abschnitt 1.2.3.). CD133 gilt darüber hinaus als Marker für Tumorstammzellen des Melanoms und des Prostatakarzinoms (Collins et al. 2005, Monzani et al. 2007). Zudem ist gelungen, aus nur 500 CD133 positiven Zellen des Kolonkarzinoms im Tiermodell einen histologisch dem Ausgangstumor sehr ähnlichen Tumor im Tiermodell zu initiieren (O'Brien et al. 2007).

CD133 steht als Stammzellmarker aber auch in der Kritik. So konnte nachgewiesen werden, dass auch aus Glioblastomzelllinien gewonnene CD133 negative Zellen fähig sein können, im Tiermodell Tumore zu initiieren (Zheng et al. 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass es auch möglich ist, aus CD133 negativen Zellen CD133 positive Zellen zu gewinnen, was CD133 als Stammzellmarker in Frage stellt (Chen et al. 2010, Wang et al. 2008).

Für den untersuchten Stammzellmarker Oct-4 konnten zwei während den experimentellen Arbeiten an dieser Dissertation veröffentlichte Publikationen eine hypoxieabhängige Expression in Tumorstammzelllinien des Glioblastoms feststellen (McCord et al. 2009, Seidel et al. 2010; vgl. Abschnitt 1.3.). Zudem konnte eine hohe Aktivität von Oct-4 in bestimmten Stammzelltumoren nachgewiesen werden: so ist in Keimbahntumoren wie dem embryonalen Karzinom und dem Germinom Oct-4 stark exprimiert (Cheng et al. 2007; vgl. Tabelle 1.2.)

Über die Bedeutung des neuralen und embryonalen Stammzellmarkers SOX2 für Glioblastomtumorstammzellen wurde bisher wenig publiziert. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass er in Stammzellkulturen von pädiatrischen Hirntumoren exprimiert wird (Hemmati et al. 2003). Gangemi et al. konnten zudem zeigen, dass der Knock-down von SOX2 in Tumorstammzellkulturen des Glioblastoms zu einem weitgehenden Stopp der Proliferation dieser Kulturen führte (Gangemi et al. 2009). Darüber hinaus wird SOX2 in einem weiteren Hirntumor, dem Medulloblastom, exprimiert (Vescovi et al. 2006; vgl. Tabelle 1.2.).

Für den neuralen Stammzellmarker Nestin ist eine Expression in Tumorstammzellkulturen des Glioblastoms nachgewiesen (Hemmati et al. 2003, Ignatova et al. 2002). Über seine Bedeutung für andere Tumorentitäten ist jedoch wenig bekannt (vgl. Tabelle 1.2.).

Das ebenfalls in Tabelle 1.2. aufgeführte Oberflächenprotein CD44 konnte bereits als Marker für Tumorstammzellen unterschiedlicher Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom und den kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden (Al-Hajj et

al. 2003, Huang und Wicha 2008). Die Bedeutung für Gliome zeigten Ylagan und Quinn, die eine Überexpression von CD44 in über 70% der in ihrer Studie untersuchten 75 Astrozytome fanden (Ylagan und Quinn 1997). Zudem wurde gezeigt, dass CD44 an der Verstärkung der *in vitro* Migrationsfähigkeit von Gliomzelllinien beteiligt ist (Koochekpour et al. 1995). Darüber hinaus machten Hagel et al. die klinische Bedeutung von CD44 für die Therapie des Glioblastoms deutlich: so konnte eine negative Korrelation zwischen CD44 Expression eines Tumors und dessen Ansprechen auf eine Chemotherapie (Tamoxifen/Carboplatin) gezeigt werden (Hagel et al. 2004). Vor diesem Hintergrund soll in dieser Arbeit ebenso die Regulation von CD44 in den etablierten Gliomstammzelllinien unter hypoxischen Bedingungen untersucht werden. Wie für neurale Stammzellen ist auch für Tumorstammzellen bekannt, dass insbesondere die metabolischen Faktoren der Umgebung großen Einfluss auf das Verhalten dieser Zellpopulationen haben (Heddleston et al. 2009, Keith und Simon 2007). Ein wichtiger Faktor der Umgebungsbedingungen, analog zur Stammzellnische (vgl. Abschnitt 1.2.1.) auch Tumorstammzellnische genannt, ist die Sauerstoffkonzentration. Der folgende Abschnitt soll nun erläutern, welche Bedeutung Hypoxie für Tumorstammzellen hat.

1.3 Tumorstammzellen und Hypoxie

Niedrige Sauerstoffpartialdrücke sind ein häufiges Phänomen humaner solider Tumore. Zwar findet in diesen meist ein hohes Maß an Neoangiogenese statt, diese genügt aber häufig nicht, den außerhalb des Tumors herrschenden Sauerstoffpartialdruck für den gesamten Tumorbereich herzustellen. Auch für Glioblastome sind diese Phänomene bekannt. So ist im Gegensatz zu niedriggradigen Gliomen, die für ihre Sauerstoff- und Nährstoffversorgung auf ein bestehendes Gefäßsystem zurückgreifen, für Glioblastome ein hohes Maß an neoangiogenetischer Aktivität beschrieben, die zeitweise zu Phasen adäquater Versorgung führen kann (Blouw et al. 2003, Ferrara 2005). Aufgrund der schnellen Proliferation der Tumore und der chaotischen Struktur der Blutgefäße geschuldeten mangelnden Effektivität der Angiogenese fällt der Sauerstoffgehalt schließlich aber wiederum ab, so dass in Glioblastomen überwiegend hypoxische Verhältnisse vorherrschen (Dvorak 2005, Ferrara 2005, Heddleston et al. 2010, Keith und Simon 2007). Rampling et al. konnten diese in Glioblastomen herrschende Hypoxie *in situ* zeigen. Mittels Sauerstoffelektroden wurde bei zehn Glioblastomresektionen intraoperativ der Sauerstoffpartialdruck im Tumor gemessen. Hierzu wurden bei jedem

Eingriff mit den Elektroden sechs Messstrecken von 22 mm Länge mit insgesamt 192 Messungen ausgewertet. Im Mittel wiesen die Tumore einen Partialdruck von 0,97% O₂ auf. Der kleinste mittlere Sauerstoffpartialdruck eines Tumors betrug dabei 0,01% O₂, der höchste mittlere Partialdruck lag bei 3,24% O₂ (Rampling et al. 1994). Auch wenn andere Autoren von variablen und geringgradig höheren Partialdrücken ausgehen (0,5% O₂ bis 10% O₂; Evans et al 2004), zeigten die Versuche von Rampling et al., dass es sich bei Hypoxie um ein in großen Teilen der Glioblastome vorherrschendes Phänomen handelt.

Heddleston et al. konnten zeigen, dass Hypoxie auch Einfluss auf Gliomstammzelllinien hat. So nahm bei hypoxischer Kultivierung die Bildung der typischen Neurosphären in Gliomstammzelllinien zu (Heddleston et al. 2009). Zudem konnten Arbeiten zeigen, dass Hypoxie die invasive Kapazität von Gliomzelllinien verstärkte (Elstner et al. 2007, Gillespie et al 2007, Jensen 2009). Darüber hinaus konnte der Einfluss von Hypoxie auf den Tumorstammzellmarker CD133 belegt werden. Blazek et al. separierten eine CD133 positive Population einer Medulloblastomkultur. Wurde diese Fraktion bei 2% O₂ kultiviert, erhöhte sich deren CD133 Expression um das 1,6-fache verglichen mit einem Ansatz kultiviert bei 20% O₂ (Blazek et al. 2007).

Platet et al. wiesen den Einfluss von hypoxischen Kulturbedingungen auf CD133 in Glioblastomzellkulturen nach. Wurden Tumorstammzellen des Glioblastoms bei 3% O₂ kultiviert, so erhöhte sich der Anteil an CD133 positiven Zellen gegenüber der Kultur in 20% O₂ (Platet et al. 2007).

Die Versuche von Griguer et al. deuten sogar darauf hin, dass Hypoxie Einfluss auf die Expression von CD133 in konventionellen, das heißt in serumhaltigem Medium kultivierten und adhären, nicht sphärisch wachsenden Gliomlinien ohne Stammzeleigenschaften haben könnte: so konnten in der bei 21% O₂ kultivierten CD133 negativen, konventionellen Gliomlinie U251 nach Kultivierung in 1% O₂ für 3 Tage 40% - 60% CD133 positive Zellen detektiert werden (Griguer et al. 2008).

Neben dem Einfluss von Hypoxie auf CD133 ist ein ähnlicher Einfluss auch für den Stammzellmarker Oct-4 bekannt. Grayson et al. konnten nachweisen, dass durch Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in Hypoxie die mRNA Expression von Oct-4 ansteigt (Grayson et al. 2007).

Wie die molekularbiologische Regulation der Antwort auf Hypoxie abläuft, deren Folge wiederum der Anstieg der Stammzellmarker sein könnte, haben zahlreiche jüngere

Publikationen gezeigt. Maßgebliche Mediatoren der Hypoxie sind die Hypoxia-Inducible-Factors (HIFs). Abbildung 1.3. zeigt zunächst schematisch den Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die HIFs.

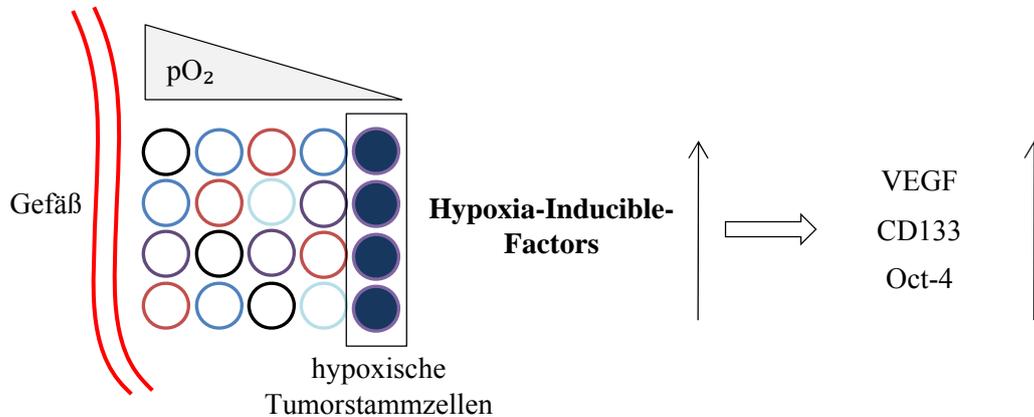


Abb. 1.3. Einfluss der Hypoxie auf Tumorstammzellen. Mit zunehmender Entfernung von dem Blutgefäß sinkt der Sauerstoffpartialdruck. Im hypoxischen Bereich werden in den Tumorzellen die Hypoxia-Inducible-Factors (HIFs) stabilisiert. Die HIFs wiederum erhöhen die Transkription von VEGF und CD133 (nach Ferrara 2005, Heddleston et al. 2010 und Keith und Simon 2007).

Der Wirkmechanismus der HIF-Transkriptionsfaktoren wurde in jüngerer Vergangenheit intensiv beforscht. So ist bekannt, dass die HIFs an die Promotor- oder Enhancerregionen ihrer Zielgene binden, von denen bisher ungefähr 150 bekannt sind. Bei den bekannten drei Isoformen (HIF1, HIF2 und HIF3) erfolgt die Regulation auf Proteinebene durch die Sauerstoffkonzentration über die Stabilität der α -Untereinheiten. Bei Sauerstoffbedingungen über 8% bis 10% werden die α -Untereinheiten schnell degradiert. Diese Degradation erfolgt über eine Hydroxylierung zweier Proline in einer hochkonservierten, sauerstoffabhängigen Proteindomäne durch eine spezifische Prolylhydroxylase. Die hydroxylierten α -Untereinheiten werden nun vom Von-Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Protein, einem Teil einer Ubiquitin-Ligase, erkannt und schließlich im Proteasom degradiert. Bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen wird die spezifische Prolylhydroxylase gehemmt, was den Abbau der HIFs verzögert (Pouyssegur et al. 2006). Die HIF1 α -Untereinheit komplexiert dann mit der β -Untereinheit und dem Kofaktor p300. Dieser Komplex bindet dann an die Promotor- oder Enhancerregionen der HIF-Zielgene (Semenza 2002).

Klinisch zeigt sich, dass HIFs insbesondere in den höhergradigen Gliomen gegenüber den niedriggradigen Gliomen hochreguliert sind. So waren in einer immunhistochemischen Untersuchung 46% (28/61) der low-grade-Gliome und 81% (92/114) der high-grade-Gliome positiv für HIF1 α (Jensen et al. 2006).

Für HIF1 α konnte gezeigt werden, dass sein Knock-down im Tiermodell zu einer Wachstumsreduktion von Tumoren aus Gliomzelllinien führte. Die *in vivo* Wachstumsrate wurde durch den HIF1 α -Knock-down um bis zu 73% reduziert gegenüber einer Kontrolle (Gillespie et al. 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Notch-System, das entscheidenden Einfluss auf die self-renewal-Kapazitäten einer Stammzelle hat, unter hypoxischen Bedingungen über HIF1 α aktiviert wird (Gustafsson et al. 2005, Zhou et al. 2009). Zudem ist bekannt, dass einer der maßgeblich Induktoren der Angiogenese in Glioblastomen, der Vascular-Endothelial-Growth-Factor einer Regulation HIF1 α unterliegt (Blouw et al. 2003, Ferrara 2005).

Für HIF2 α wird die Regulation von Oct-4 diskutiert. Somit könnte HIF2 α einen wichtigen Regulator des Stammzellphänotyps darstellen (Keith und Simon 2007, Seidel et al. 2010).

Außerdem wurde das Konzept der Pseudohypoxie postuliert, begründet auf der Beobachtung, dass es auch Bedingungen mit normalem Sauerstoffgehalt gibt, bei denen die HIFs dennoch hochreguliert sein können. Zum Beispiel kann der Funktionsverlust von Enzymen des Zitratzyklus für eine Hochregulation der HIFs verantwortlich sein. So führt der Funktionsverlust der Succinatdehydrogenase zu einer Akkumulation von Succinat, welches die spezifische Prolylhydroxylase, die die Degradation der HIFs einleitet, hemmt (MacKenzie et al. 2007). Darüber hinaus ist bekannt, dass in einer Vielzahl von Gliomen Mutationen in der Isozitatdehydrogenase 1 (IDH-1) und der Isozitatdehydrogenase 2 (IDH-2) vorliegen (Yan et al. 2009). Die IDH-1 stellt dabei statt α -Ketoglutarat 2-Hydroxyglutarat her (Dang et al. 2009). Für 2-Hydroxyglutarat wurde nun von Frezza et al. postuliert, dass es auch die spezifische Prolylhydroxylase und somit die Degradation der HIFs hemmt und zu pseudohypoxischen Verhältnissen führen kann (Frezza et al. 2010).

1.4 Zielsetzung

In Vorarbeiten des Labors für Hirntumorforschung der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf war es gelungen, aus humanen Glioblastomen Tumorstammzellkulturen zu etablieren, die im Folgenden als GS-Linien bezeichnet werden (Günther et al. 2008, Schulte et al. 2011; vgl. Abschnitt 2.1.1.1.)

Vor dem Hintergrund der publizierten Beobachtung, dass Stammzeleigenschaften von Glioblastomstammzellpopulationen durch Hypoxie beeinflusst werden (Platet et al. 2007), hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, zu untersuchen, inwiefern der Stammzellphänotyp der etablierten GS-Linien durch Kultivierung in 1% O₂ reguliert wird.

Zur Klärung dieser Fragestellung versuchten wir zuerst, den Einfluss kurzzeitiger Hypoxie auf die GS-Linien zu untersuchen. Zu Beginn sollten die Experimente von Griguer et al., das heißt die Induktion von CD133 in einer in serumhaltigem Medium kultivierten und adhärent wachsenden Gliomlinie ohne Stammzeleigenschaften (konventionelle Gliomlinie), reproduziert werden (Griguer et al. 2008). Parallel dazu wurde der Einfluss von kurzzeitiger Hypoxie auf die Stammzellmarker CD133 und Oct-4 auf mRNA und Proteinebene in den GS-Linien untersucht.

Vor dem Hintergrund, dass Hypoxie in großen Teilen des Glioblastoms dauerhaft vorherrscht (Rampling et al. 1994), spiegeln kurzzeitige *in vitro* Hypoxieversuche (Griguer et al. 2008, McCord et al. 2009) die Situation in Glioblastomen im menschlichen Gehirn nur eingeschränkt wider. Um den Zustand der Dauerhypoxie zu simulieren, waren im Labor für Hirntumorforschung in Vorarbeiten bereits Tumorstammzellkulturen etabliert worden, die sofort nach Entnahme unter Erhalt der Tumorphoxie (1% O₂) kultiviert worden waren (vgl. Abschnitt 2.1.1.1). In diesen als GSH-Linien bezeichneten Tumorstammzellkulturen sollte dann im Vergleich zu den regulär unter 21% O₂ aus denselben Ursprungstumoren etablierten Linien der Einfluss von Hypoxie auf die Stammzellmarker CD133, Oct-4, SOX2, Nestin und CD44 untersucht werden.

Darüber hinaus sollten Experimente zur Klärung der Frage durchgeführt werden, inwieweit funktionelle Eigenschaften wie das Differenzierungspotential durch Kultivierung der GS-Linien in dauerhafter Hypoxie beeinflusst werden.

Wie in der Einleitung dieser Arbeit dargestellt wurde, zeigten andere Arbeitsgruppen, dass die Hypoxia-Inducable-Factors (HIFs) an der Regulation des Stammzellphänotyps

beteiligt sind (Gustafsson et al. 2005, Heddleston et al. 2010). Zum einen durch Versuche mit dem HIF-Inhibitor Chaetomin, zum anderen durch den Knock-down von HIF1 α mittels einer shRNA sollte dessen Einfluss auf den wichtigsten Stammzellmarker CD133 in den GS-Linien untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Methoden der Zellbiologie

2.1.1.1 Etablierung und Kultivierung von Glioblastomstammzelllinien

Die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendeten Glioblastomstammzelllinien wurden in Vorarbeiten im Labor für Hirntumorbiologie der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) etabliert. Bei bestehender Einwilligung der Patienten wurden Proben aus frisch reseziertem Tumor aus dem OP der Neurochirurgischen Klinik unter Stammzellbedingungen, das heißt in Stammzellmedium (s.u.), angesetzt. Zum einen wurden vier Proben bei 21% O₂ und 37°C als Zelllinien GS-10, GS-11, GS-12 und GS-13 etabliert. Parallel dazu wurden Proben der den Linien GS-10 bis GS-13 zu Grunde liegenden Ursprungstumore sofort unter Erhalt der Tumorhypoxie in 1% O₂ kultiviert und damit die Linien GS-10H, GS-11H, GS-12H und GS-13H etabliert.

Die GS-Linien zeigen die Besonderheit, dass sie als Xenotransplantat im Hirn von Nacktmäusen wie das humane Glioblastom *in situ* als infiltrative Tumore wachsen. Damit grenzen sich diese Linien von herkömmlichen, das heißt mit fötalem Kälberserum kultivierten und adhärent wachsenden Gliomlinien ab, die *in vivo* meist als abgekapselte, nicht infiltrative Tumoren wachsen. Darüber hinaus weisen die GS-Linien ein den primären Tumoren eng verwandtes Genexpressionsprofil auf (Günther et al. 2008, Schulte et al. 2011).

Die verwendeten Zelllinien GS-2 und GS-7 wurden als Glioblastomstammzelllinien mit eingeschränktem Tumorstammzellphänotyp beschrieben, die semiadhärent wachsen und gegenüber Zelllinien mit voll ausgeprägtem Stammzellphänotyp (GS-10 bis GS-13) zum Beispiel eine eingeschränkte Differenzierungskapazität zeigen (vgl. Abschnitt 3.3.). Die GS-2 bietet dabei die Besonderheit, dass es sich um eine Linie eines zweiten Tumorrezidivs nach Radiochemotherapie handelt (Günther et al. 2008).

Die oben genannten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit den Dimensionen T25 (Beckton Dickinson Labware, New Jersey, USA), T75 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) oder T175 (Beckton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) bei 37°C, 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert (Brutschrank: Heraeus Instruments FunctionLine, Hannover). Für die Kultivierung in 1% O₂ wurde der Sauerstoff durch Stickstoff ersetzt.

Zur optimalen Versorgung der Zellen wurden diese mindestens einmal wöchentlich mit frischem Medium versorgt und im Verhältnis 1/10 durch mechanische Dissoziation subkultiviert.

Das Stammzellmedium setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Neurobasalmedium (NBM, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit
- B27 Supplement (20 µl/ml, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- GlutaMAX (10 µl/ml, Invitrogen GmbH, Karlsruhe),
- Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2, 20 ng/ml, PeproTech Inc., Rocky Hills, NJ, USA)
- Epidermal Growth Factor (EGF, 20 ng/ml, PeproTech Inc., Rocky Hills, NJ, USA)
- Heparin (32 IE/ml, Ratiopharm GmbH, Ulm)

Diesem Medium wurden, wenn nicht anders erwähnt, folgende Zusätze gegeben:

- 0,5% Fungizone (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- 0,5% Penicillin/Streptomycin (PenStrep, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

2.1.1.2 Konventionelle Glioblastomzelllinien

Die Zelllinien U251 und U87 wurden bei ATCC, Manassas, Virginia, USA, die verwendeten HEK293(FT)-Zellen bei Invitrogen GmbH, Karlsruhe kommerziell erworben. Die Zelllinie G123 wurde unter konventionellen Kulturbedingungen (s.u.) im Labor für Hirntumorforschung des UKE etabliert, wächst adhärent und wurde von Anker et al. charakterisiert (Anker et al. 1993).

Die konventionellen Zelllinien wurden in folgendem Medium kultiviert:

Kulturmedium für adhärente Zellen:

- DMEM Medium (GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit
- 10 % FCS (Fetal Bovine Serum, GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- 1 mM Natriumpyruvat (Biochrom AG, Berlin)

Diesem Medium wurde, wenn nicht anders erwähnt, folgendes hinzugesetzt:

- 0,5% Fungizone (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- 0,5% Penicillin/Streptomycin (PenStrep, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Wie die GS-Linien wurden die konventionellen Linien in Zellkulturflaschen mit den Dimensionen T25 (Beckton Dickinson Labware, New Jersey, USA), T75 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) oder T175 (Beckton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) bei 37°C, 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert (Brutschrank: Heraeus Instruments FunctionLine, Hannover). Die Zellen wurden einmal wöchentlich zur Subkultivierung mit PBS (GIBCO DPBS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gewaschen und

anschließend mit 1 ml Trypsin (GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe) abgelöst und in 20 ml neuem Medium aufgenommen.

2.1.1.3 GS-Linien und konventionelle Linien in Hypoxie

Für die kurzzeitigen Hypoxieversuche wurden die Zelllinien GS-2, GS-7, GS-11, GS-12, g123 und U251 vor Versuchsbeginn dissoziiert. Die GS-Linien wurden mechanisch unter vorsichtigem Auf- und Abpipettieren in 1 ml Medium, adhärenz Zelllinie U251 mittels Trypsinbehandlung (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) dissoziiert. Für die Versuche wurde dann aus diesem vorbereiteten Ansatz jeweils eine Probe unter hypoxischen (1% O₂) und als Kontrolle eine andere unter normoxischen Bedingungen (21% O₂) kultiviert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden dann wiederum FACS-Analysen oder RealTime-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Überschritt die Versuchsdauer eine Woche, wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt.

2.1.1.4 Differenzierungsversuche

Zur Differenzierung wurden die sphärisch wachsenden Zelllinien GS-12 und GS-12H vor Versuchsbeginn mechanisch dissoziiert. Die Induktion der Differenzierung (Tag 0) erfolgte mittels Zugabe von 10% FCS (Fetal Bovine Serum, GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 1 µM Retinsäure (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) und 0,75 mM cAMP (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Günther et al. 2008). FACS-Analysen zur Messung von Differenzierungsmarkern wurden an den Tagen 0 (24 Stunden nach der Dissoziation), 1, 4 und 6 nach dem in Abschnitt 2.1.3.1. beschriebenen Protokoll durchgeführt.

2.1.1.5 Versuche mit Chaetomin

Chaetomin hemmt den für die Wirkung der Hypoxia-Inducible-Factors wichtigen Kofaktor p300. So kommt es zu keinem aktiven Komplex aus p300 sowie der HIF α - und HIF β -Untereinheit. Die HIFs können somit keine Wirkung an den Promotor- und Enhancerregionen ihrer Zielgene entfalten (Semenza 2002, Lu et al. 2009). Die Versuche mit Chaetomin (Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz) wurden mit der Linie GS-11 durchgeführt. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mechanisch dissoziiert. Die Zellen wurden nun auf mehrere Ansätze verteilt. Für 48 Stunden wurden nun je zwei Ansätze unter normoxischen und je zwei Ansätze unter hypoxischen Bedingungen inkubiert (vgl. Abschnitt 2.1.1.3.). Je ein Ansatz in der

entsprechenden Bedingung wurde mit 1,5 mM Chaetomin behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels RealTime-PCR (vgl. Abschnitt 2.1.2.3.).

2.1.2 Molekularbiologische Methoden

2.1.2.1 Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung wurde mittels des NucleoSpin RNA XS Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt (Anionenaustauschchromatographie). Hierbei wurde genau nach Herstellerprotokoll gearbeitet und je Ansatz bis zu 5×10^5 Zellen eingesetzt. Die im letzten Schritt in $10 \mu\text{l}$ Wasser eluierte RNA wurde bei -80°C eingefroren und innerhalb von 24 Stunden in cDNA umgeschrieben.

2.1.2.2 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase Reaktion

Die mittels des NucleoSpin RNA XS Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren) in den jeweiligen Versuchen gewonnenen RNA Mengen wurden vollständig in einen $20 \mu\text{l}$ cDNA-Syntheseansatz eingesetzt.

Im ersten Schritt wurden zu der in $10 \mu\text{l}$ eluierten RNA $1 \mu\text{l}$ Oligo-dT₁₈ Primer der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) und $1 \mu\text{l}$ 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate im Verhältnis 1:1:1:1 zwischen ATP, GTP, CTP und TTP gegeben. Dieser Ansatz wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen in der cDNA und zur Anlagerung des Primers für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden $4 \mu\text{l}$ 5X First-Strand Buffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), $2 \mu\text{l}$ 0,1 M Dithiothreitol (DTT, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), $1 \mu\text{l}$ (entspricht 40 IU) Ribonuklease Hemmer (RNaseOut, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und $1 \mu\text{l}$ (entspricht 200 IU) Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) hinzugegeben und dieser Ansatz für zunächst 50 Minuten bei 42°C zur Synthese inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 70°C zur Inaktivierung der Transkriptase. Die cDNA wurde schließlich bei -20°C eingefroren.

2.1.2.3 Quantitative RealTime-PCR (TaqMan 5'-Nuklease-Assay)

Die wie oben beschrieben aus den zu untersuchenden Zellen hergestellte cDNA wurde nun auf die Expressionsprofile der in Tabelle 2.1 dargestellten mRNAs untersucht. Hierbei handelte es sich um ausschließlich humane Gene.

Als endogene Kontrolle dienten die mRNAs der Gene RPL13A und 18S. RPL13A codiert für das Protein 13A der 60S-Untereinheit der Ribosomen, 18S codiert für einen Teil der ribosomalen 40S-Untereinheit.

Anders als bei der qualitativen PCR, bei der typischerweise eine quantitative Bestimmung mittels Gelelektrophorese erfolgen muss, kann bei der Real-Time PCR die Bestimmung der Quantität der eingesetzten cDNA mittels Messung einer Fluoreszenz in Echtzeit durchgeführt werden. In den Versuchen dieser Arbeit wurde die Quantität dabei immer als n-fache Expression gegenüber der endogenen Kontrolle angegeben.

Für die Bestimmung der Quantität musste zuerst ein Schwellenwert bestimmt werden. Dieser Schwellenwert wurde in einem Bereich gewählt, in dem sich alle im Ansatz befindlichen cDNAs in der exponentiellen Amplifikationsphase befunden haben. Anschließend wurde für jedes Gen die Zyklusanzahl bestimmt, bei der der Schwellenwert überschritten wurde (Ct-Wert). Von diesem Ct-Wert wurde der Wert der endogenen Kontrolle subtrahiert, woraus der Δ Ct-Wert resultierte. Von diesem Δ Ct-Wert wurde nun der Wert des Kalibrators (meist der kleinste Ct-Wert des Ansatzes) subtrahiert, was den $\Delta\Delta$ Ct-Wert ergab. Aus diesem Wert wurde nach der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ der RQ-Wert berechnet, der die relative Quantität der entsprechenden mRNA Expression darstellt. Die Fehlerdarstellung erfolgte mittels der Berechnung der Standardabweichung aus den dreifachen RQ-Werten. Signifikanzberechnungen wurden mittels t-Tests für ungepaarte Stichproben („student t-test – unpaired“) mit SigmaPlot (SigmaPlot 2002 für Windows, Version 8.0) durchgeführt.

Die Taq-Man Analyse der cDNAs wurde in 96-well-Platten (Applied Biosystems) in dreifachen Werten nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden pro Ansatz 10 μ l 2x Real-Time Mastermix TaqMan Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems), 8 μ l Wasser und 1 μ l cDNA in einem 20 μ l Gesamtvolumen analysiert.

Die folgende Tabelle 2.1. enthält die verwendeten TaqMan-Sonden der Firma Applied Biosystems.

Tabelle 2.1. Verwendete TaqMan-Sonden der Firma Applied Biosystems

Gen Name	Applied Biosystems ID	detektierte mRNA (nach NCBI)
CD133	Hs00195682_m1	NM_006017.1
Oct-4	Hs00742896_s1	NM_203289.3
SOX2	Hs00602736_s1	NM_003106.2
Nestin	Hs00707120_s1	NM_006617.1
HIF1 α	Hs00936376_m1	NM_181054.2 NM_001530.3
HIF2 α	Hs01026149_m1	NM_001430.3
CD44	Hs00174139_m1	NM_001001391.1 NM_001001390.1 NM_001001389.1 NM_000610.3
RPL13A	Hs01578912_m1	nicht bekannt
18S	Hs99999901_s1	nicht bekannt

2.1.2.4 Herstellung einer shRNA gegen HIF1 α

Für die shRNA wurde die als effektiv beschriebene Sequenz 5'-GAT ACA AGT AGC CTC TTT G-3' ausgewählt (Song et al. 2006). Eine Hairpin Struktur für diese Sequenz wurde mittels des Tools www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai ermittelt. Da das Expressionsvektorsystem pRNAT-U6.2/Lenti (GenScript Corporation, Iowa City, Iowa, USA) verwendet wurde, wurden den Konstrukten auch die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und XhoI eingefügt. Somit wurde bei Eurofins MWG Operon, Ebersberg ein sense-Strang der Sequenz 5'-GGA TCC CGA TAC AAG TAG CCT CTT TGT TCA AGA GAC AAA GAG GCT ACT TGT ATC TTT TTT CCA ACT CGA G-3' und ein antisense-Strang der Sequenz 5'-CTC GAG TTG GAA AAA AGA TAC AAG TAG CCT CTT TGT CTC TTG AAC AAA GAG GCT ACT TGT ATC GGG ATC C-3' in Auftrag gegeben.

Zuerst wurden der sense und der antisense Strang mit Wasser zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gelöst. Zum Annealing wurde 1 μl des gelösten sense-Stranges, 1 μl des antisense-Stranges und 1 μl 20 x SSC (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) mit 17 μl

Wasser versetzt, für zehn Minuten auf 95°C erhitzt und für 60 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt.

Dieser 20 µl Ansatz wurde nun nach folgendem Protokoll verdaut:

- 10 µl Ansatz sense- und antisense-Strang (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)
- 2 µl Fast Digest Buffer (Fermentas, St. Leon-Rot)
- 1 µl Fast Digest BamHI (Fermentas, St. Leon-Rot)
- 1 µl Fast Digest XhoI (Fermentas, St. Leon-Rot)
- 6 µl Wasser (Fermentas, St. Leon-Rot)

Dieser Ansatz wurde gemischt und anschließend bei 37°C für 5 Minuten und zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme für 5 Minuten bei 80°C inkubiert.

Der Vektor pRNAT-U6.2/Lenti (GenScript Corporation, Iowa City, Iowa, USA) wurde zunächst mittels Transformation vermehrt. Zur Transformation wurden 200 ng eingesetzt. Klone dieser Transformation wurden vermehrt und die Plasmide mittels NucleoBond®Xtra Maxi (Macherey-Nagel GmbH, Düren) aufgereinigt. Anschließend wurde der vermehrte Vektor zu einer Konzentration von 1 µg/µl verdünnt und nach dem folgendem Protokoll verdaut.

- 1 µl Vektor pRNAT-U6.2/Lenti (entspricht 50ng im 20 µl Verdau-Ansatz)
- 2 µl Fast Digest Buffer (Fermentas, St. Leon-Rot)
- 1 µl Fast Digest BamHI (Fermentas, St. Leon-Rot)
- 1 µl Fast Digest XhoI (Fermentas, St. Leon-Rot)
- 15 µl Wasser (Fermentas, St. Leon-Rot)

Dieser Ansatz wurde gemischt und bei 37°C für fünf Minuten und anschließend zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme für fünf Minuten bei 80°C inkubiert.

Für die Ligation wurde zunächst folgender Ansatz für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

- 4 µl Ligase Buffer (Fermentas, St. Leon-Rot)
- 2 µl des pRNAT-U6.2 Vektorverdaus
- 12,5 µl des Verdaus des sense- und antisense-Stranges
- 0,5 µl T4 Polynukleotidkinase (Fermentas, St. Leon-Rot)

Diesem Ansatz wurde 1 µl T4 DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. 5 µl dieses Ansatzes wurden in die anschließende Transformation (vgl. Abschnitt 2.1.2.5.) eingesetzt. Klone dieser Transformation wurden vermehrt (vgl. Abschnitt 2.1.2.6.) und die Plasmide mittels

QIAprep Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt (Endkonzentration 100 ng/ μ l) und sequenziert.

2.1.2.5 Transformation

Alle Transformationen wurden mit OneShot®Top10-Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und jedes Aliquot (25 μ l) mit 1 μ l Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt. Diese Ansätze wurden für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das entsprechende Plasmid (vgl. Abschnitt 2.1.2.4.) wurde hinzugegeben und weiter für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock zur erfolgreichen Aufnahme der Plasmide für 30 Sekunden in einem 42°C warmen Wasserbad. Dann wurden die Ansätze zur Regeneration für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 300 μ l S.O.C. Medium (22°C, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) hinzugegeben und die Ansätze für eine Stunde bei 300 rpm und 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 75 μ l jedes Ansatzes ausplattiert.

2.1.2.6 Vermehrung von Bakterien und Picken von Klonen

1,2% Agarose (Bacto Agar, BD, Sparks, Maryland, USA) wurde in LB-Medium (pro Liter Wasser: 10 g Tryptone (Bacto, BD, Sparks, Maryland, USA) 5 g Yeast Extract (Bacto, BD, Sparks, Maryland, USA) und 10 g Natriumchlorid (Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)) gelöst. Dieses Agarosemedium wurde autoklaviert, nach Abkühlen mit 100 mg/ml Ampicillin versetzt und auf Zellkulturplatten (Corning Incorporated, 100 mm x 20 mm, Corning, NY, USA) aufgetragen. Hierauf erfolgte die Ausplattierung der transformierten OneShot®Top10-Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Die Klone wurden mit 20 μ l Pipettenspitzen (Biosphere® Filter Tips, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) gepickt und in Falcon Gefäßen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler bei 300 rpm in 5 ml LB Medium (s.o.) und 100 mg/ml Ampicillin vermehrt.

2.1.2.7 Aufreinigung der Plasmide

Die Aufreinigung der Plasmide mittels NucleoBond®Xtra Maxi (Macherey-Nagel GmbH, Düren) und QIAprep Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) erfolgte exakt nach Protokoll der Hersteller.

2.1.2.8 Transfektion von HEK293(FT)-Zellen mit HIF1 α -shRNA-Plasmid

24 Stunden vor der Transfektion wurden die HEK293(FT)-Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gesplittet und mit 10 ml Transfektionsmedium (DMEM Medium (GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit 1mM Natriumpyruvat (Biochrom AG, Berlin)) inkubiert. Am Versuchstag wurden 9 μ g des ViraPower® Packaging Mix (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und 30 μ l (entspricht 3 μ g) des hergestellten Vektors zu 1,5 ml Opti-MEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gegeben. In einem weiteren Ansatz wurden 36 μ l Lipofectamin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zu 1,5 ml Opti-MEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Lipofectamin-Ansatz und der Vektorplasmidansatz wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur zusammen inkubiert und tropfenweise auf die vorbereiteten HEK-Zellen gegeben.

Von nun an erfolgten alle Arbeiten unter den Bedingungen der Sicherheitsstufe S2.

Die Zellen wurden für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das vor 12 Stunden aufgetragene Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml frischem Transfektionsmedium versorgt. Nach 48 Stunden wurde der gesamte HEK-Zell-Überstand bei -80°C weggefroren.

2.1.2.9 Transduktion von U87 und GS-11H mit shRNA gegen HIF1 α

Die Etablierung der Transduktion erfolgte zunächst anhand der Linie U87. Nach Etablierung der Bedingungen erfolgte die Transduktion der Linie GS-11H, die im Folgenden beschrieben werden soll.

24 Stunden vor der Transduktion wurden die GS-11H Zellen mechanisch dissoziiert und in vier Ansätzen mit 4 ml Kulturmedium für Glioblastomstammzellen ohne PenStrep und Fungizone (vgl. Abschnitt 2.1.1.1.), im folgenden Abschnitt Transduktionsmedium genannt, in einer 6-well Platte "Nunclon Surface" (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) inkubiert. Nach 24 Stunden (Tag 1) wurden 120 μ l des in Abschnitt 2.1.2.8. hergestellten Überstandes und 10 μ g/ml Hexadimethrin Bromid (Polybrene, Sigma-Aldrich GmbH, Steinbach) zu je zwei Ansätzen gegeben. Die Zugabe von 120 μ l des in Abschnitt 2.1.2.8. hergestellten Überstandes wurde nach 24 weiteren Stunden (Tag 2) für die zwei bereits transduzierten Ansätze wiederholt. Die beiden nicht transduzierten Ansätze dienten als (Negativ-) Kontrolle. An Tag fünf wurden nun den transduzierten Zellen 500 μ g/ml Neomycin (G418 Sulphate, PAA, Pasching,

Österreich) zugesetzt. An Tag acht erfolgten nun FACS-Analysen gegen HIF1 α (vgl. Abschnitt 2.1.3.1.).

2.1.3 Proteinbiochemische Methoden

2.1.3.1 Durchflusszytometrie

Die Fluorescence-Activated-Cell-Sorting-Analyse (FACS-Analyse) wurde für extra- und intrazelluläre Proteine mit dem PAS Particle Analysing System, Partec, Münster durchgeführt. Die FACS-Rohdaten (FACS-Dot-Plots) und die sich den Messungen anschließenden Auswertungen sind im Anhang in Abschnitt 6.1. dargestellt.

Die folgende Tabelle 2.2. enthält die verwendeten primären Antikörper gegen intrazelluläre Proteine, Tabelle 2.3. die verwendeten Sekundärantikörper.

Tabelle 2.2. In den FACS-Analysen verwendete Primärantikörper gegen intrazelluläre Proteine und die dazugehörigen Isotypkontrollen

Primärantikörper	Isotypkontrolle
Oct-4 rat IgG ₂ B R+D Systems* MAB1759 500 µg/ml 3 µg/ml Endkonzentration	IgG ₂ B rat R+D Systems* MAB0061 500 µg/ml 3 µg/ml Endkonzentration
SOX2 mouse IgG ₂ A R+D Systems* MAB2018 100 µg/ml 3 µg/ml Endkonzentration	IgG ₂ A mouse R+D Systems* MAB0031 500 µg/ml 3 µg/ml Endkonzentration
HIF1α mouse IgG ₁ R+D Systems* MAB294 500 µg/ml 3 µg/ml Endkonzentration	IgG ₁ mouse BD Pharmingen** 554121 500 µg/ml 3 µg/ml Endkonzentration
GFAP polyclonal rabbit DakoCytomation*** Z 0334 2,4 mg/ml 48 µg/ml Endkonzentration	Rabbit Immunoglobulin Fraction DakoCytomation X0936 15 mg/ml 48 µg/ml Endkonzentration
Neurofilament mouse IgG ₁ DakoCytomation*** M 0762 270 µg/ml 10,8 µg/ml Endkonzentration	IgG ₁ mouse BD Pharmingen** 554121 500 µg/ml 10,8 µg/ml Endkonzentration
GalC mouse IgG ₃ Chemicon**** MAB342 1 mg/ml 20 µg/ml Endkonzentration	IgG ₁ mouse BD Pharmingen** 554121 500 µg/ml 20 µg/ml Endkonzentration

*R+D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

**BD Pharmingen, San Jose, California, USA

***DakoCytomation, Glostrup, Denmark

****Chemicon, Billerica, Massachusetts, USA

Tabelle 2.3. Verwendete Sekundärantikörper.

Anti-rat	Anti-mouse	Anti-rabbit
JacksonImmunoResearch* Fluorescein(FITC)-conjugated Goat Anti-rat IgG 112-096-143 1,5 mg/ml 15 µg/ml Endkonzentration	Dako** Goat-Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC F0479 1,0 mg/ml 50 µg/ml Endkonzentration	Dako** Swine-Anti-Rabbit Immunoglobulins/FITC F0205 810 µg/ml 20,25 µg/ml Endkonzentration

* JacksonImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA

** DakoCytomation, Glostrup, Denmark

Die Färbungen gegen die in Tabelle 2.2. aufgeführten intrazellulären Proteine wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Der im Folgenden als Waschpuffer bezeichnete Puffer bestand aus 0,1% Saponin (Sigma-Aldrich, in GIBCO DPBS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und 0,1% BSA (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories GmbH, in GIBCO DPBS, Invitrogen).

Zuerst wurden die zu untersuchenden Zellen zentrifugiert (250 x g, 5 min) und in 5 ml PBS (GIBCO DPBS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mechanisch dissoziiert. Anschließend wurden 10.000 Zellen entnommen und der Ansatz mit gekühltem PBS (GIBCO DPBS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) / 0,01% NaN₃ (Merck, Darmstadt) auf 10 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (250xg, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 100 µl 4% Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) resuspendiert und bei 4°C für 20 Minuten zum Fixieren inkubiert. Von diesem Schritt an wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt.

Der Ansatz wurde dann mit Waschpuffer auf 200 µl aufgefüllt und zentrifugiert (250 x g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 50 µl 0,5% Saponin (in GIBCO DPBS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) / 0,1% BSA (in GIBCO DPBS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C zum Permeabilisieren inkubiert.

Folgend wurde der Ansatz mit Waschpuffer auf 200 µl aufgefüllt und zentrifugiert (250 x g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 200 µl 0,1% Saponin (in GIBCO DPBS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) / 0,5% BSA (in GIBCO DPBS, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C zum Blockieren inkubiert.

Nun wurde der Ansatz mit Waschpuffer auf 1000 µl aufgefüllt und zentrifugiert (250 x g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 40 µl eines entsprechenden Primärantikörperansatzes oder 40 µl des entsprechenden Isotypkontrollansatzes (siehe Tabelle 2.2) resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde der Ansatz mit Waschpuffer auf 200 µl aufgefüllt und zentrifugiert (250 x g, 5 min, 4°C). Nun wurde das Pellet in 25 µl entsprechender Sekundärantikörperlösung (siehe Tabelle 2.3) resuspendiert und bei 4°C für 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Nun wurde der Ansatz mit Waschpuffer auf 200 µl aufgefüllt und zentrifugiert (250 x g, 5 min, 4°C) und das Pellet in 200 µl DAPI (CyStain DNA 1 step, Partec, Münster) für fünf Minuten bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde die FACS-Analyse mit dem PAS Particle Analysing System, Partec, Münster durchgeführt.

Für die Färbungen zur FACS-Analyse gegen CD133 wurden die in der folgenden Tabelle 2.4. aufgeführten Materialien verwendet.

Tabelle 2.4. Verwendete Materialien bei der Färbung gegen CD133

CD133/1-Antikörper (AC133), human	CD133/2-Antikörper (AC141), human	Mouse IgG ₁	FcR-Blocking Reagent, human
Miltenyi-Biotec* 130-080-801	Miltenyi-Biotec* 130-080-901	Miltenyi-Biotec* 130-092-212	Miltenyi-Biotec* 130-059-901
erkennt das glycolysierte Epitop 1 des humanen CD133 (CD133/1)	erkennt Epitop 2 des humanen CD133 (CD133/2)	Isotypkontrolle	zum Blockieren

* Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach

Die Färbungen zur FACS-Analyse gegen CD133 wurden nach dem modifizierten Protokoll des Herstellers (Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach) durchgeführt. Da es sich bei CD133 um ein Oberflächenprotein handelt, konnte auf Schritte zur Permeabilisierung der Zellen verzichtet werden. Nach mechanischer Dissoziation der zu untersuchenden Zellen wurden 10.000 Zellen entnommen und der Ansatz mit gekühltem PBS (Invitrogen) / 0,01% NaN₃ (Merck, Darmstadt) auf 10 ml aufgefüllt und zentrifugiert (250 x g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde nun in 90 µl PBS / 0,01% NaN₃ resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl FcR Blocking Reagent, 5 µl CD133/1-Antikörper und 5 µl CD133/2-Antikörper hinzugegeben. Für die entsprechenden Isotypkontrollen wurden 10 µl FcR Blocking Reagent und 10 µl Mouse IgG₁ hinzugegeben (siehe Tabelle 2.4.). Die Ansätze wurden nun für 45 Minuten auf dem Schüttler lichtgeschützt bei 4°C inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die Ansätze mit auf 1 ml mit gekühltem PBS / 0,01% NaN₃ aufgefüllt, mit 200 µl fötalem Kälberserum (FCS, Fetal Bovine Serum, GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe) unterschichtet und bei 250 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden nun in 200 µl DAPI (CyStain DNA 1 step, Partec, Münster) für fünf Minuten bei 4°C inkubiert.

Dann wurde die FACS-Analyse mit dem PAS Particle Analysing System, Partec, Münster durchgeführt.

2.1.3.2 Fluoreszenz-Immunzytochemie

Die Immunzytochemie wurde mit GS-12 Zellen durchgeführt. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mechanisch dissoziiert und in Lab-Tek Chamber

Slides (Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA) gegeben. Am ersten Versuchstag (Tag 0) wurde in diesen Zellen die Differenzierung induziert (vgl. Abschnitt 2.1.1.4.). Die folgenden Schritte wurden an Tag 2 (48 h nach Differenzierungsinduktion) durchgeführt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

- Fixieren in 4% PFA (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) für 15 min
- viermalig Waschen in 1% Pferdeserum in PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Permeabilisieren mit 3% Triton (Triton-X-100, Merck GmbH, Darmstadt) in PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) für 10 min
- viermalig Waschen in 1% Pferdeserum in PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- Blockieren in 5% Pferdeserum in PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) für 30 min

-viermaliges Waschen in 1% Pferdeserum in PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem GFAP-Erstantikörper (polyclonal rabbit, 2,4 mg/ml, 48 µg/ml, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) bzw. der Isotypkontrolle (Rabbit Immunoglobulin Fraction, 15 mg/ml, 48 µg/ml, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) in einer Feuchtkammer für 60 Minuten. Anschließend wurde viermalig in 1% Pferdeserum in PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gewaschen. Für 30 min wurde dann mit dem FITC-Sekundärantikörper (Swine-Anti-Rabbit Immunoglobulins/FITC, 810 µg/ml, 20,25 µg/ml) inkubiert und viermalig in 1% Pferdeserum in PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gewaschen. Für 10 Minuten wurde anschließend mit DAPI (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) inkubiert und viermalig in 1% Pferdeserum in PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gewaschen. Die Zellen wurden nun fotografiert.

2.1.4 Tierexperimente und HE-Färbung der Schnitte

2.1.4.1 Tierexperimente

Für die anschließend dargestellten Testungen des *in vivo* Tumorigenitätspotentials der GS-Linien lag eine behördliche Genehmigung vor (Anzeigennummer A10a292).

Zunächst erfolgte die Narkotisierung der verwendeten 6-8 Wochen alten Versuchstiere (athymischen Nacktmäuse vom Stamm NMRI nu/nu, Harlan Laboratories, USA) mittels intraperitonealer Gabe von 100 mg/kg Ketamin und 5mg/kg Xylazin. Anschließend wurde der Kopf der Versuchstiere in einem stereotaktischen Rahmen fixiert, die Kopfschwarte eröffnet und eine lokale Hautdesinfektion durchgeführt. Als nächster

Schritt erfolgte eine Bohrlochreparation (2 mm lateral der Sagittalnaht, 1 mm anterior des Bregmas) und folgend die intrazerebrale Injektion von 4 µl einer Zellsuspension mit jeweils $1,5 \times 10^5$ mechanisch dissoziierten Zellen der zu testenden GS-Linie mittels einer Mikroliterspritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz). Die Injektion wurde dabei 2,5 mm tief in das Striatum durchgeführt. Um einem Herausquellen der Tumorzellen aus dem Gewebe vorzubeugen, wurde die Spitze der Mikroliterspritze dann zunächst für zwei Minuten in der Injektionsposition belassen und anschließend über einen Zeitraum von zwei Minuten schrittweise aus dem Hirn der Versuchstiere entfernt. Zum Schluss des Hautschnitts wurde Histoacryl-Gewebekleber (Braun AG, Melsungen) verwendet, eine postoperative Schmerztherapie erfolgte mit 50 mg/kg Novalgin als subkutane Injektion. Im weiteren Verlauf erfolgte eine dreitägige Analgesierung (25 mg Metamizol pro 20 ml Trinkwasser).

Nach der Operation wurden die Tiere regelmäßig gewogen und ihr Verhalten sowie ihre Bewegungen kontrolliert. Bei einem Gewichtsverlust von über 10% verglichen mit dem Ausgangsgewicht oder bei einer Manifestation neurologischer Bewegungsbeziehungsweise Koordinationstörungen wurden die Tiere mittels CO₂ getötet. Anschließend wurde das Hirn entnommen und über mindestens eine Nacht in 10% Formalin fixiert. Im Institut für Neuropathologie des UKE erfolgten die weitere Prozessierung und das Gießen der Hirne in Paraffinblöcke.

2.1.4.2 HE-Färbungen für histologische Untersuchungen

Zur histologischen Auswertung der entnommenen Hirne wurden zunächst mit einem Mikrotom (Leica) 4 µm dicke Stufenserienschnitte hergestellt (ca. 10 Schnitte auf 100 µm). Dieser Vorgang wurde über die nachweisliche maximale Tumorausdehnung hinaus durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger (SuperFrost®, Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) aufgebracht und über Nacht getrocknet. Mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) wurden die Schnitte nun wie folgend dargestellt gefärbt.

Zunächst erfolgte zweimalig eine Entparaffinierung der Schnitte mit Xylol (Merck GmbH, Darmstadt) für jeweils 10 Minuten und anschließend eine Hydrierung der Präparate in einer absteigenden Ethanolreihe (100% - 100% - 96% - 90% - 80% - 70% - destilliertes Wasser, für je zwei Minuten). Im nächsten Schritt wurde die Kernfärbung mittels Hämalaun (Merck GmbH, Darmstadt), das sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen im Zellkern anlagert, durchgeführt (10 Minuten). Unter fließendem

Leitungswasser wurden die Schnitte nun für fünf Minuten gebläut. Mittels Differenzierung mit Ethanol/HCl (Merck GmbH, Darmstadt) für zwei Sekunden wurde dann die durch Diffusion des Farbstoffs stattfindene Färbung des Zytoplasmas ausgewaschen und die Bläung in Leitungswasser wiederholt. Im folgenden Schritt erfolgte die Färbung Zytoplasmas mit 1%iger Eosinlösung (Merck GmbH, Darmstadt) für sieben Minuten. Eosin lagert sich dabei als saurer Fluorescein-Farbstoff an die basischen Bestandteile des Zytoplasmas an. Anschließend wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe behandelt (90% - 96% - 100%, je eine Minute) und zur Entfernung des Alkohols für zehn Minuten mit Xylol überdeckt. Zuletzt erfolgte eine Überschichtung der Schnitte mit Eukitt® Medium (O. Kindler GmbH, Freiburg) sowie eine Abdeckung der Präparate mit einem Deckgläßchen. Unter mikroskopischer Sichtung erfolgte dann die Auswertung der Schnitte.

2.2 Material

Tabelle 2.5. gibt die verwendeten Materialien an

Eppendorf Gefäße (0,2 / 0,5 / 1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
6-Loch Platte "Nunclon Surface"	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
96-Loch Platte "Nunclon Surface"	
T-25 Zellkulturflaschen "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
T-75 Zellkulturflaschen "Cellstar"	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
T-125 Zellkulturflaschen "Falcon"	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
50 ml Gefäße "Falcon Cellstar"	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
15 ml Gefäße "Falcon Cellstar"	
Pipetten "Falcon" (2 / 5 / 10 / 25 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
96-Loch Platten für RT-PCR "Optical 96-Well Fast Thermal Cycling Plate"	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Neubauer Zellzählkammer	Rudolf Brand GmbH & Co, Wertheim
Lab-Tek Chamber Slides	Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA
Pipetten Biosphere® Filter Tips 10 / 20 / 100 / 200 / 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Kulturplatten Bakterien 100 mm x 20 mm	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Zellkulturplatten Falcon	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Objektträger SuperFrost®	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig

2.3 Geräte

Tabelle 2.6. gibt die verwendeten Geräte an

Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co. ,Inc, Edison, New Jersey, USA
Allegro Rotator	Nichols Institute Diagnostics, Chantilly, Virginia, USA
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus-Akku-Pipetten	Hirschmann, Eberstadt
Sicherheitswerkbank Herasafe Klasse 2	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
Begasungs-Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
Hypoxie-Brutschrank Labortec C16/C42	Labortec, Göttingen
Mikroskop "DM IL", "DM IRB"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
Zentrifuge "Centrifuge 5810"	Eppendorf AG, Hamburg
Tisch-Zentrifuge "Centrifuge 5415 C"	
Tisch-Zentrifuge "miniSpin"	
-80 Grad Kühltruhe	Kryotec GmbH, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Vortexer	Heidolph GmbH, Schwabach
Durchflusszytometer	PAS Partec GmbH, Münster
Photometer "GeneQuant pro"	Amersham plc, Little Chalfont, England
Biometra "Personal Cycler"	Biometra GmbH, Göttingen
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Fluoreszenzmikroskop "Axioskop"	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenzlampe "HBO 50"	
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Liebherr International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Liebherr International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Mikroliterspritze zur Zellinjektion	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Mikrotom "SM 2000R"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

3 Ergebnisse

3.1 CD133 in der konventionellen Gliomlinie U251 in kurzzeitiger Hypoxie

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, zu untersuchen, inwiefern der Tumorstammzellphänotyp und dabei insbesondere das Verhalten der Tumorstammzellmarker der im Labor für Hirntumorforschung des UKE etablierten Glioblastomstammzelllinien (GS-Linien) durch Hypoxie reguliert wird. Als spezifischster Marker für Glioblastomstammzellen gilt CD133 (Singh et al. 2004), dessen Expression durch Hypoxie in Glioblastomstammzellen induziert werden konnte (Platet et al. 2007). In den Versuchen von Griguer et al. (2008) war es gelungen, CD133 sogar in der konventionellen, das heißt adhärent wachsenden, in serumhaltigem Medium kultivierten Gliomlinie U251 durch Hypoxie zu induzieren (vgl. Abschnitt 2.1.1.2.). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, dieses Ergebnis zu reproduzieren. Hierzu wurde die Linie U251 für 3 Tage in 1% O₂ kultiviert und anschließend für 5 Tage reoxygeniert. Parallel wurde die Zelllinie als Kontrolle durchgehend in 21% O₂ kultiviert. Es wurden an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 8 FACS-Analysen für CD133 durchgeführt. Die folgende Abbildung 3.1. zeigt, dass es nicht möglich war, die Ergebnisse von Griguer et al. zu reproduzieren.

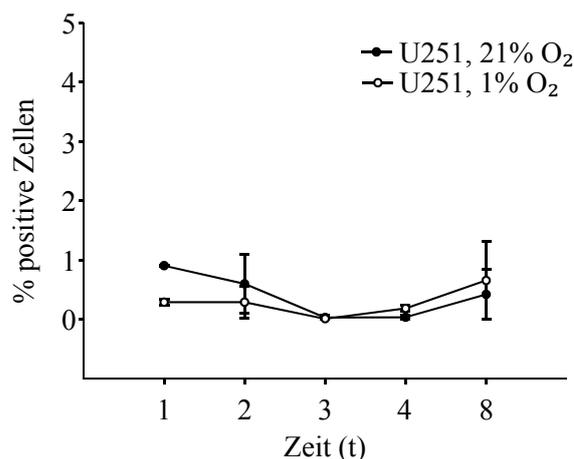


Abb. 3.1. CD133 positive Zellen in U251 in 21% O₂ und 1% O₂ über acht Tage (FACS-Analyse). An Tag 4 erfolgte die Reoxygenierung der 1% O₂-Zellen in 21% O₂. Die Messung erfolgte als Duplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Varianz. Abb. 6.1. zeigt die zugehörigen FACS-Dot-Plots.

Zu keinem der Messzeitpunkte lag der Anteil CD133 positiver Zellen in den untersuchten Populationen über 1%. Die Abbildung zeigt auch, dass nach 24-stündiger Kultivierung in 1% O₂ (Tag 1 in Abb. 3.1.) der Anteil CD133 Protein exprimierender Zellen sogar niedriger war als in den in 21% O₂ kultivierten Zellen. Zudem fiel die Expression von CD133 bis zu Tag 3 in beiden Populationen ab. Von Tag 4 zu Tag 8 erfolgte wiederum ein diskreter Anstieg der Expression. Da dieser Anstieg aber bereits in der Reoxgenierungsphase stattfand, kann von keiner Induktion des CD133 Proteins durch Hypoxie in der verwendeten U251-Linie ausgegangen werden.

Zusätzlich wurden mRNA-Analysen mit der U251 durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass es nach 3-tägiger Kultivierung der U251 in 1% O₂ zu keiner Induktion von CD133 mRNA kam (Daten nicht gezeigt). Auch in der im Labor für Hirntumorforschung etablierten konventionellen, CD133 negativen Zelllinie G123 wurde durch Hypoxie CD133 auf mRNA-Ebene nicht induziert. So konnte selbst nach 9 Wochen Kultivierung in 1% O₂ keine konsistente Induktion der CD133 Expression gegenüber der Vergleichsprobe (kultiviert in 21% O₂) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Ausgehend von diesen Ergebnissen, nach denen es nicht möglich zu sein schien, eine CD133 Expression in den konventionellen Zelllinien U251 und G123 zu provozieren, sollte untersucht werden, inwieweit sich die Expression von CD133 in den Glioblastomstammzelllinien bei Kultivierung in 1% O₂ verändern würde.

3.2 CD133 in den Linien GS-11 und GS-12 in kurzzeitiger Hypoxie

Zur Klärung der Frage, inwieweit die Expression des Tumorstammzellmarkers CD133 in den Glioblastomstammzelllinien durch Hypoxie provoziert werden konnte, wurden die Zelllinien GS-11 und GS-12 kurzzeitigen hypoxischen Kulturbedingungen (1%O₂, 48h) ausgesetzt.

Abbildung 3.2. zeigt die CD133 mRNA Expressionen in der GS-11 bei Kultivierung in 1% O₂ für 48h und anschließender Reoxygenierung in 21% O₂.

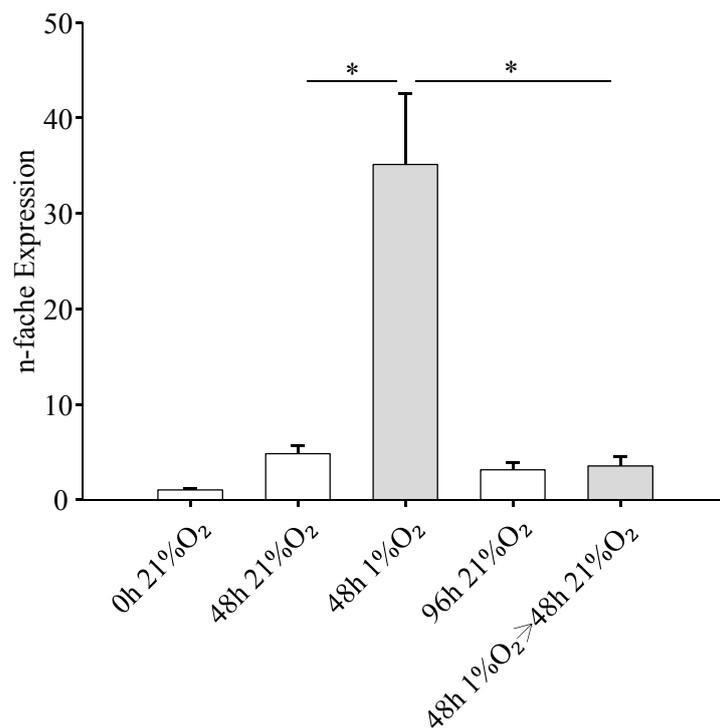


Abb. 3.2. CD133 mRNA Expression in GS-11 nach 48h in 1%O₂ und anschließender Reoxygenierung. Die RealTime-PCR erfolgte als Triplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Es zeigte sich, dass CD133 mRNA durch 48 stündige Kultivierung in 1% O₂ signifikant ($p = 0,002$) gegenüber der Vergleichsprobe, die für 48h in 21% O₂ kultiviert wurde, hochreguliert wurde. Der anschließende Abfall der CD133 mRNA Expression nach weiteren 48h Reoxygenierung in 21% O₂ auf das mRNA Niveau der Vergleichsprobe (96h 21% O₂) war ebenfalls signifikant ($p = 0,01$).

Auf Proteinebene erfolgte ein deutlicher Anstieg des Anteils CD133 positiver Zellen nach 5 Tagen, wie Abbildung 3.3. zeigt. Verglichen mit dem Ausgangswert (4,2%-positive Zellen ($\pm 0,03\%$)) ging der Anteil CD133 exprimierender Zellen nach 48 stündiger Kultivierung in 1% O₂ zunächst leicht zurück, um dann nach 5 Tagen auf 15,8% ($\pm 0,5\%$) anzusteigen gegenüber 2,4%-positiven Zellen ($\pm 0,3$) in den in 21% O₂ kultivierten Zellen der GS-11.

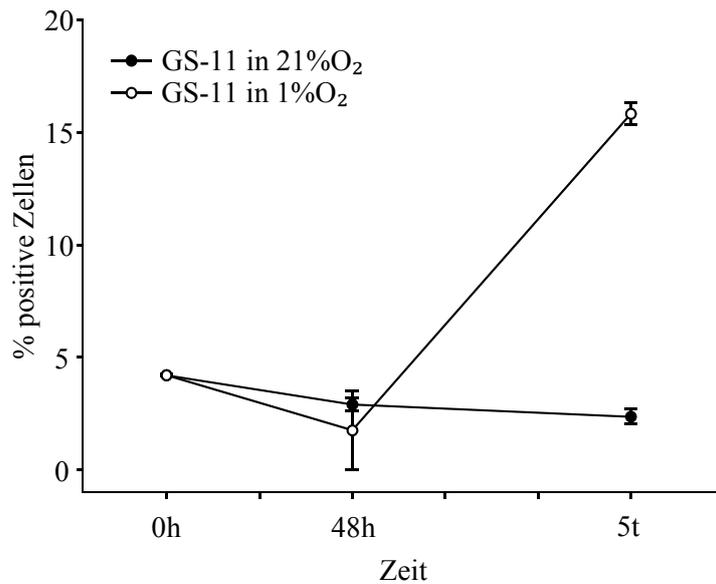


Abb. 3.3. Anteil CD133 positiver Zellen in GS-11 nach 48h und 5t in 1%O₂ (FACS-Analyse). Die Messung erfolgte als Duplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Varianz. Abb. 6.2. zeigt die zugehörigen FACS-Dot-Plots.

Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Versuche mit der Linie GS-12 erzielt. Die Abbildung 3.4. zeigt zunächst die CD133 mRNA Expressionen in der GS-12 bei Kultivierung in 1% O₂ für 48h mit anschließender Reoxygenierung in 21% O₂. Es zeigt sich, dass die CD133 mRNA durch 48 stündige Kultivierung in 1% O₂ signifikant ($p = 0,008$) gegenüber der Vergleichsprobe, die für 48h in 21% O₂ kultiviert wurde, hochreguliert wurde. Die anschließende Abfall der CD133 mRNA Expression nach weiteren 48h Reoxygenierung in 21% O₂ auf das mRNA Niveau der Vergleichsprobe (96h 21%O₂) war ebenfalls signifikant ($p = 0,046$).

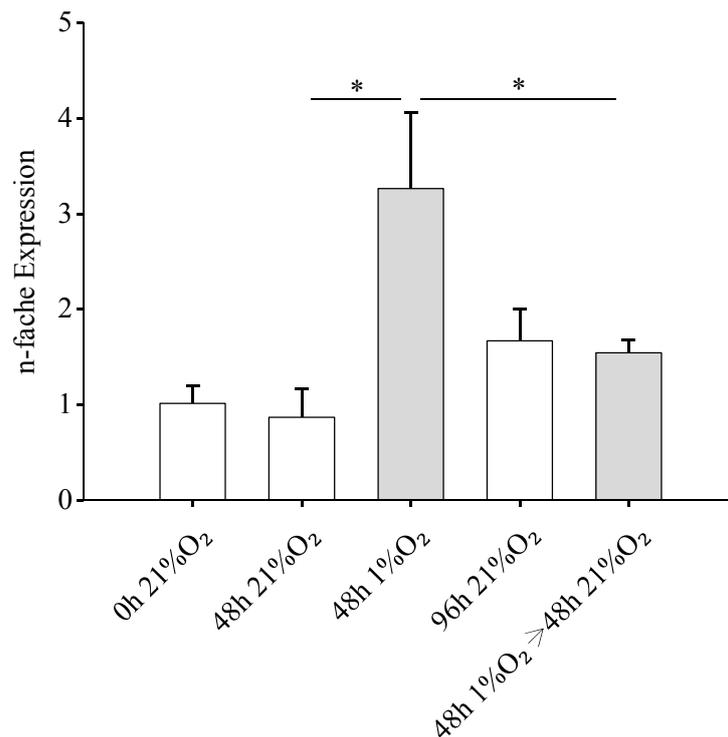


Abb. 3.4. CD133 mRNA Expression in GS-12 nach 48h in 1%O₂ und anschließender Reoxygenierung. Die RealTime-PCR erfolgte als Triplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Wie bei der Zelllinie GS-11 reagierte auch das CD133 Protein in der GS-12 später als die mRNA Expression auf die Kultivierung in 1% O₂, wie Abbildung 3.5. zeigt.

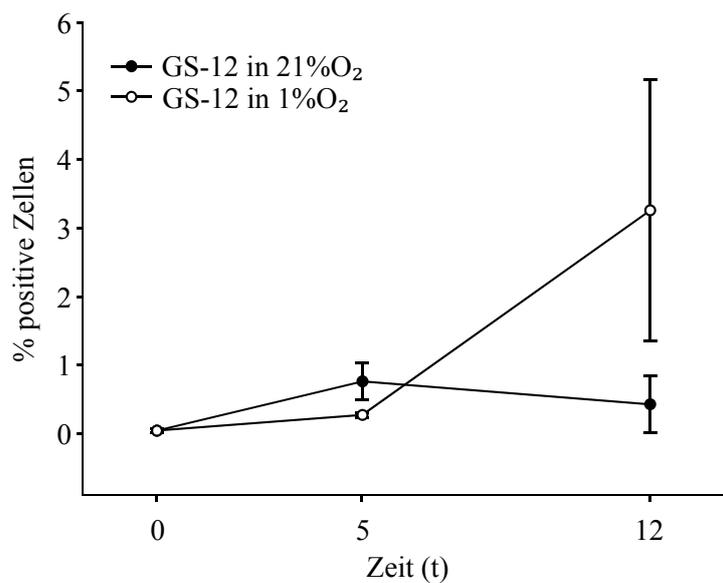


Abb. 3.5. Anteil CD133 positiver Zellen in GS-12 nach 5t und 12t in 1%O₂ (FACS-Analyse). Die Messung erfolgte als Duplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Varianz. Abb. 6.3. zeigt die zugehörigen FACS-Dot-Plots.

Ausgehend von einer CD133 negativen Zellpopulation konnten nach 12 Tagen Kultivierung in 1% O₂ 3,26%-CD133 positive Zellen detektiert werden, wohingegen die Kontrolle, die in 21% O₂ kultiviert wurde, auch nach 12 Tagen CD133 negativ (0,43% ± 0,42%) blieb.

Die Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zu der konventionellen Gliomlinie U251 eine Induktion der CD133 Expression durch kurzzeitige Hypoxie auf Protein- und mRNA-Ebene in den Glioblastomstammzelllinien GS-11 und GS-12 konsistent möglich war. Um zu prüfen, inwieweit die Induzierbarkeit von CD133 durch Hypoxie mit dem Stammzellphänotyp von Glioblastomzelllinien assoziiert ist, wurden anschließend Versuche mit GS-Linien, die lediglich einen eingeschränkten Stammzellphänotyp aufweisen, durchgeführt.

3.3 CD133 in den Linien GS-2 und GS-7 in kurzzeitiger Hypoxie

Während die Zelllinien GS-11 und GS-12 die Kriterien für Tumorstammzellen vollständig erfüllten (Schulte et al. 2011), wiesen einige andere Linien, darunter die GS-2 und GS-7, lediglich einen eingeschränkten Stammzellphänotyp auf. Das heißt, sie waren kaum tumorigenitierend *in vivo* und / oder wuchsen nicht invasiv. Darüber hinaus wuchsen sie zwar sphärisch, allerdings adhärirten die Sphären anders als bei Linien mit

voll ausgeprägtem Stammzellphänotyp (semi-adhärentes Wachstum). Zudem ließen sie sich nur eingeschränkt differenzieren und enthielten keine oder kaum CD133 positive Zellen (Günther et al. 2008). Diese Linien weisen somit einen Phänotyp auf, der intermediär ist zwischen Glioblastomstammzelllinien mit voll ausgeprägten Tumorstammzellphänotyp und konventionellen Linien. Die Zelllinien GS-2 und GS-7 wurden analog den zuvor beschriebenen Experimenten kurzzeitig hypoxischen Bedingungen ausgesetzt.

Wie Abbildung 3.6. zeigt, konnte für die Linie GS-2 eine signifikante Hochregulation der CD133 mRNA unter Kultivierung in 1% O₂ für 48h festgestellt werden. Die CD133 mRNA war dabei 8,0-fach ($\pm 1,3$, $p = 0,0006$) gegenüber dem Wert der Proben, die für 48h in 21% O₂ kultiviert wurden, erhöht. In der GS-7 konnte unter Kultivierung in 1% O₂ für 48h dagegen keine CD133 mRNA-Hochregulation beobachtet werden. Vielmehr konnte weder nach 48 stündiger Kultivierung in 1% O₂ noch in der Ausgangsprobe CD133 mRNA detektiert werden.

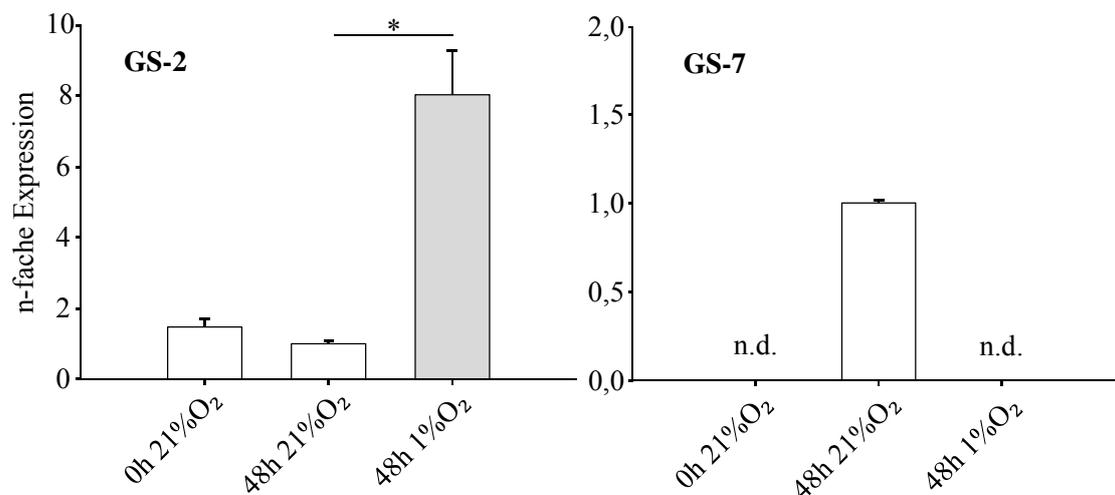


Abb. 3.6. CD133 mRNA Expression in GS-2 (links) und GS-7 (rechts). Der jeweils linke Balken zeigt die Ausgangsexpression von CD133, die weiteren Balken die Expressionen nach 48h in entweder 21% O₂ oder 1% O₂. Die RealTime-PCR erfolgte als Triplikatabbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet (n.d. = keine mRNA detektiert).

Eine mögliche Erklärung für dieses diskrepante Verhalten der GS-2 und GS-7 könnte sein, dass es sich bei der GS-2 um eine Linie eines zweiten Tumorrezidivs nach Radiochemotherapie handelt und damit bereits Selektionsprozesse stattgefunden haben könnten. Bao et al. konnten zeigen, dass CD133 positive Gliomzellen eine Bestrahlung

in größerer Anzahl überlebten als CD133 negative Linien (Bao et al. 2006). Ein solcher Selektionsprozess könnte dafür verantwortlich sein, dass die aus einem vorbehandelten Tumor etablierte Zelllinie GS-2 bereits unter normoxischen Bedingungen 1% CD133 positive Zellen enthielt, wohingegen die GS-7 CD133 negativ war. Darüber hinaus war die Linie GS-2 im Gegensatz zur GS-7 *in vivo* tumorinitiierend, wenngleich die Tumoren nicht invasiv wuchsen.

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3. zeigen, dass die Expression von CD133 in Glioblastomlinien mit eingeschränktem Stammzellphänotyp durch Hypoxie nicht einheitlich induziert werden konnte. Da auch in den konventionellen Gliomlinien U251 und G123 keine Induktion von CD133 durch Hypoxie beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 3.1.), scheint dieses Phänomen mit dem Ausprägungsgrad des Stammzellphänotyps von Gliomzelllinien assoziiert zu sein.

3.4 Oct-4 in den Linien GS-11 und GS-12 in kurzzeitiger Hypoxie

Vor dem Hintergrund der Beobachtung, dass die Expression von CD133 vor allem in den Glioblastomstammzelllinien durch kurzzeitige hypoxische Kultivierung induziert werden konnte, stellten wir uns die Frage, inwieweit auch andere Stammzellmarker in den GS-Linien durch Hypoxie reguliert sein könnten. Der Transkriptionsfaktor Oct-4 gilt als hochpotenter Induktor für Eigenschaften embryonaler Stammzellen und hat außerdem großen Einfluss auf den Stammzellphänotyp adulter neuraler Stammzellen (Kim et al. 2009, Takahashi und Yamanaka 2006, Shimosaki et al. 2003). Außerdem ist bekannt, dass Oct-4 in humanen mesenchymalen Stammzellen durch Hypoxie reguliert wird (Grayson et al. 2007). Somit sollte das Expressionsverhalten des Stammzellmarkers Oct-4 in den Linien GS-11 und GS-12 bei deren Kultivierung unter kurzzeitiger Hypoxie untersucht werden. Die folgende Abbildung 3.7. zeigt die Expression von Oct-4 auf Proteiniveau in der GS-11 und GS-12 unter kurzzeitiger hypoxischer Kultivierung.

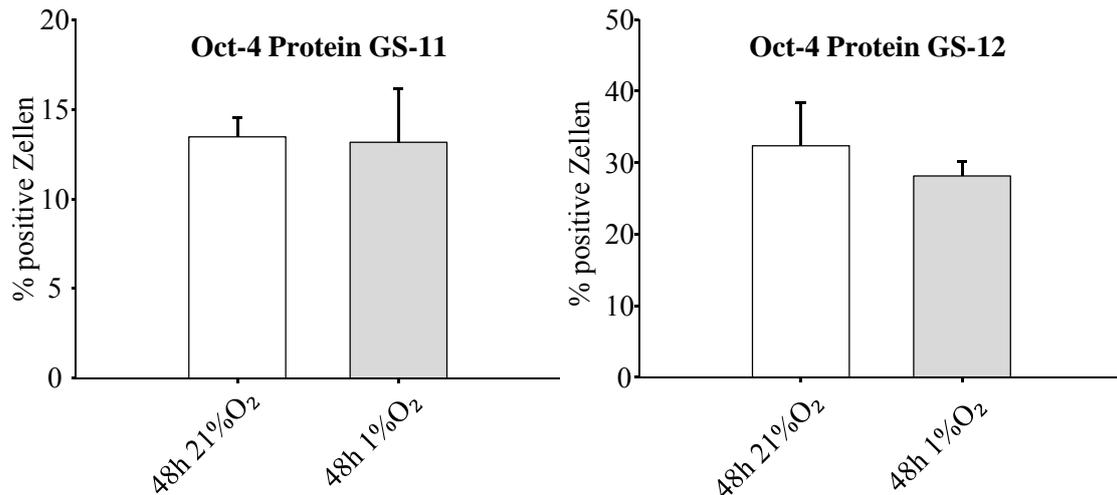


Abb. 3.7. Oct-4 Proteingehalt (FACS-Analyse) in GS-11 und GS-12 nach 48h in 21% O₂ (linker Balken) und in 1% O₂ (rechter Balken). Die Messung erfolgte als Duplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Varianz. Abb. 6.4. und 6.5. zeigen die zugehörigen FACS-Dot-Plots.

Es zeigte sich, dass das Proteinniveau in beiden Zelllinien bei Kultivierung in 1% O₂ für 48h stabil blieb. Der Anteil der für Oct-4 positiven Zellen lag in der GS-11 nach 48h Kultur in 1% O₂ bei 13,2% (± 3,0%) gegenüber 13,5 % (± 1,0%) positiver Zellen bei Kultivierung in 21% O₂. Ebenso verhielt sich Oct-4 in der GS-12. Die Oct-4 positive Zellpopulation machte bei 1% O₂ nach 48h 28,1% (± 2,1%) aus gegenüber 32,3% (± 6,0%) positiver Zellen in 21% O₂ für 48h.

Auch auf mRNA-Ebene kam es zu keiner eindeutigen Hochregulation des Stammzellmarkers Oct-4 in der GS-11 und GS-12. In der GS-11 reagierte die mRNA Expression von Oct-4 nach Kultivierung in 1% O₂ für 48h mit einer signifikanten Herunterregulation auf das 0,6-Fache (± 0,1) der Vergleichsprobe, die für 48h in 21% O₂ kultiviert wurde. In der GS-12 fand zwar eine signifikante, aber dennoch im Vergleich zur Reaktion von CD133 deutlich geringfügigere, zudem biologisch nicht relevante Hochregulation (1,4-fach ± 0,2) nach Kultivierung der Zellen in 1% O₂ für 48h statt. (Daten nicht gezeigt).

Es zeigt sich somit, dass in den Glioblastomstammzelllinien GS-11 und GS-12 anders als für Stammzellmarker CD133 keine konsistente Hochregulation von Oct-4 durch Kultivierung in kurzzeitiger Hypoxie beobachtet werden konnte.

3.5 Verhalten von Stammzellmarkern in dauerhafter Hypoxie

Die kurzzeitige Hypoxieexposition von Gliomzellen *in vitro* spiegelt nur eingeschränkt die Situation in Glioblastomen im menschlichen Gehirn wider, denn in diesen Tumoren herrscht nicht nur kurzfristige Hypoxie, sondern es besteht ein permanent hypoxisches Milieu von ca. 1% O₂ (Rampling et al. 1994). Dabei kommt es infolge der Tumorangio-genese immer wieder zeitweise zu Phasen stärkerer Oxygenierung, bis dann durch die Proliferation der Tumorzellen schließlich wiederum die Sauerstoffversorgung nicht mehr ausreicht (Brat et al. 2004, Dvorak 2005, Ferrara 2005, Heddleston et al. 2010). Um diesen Zustand der Dauerhypoxie zu imitieren, wurden die Zelllinien GS-11 und GS-12 von vornherein parallel auch unter hypoxischen Bedingungen (1%O₂) etabliert, so dass diese Linien, die als GS-11H und GS-12H bezeichnet werden, mit den parallel regulär unter 21% O₂ etablierten Linien verglichen werden konnten.

Ein Teilziel der vorliegenden Arbeit war zu klären, inwiefern dauerhaft hypoxische Kulturbedingungen die Expression von Stammzellmarkern wie CD133, Oct-4 und SOX2 beeinflusst. Die Abbildung 3.8. zeigt zunächst die mRNA Expression für CD133, Oct-4 und SOX2 in den Linien GS-11 und GS-11H sowie der GS-12 und GS-12H im direkten Vergleich.

A	n-fache Expression in GS-11H gegenüber GS-11	B	n-fache Expression in GS-12H gegenüber GS-12
CD133 mRNA	29,7 (±9,1)*	CD133 mRNA	2972,0 (±683,2)*
Oct-4 mRNA	1,0 (±0,04)	Oct-4 mRNA	1,2 (±0,1)
SOX2 mRNA	1,1 (±0,1)	SOX2 mRNA	1,4 (±0,1)*

Abb. 3.8. N-fache mRNA Expression von CD133, Oct-4 und SOX2 in GS-11H gegenüber GS-11 (**A**) und GS-12H gegenüber GS-12 (**B**). Die RealTime-PCR erfolgte als Triplikatabbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung in Klammern, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

In beiden Zelllinien nahm unter langfristiger hypoxischer Kultivierung die CD133 Expression signifikant zu, für Oct-4 hingegen konnte in beiden Zelllinien keine

signifikante Regulation beobachtet werden. SOX2 wiederum war in der GS-12H gegenüber der GS-12 signifikant, aber sehr geringfügig hochreguliert, in der GS-11H jedoch konnte in Bezug auf die GS-11 für SOX2 keine signifikante Regulation beobachtet werden. Die Ergebnisse der anschließenden Messungen für CD133, Oct-4 und SOX2 auf Proteinebene sind in der folgenden Abbildung 3.9. dargestellt.

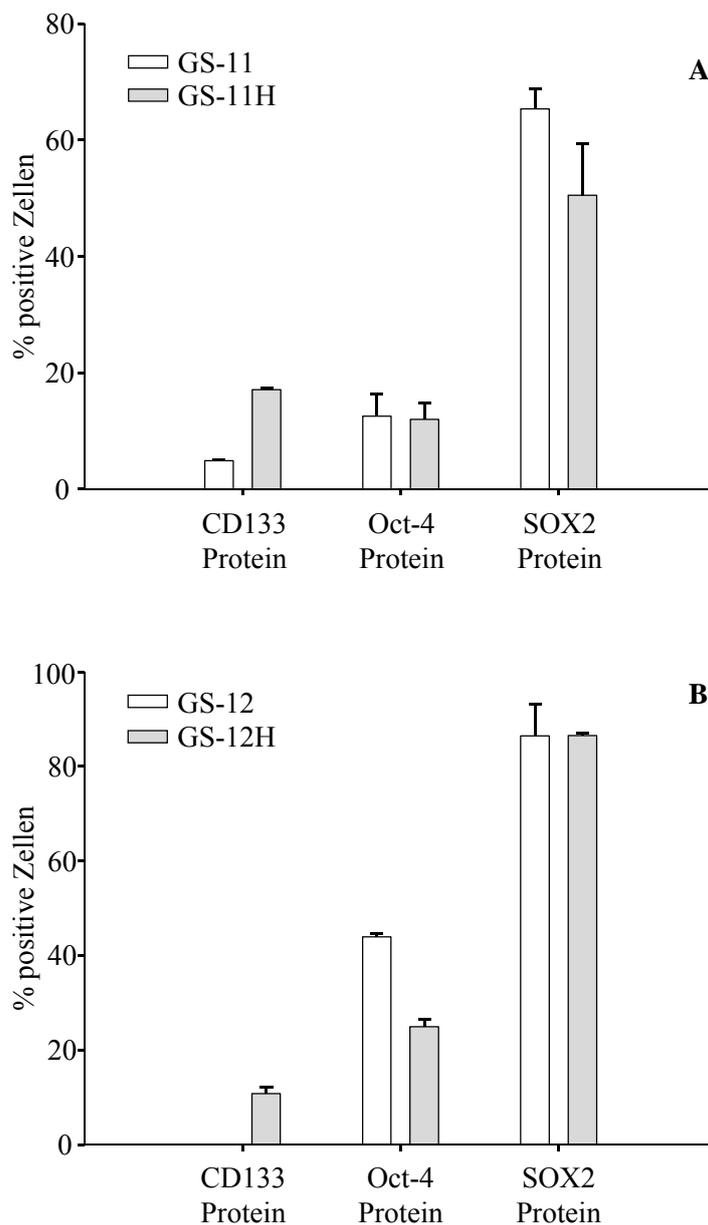


Abb. 3.9. CD133, Oct-4 und SOX2 positive Zellen (FACS-Analyse) in GS-11 und GS-11H (**A**) sowie GS-12 und GS-12H (**B**). Die Messung erfolgte als Duplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Varianz. Abb. 6.6. und 6.7. zeigen die zugehörigen FACS-Dot-Plots.

Sowohl in der GS-11H als auch in der GS-12H konnte ein höherer Anteil CD133 positiver Zellen in Bezug auf die normoxisch kultivierten Vergleichslinien bestimmt werden. So wurde in der GS-11H ein ungefähr dreifach höherer Anteil CD133 positiver Zellen gegenüber der GS-11 gemessen. In der GS-12H fanden sich 10,6% ($\pm 2,3\%$) CD133 positive Zellen gegenüber keinen detektierbaren CD133 positiven Zellen in der GS-12. Für Oct-4 konnte keine Regulation der Anzahl positiver Zellen in der GS-11H gegenüber der GS-11 beobachtet werden. In der GS-12H hingegen war der Anteil Oct-4 positiver Zellen gegenüber der GS-12 0,6-fach geringer. Der Anteil SOX2 positiver Zellen war in der GS-11H gegenüber der GS-11 0,8-fach geringer, wohingegen in der GS-12H gegenüber der GS-12 ein konstanter Anteil SOX2 positiver Zellen bestimmt wurde.

Es wird deutlich, dass, ähnlich den Ergebnissen aus den Versuchen mit kurzzeitiger Hypoxie, auch durch langfristiger Hypoxie CD133 sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene reguliert werden konnte. Für Oct-4 und SOX2 konnte jedoch keine einheitliche Regulation durch langfristige Hypoxie nachgewiesen werden.

Die inhomogene und sehr eingeschränkte Regulation der Stammzellmarker Oct-4 und SOX2 widersprach unseren Erwartungen und veranlasste die Ausweitung der Versuche auf weitere Tumorstammzelllinien. Da sich Gliome als sehr heterogen darstellen, blieb die Möglichkeit, dass es sich bei den verwendeten Zelllinien um Kulturen handelt, die zufällig keine Regulation von Oct-4 und SOX2 zeigten. Daher sollte das Spektrum der untersuchten Zelllinien erweitert werden.

3.6 Untersuchungen weiterer GS-Linien

Zusätzlich zu den Zelllinien GS-11 und GS-12, auf die wir zunächst geplant hatten, die Langzeithypoxieexperimente exemplarisch zu beschränken, erweiterten wir die Untersuchungen auf die Zelllinien GS-10(H) und GS-13(H), die analog zu den Linien GS-11(H) und GS-12(H) etabliert wurden (vgl. Abschnitt 2.1.1.1.). Die folgende Tabelle 3.1. zeigt, dass die verwendeten Zelllinien Tumoren von Patienten unterschiedlichen Geschlechts und Alters entstammen. Außerdem unterscheidet sich die Lokalisation des Tumors, der Proliferationsstatus (MIB-1 Wert) und des p53-Status. Zudem ist die Linie GS-11 (bzw. GS-11H) aus einem Rezidivtumor entstanden.

Tabelle 3.1. Eigenschaften der den Linien GS-10 bis GS-13 zu Grunde liegenden Tumoren (laut Befunden der Klinik für Neurochirurgie des UKE und des Instituts für Neuropathologie des UKE).

Zelllinie	Alter ^a	Geschlecht	Ort des Tumors	Neuer Tumor/ Rezidiv	MIB-1 ^b (%)	p53 IHC ^b (%)
GS-10	63	weiblich	links, temporal	neu	10	30
GS-11	50	männlich	rechts, temporal	erstes Rezidiv	30	57
GS-12	69	weiblich	rechts, parietal	neu	23	50 (schwach)
GS-13	45	weiblich	rechts, frontal	neu	6	35

^a bei Operation in Jahren; ^b % p53/MIB-1 immunreaktive Zellen pro 0.1mm², bemessen auf Paraffin Schnitte des Tumors.

Zunächst wurde die mRNA Expression der Stammzellmarker CD133, Oct-4 und SOX2 in den Zelllinien GS-10 und GS-13 untersucht, wie Tabelle 3.2. zeigt.

Tabelle 3.2. N-fache mRNA Expression von CD133, Oct-4 und SOX2 in den Linien GS-10H gegenüber GS-10 und GS-13H gegenüber GS-13. Die RealTime-PCR erfolgte als Triplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung in Klammern, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	GS-10H gegenüber GS-10	GS-13H gegenüber GS-13
CD133	4,1 ($\pm 1,1$)*	1449,2 ($\pm 525,9$) ¹
Oct-4	2,7 ($\pm 0,1$)*	5,8 ($\pm 0,3$)*
SOX2	0,1 ($\pm 0,01$)*	1,1 ($\pm 0,01$)*

¹ Nur Doppelwerte verfügbar, angegeben ist die Varianz.

Es zeigte sich, dass auch in den Linien GS-10(H) und GS-13(H) CD133 durch dauerhafte Kultivierung der Linien in Hypoxie hochreguliert wurde: 4,1-fach in der GS-10H gegenüber der GS-10 und 1449,2-fach in der GS-13H gegenüber der GS-13. Auch Oct-4 wurde in beiden Zelllinien auf mRNA-Ebene hochreguliert: 2,7-fach in der GS-10H gegenüber der GS-10 und 5,8-fach in der GS-13H gegenüber der GS-13. SOX2 mRNA hingegen wurde in der GS-10H gegenüber der GS-10 herunterreguliert

(0,1-fach) und in der GS-13H gegenüber der GS-13 sehr geringfügig hochreguliert (1,1-fach).

Somit wird deutlich, dass CD133 in allen vier verwendeten Zelllinien durch Hypoxie induziert werden konnte. Für SOX2 hingegen ergibt sich ein uneinheitliches Bild. Es war in zwei Linien signifikant herauf- (vor allem in der GS-13H aber äußerst geringfügig), in einer Linie herunter- und in einer Linie nicht signifikant reguliert. Oct-4 zeigte sich in den zunächst verwendeten Linien GS-11H und GS-12H nicht reguliert. In den beiden zusätzlich untersuchten Zelllinien GS-10H und GS-13H war es jedoch signifikant (2,7-fach und 5,8-fach) hochreguliert.

3.7 Untersuchung weiterer Marker

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Erweiterung der Anzahl untersuchter Zelllinien sinnvoll und wichtig war, da hierdurch zumindest die Induktion von Oct-4 mRNA durch dauerhaft hypoxische Kultivierung in den Linien GS-10 und GS-13 nachgewiesen werden konnte, vermuteten wir, dass auch hinsichtlich der Regulation anderer Stammzellmarker Heterogenität zwischen den verschiedenen Zelllinien bestehen könnte. Wir setzten daher die Untersuchungen an den vier GS-Linien fort und dehnten diese auf zwei weitere Marker, Nestin und CD44, aus. Das Intermediärfilament Nestin wird in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung von Nervengewebe exprimiert und gilt als Marker neuraler Stammzellen (Cattaneo und McKay 1990, Michalczyk und Ziman 2005). Zudem wird es in Glioblastomstammzelllinien exprimiert (Ignatova et al. 2002). Obwohl nicht bekannt ist, dass es sich bei CD44 um ein Marker für Glioblastomstammzelllinien handelt, sollte der Einfluss hypoxischer Bedingungen auf diesen Marker untersucht werden, da er von Tumorstammzellen des Kolonkarzinoms und des Mammakarzinoms exprimiert wird (Al-Hajj et al. 2003, Huang und Wicha 2008; vgl. Abschnitt 1.2.4.).

Die folgende Tabelle 3.3. zeigt die mRNA Expression von Nestin und CD44 in GS-10H bis GS-13H.

Tabelle 3.3. N-fache mRNA Expression von Nestin und CD44 in den Linien GS-10H bis GS-13H. Die RealTime-PCR erfolgte als Triplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung in Klammern, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

	GS-10H gegenüber GS-10	GS-11H gegenüber GS-11	GS-12H gegenüber GS-12	GS-13H gegenüber GS-13
Nestin	0,13 ($\pm 0,06$)*	1,1 ($\pm 0,5$)	0,7 ($\pm 0,02$)*	35,7 ($\pm 9,3$)*
CD44	0,6 ($\pm 0,1$)*	2,1 ($\pm 0,2$)*	1,3 ($\pm 0,1$)*	0,4 ($\pm 0,02$)*

Aus der Tabelle 3.3. wird deutlich, dass Nestin auf mRNA-Ebene in den Linien GS-10 und GS-12 durch deren Kultivierung in dauerhafter Hypoxie signifikant herunter-, in der Linie GS-13 hingegen signifikant hochreguliert wurde. In der Linie GS-11 wiederum konnte keine Regulation von Nestin beobachtet werden. CD44 mRNA fand sich in der GS-10 und GS-13 in dauerhafter Hypoxie herunter-, in der GS-11 und GS-12 (hier sehr geringergradig) dagegen hochreguliert.

Die folgende Tabelle 3.4. zeigt zusammenfassend die Regulationen der untersuchten Stammzellmarker in den Zelllinien GS-10 bis GS-13 auf mRNA-Ebene bei deren Kultivierung unter langfristige hypoxischen Bedingungen (vgl. Abschnitte 3.5. und 3.6.).

Tabelle 3.4. Anzahl der regulierten mRNA Expression der Stammzellmarker CD133, Oct-4, SOX2, Nestin und CD44 in den Linien GS-10, GS-11, GS-12 und GS-13 bei Kultivierung in dauerhafter Hypoxie.

	Anzahl der GS-Linien mit einer signifikanten Hochregulation	Anzahl der GS-Linien mit einer signifikanten Herunterregulation	Anzahl der GS-Linien ohne signifikante Regulation
CD133	3 von 4 ⁽¹⁾	-	1 ⁽¹⁾
Oct-4	2 von 4	-	2 von 4
SOX2	2 von 4	1 von 4	1 von 4
Nestin	1 von 4	2 von 4	1 von 4
CD44	2 von 4	2 von 4	-

⁽¹⁾ Bei der nicht signifikant regulierten Linie handelt es sich um die Linie GS-13, bei der eine über 1000-fach erhöhte Expression von CD133 gemessen werden konnte. Bei nur vorhandenen Doppelwerten war allerdings keine Signifikanzbestimmung möglich.

Aus der Übersicht wird deutlich, dass CD133 konsistent durch Hypoxie induziert werden konnte. Oct-4 mRNA Expression konnte in zwei der verwendeten Zelllinien induziert

werden, in zwei weiteren fand keine Induktion statt. Für die Marker SOX2 und Nestin ergibt sich hingegen ein sehr heterogenes Bild in Bezug auf ihre Regulation in Glioblastomstammzelllinien unter langfristig hypoxischen Bedingungen. Auch für CD44 ergibt sich ein uneinheitliches Gesamtbild, da es in jeweils zwei Linien entgegengesetzt reguliert war. Zudem zeigte sich die beobachtete Hochregulation deutlich weniger ausgeprägt als die von CD133 und Oct-4 in dauerhaft hypoxischen Bedingungen.

Mit den folgend dargestellten Versuchen sollte nun der Mechanismus der Regulation des in den verwendeten Zelllinien konsistent durch kurzzeitige und langfristige Hypoxie induzierbaren Stammzellmarkers CD133 untersucht werden.

3.8 shRNA gegen HIF1 α

Für die molekulare Antwort auf hypoxische Umgebungsbedingungen ist maßgeblich die Familie der Transkriptionsfaktoren der Hypoxia-Inducible-Factors (HIFs) verantwortlich. Für Glioblastome ist der Einfluss der HIFs belegt. So zeigte sich klinisch, dass HIF1 α insbesondere in höhergradigen Gliomen gegenüber niedriggradigen Gliomen hochreguliert ist. (Jensen et al. 2006). Außerdem konnte für HIF1 α gezeigt werden, dass dessen Knock-down im Tiermodell zu einer Wachstumsreduktion eines Tumors aus Glioblastomstammzellen führt (Gillespie et al. 2007).

Mittels der folgenden Versuche sollte vor diesem Hintergrund untersucht werden, welche Bedeutung HIF1 α für die Hypoxieinduktion von CD133 in den in dieser Arbeit verwendeten Glioblastomstammzelllinien hat. Zunächst wurde der unselektive HIF-Inhibitor Chaetomin eingesetzt. Chaetomin hemmt die für die Wirkung der Hypoxia-Inducible-Factors wichtigen Kofaktor p300. So kommt es zu keinem aktiven Komplex aus p300 und der HIF α - und HIF β -Untereinheit. Die HIFs können somit keine Wirkung an den Promotor- und Enhancerregionen ihrer Zielgene entfalten (Semenza 2002, Lu et al. 2009).

Wie die folgende Abbildung 3.10. zeigt, konnte der HIF-Inhibitor Chaetomin die CD133 mRNA Expression in der GS-11 senken. Wurden die Zellen für 48h in 1%O₂ kultiviert, stieg die CD133 mRNA Expression 4,5-fach ($\pm 0,8$) gegenüber den in 21% O₂ kultivierten Zellen ($p = 0,002$). Bei Behandlung mit Chaetomin fand dieser Anstieg nicht statt, was auf eine Regulation von CD133 durch die HIFs hindeutet. Die CD133

mRNA in der behandelten Probe wurde sogar gegenüber der Ausgangsprobe (0h, 1%O) auf das 0,06-Fache ($\pm 0,02$) herunterreguliert. Der Unterschied zwischen den Werten der unbehandelten und der behandelten Probe aus 48h 1% O₂ war ebenfalls signifikant ($p = 0,0006$).

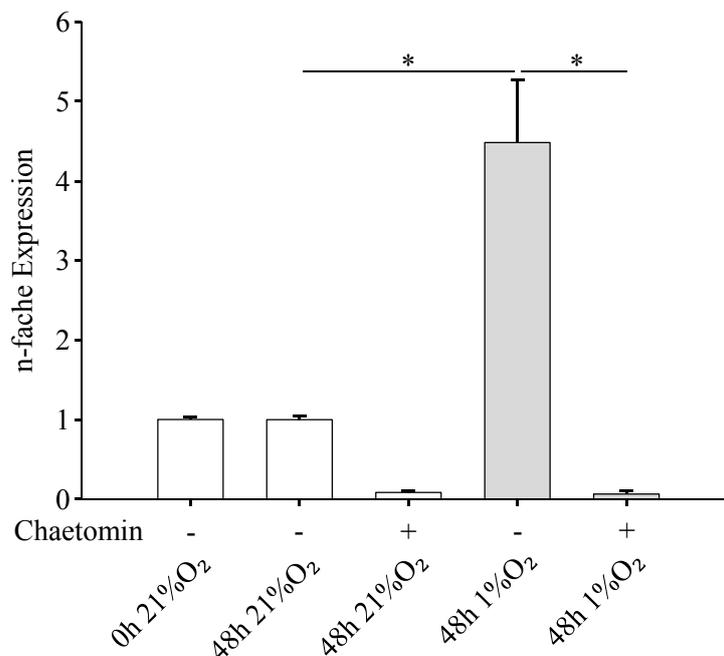


Abb. 3.10. CD133 mRNA Expression in Abhängigkeit von Chaetomin in GS-11. Die RealTime-PCR erfolgte als Triplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Da Chaetomin einen unselektiven HIF-Inhibitor darstellt, kann aus den soeben dargestellten Daten nicht zwischen dem Einfluss von HIF1 α und HIF2 α unterschieden werden. Um festzustellen, inwieweit HIF1 α für die Induktion von CD133 in Hypoxie verantwortlich ist, wurde eine shRNA gegen HIF1 α hergestellt.

Zunächst wurde für die shRNA die als effektiv beschriebene Sequenz 5'-GAT ACA AGT AGC CTC TTT G-3' gewählt (Song et al. 2006), die mittels Restriktionsenzymen in einen lentiviralen Expressionsvektor kloniert wurde. Anschließend wurde dieser Vektor sequenziert, wobei die gewünschte Sequenz nachgewiesen werden konnte, wie Abbildung 3.11. zeigt.

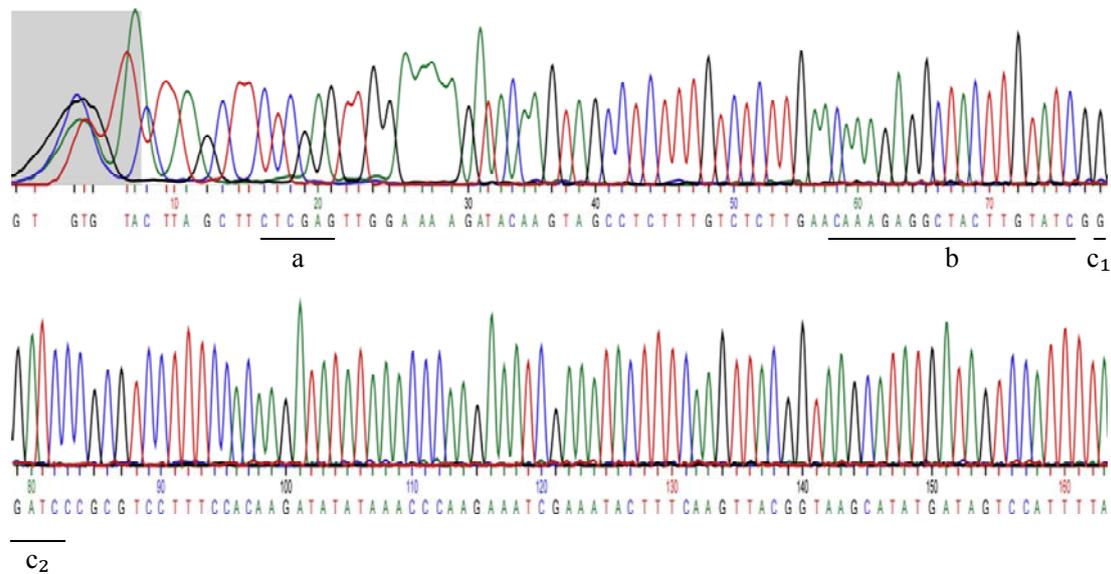


Abb. 3.11. Ergebnis der Sequenzierung des Vektors. Mit a ist die Schnittstelle des Restriktionsenzym XhoI und mit b die Sequenz der shRNA gekennzeichnet. c₁ und c₂ bilden die Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI. Die Ungenauigkeit im Bereich der Basenpaare 25 bis 30 ist der Sequenziermethodik geschuldet. Sie hat keine Auswirkungen, da der Teil zwischen a und c der bestellten Sequenz entspricht (vgl. Abschnitt 2.1.2.4.).

Anschließend wurde der Vektor mittels Transformation in OneShot®Top10-Zellen (E. coli, Invitrogen) vermehrt. Mit dem aufgereinigten Plasmid wurde nun die Verpackungszelllinie HEK293(FT) der Firma Invitrogen transfiziert, die einen viralen Vektor in ihrem Überstand produzierte. Mit dem Überstand dieser Verpackungszelllinie wurde nun zunächst die konventionelle Gliomlinie U87 transduziert (vgl. Abschnitte 2.1.2.5. bis 2.1.2.9.). Hierdurch sollten zum einen die Transduktionsbedingungen etabliert werden, zum anderen sollte die Wirksamkeit und damit die stabile Integration der shRNA in das Genom der Linie nachgewiesen werden. Abbildung 3.12. zeigt die Ergebnisse der Transduktion der U87 mit der hergestellten shRNA.

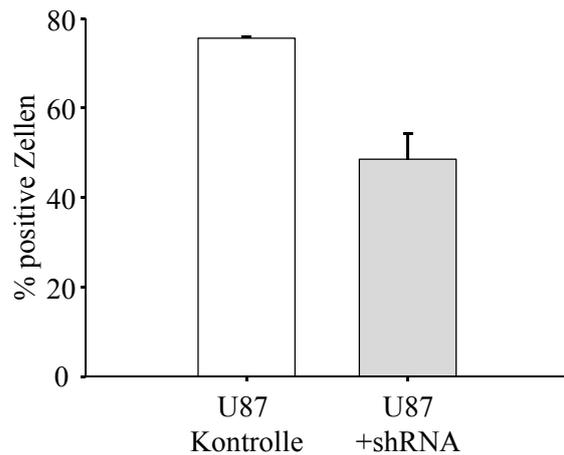


Abb. 3.12. Anteil der HIF1 α positiven Zellen (FACS-Analyse) in U87 in Abhängigkeit von einer shRNA gegen HIF1 α . Die Messung erfolgte als Duplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Varianz. Abb. 6.8. zeigt die zugehörigen FACS-Dot-Plots.

Es zeigte sich, dass HIF1 α in den mit der shRNA behandelten Zellen herunterreguliert wurde. Der Anteil an HIF1 α positiven Zellen fiel von 75,6% ($\pm 0,3\%$) in der Kontrolle auf 48,5% ($\pm 5,7\%$) in den mit der shRNA transduzierten Zellen.

Anschließend wurde die Linie GS-11H transduziert, weil sie einen vergleichsweise hohen Anteil von CD133 positiven Zellen enthielt (vgl. Abschnitt 3.5.). Es sollte untersucht werden, inwieweit sich dieser Anteil unter dem Einfluss der shRNA gegen HIF1 α verändern würde.

Abbildung 3.13. zeigt, wie der Anteil HIF1 α positiver Zellen in der GS-11H von 4,11% ($\pm 0,45\%$) in der Kontrolle auf 1,9% ($\pm 0,3\%$) in den transduzierten Zellen fiel.

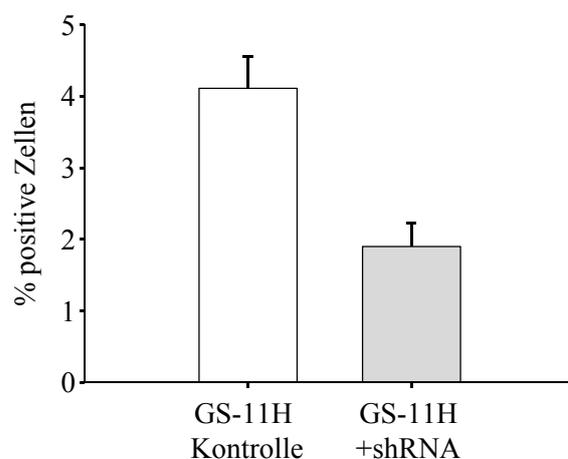


Abb. 3.13. Anteil der HIF1 α positiven Zellen (FACS-Analyse) in GS-11H (1% O₂) in Abhängigkeit von einer shRNA gegen HIF1 α . Die Messung erfolgte als Duplikatbestimmung, angegeben sind Mittelwert und Varianz. Abb. 6.8. zeigt die zugehörigen FACS-Dot-Plots.

Im Gegensatz zu der U87 ließen sich die Glioblastomstammzelllinien allerdings nur sehr schwer transduzieren. So waren zahlreiche Modifikationen des Transduktionsprotokolls nötig. Trotz der intensiven Arbeiten am Protokoll überlebten nur sehr kleine Anteile der Ausgangszellpopulation der Gliomstammzelllinien die Transduktionsphasen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Gliomstammzelllinien mit dem herunterregulierten HIF1 α nicht überlebensfähig waren. Aufgrund der geringen Anzahl an transduzierten Zellen war es bisher nur möglich, die Wirksamkeit der hergestellten shRNA gegen HIF1 α in den GS-Linien nachzuweisen. Es müssen nun weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um den Einfluss von HIF1 α auf CD133 in den GS-Linien nachzuweisen.

3.9 Funktionelle Unterschiede zwischen GS-12 und GS-12H

In den bisherigen Versuchen wurde untersucht, inwieweit Hypoxie einen Einfluss auf die Regulation von Stammzellmarkern in den GS-Linien hat. Neben der Expression von Stammzellmarkern werden von einer Glioblastomstammzelllinie aber auch als wesentliche Eigenschaften ihres Tumorstammzellphänotyps die Fähigkeit *in vitro* Neurosphären bilden zu können, ein Tumoringitierungspotential *in vivo* und eine *in vitro* Differenzierungsfähigkeit in astrozytäre, neuronale und oligodendrogliale Richtung gefordert (Vescovi et al. 2006). Wir stellten uns nun die Frage, inwieweit sich die Linien GS-12 und GS-12H in Hinblick auf diese Eigenschaften unterscheiden.

Die folgende Abbildung 3.14. zeigt zum einen, dass sowohl die GS-12 als auch die GS-12H als morphologisch ähnliche Neurosphären wuchsen. Zum anderen zeigt die Abbildung exemplarisch, dass die intrazerebrale Injektion der jeweiligen Zelllinie in die rechte Hemisphäre athymischer Nacktmäuse zu Tumoren vergleichbarer Ausdehnung führte. Dabei überschritten die Tumoren beider Linien die Hemisphäregrenzen.

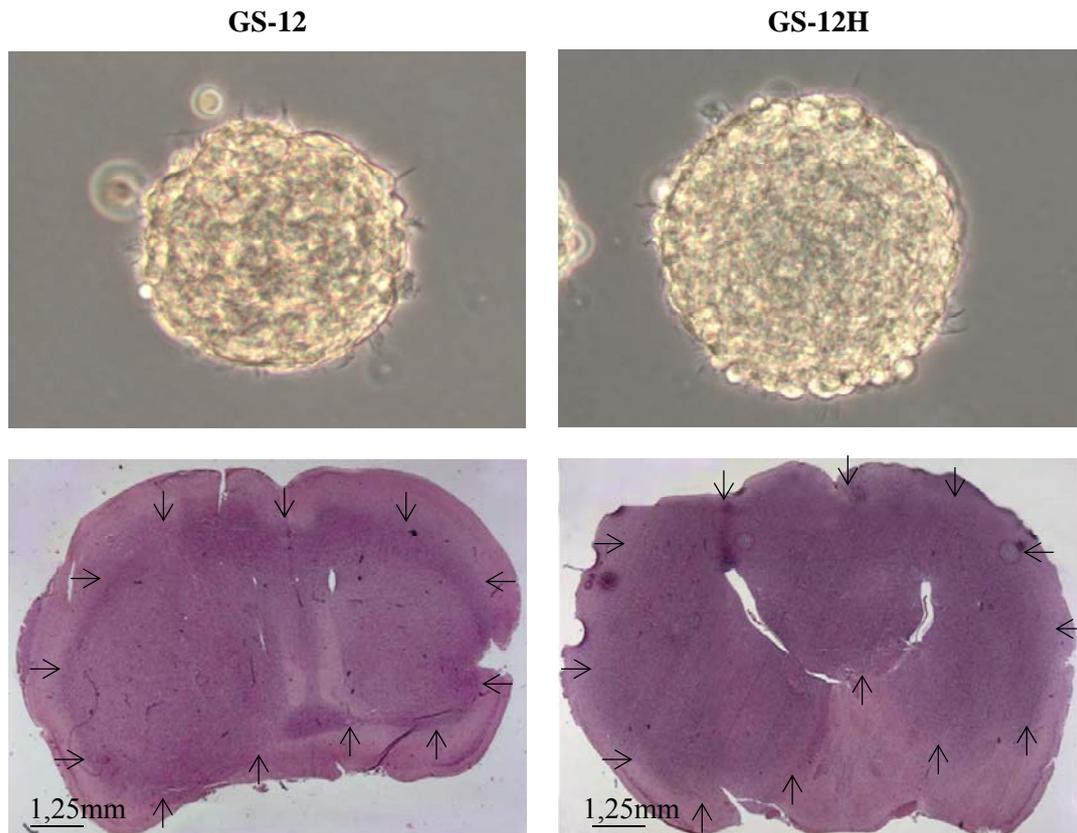


Abb. 3.14. Morphologie und Tumorinitiierungstests der GS-12 und GS-12H. Beide Linien zeigen sphärisches Wachstum (oben) und Tumorinitiierungspotential (unten). Die Ausdehnung der dunkelviolett imponierenden Tumore der GS-12 und GS-12H ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Dabei stellen sich die Grenzen der Tumore bedingt durch deren Invasivität zum Teil unscharf dar.

Allerdings unterschieden sich die Linien hinsichtlich der Geschwindigkeit des Tumorwachstums: so lag das mediane Überleben der Versuchstiere, in die GS-12H injiziert worden war, 18 Tage unter dem der Tiere, in die die GS-12 injiziert worden war ($p = 0,0246$; vgl. Abschnitt 2.1.4.1.). Die folgende Abbildung 3.15. zeigt das Überleben der Versuchstiere als Kaplan-Meier Kurve.

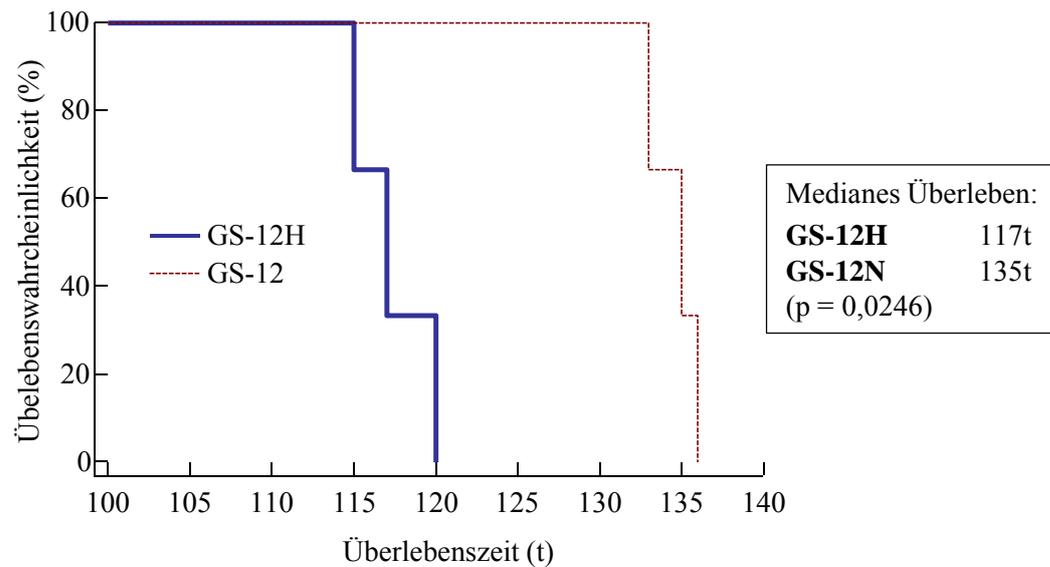


Abb. 3.15. Kaplan-Meier Kurve für die Überlebenszeit der Versuchstiere, in die entweder die Linie GS-12H oder die Linie GS-12 intrazerebral injiziert wurde.

Die folgenden Versuche sollten dann untersuchen, inwieweit die dauerhafte Kultivierung in Hypoxie Einfluss die Differenzierungskapazität der Linie GS-12 hat. Die Differenzierung wurde anhand der Expressionsprofile von Differenzierungsmarkern analysiert. Die folgende Abbildung 3.16. stellt die Differenzierungsmarker GFAP (A), NF (B) und GalC (C) im Verlauf der Differenzierung der GS-12 und GS-12H dar. Das saure Gliafaserprotein GFAP ist ein Marker für astrozytäre Differenzierung, Neurofilament (NF) ein Marker für neuronale Differenzierung und Galactocerebroside (GalC) ein Marker für oligodendrogliale Differenzierung.

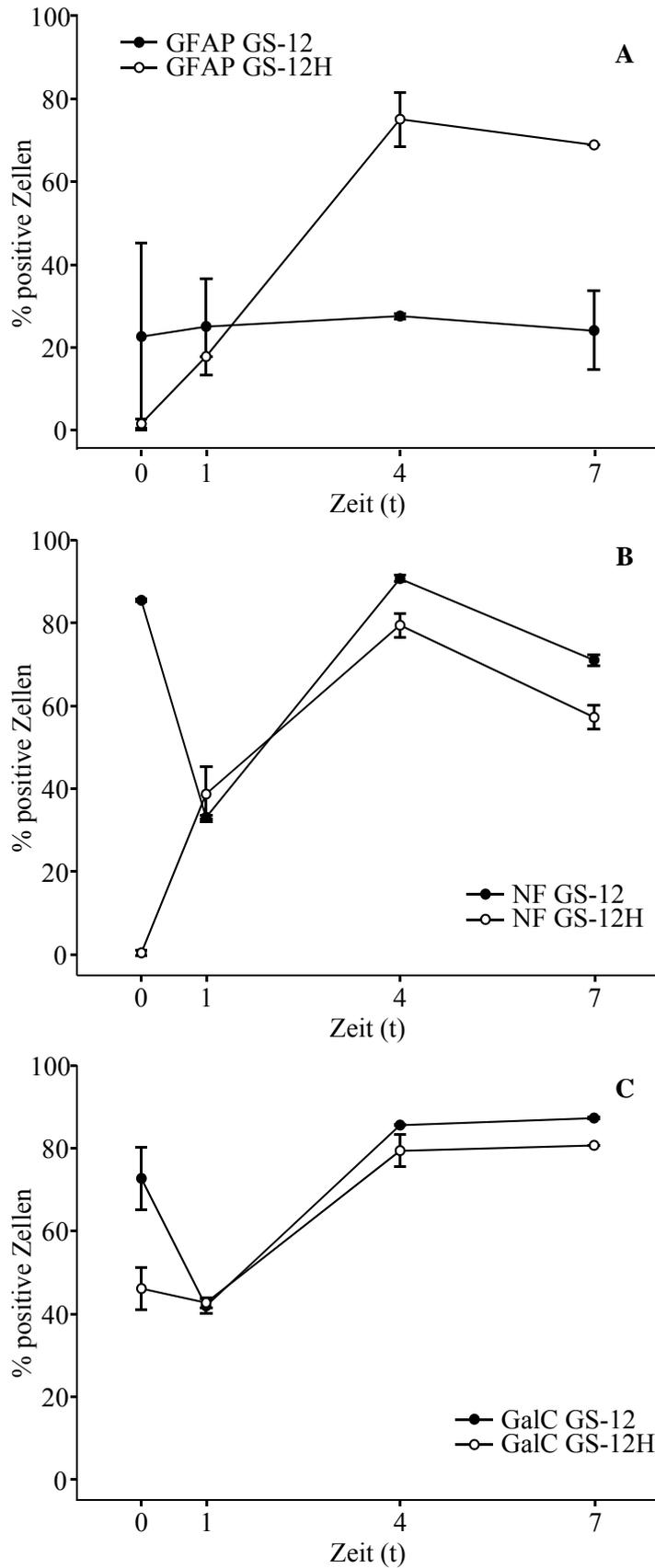


Abb. 3.16. Anteil von GFAP (A), NF (B) und GalC (C) positiven Zellen (FACS-Analyse) in GS-12 und GS-12H 1t, 4t und 7t nach Induktion der Differenzierung an Tag 0. Die Messungen wurden durchgeführt mittels Bestimmung von Duplikaten, angegeben sind Mittelwert und Varianz. Abb. 6.9. zeigt die zugehörigen FACS-Dot-Plots.

Die Abbildung 3.16. zeigt, dass es nach Induktion der Differenzierung (Tag 0) zu einer unterschiedlichen Expression von GFAP in der GS-12 und GS-12H kommt. In der GS-12 fand sich kein Anstieg der Proteinexpression, wohingegen in der GS-12H ein Anstieg der GFAP exprimierenden Zellen gemessen werden konnte. In der GS-12H fanden sich an Tag 1 17,7%-positive Zellen, an Tag 4 75,1%-positive Zellen und an Tag 7 ging der Anteil wieder leicht zurück auf 68,9%-positive Zellen. Die Expression von GFAP ließ sich auch immunzytochemisch bestätigen, wie Abbildung 3.17. zeigt.

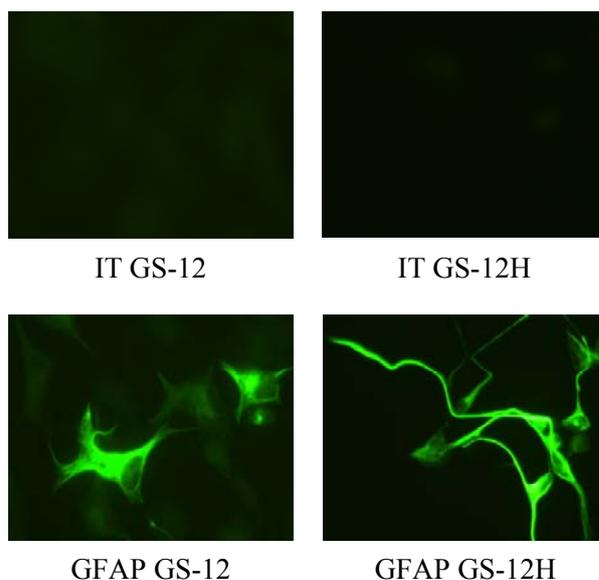


Abb. 3.17. Immunzytochemische Färbung für GFAP der GS-12 und GS-12H 2 Tage nach Differenzierungsinduktion. Oben sind die Isotypkontrollen (IT), unten die positiven Fluoreszenzen nach Inkubation der Proben mit GFAP Erstantikörper bzw. Kaninchen-Immunglobulin sowie des FITC-Sekundäntikörpers gezeigt.

Im Verlauf der Differenzierung verhielten sich die beiden Zelllinien in Bezug auf den von Tag 1 zu Tag 4 ansteigenden und von Tag 4 nach Tag 7 abfallenden Anteil NF positiver Zellen parallel (Abb. 3.16). Allerdings war das Ausgangsniveau in den Zelllinien sehr unterschiedlich. Es fanden sich 0,3% NF positive Zellen in der GS-12H, wohingegen der Anteil NF positiver Zellen in der GS-12 bei 85,5% lag. Dieser Unterschied könnte auf eine bestehende Andifferenzierung der GS-12 zurückzuführen sein.

Auch der Anstieg des Anteils von GalC exprimierenden Zellen verlief von Tag 1 bis Tag 7 parallel. Allerdings waren auch hier die Ausgangswerte in beiden Linien unterschiedlich. In der GS-12 lag der Anteil GalC positiver Zellen bei 72,7%, in der GS-12H bei 46,1% (Tag 0).

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Versuche machen deutlich, dass neben der Regulation der Stammzellmarker die dauerhafte hypoxische Kultivierung auch zu funktionellen Änderungen in den GS-Linien führte. So zeigte die GS-12H zum einen eine schnellere Tumorprogression im Tiermodell als die GS-12, zum anderen stieg die Differenzierungsfähigkeit in astrozytäre Richtung im Sinne einer stärkeren GFAP-Expression im Verlauf der Differenzierung in der Linie GS-12H gegenüber der GS-12.

4 Diskussion

4.1 Stammzellmarker und kurzzeitige Hypoxie

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, zu untersuchen, inwiefern der Stammzellphänotyp und dabei insbesondere das Verhalten der Tumorstammzellmarker der im Labor für Hirntumorforschung des UKE etablierten Glioblastomstammzelllinien, GS-Linien genannt, durch Hypoxie reguliert wird. Zunächst sollte versucht werden, in der konventionellen, das heißt in serumhaltigem Medium kultivierten und adhärent wachsenden Linie U251 die Expression des Glioblastomstammzellmarkers CD133 durch kurzzeitige hypoxische Kultivierung zu induzieren, wie es der Arbeitsgruppe von Griguer et al. zuvor gelungen war (Griguer et al. 2008). Es zeigte sich allerdings in den Versuchen der vorliegenden Arbeit, dass diese Induktion in der verwendeten U251-Linie nicht möglich war. Auch die auf die konventionelle Linie G123 ausgeweiteten Versuche zeigten keine CD133 Induktion durch hypoxische Kultivierung. Darüber hinaus versuchte auch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Christel Herold-Mende erfolglos, in der konventionellen Linie U251 CD133 zu induzieren (persönliche Korrespondenz mit PD Dr. Christel Herold-Mende, Neurochirurgische Universitätsklinik Heidelberg, Abteilung Neuroonkologie). Dass es sowohl in der Linie U251 als auch in der Linie G123 nicht möglich war, eine CD133 Expression mittels hypoxischer Kultivierung zu induzieren, legt den Schluss nahe, dass die Induktion dieses Stammzellmarkers mit dem Stammzellphänotyp von Gliomlinien assoziiert und damit auf Glioblastomstammzelllinien beschränkt sein könnte.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz in den vorgestellten Ergebnissen bezüglich der Induktion von CD133 in der Linie U251 besteht darin, dass Griguer et al. eine andere Sublinie der U251 verwendeten als wir. Weltweit existieren zahlreiche verschiedene Kulturen der U251, und es ist bekannt, dass zumindest eine dieser Linien bereits vor längerer Zeit mit einer anderen Linie (U373) kontaminiert wurde. So wies in einer Untersuchung von Ishii et al. eine der kommerziell zu erwerbenden U251 Kulturen der Firma ATCC (vgl. Abschnitt 2.1.1.2.) exakt die gleichen PTEN- und p53-Mutationen auf wie eine untersuchte U373 Zelllinie, was eine Kontamination wahrscheinlich erscheinen lässt (Ishii et al. 1999).

Um unsere Ausgangsfrage zu klären, inwieweit sich die CD133 Expression in Gliomstammzelllinien unter hypoxischer Kultivierung ändern würde, schlossen sich den

Versuchen mit den konventionellen Linien Versuche mit den Gliomstammzelllinien GS-11 und GS-12 an. Die Ergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zu den konventionellen Linien durch kurzzeitige Hypoxie in Gliomstammzelllinien eine Induktion von CD133 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene möglich war. Diese Reaktion entsprach unseren Erwartungen, da die mögliche Induktion durch Hypoxie des Tumorstammzellmarkers CD133 in Tumorstammzelllinien des Glioblastoms seit den Versuchen von Platet et al. bekannt war (Platet et al. 2007). Zudem konnte eine andere Publikation, die während der experimentellen Arbeit an der vorliegenden Dissertation erschien, ebenso die Induzierbarkeit von CD133 durch hypoxische Kultivierung zeigen. So kultivierten McCord et al. Gliomstammzelllinien in Hypoxie in 7% O₂ über 7 Tage und konnten ebenso wie diese Arbeit einen Anstieg der CD133 positiven Zellen ermitteln (McCord et al. 2009).

Die dargestellte Diskrepanz im Verhalten der konventionellen Linien und der Gliomstammzelllinien in Bezug auf die Induktion der CD133 Expression machte deutlich, dass diese Induzierbarkeit von CD133 durch kurzzeitige hypoxische Kultivierung mit dem Stammzellphänotyp von Gliomzelllinien assoziiert ist. Diese Assoziation wurde durch die anschließenden Versuche mit den Linien GS-2 und GS-7 bestätigt. Dabei weisen sowohl die GS-2 als auch die GS-7 einen Stammzellphänotyp auf, der intermediär ist zwischen Glioblastomstammzelllinien mit voll ausgeprägtem Tumorstammzellphänotyp und konventionellen Linien. So lassen sich diese Linien zum Beispiel nur eingeschränkt differenzieren und wachsen trotz Verwendung von Stammzellkulturbedingungen zwar sphärisch, allerdings als adhärente Sphären (semi-adhärentes Wachstum) und weisen in vivo entweder eine hochgradig eingeschränkte Tumorigenität auf (GS-7) oder zeigen bei vorhandener Tumorigenität eine nicht invasive Wachstum (GS-2) vergleichbar den Xenograftumoren, die aus konventionellen Linien resultieren können (Günther et al. 2008). Dieser funktionelle Unterschied im Tumorstammzellphänotyp hat sich in den Versuchen der vorliegenden Arbeit im Verhalten von CD133 in diesen Linien abgebildet. So konnte nur in der tumorinitiierenden GS-2 CD133 durch kurzzeitige Kultur in Hypoxie induziert werden, nicht in der nicht-tumorinitiierenden Linie GS-7. Diese Beobachtung legt eine Assoziation des Grads des Tumorstammzellphänotyps mit der Expression von CD133 nahe. Je ausgeprägter dabei der Stammzellphänotyp war, wie im Falle der Linien GS-11 und GS-12, desto größer stellte sich die Induzierbarkeit

von CD133 dar. Auf die beschriebene Assoziation deutet auch eine Publikation von Chen et al., die eine Assoziation der Expression von CD133 mit der Position von Gliomstammzellen in einer Stammzellhierarchie zeigte. In den Versuchen von Chen et al. waren aus einem CD133 positiven Klon gewonnene CD133 negative Zelllinien mit einem weiter differenzierten und weniger aggressiven Phänotyp von Gliomstammzelllinien assoziiert (Chen et al. 2010). Die folgende Abbildung 4.1. zeigt den Zusammenhang zwischen der Induzierbarkeit von CD133 und dem Tumorstammzellphänotyp anschließend graphisch. Je ausgeprägter sich dabei die potentielle CD133 Induzierbarkeit darstellt (x-Achse), desto größer ist die Ausprägung des Tumorstammzellphänotyps (y-Achse).

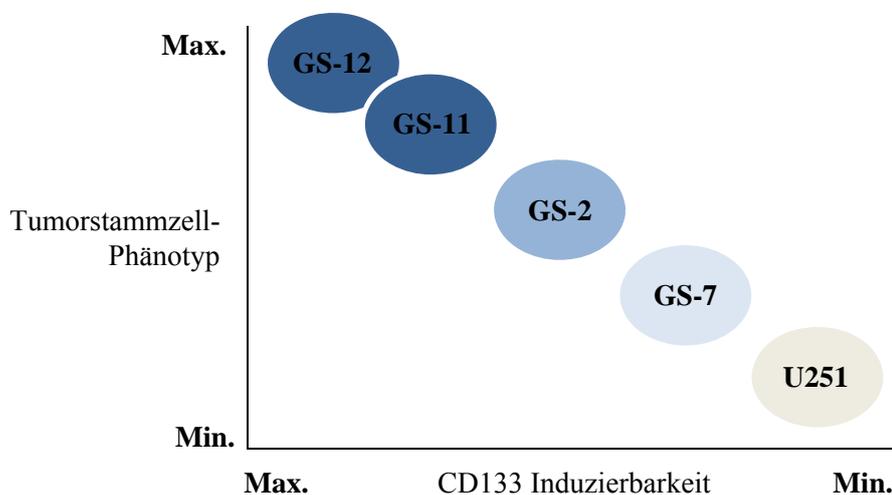


Abb. 4.1. Assoziation der Ausprägung des Tumorstammzellphänotyps mit der Induzierbarkeit von CD133.

Die CD133 Induktionsversuche mit der Linie GS-12 zeigten außerdem den in jüngeren Publikationen beschriebenen Befund einer CD133 negativen Gliomstammzelllinie (Beier et al. 2007, Ogden et al. 2008, Joo et al. 2008). Die GS-12 erfüllte alle Kriterien einer Tumorstammzelllinie, war aber unter normoxischen Bedingungen CD133 negativ (Schulte et al. 2011). Erst unter hypoxischen Bedingungen ließ sich ein Anteil CD133 positiver Zellen ermitteln. Diese Beobachtungen bestätigen, dass nicht die Expression von CD133 sondern die potentielle Induzierbarkeit von CD133 mit dem Grad des Tumorstammzellphänotyps assoziiert war, wie in Abbildung 4.1. dargestellt. Für diese Überlegung spricht auch die Tatsache, dass es auch anderen Arbeitsgruppen gelungen ist, aus CD133 negativen Gliomstammzellen unter bestimmten Bedingungen CD133

positive Populationen zu generieren (Chen et al. 2010, Wang et al. 2008). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Hypoxie eine dieser Bedingungen darstellt.

Die Versuche mit den Linien GS-11 und GS-12 zeigten außerdem die Reversibilität der Induktion des Stammzellmarkers CD133. Nach dem beobachteten mRNA Anstieg unter kurzzeitiger hypoxischer Kultivierung für 48 Stunden war nach 48 stündiger Reoxygenierung die mRNA Expression von CD133 wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen. Analoge Ergebnisse zeigt die bereits erwähnte Publikation von McCord et al. (2009). Diese beobachtete Reversibilität könnte die Flexibilität und Anpassungsfähigkeit der Gliomstammzelllinien an die sich ändernden Milieuverhältnisse im humanen Glioblastom widerspiegeln. Inwieweit die beobachtete Plastizität des Phänotyps dabei therapeutische Konsequenzen im Sinne schneller Änderungen des Stoffwechsels der Tumore zum Beispiel zur Erlangung von Resistenzmechanismen hat, muss offen bleiben. Die Ergebnisse unterstreichen aber die große Bedeutung der änderbaren Umgebungsfaktoren für den Phänotyp von Gliomstammzelllinien (Blouw et al. 2003, Keith und Simon 2007).

Außerdem zeigten die Versuche mit kurzzeitiger hypoxischer Kultivierung einen gegenüber der CD133 mRNA verzögerten Anstieg des CD133 Proteins. So reagierte in der GS-11 die mRNA mit einem Anstieg nach 48h, wohingegen der Anteil an CD133 positiven Zellen erst nach fünf Tagen anstieg. In der GS-12 konnte ein Zuwachs an CD133 positiven Zellen sogar erst nach 12 Tagen beobachtet werden. Die mRNA hingegen reagierte wie in der GS-11 bereits nach 48h (vgl. Abschnitt 3.2.). Diese gegenüber der mRNA deutlich verzögerte Reaktion des CD133 Proteins unterscheidet sich dabei von der Reaktion anderer Proteine. So zeigen Ergebnisse unseres Labors, dass im Falle einer Hochregulation einer mRNA unter hypoxischer Kultivierung ein Anstieg des entsprechenden Proteins zumeist innerhalb von 20h bis 24h erfolgt (persönliche Korrespondenz mit Annegret Kathagen, Labor für Hirntumorbiologie, Neurochirurgische Klinik des UKE).

Diese deutlich spätere Reaktion des CD133 Proteins gegenüber dessen mRNA könnte bedeuten, dass eine von der CD133 mRNA unabhängige Regulation des Proteingehalts in den Linien GS-11 und GS-12 besteht. Auch Sgambato et al. konnten Unterschiede zwischen CD133 mRNA und CD133 Protein beobachten. Wurden humane Kolonkarzinomlinien differenziert, fiel der CD133 Proteingehalt in den Linien, wohingegen die mRNA Expression keine signifikanten Änderungen zeigte (Sgambato

et al. 2010). Eine mögliche Erklärung für die Beobachtungen von Sgambato et al. besteht in der Vermutung, dass sich während der Differenzierung vor allem der Glycosylierungsstatus von CD133 ändert. Diese Änderungen des Glycosylierungsstatus und nicht der Verlust von CD133 würden dann zur Nicht-Erkennung von CD133 durch den international wie in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper (vgl. Abschnitt 2.1.3.1.) und dann zu einem falsch negativen Ergebnis bezüglich des Gesamtproteingehalts führen (Corbeil et al. 2000, Yin et al. 1997). Dies könnte bedeuten, dass wie in den Differenzierungsversuchen in den in dieser Arbeit durchgeführten Hypoxieversuchen nach dem Anstieg der mRNA zunächst unglycosyliertes CD133 an der Zelloberfläche zu finden war, welches vom Antikörper zunächst nicht erkannt wurde. Erst nach erfolgter Glycosylierung des induzierten CD133 detektierte der verwendete Antikörper dann CD133. Somit wäre ein richtig positives Ergebnis bezüglich CD133 Protein mit einer Latenz zu erwarten, wie sie sich in den Versuchen mit der GS-11 und GS-12 zeigten.

Eine andere Erklärung für die beobachteten Diskrepanzen zwischen CD133 Protein und mRNA bieten die Versuche von Zhou et al.. Diese jüngere Publikation konnte zeigen, dass CD133 in neuronalen Stammzellen und Gliomstammzelllinien mittels α 2,3-Sialylierung des N-Terminus vor dem Abbau durch das lysosomale System geschützt wird. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zelllinien mit Inhibitoren des lysosomalen Systems, wie Chloroquine, zu einer Erhöhung von CD133 führten. Zum anderen konnte der negative Effekt auf den CD133 Proteingehalt einer durchgeführten Desialylierung durch Inhibierung des lysosomalen Systems wieder aufgehoben werden (Zhou et al. 2010). Dies könnte bedeuten, dass unter kurzzeithypoxischen Bedingungen der Anteil an sialyliertem CD133 in der GS-11 und GS-12 zugenommen hat, dieses CD133 vor dem lysosomalen Abbau geschützt war und es somit zu einem von der mRNA Expression unabhängigen Anstieg der CD133 positiven Zellen kam. Dies würde ein bisher in Literatur nicht beschriebenen Einfluss von Hypoxie auf CD133 Protein darstellen.

Anders als auf CD133 hatte die kurzzeitige hypoxische Kultivierung keinen Einfluss auf die Proteinexpression des mit dem Stammzellphänotyp adulter und embryonaler Stammzellen assoziierten Transkriptionsfaktors Oct-4 (vgl. Abb. 3.7.), obwohl dieser Marker in humanen mesenchymalen Stammzellen zuvor als durch Hypoxie hochregulierbar beschrieben worden war (Grayson et al. 2007, Kim et al. 2009,

Shimozaki et al. 2003, Takahashi und Yamanaka 2006). Auch die während der Arbeit an der vorliegenden Dissertation erschienene Publikation von Seidel et al. konnte eine Oct-4 Hochregulation in Glioblastomstammzelllinien hypoxieabhängig über HIF2 α zeigen (Seidel et al. 2010). In Stammzellen des Knochenmarks hingegen wurde Oct-4 als durch Hypoxie herunterreguliert beschrieben, in humanen embryonalen Stammzellen als durch Hypoxie nicht reguliert (Ren et al. 2006, Westfall et al. 2008). Die Ergebnisse der Arbeiten von McCord et al. zeigen ebenso ein heterogenes Bild der Oct-4 Regulation innerhalb des Glioblastoms. So wurde in zwei der in den Versuchen verwendeten drei Glioblastomstammzelllinien Oct-4 mittels hypoxischer Kultivierung für 7 Tage induziert, in der dritten verwendeten Linie hingegen konnte sowohl in der Normoxie als auch in der Hypoxie kein Oct-4 nachgewiesen werden (McCord et al. 2009). Somit wird deutlich, dass Oct-4 sehr zelltypabhängig exprimiert und reguliert wird. Trotz der Hinweise in der Literatur auf eine Regulation von Oct-4 in Glioblastomtumorstammzellen zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Oct-4 anders als CD133 kein maßgeblich durch kurzzeitige Hypoxie induzierter Tumorstammzellmarker war. Dies deutet daraufhin, dass trotz der Assoziation von Oct-4 mit dem Stammzellphänotyp adulter und embryonaler Stammzellen, die Assoziation von Oct-4 mit der Änderung des Tumorstammzellphänotyps in Glioblastomstammzelllinien in kurzzeitiger Hypoxie begrenzt ist (Kim et al. 2009, Shimozaki et al. 2003, Takahashi und Yamanaka 2006).

4.2 Stammzellmarker in dauerhafter Hypoxie

Die bisher diskutierten Versuche mit kurzzeitiger Hypoxieinduktion und anschließender Reoxygenierung bildeten sich schnell ändernde Umgebungsbedingungen im humanen Glioblastom ab. Diese Änderungen sind auch *in vivo* möglich, da es infolge von Tumorangiogenese immer wieder zeitweise zu Phasen stärkerer Oxygenierung kommen kann, bis dann durch die Proliferation der Tumorzellen schließlich wiederum die Sauerstoffversorgung nicht mehr ausreicht und wieder hypoxische Zustände herrschen (Brat et al. 2004, Dvorak 2005, Ferrara 2005, Heddleston et al. 2010). Dass permanent hypoxische Zustände von ca. 1% O₂ in den überwiegenden Anteilen des humanen Glioblastom vorherrschen und nicht nur kurzfristig grenzwertig hypoxische Milieubedingungen bestehen, konnten Rampling et al. zeigen (Rampling et al. 1994). Somit bildet die kurzzeitige Hypoxieexposition von Gliomzellen *in vitro* nur

eingeschränkt die Situation in Glioblastomen im menschlichen Gehirn ab. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher auch Gliomstammzelllinien, die von vornherein unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) etabliert wurden, um diesen Zustand der Dauerhypoxie konsequent zu imitieren (vgl. Abschnitt 2.1.1.1.).

Symptomatisch für die bisher geringe Beachtung dauerhafter Hypoxie ist die Tatsache, dass Autoren Hypoxieexpositionen von 48 bis 72 Stunden bereits als chronische Hypoxie bezeichnen (Chan et al. 2008, Pires et al. 2010). Dennoch sind wenige Versuche beschrieben, die den Einfluss von Hypoxieexposition mehrerer Wochen auf Tumorklinien untersucht haben und die vor allem wie die vorliegende Arbeit kurzzeitige und länger andauernde Hypoxieexposition vergleichen konnten. So untersuchten Alqawi et al. den Einfluss von akuter (5h) und chronischer (8 Wochen) Hypoxie auf Prostatakarzinomlinien. Im Vergleich fand sich dabei ein Anstieg des Invasionspotentials in den Linien, die chronischer Hypoxie ausgesetzt waren, wohingegen akute Hypoxie keinen Einfluss auf die Invasivität der Linien hatte. Auch die Expression des Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF), einem maßgeblichen Induktor der Angiogenese, wurde in den untersuchten Prostatakarzinomlinien nur durch chronische Hypoxie, nicht durch akute Hypoxie signifikant verstärkt. Darüber hinaus zeigte die Arbeit, dass der Hypoxia-Inducible-Factor HIF1 α nur in der chronischen Hypoxie einen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel der verwendeten Tumorklinien ausübte, was die Autoren vermuten ließ, dass die Antwort auf akute und chronische Hypoxie unterschiedlich reguliert sein könnte (Alqawi et al. 2007).

Watson et al. kultivierten eine benigne Prostataepithelzelllinie für bis zu 14 Wochen in hypoxischen Bedingungen und verglichen sie mit einer unter normoxischen Bedingungen kultivierten Linie. Es konnte gezeigt werden, dass die hypoxischen Kulturen weniger apoptotisch wurden bei Behandlung mit einem löslichen rekombinanten Fas-Liganden. Darüber hinaus verdoppelte sich in der verwendeten benignen Linie das Invasionspotential, was die Bedeutung der chronischen Hypoxie für die Erlangung und Aufrechterhaltung eines invasiven Tumorstammzellphänotyps unterstreicht (Watson et al. 2009).

Kang et al. konnten zeigen, dass die Kultivierung von Kolonkarzinomlinien in kurzer und dauerhafter Hypoxie zu Unterschieden in der Resistenz gegenüber Mitomycin C führt, wobei eine Abnahme der Zytotoxizität in den verwendeten Linien mit einer Abnahme des Topoisomerase II Proteingehalts assoziiert war. Linien, kultiviert in

dauerhafter Hypoxie, zeigten in den Versuchen eine erhöhte Resistenz gegenüber Mitomycin C verglichen mit den in akuter Hypoxie kultivierten Linien. Dies unterstreicht die Bedeutung von chronischer Hypoxie für einen aggressiven, resistenten Phänotyp von Tumorlinien (Kang et al. 1996).

Die soeben dargestellten Arbeiten zeigen aber ebenso, dass sich in der Reaktion von Zelllinien auf akute oder dauerhafte Hypoxie entscheidende Unterschiede finden lassen. Die Bedeutung von dauerhafter Hypoxie und die Unterschiede zu kurzzeitiger hypoxischer Kultivierung wurden in der in der vorliegenden Arbeit zunächst anhand des Einflusses von dauerhafter Hypoxie auf die Stammzellmarker untersucht, beginnend mit CD133. Dabei zeigte sich in den verwendeten Gliomstammzelllinien eine konsistente Induktion von CD133 in dauerhaft hypoxischen Bedingungen auf mRNA- und Proteinebene. Im Vergleich mit den Ergebnissen aus den kurzzeitigen Hypoxieexpositionen fällt auf, dass es in der GS-12 bei dauerhafter hypoxischer Kultivierung zu einer fast 3000-fachen Erhöhung der Expression von CD133 mRNA kam, wohingegen nach 48 Stunden lediglich eine ungefähr 3-fache Erhöhung beobachtet werden konnte. Zudem stieg unter dauerhafter Hypoxieexposition der Anteil CD133 positiver Zellen in der CD133 negativen GS-12 auf über 10%, in kurzzeitigen hypoxischen Verhältnissen hingegen nur auf ca. 3%. Auch in der GS-13 fand sich eine massive Erhöhung der CD133 mRNA Expression auf das über 1400-Fache bei Kultivierung in dauerhafter Hypoxie. Dieser gegenüber den Versuchen mit kurzzeitiger Hypoxie deutlich stärkere Anstieg der CD133 Expression in dauerhafter Hypoxie und die Tatsache, dass auch innerhalb der Versuche zur kurzzeitigen Hypoxieexposition CD133 auf Proteinebene zunächst auf einem Ausgangsniveau verblieb, um dann nach einer bestimmten Zeit (5-12 Tage) anzusteigen, legen den Schluss nahe, dass die Länge der hypoxischen Kultivierung mit der Höhe des Anstiegs von CD133 assoziiert sein könnte. Dabei könnten wie oben diskutiert im Verlauf der hypoxischen Kultivierung unterschiedliche molekulare Mechanismen zu den dargestellten Veränderungen führen. In Bezug auf HIF1 α und dessen Einfluss in den Phasen der Hypoxie finden sich allerdings uneindeutige Hinweise in der Literatur. Alqawi et al. zeigten den Einfluss von HIF1 α auf den Glukosestoffwechsel für chronische Hypoxie (Alqawi et al. 2007, s.o.), Eckerich et al. wiederum konnten dessen Einfluss auf die kurzfristige Änderung (24h) der Expression von c-Met belegen (Eckerich et al. 2007). Eine mögliche Erklärung wäre, dass Alqawi

et al. Prostatakarzinomzelllinien, Eckerich et al. hingegen Gliomlinien verwendeten. Somit könnte HIF1 α in der jeweiligen Tumorentität einer unterschiedlichen Regulation unterliegen.

Berücksichtigung bei der Betrachtung des Expressionsverhaltens von CD133 in den unterschiedlichen hypoxischen Bedingungen muss die Tatsache finden, dass die in dauerhafter Hypoxie kultivierten Zelllinien nie normoxischen Verhältnissen ausgesetzt waren, sondern direkt nach Probenentnahme in hypoxischen Verhältnissen etabliert wurden (vgl. Abschnitt 2.1.1.1.). Somit könnten die Daten auch dahingehend interpretiert werden, dass die Etablierung und anschließende Kultivierung der Tumorzelllinien in Normoxie zu einem Verlust der CD133 Expression führte. Wurden diese in normoxischen Verhältnissen etablierten Linien wieder hypoxisch kultiviert, führte dies nicht zu einer Wiedererlangung des Ausgangsstatus der CD133 Expression, sondern lediglich zu einer geringeren CD133 Expression. Der offensichtliche Verlust von CD133 Expression bei Kultivierung in 21% O₂, einer für den Tumor als Hyperoxie zu bezeichnende Umgebungsbedingung, unterstreicht die Wichtigkeit der hypoxischen Kultivierung in 1% O₂, um den ursprünglichen Phänotyp zu erhalten (Rampling et al. 1994). Die folgende Abbildung 4.2. zeigt den diskutierten Verlauf der CD133 Expression.

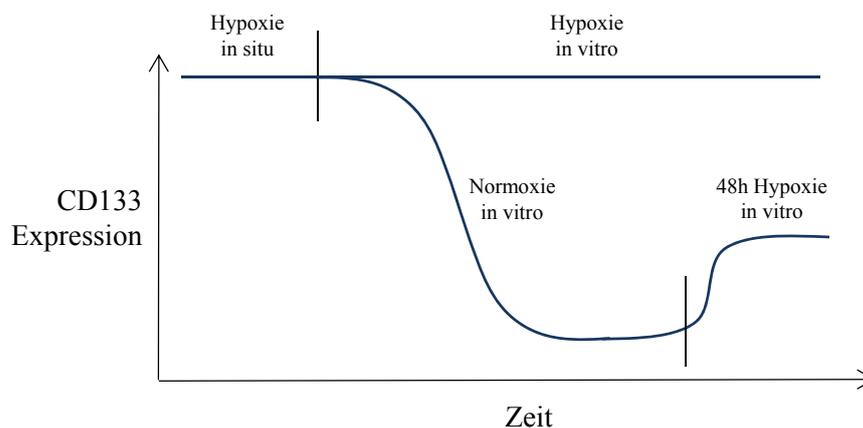


Abb. 4.2. Hypothetischer Verlauf der CD133 Expression in der Linie GS-12. Zunächst herrschte im Tumor Hypoxie, was mit einer hohen CD133 Expression assoziiert war. Nach der Probenentnahme blieb in den sofort unter Hypoxie kultivierten Linien die CD133 Expression erhalten, wohingegen eine Hyperoxygenierung durch normoxische Verhältnisse *in vitro* zu einem Verlust der CD133 Expression führte. Kurzzeitige hypoxische Kultivierung *in vitro* führte dann nicht zu einer Zurückführung der Expression auf das Ausgangsniveau.

Darüber hinaus müssen vor dem Hintergrund des Verlusts von CD133 in normoxischen Kulturbedingungen die Ergebnisse vieler Autoren kritisch betrachtet werden, da in Versuchen mit Gliomstammzelllinien zumeist unter normoxischen Bedingungen CD133 positive Kulturen untersucht wurden. Bei diesen Untersuchungen besteht die Möglichkeit, dass Subpopulationen die initial im Tumor CD133 positiv waren und dann im Verlauf der normoxischen Kultivierung ihr CD133 verloren haben, keinen Betrachtungen mehr unterzogen werden können (Fan et al. 2009, Kelly et al. 2009, Kolenda et al. 2010, Ma et al. 2010, Ropolo et al. 2009). Zudem könnte der beschriebene Verlust von CD133 in normoxischen Bedingungen auch eine Erklärung für das Auffinden von CD133 negativen Gliomstammzelllinien darstellen (Beier et al. 2007, Ogden et al. 2008, Joo et al. 2008). Da keine dieser Arbeiten eine konsequente hypoxische Etablierung wie die vorliegende Arbeit angewendet hat, könnten die beschriebenen CD133 negativen Gliomstammzelllinien initial CD133 positiv gewesen sein und zum Zeitpunkt der Experimente immer noch einen Phänotyp aufgewiesen haben, der dem der CD133 positiven Tumorstammzellen ähnlich war.

Die vorliegende Arbeit setzte die Versuche dann mit der Betrachtung von Oct-4 fort. Anders als für CD133 ließ sich für dessen Regulation keine alle Linien betreffende homogene Regulation unter dauerhaft hypoxischen Bedingungen beobachten. So wiesen die Linien GS-11 und GS-12 keine Regulation von Oct-4 auf, die Linien GS-10 und GS-13 hingegen reagierten mit einem signifikanten und deutlichen (2,7-fach und 5,4-fach) mRNA Expressionsanstieg (vgl. Tabelle 3.4.). Wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert konnten bisherige Veröffentlichungen eine zelltypabhängige Regulation von Oct-4 in hypoxischen Bedingungen zeigen (Grayson et al. 2007, Ren et al. 2006, Seidel et al. 2010, Westfall et al. 2008). Die Arbeit von McCord et al. deutet zudem eine heterogene Regulation und Expression von Oct-4 innerhalb von Glioblastomstammzelllinien an, da in zwei der in den Versuchen der Gruppe verwendeten drei Glioblastomstammzelllinien Oct-4 mittels hypoxischer Kultivierung induziert, in der dritten Linie hingegen sowohl in der Normoxie als auch in der Hypoxie kein Oct-4 nachgewiesen werden konnte (McCord et al. 2009; vgl. Abschnitt 4.1.). Vor diesem Hintergrund müsste, um die Regulation von Oct-4 in Gliomstammzellen weiter zu untersuchen, nun die Stichprobe an Zelllinien erhöht werden. Somit könnte ausgeschlossen werden, dass sich die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Unterteilung der Linien in eine Gruppe mit deutlicher Hochregulation und eine ohne Regulation von

Oct-4 in dauerhaft hypoxischen Bedingungen nicht zufällig ergeben hat und in Gliomstammzelllinien eine Differenzierung in Bezug auf die Regulation von Oct-4 möglich ist.

Die Untersuchungen wurden dann mit SOX2, dem ebenso wie Oct-4 mit dem Stammzellphänotyp adulter und embryonaler Stammzellen assoziierten und in Glioblastomstammzellen exprimierten Transkriptionsfaktor, fortgesetzt. Es entstand dabei zunächst der Eindruck, dass SOX2 in den verwendeten Linien unter dauerhaft hypoxischen Bedingungen uneinheitlich reguliert ist. So reagierten zwei der verwendeten Linien mit einer Hoch- und eine Linie mit einer Herunterregulation. In einer Linie konnte zudem keine Regulation beobachtet werden (vgl. Tabelle 3.4.). Dabei muss bedacht werden, dass der Eindruck der heterogenen Regulation auf der Basis zweier signifikanter Hochregulationen auf mRNA-Ebene beruht. Diese Hochregulationen stellten allerdings lediglich je einen 1,4-fachen sowie 1,1-fachen Anstieg dar und waren zudem in der Linie GS-12 nicht mit einem Proteinanstieg assoziiert. Da vor diesem Hintergrund drei der verwendeten Linien keine biologisch relevante Regulation von SOX2 unter dauerhafter hypoxischer Kultivierung aufwiesen, kann in der Zusammenschau am ehesten von einer Nicht-Regulation von SOX2 in der vorliegenden Arbeit ausgegangen werden.

Auch in der Literatur finden sich Beispiele für eine Nicht-Regulation von SOX2 in Hypoxie. So unterliegt SOX2 in humanen embryonalen Stammzellen wie Oct-4 keinem hypoxischen Einfluss (Westfall et al. 2008). In mesenchymalen Stammzellen der Ratte hingegen reagierte SOX2 mit einer signifikanten Herunterregulation seiner mRNA bei hypoxischer Kultivierung (Valorani et al. 2010). In den Versuchen von McCord et al. wiederum zeigte sich SOX2 in zwei der drei verwendeten Gliomstammzelllinien hoch- in einer dagegen nicht reguliert (McCord et al. 2009). Diese unterschiedlichen Regulationen von SOX2 können zum einen dahingehend interpretiert werden, dass SOX2 in hypoxischen Verhältnissen einer sehr heterogenen, zelltypabhängigen Regulation unterliegt, da selbst in Gliomstammzelllinien unterschiedliche Regulationen beobachtet wurden (McCord et al. 2009).

Die Ergebnisse der heterogenen Regulation von SOX2 können zum anderen aber auch in der Weise interpretiert werden, dass sie Schwäche des Modells von kurzzeitigen Hypoxieexpositionen darlegen. So hat die vorliegende Arbeit die Regulation von SOX2 in dauerhaft hypoxischen Verhältnissen betrachtet, wie sie in großen Teilen des

Glioblastoms vorherrschen (Rampling et al. 1994). McCord et al. hingegen führten zum Beispiel ihre Versuche lediglich mit einer kurzzeitigen Hypoxieexposition durch. Somit könnte der von McCord et al. gemessene Anstieg von SOX2 auch eine artifizielle Regulation der nicht die realen Verhältnisse im Glioblastom abbildenden *in vitro* Bedingungen darstellen und die hingegen in der vorliegenden Arbeit beobachtete Nicht-Regulation die realen Verhältnisse im Großteil der Glioblastome abbilden.

Neben CD133, Oct-4 und SOX2 wurde auch das Intermediärfilament Nestin untersucht, für das in der vorliegenden Arbeit eine heterogene Regulation unter dauerhaft hypoxischen Bedingungen beobachtet werden konnte. So reagierte eine der verwendeten Linien mit einer Hoch- und zwei Linien hingegen mit einer Herunterregulation von Nestin. In einer Linie konnte keine Regulation beobachtet werden (vgl. Tabelle 3.4.). Diese heterogene Regulation von Nestin durch hypoxische Kultivierung wurde auch von Fang et al. beschrieben. Im archaischen Stör (*Acipenser shrenckii*) fand sich in Retinagewebe eine Herunter-, in Gewebe des Myelons dagegen eine Hochregulation von Nestin als Reaktion auf hypoxische Kultivierung (Fang et al. 2009). Ein Anstieg des Nestingehalts in neuralen Stammzellen bei Kultivierung in Hypoxie wurde von Santilli et al. beobachtet. Dieser Anstieg in hypoxischen Bedingungen war zudem mit einem langen Erhalt des Nestingehalts während einer induzierten Differenzierung assoziiert (Santilli et al. 2010). Dabei führten Santilli et al. wie diese Arbeit Versuche mit 1%iger O₂-Konzentration durch und beobachteten die beschriebene Hochregulation von Nestin in neuralen Stammzellen. Die vorliegende Arbeit fand dagegen bei Kultivierung unter gleichen Sauerstoffkonzentrationsbedingungen in Gliomstammzelllinien keine homogene Regulation von Nestin auf. Dies macht deutlich, dass Nestin zwar mit Änderungen des Stammzellphänotyp adulter neuraler Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen assoziiert ist, aber Änderungen im Tumorstammzellphänotyp von Gliomstammzelllinien in dauerhaft hypoxischen Kulturbedingungen nicht abbilden kann.

Auch für den etablierten Tumorstammzellmarker des Mammakarzinoms und des Kolonkarzinoms CD44 wurde eine heterogene Regulation unter hypoxischen Bedingungen beobachtet (Al-Hajj et al. 2003, Huang und Wicha 2008). Zwar reagierten wie bei Oct-4 zwei Linien bei Kultivierung in dauerhafter Hypoxie mit einer Hochregulation von CD44 mRNA, diese Regulation war aber deutlich weniger ausgeprägt als die von CD133 und Oct-4, so dass vor allem die Hochregulation von

CD44 in Linie GS-12H als biologisch nicht relevant bezeichnet werden kann. Zudem zeigten die anderen beiden verwendeten Zelllinien wiederum eine signifikante Herunterregulation (vgl. Tabelle 3.4.). Dies macht deutlich, dass CD44 zwar mit dem Tumorstammzellphänotyp des Mamma- und des Kolonkarzinoms assoziiert ist, seine Bedeutung aber für den Tumorstammzellphänotyp von Gliomlinien, insbesondere für die Abbildung von dessen Änderungen in dauerhafter Hypoxie, begrenzt ist.

Da der Anstieg der CD133 Expression in den verwendeten GS-Linien auch mit einer Zunahme der funktionellen Eigenschaften des Tumorstammzellphänotyps assoziiert war (vgl. Abschnitt 3.9., s.u.), verdeutlichen die vorgestellten Daten, dass CD133 nicht nur unter normoxischen Verhältnissen die größte Assoziation mit dem Tumorstammzellphänotyp von Glioblastomlinien aufweist, sondern dass CD133 auch die funktionellen Änderungen des Tumorstammzellphänotyps unter hypoxischen Verhältnissen konsistent abbildet (Singh et al. 2004, Vescovi et al. 2006). Darüber hinaus scheint neben CD133 Oct-4 eine begrenzte Assoziation mit der Änderung des Phänotyps von Gliomstammzelllinien in Hypoxie aufzuweisen. So reagierten zwei der verwendeten Gliomlinien mit einer deutlichen und signifikanten Hochregulation der Oct-4 mRNA unter chronisch hypoxischen Bedingungen.

4.3 Molekulare Grundlagen der Regulation des Tumorstammzellphänotyps

Wir stellten uns nun die Frage, durch welche molekularbiologischen Mechanismen der Anstieg von CD133 in hypoxischen Verhältnissen induziert werden könnte. Einen möglichen Induktor des CD133 Anstiegs könnten die Hypoxia-Inducible-Factors (HIFs) darstellen, da für diese Transkriptionsfaktoren eine hohe Assoziation mit den malignen Eigenschaften des Glioblastoms bekannt ist (Jensen et al. 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Notch-System, das entscheidenden Einfluss auf die self-renewal-Kapazitäten einer Stammzelle hat, unter hypoxischen Bedingungen über die HIFs aktiviert wird (Gustafsson et al. 2005, Zhou et al. 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit zunächst durchgeführten Versuche mit dem HIF-Inhibitor Chaetomin bestätigten unsere Vermutung, da bei Behandlung der GS-Linien mit Chaetomin keine CD133 Induktion bei hypoxischer Kultivierung mehr beobachtet werden konnte. Dies war insofern nicht unerwartet, da für die HIFs eine Assoziation mit den Eigenschaften des Tumorstammzellphänotyps beschrieben ist

(Jensen 2009). Um unterscheiden zu können, ob für die Regulation von CD133 nun maßgeblich HIF1 α oder HIF2 α verantwortlich war, wurde eine shRNA gegen HIF1 α konstruiert. Die Regulation durch HIF1 α erschien uns dabei wahrscheinlicher, da für HIF1 α zum einen gezeigt werden konnte, dass sein Knock-down im Tiermodell zu einer Wachstumsreduktion eines Tumors aus Gliomzelllinien führte (Gillespie et al. 2007). Zum anderen ist für HIF1 α bekannt, dass es für die Regulation von VEGF, welcher wiederum die für das Glioblastom charakteristische Neoangiogenese induziert, maßgeblich verantwortlich ist (Blouw et al. 2003, Ferrara 2005).

Nachdem die Sequenz des hergestellten, die shRNA enthaltenden Vektors überprüft und die Transduktionsbedingungen anhand einer konventionellen Linie etabliert worden waren, wurde die Linie GS-11H transduziert. Anschließende FACS-Analysen für HIF1 α zeigten dann die Wirksamkeit der shRNA in der transduzierten GS-11H gegenüber einer nicht transduzierten Kontrolle. Dennoch stellte sich trotz intensiver Modifikationsarbeiten am Versuchsprotokoll heraus, dass die mit der shRNA gegen HIF1 α transduzierten GS-11H Kulturen nicht überlebensfähig waren, so dass keine Analysen der CD133 Expression in diesen Kulturen möglich war. Eine mögliche Erklärung ist, dass HIF1 α für die Linie GS-11H einen überlebenswichtigen Faktor darstellt, da seine Expression wie oben beschrieben mit typischen Eigenschaften von Glioblastomen assoziiert ist (Ferrara 2005, Jensen 2009).

Die während den Arbeiten an der vorliegenden Dissertation erschienene Arbeit von Soeda et al. bestätigte unsere Überlegungen. Soeda et al. waren der Nachweis des Einflusses von HIF1 α auf CD133 in Gliomstammzelllinien gelungen (Soeda et al. 2009). Eine siRNA gegen HIF1 α verhinderte den sonst beobachteten Anstieg der CD133 positiven Zellen. Zudem zeigte die Arbeit von Soeda et al., dass die mit der siRNA gegen HIF1 α behandelten Populationen eine verminderte Sphärenbildungskapazität aufwiesen. Dieses wiederum belegt unsere Vermutung, dass HIF1 α ein für das Wachstum von Gliomstammzelllinien essentieller Faktor ist. Die Tatsache, dass die Gliomstammzelllinien von Soeda et al. im Gegensatz zu den Gliomstammzelllinien der vorliegenden Arbeit trotz Herunterregulation von HIF1 α überlebensfähig waren, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Soeda et al. in normoxischen Verhältnissen etablierte Linien verwendeten. Für den Metabolismus der in der vorliegenden Arbeit verwendeten, unter hypoxischen Bedingungen etablierten Linie GS-11H scheinen die HIFs somit wesentlich essentieller zu sein. Dies

unterstreicht die Wichtigkeit der Etablierung von Linien unter hypoxischen Kulturbedingungen, da dies zu einem sich von in Normoxie kultivierten Linien unterscheidenden Phänotyp führen kann.

Zudem zeigten Soeda et al., dass HIF2 α anders als HIF1 α in den verwendeten Gliomstammzelllinien keinen Änderungen in hypoxischen Kulturbedingungen unterlag (Soeda et al. 2009). Dies unterstreicht unsere Vermutung, dass HIF1 α in unserem kurzzeithypoxischen Versuchsaufbau unter Verwendung von Chaetomin maßgeblich an der Regulation von CD133 beteiligt war. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass in dauerhaft hypoxischen Bedingungen wiederum HIF2 α einen Regulator von CD133 darstellen könnte. Darauf deuten die Ergebnisse von McCord et al. hin, die entgegen Soeda et al. zwar keine dauerhafte, aber dennoch eine längere hypoxische Expositionszeit wählte (7 Tage gegenüber 48h) und nach dieser Zeit einen Einfluss von HIF2 α auf CD133 feststellen konnte (McCord et al. 2009).

Neben den unterschiedlichen Expositionszeiten könnten auch die unterschiedlichen *in vitro* verwendeten Sauerstoffkonzentrationen der einzelnen Arbeitsgruppen für die divergierenden Ergebnisse verantwortlich sein. So scheinen sich HIF1 α und HIF2 α bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen zu stabilisieren. Die Stabilisierung von HIF2 α erfolgt dabei unter moderaten hypoxischen Bedingungen wie Holmquist-Mengelbier et al. neben McCord et al. (7% O₂) auch für das Neuroblastom in 5% O₂ zeigen konnten (Holmquist-Mengelbier et al. 2006). HIF1 α dagegen benötigte in Glioblastomstammzelllinien und Neuroblastomlinien für seine Stabilisierung niedrigere Sauerstoffkonzentrationen von 1% O₂ (Eckerich et al. 2007, Holmquist-Mengelbier et al. 2006, Soeda et al. 2009).

Trotz dieser Abhängigkeit der Regulation von Sauerstoffkonzentration und Dauer der hypoxischen Kultivierung *in vitro* stellen die HIFs aufgrund ihres hohen Einflusses auf den Tumorstammzellphänotyp potente therapeutische Ziele dar. Neben der Entwicklung hochselektiver HIF-Inhibitoren konnten zahlreiche Studien zeigen, dass auch bereits etablierte Tumorthapeutika die HIFs beeinflussen. Zum Beispiel verfügt das Anthracyclin Doxorubicin über das Potential, die Bindungswahrscheinlichkeit von HIF1 α an seine Ziel-DNA zu verringern. Dieser Effekt ist auch bei geringen zytotoxischen Wirkungen zu beobachten und birgt daher die Möglichkeit, Doxorubicin ohne Unterbrechungen in kleineren Dosierungen einzusetzen, um zum Beispiel die über die HIFs vermittelte Strahlenresistenz während einer Radiotherapie zu verringern (Lee et

al 2009). Insbesondere für die radioresistenten Gliomstammzellen könnte sich ein solches therapeutisches Regime als wirksam erweisen. Auch für den Topoisomerase I Inhibitor Topotecan wurde in Gliomlinien gezeigt, dass er unabhängig von der zytotoxischen Wirkung zu einer verminderten HIF-Synthese führte (Rapisarda et al. 2002). Zudem führte die Behandlung mit Topotecan zu einer Reduktion von HIF1 α , Angiogenese und Tumorwachstum im Gliomtiermodell (Rapisarda et al. 2004). Zhang et al. konnten den Effekt des Herzglykosids Digoxin auf HIF1 α zeigen. So führte die Behandlung mit Digoxin im Tiermodell zu einer Verminderung der HIF1 α Expression und damit verbunden zu einer Herabsetzung des Wachstums von Leber- und Prostatakarzinomtumoren (Zhang et al. 2008). Vermutlich wirkt Digoxin dabei über eine Hemmung der HIF-Synthese (Semenza 2009).

Darüber hinaus gibt es Bedingungen, unter denen die HIFs trotz normoxischer Verhältnisse hochreguliert sind (vgl. Abschnitt 1.3.). Sie werden als pseudohypoxische Verhältnisse bezeichnet. Dieses Phänomen kann darauf beruhen, dass die HIFs in Normoxie über ein fehlerhaftes Produkt von mutierten Isozitratdehydrogenasen stabilisiert und nicht abgebaut werden (Dang et al. 2009, Frezza et al. 2010). Da für Gliome eine Vielzahl von Mutationen in der Isozitratdehydrogenase 1 und Isozitratdehydrogenase 2 bekannt sind (Yan et al. 2009), könnte Pseudohypoxie ein bedeutendes Phänomen der Tumorentstehung und der Tumorprogression darstellen. In der Phase, in denen noch keine tatsächlich hypoxischen Areale bestehen, könnte die pseudohypoxische Stabilisierung der HIFs einen der Faktoren einer schnellen Malignisierung darstellen. Die pseudohypoxische Stabilisierung ist somit im Sinne einer frühen Intervention von großem therapeutischem Interesse.

Neben den HIFs könnten aber auch andere Signalwege für die Regulation von CD133 und den Tumorstammzellphänotyp in hypoxischen Verhältnissen verantwortlich sein. Eine solche Möglichkeit stellt eine Regulation über NF- κ B dar. Dieser fast ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor ist in seiner Aktivität wie die HIFs von der Sauerstoffkonzentration abhängig und stellt ein Regulator der Immunantwort dar. Es wurde berichtet, dass sich seine Aktivität in Prostatakarzinomzellen nicht in kurzzeitiger Hypoxieexposition, jedoch in chronischer Hypoxie verändert (Alqawi et al. 2007). NF- κ B wurde zudem in Glioblastomen als konstitutiv aktiviert beschrieben, was mit einem invasivem, chemoresistenten Phänotyp assoziiert war (Raychaudhuri et al. 2007). Eine jüngere Publikation deutet zudem einen Einfluss von NF- κ B auf CD133 positive

Tumorstammzellen des Kolonkarzinoms an (Grimm et al. 2010, O'Brien et al 2007). So führte eine persistente Aktivierung von NF- κ B über Toll-like-Rezeptoren zur Aufrechterhaltung von Tumorstammzellwachstum und self-renewal Kapazität in Kolonkarzinomlinien. Darüber hinaus finden sich Hinweise, dass NF- κ B einen Regulator der Angiogenese darstellt. So konnte in aus kindlichen Hämangiomen gewonnenen Stammzellen durch spezifische Inhibition von NF- κ B die VEGF Expression supprimiert werden (Greenberger et al. 2010).

Die Ergebnisse dieser jüngeren Publikationen machen deutlich, dass neben der Regulation über die HIFs andere hypoxieabhängige Regulationsmechanismen bestehen, die in Gliomstammzelllinien zu einer Änderung des Tumorstammzellphänotyps führen könnten. Es sollten daher neben zusätzlichen Untersuchungen der über die HIFs vermittelten Antwort weitere Anstrengungen unternommen werden, die molekularen Grundlagen der möglicherweise auch konkurrierenden Mechanismen der Hypoxieadaptation über NF- κ B aufzuklären. Sowohl innerhalb des Regulationspfads der HIFs als auch innerhalb der Regulationskaskade von NF- κ B könnten sich wirkungsvolle therapeutische Ziele befinden.

4.4 Funktionelle Änderungen des Tumorstammzellphänotyps in Hypoxie

Die vorliegende Arbeit hatte neben der Untersuchung von Stammzellmarkern und deren Regulation auch das Ziel, funktionelle Unterschiede im Tumorstammzellphänotyp unter dauerhafter Hypoxieexposition zu ermitteln. Es sollten dabei die Morphologie *in vitro*, das Tumorstammzellinitiationspotential sowie die Tumorstammzellprogression *in vivo* und die Differenzierungskapazität *in vitro* untersucht werden.

Bei der Betrachtung der Neurosphären zeigten sich zunächst keine morphologischen Unterschiede zwischen den in Normoxie und den dauerhaft hypoxisch kultivierten Gliomstammzellpopulationen. Es wurde aber deutlich, dass die in Hypoxie etablierten Linien ein höheres Tumorstammzellprogressionspotential aufwiesen. Dies war insofern nicht überraschend, als dass Hypoxie vielfach als Verstärker des invasiven Potentials von Tumorstammzelllinien beschrieben wurde. Bereits 1988 konnte Young zeigen, dass Fibrosarkomlinien der Maus durch hypoxische Kultivierung ein höheres Potential zur Lungenmetastasierung erlangten (Young et al. 1988). Auch für humane Tumore konnte der Einfluss von Hypoxie auf deren Invasivität belegt werden. So zeigten Graham et al.

die verstärkende Wirkung von Hypoxie auf das invasorische Potential von Zellkulturen des Mammakarzinoms, Krishnamachary den hypoxischen Einfluss auf Kolonkarzinomkulturen (Graham et al. 1999, Krishnamachary et al. 2003). Auch für die Gliome ist der die Invasivität von Gliomen erhöhende Einfluss von Hypoxie belegt (Elstner et al. 2007, Gillespie et al. 2007, Jensen 2009).

Die vorliegende Arbeit konnte nun den Einfluss von konsequenter, dauerhafter hypoxischer Kultivierung auf das Wachstumspotential von Gliomstammzelllinien zeigen. So lag das mediane Überleben der Versuchstiere, in die hypoxisch etablierte Zellen injiziert wurden, signifikant unter dem der Tiere, die mit der in Normoxie etablierten Zellen behandelt wurden (vgl. Abschnitt 3.9.). Dieses beobachtete stärkere Tumorstammzellwachstumspotential könnte zum einen als durch die hypoxische Kultivierung verursacht interpretiert werden. Es könnte zum anderen aber auch in der Weise gedeutet werden, dass die in Hypoxie etablierten Kulturen das invasive Potential der primären Proben beibehalten haben, da sie weiter in den Sauerstoffverhältnissen des Tumors kultiviert wurden. Die in Normoxie kultivierten Linien haben dann im Gegensatz zu den in dauerhafter Hypoxie kultivierten Linien eine Reduktion ihre Wachstumsgeschwindigkeit erfahren, vergleichbar mit dem Abfall der CD133 Expression (vgl. Abschnitt 4.2.). Deutet man die Ergebnisse in dieser Weise, wird erneut die Wichtigkeit hypoxischer Etablierung von Gliomstammzelllinien deutlich, um den Tumorstammzellphänotyp der Ausgangskulturen erhalten zu können.

Analog zu der Erhöhung der Tumorstammzellprogression zeigten die funktionellen Testungen, dass die hypoxisch etablierten Kulturen einen stärkeren dedifferenzierten Zustand aufwiesen. So waren die Anteile der für die Differenzierungsmarker GFAP (astrozytär), Neurofilament (neuronal) und GalC (oligodendrozytär) positiven Zellen in den hypoxisch etablierten Kulturen geringer als in den normoxisch kultivierten Proben. Dies könnte bedeuten, dass normoxische Kultivierung eine Differenzierung in den Gliomstammzelllinien auszulöst, wohingegen Hypoxieexposition eine Differenzierung hemmt und damit den Stammzellphänotyp begünstigt. Diese Wirkung von hypoxischer Kultivierung ist auch für andere Stammzellpopulationen beschrieben worden. So zeigte sich, dass sich im Falle einer hypoxischen Kultivierung die spontane Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen verringerte (Ezashi et al. 2005). Auch Santilli et al. zeigten, dass die Kultivierung adulter neuraler Stammzellen in hypoxischen Bedingungen zu einer Zunahme des dedifferenzierten Zustands der Kulturen in Form

eines Anstiegs der Nestinexpression führte (Santilli et al. 2010). Soeda et al. konnten wie diese Arbeit dann die Zunahme der Dedifferenzierung unter hypoxischen Bedingungen in Gliomstammzelllinien zeigen. So waren in hypoxischer Kultur die Gliomstammzellkulturen vermindert positiv für Marker der astrozytären und neuronalen Differenzierung (Soeda et al. 2009). Somit ist die Verstärkung des Stammzellphänotyps im Hinblick auf die Zunahme des dedifferenzierten Zustandes unter langzeithypoxischen Bedingungen ein Phänomen, das sowohl in adulten neuralen Stammzellen als auch in Tumorstammzellen beobachtet werden konnte. Diese Gemeinsamkeit der beiden Zellpopulationen lässt trotz der oben beschriebenen Unterschiede in der Regulation der Stammzellmarker auf eine bestehende Verwandtschaft dieser Phänotypen schließen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte darüber hinausgehend die Differenzierungskapazität unter hypoxischen Kulturbedingungen. Es zeigte sich, dass die in dauerhaft hypoxischen Bedingungen kultivierten Zellpopulationen über eine größere Kapazität verfügten, sich in astrozytäre Richtung zu differenzieren, wohingegen die neuronale und oligodendrozytäre Differenzierungskapazität vergleichbar war. Andere Autoren hingegen beschreiben bei Hypoxieexposition von Gliomstammzelllinien tendenziell eine Zunahme der Differenzierungsfähigkeit in neuronale Richtung (McCord et al. 2009, Zhang et al. 2006).

Dies verdeutlicht, dass die Zunahme der Differenzierungskapazität unter hypoxischen Bedingungen zwar ein bekanntes Phänomen ist, dass die jeweils verstärkten Differenzierungsrichtungen aber heterogen waren. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass auch die den Stammzelllinien zu Grunde liegenden Glioblastome eine sehr heterogene Entität darstellen. So ist die Bezeichnung Glioblastom eigentlich ein Sammelbegriff für hirneigene Tumore höchster Malignität (Who-Grad IV, vgl. Tabelle 1.1.). Da die meisten Glioblastome *de novo*, also ohne vorherige klinische Manifestation eines Tumors niedergradiger Malignität diagnostiziert werden, kann bei Diagnosestellung dann nicht mehr zwischen astrozytärer oder oligodendrozytärer Herkunft unterschieden werden. Diese unterschiedlichen ursprünglichen zellulären Grundlagen könnten sich in den beschriebenen heterogenen Differenzierungsrichtungen widerspiegeln und wären damit auf die Herkunft der Linien und weniger auf unterschiedliche hypoxische Kultivierungsprotokolle zurückzuführen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, den Einfluss von hypoxischen Kulturbedingungen auf den Stammzellphänotyp der im Labor für Hirntumorforschung etablierten Glioblastom-Tumorstammzelllinien (GS-Linien) zu untersuchen. Dabei wurden Experimente mit kurzzeitiger Hypoxieexposition und erstmals Versuche mit Linien, die primär unter hypoxischen Bedingungen etabliert worden waren (GSH-Linien), durchgeführt.

Es wurde deutlich, dass die den Tumorstammzellphänotyp determinierenden Eigenschaften in unterschiedlicher Weise auf Hypoxie reagierten.

Mit einer konsistenten Hochregulation in sowohl kurzzeitiger als auch dauerhafter Hypoxie reagierte der Gliomstammzellmarker CD133. Die Einbeziehung der Versuche mit konventionellen Linien ohne Stammzeleigenschaften und Linien mit eingeschränktem Tumorstammzellphänotyp konnte zeigen, dass die CD133 Induzierbarkeit in Hypoxie mit der Ausprägung des Tumorstammzellphänotyps assoziiert ist.

Zudem zeigte sich, dass die Linie GS-12H CD133 positiv, die in Normoxie etablierte Linie GS-12 hingegen CD133 negativ war. Eine kurzzeitige Hypoxieexposition der GS-12 führte zwar zu einem Anstieg von CD133, nicht jedoch auf CD133 Niveau der GS-12H. Dies macht deutlich, dass weniger die hypoxische Kultivierung zu einer Verstärkung des Tumorstammzellphänotyps, sondern vielmehr die normoxische Kultivierung zu einem Verlust des Stammzellphänotyps führte. Außerdem könnte diese Beobachtung eine Erklärung für CD133 negative Gliomstammzelllinien liefern, da diese wie die GS-12 initial CD133 positive Zelllinien gewesen sein können, um dann im Verlauf der normoxischen Kultivierung CD133 negativ zu werden. Diese Erklärung unterstreicht die Wichtigkeit primär hypoxischer Etablierung und anschließender konsequenter hypoxischer Kultivierung, um einen möglichst ursprünglichen Phänotyp in Gliomstammzelllinien zu erhalten.

Darüber hinaus wurde der Einfluss der Hypoxia-Inducible-Factors (HIFs) auf CD133 mittels des HIF Inhibitors Chaetomin nachgewiesen. Zudem führte die Transduktion der Linie GS-11H mit einer hergestellten shRNA gegen HIF1 α zum Sterben der transduzierten Zellen, was bedeuten könnte, dass HIF1 α für das Wachstum der in Hypoxie etablierten Linien essentiell ist.

Die weiteren untersuchten Stammzellmarker Oct-4, SOX2 und Nestin zeigten im Gegensatz zu CD133 keine einheitliche Regulation durch Hypoxie. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass zwar eine Assoziation mit dem Phänotyp adulter neuraler Stammzellen besteht, dass diese Stammzellmarker aber weniger stringent mit dem Tumorstammzellphänotyp von Gliomstammzelllinien assoziiert sind.

Zudem zeigte sich, dass unter dauerhafter hypoxischer Kultivierung in den untersuchten Gliomstammzellpopulationen das Tumorstammzellwachstumspotential, der dedifferenzierte Zustand und die Differenzierungskapazität zunahm beziehungsweise erhalten blieb.

6 Anhang

6.1 FACS-Rohdaten

Die folgenden Abbildungen zeigen die FACS-Dot-Plots für die in Abschnitt 3 gezeigten Abbildungen mit Proteindaten.

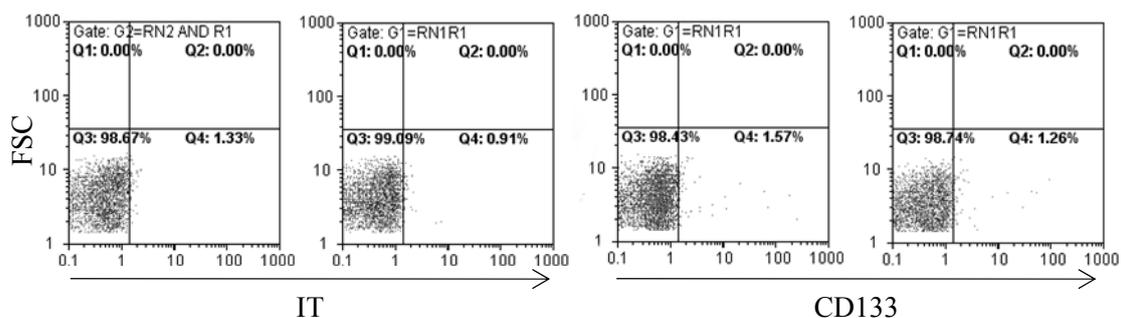


Abb. 6.1. FACS-Dot-Plots der U251 24h nach Inkubation in 1%O₂ (Tag 1) für Abb. 3.1. Auf der rechten Seite in Quadrant Q4 finden sich die CD133 positiven Zellen in Prozent, links sind in Quadrant Q4 die positiven Zellen der Isotypkontrollen (IT) in Prozent dargestellt.

Für die Darstellung in Abbildung 3.1. wurde von jedem Wert für die positiven U251-Zellen (1,57% und 1,26%) der entsprechende IT-Wert abgezogen ($1,57\% - 1,33\% = 0,24\%$ und $1,26\% - 0,91\% = 0,35\%$) und von diesen Werten ein Mittelwert ($0,295\%$) gebildet sowie in Klammern die Varianz angegeben (hier: $\pm 0,055\%$). Die hier genannten Werte findet sich nun als U251, 1% O₂-Wert für Tag 1 in Abbildung 3.1.

Wie hier beschrieben wurde für jede weitere Abbildung mit Proteindaten in Abschnitt 3 vorgegangen.

In den folgenden Abbildungen ist exemplarisch jeweils ein Wert in Form eines FACS-Dot-Plot für die ermittelten Doppelwerte dargestellt.

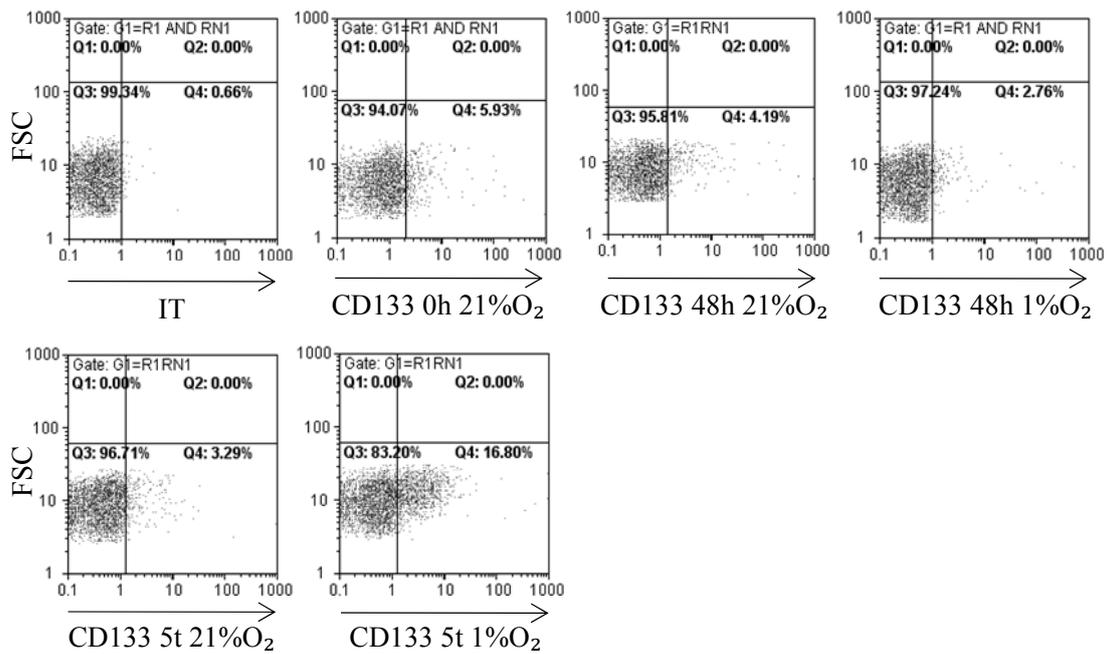


Abb. 6.2. FACS-Dot-Plots der GS-11 für Abb. 3.3. Dargestellt sind in Q4 die CD133 positiven Zellen in Prozent.

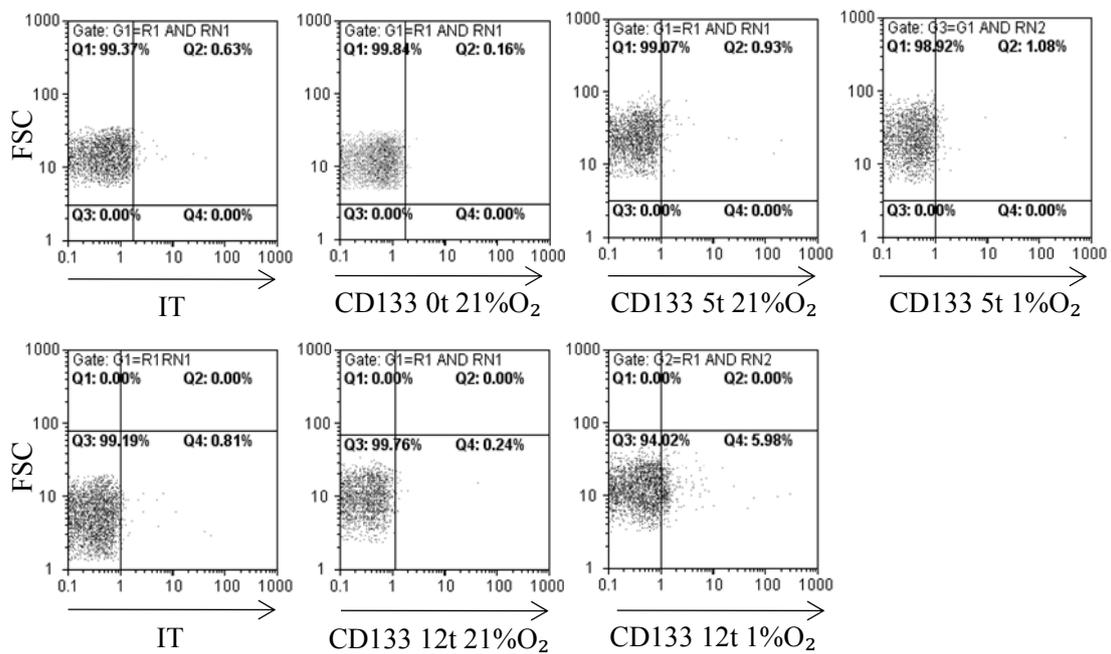


Abb. 6.3. FACS-Dot-Plots der GS-12 für Abb. 3.5. In Q2 (obere Reihe) bzw. in Q4 (untere Reihe) befinden sich die CD133 positiven Zellen in Prozent.

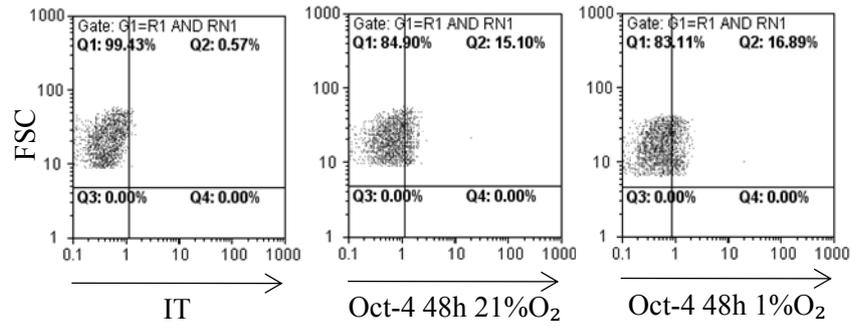


Abb. 6.4. FACS-Dot-Plots der GS-11 für Abb. 3.7. Dargestellt sind in Q2 die Oct-4 positiven Zellen in Prozent.

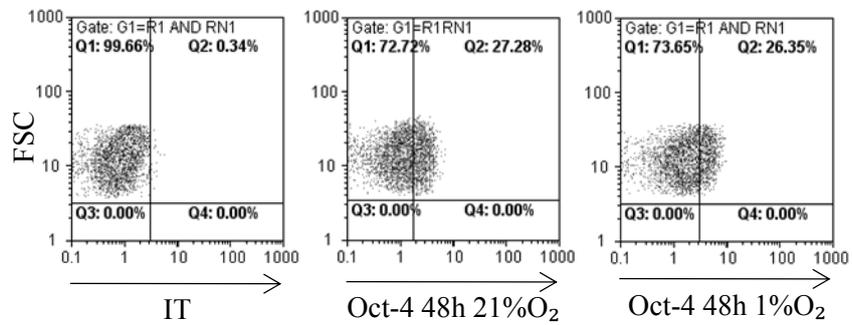


Abb. 6.5. FACS-Dot-Plots der GS-12 für Abb. 3.7. Dargestellt sind in Q2 die Oct-4 positiven Zellen in Prozent.

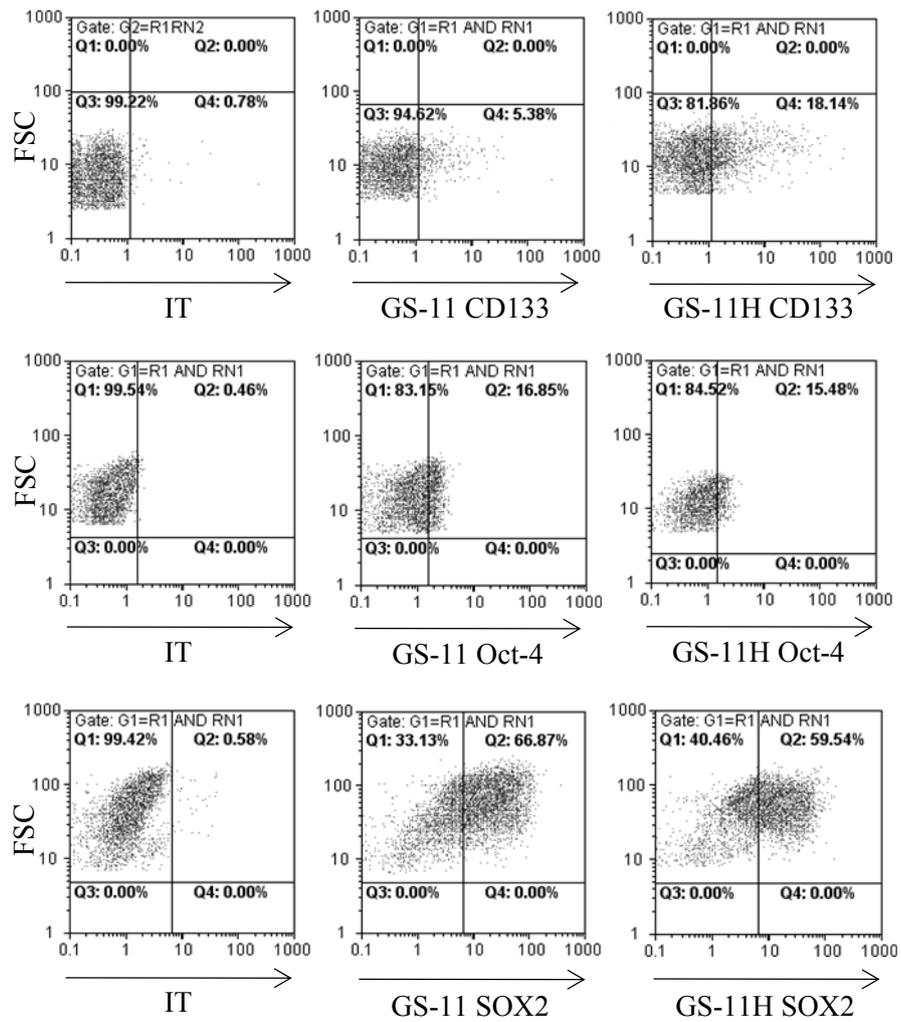


Abb. 6.6. FACS-Dot-Plots der GS-11, GS-11H und den entsprechenden Isotypkontrollen für Abb. 3.9. Dargestellt sind die positiven Zellen in Prozent bei Färbungen gegen CD133 in Q4, gegen Oct-4 und SOX2 in Q2.

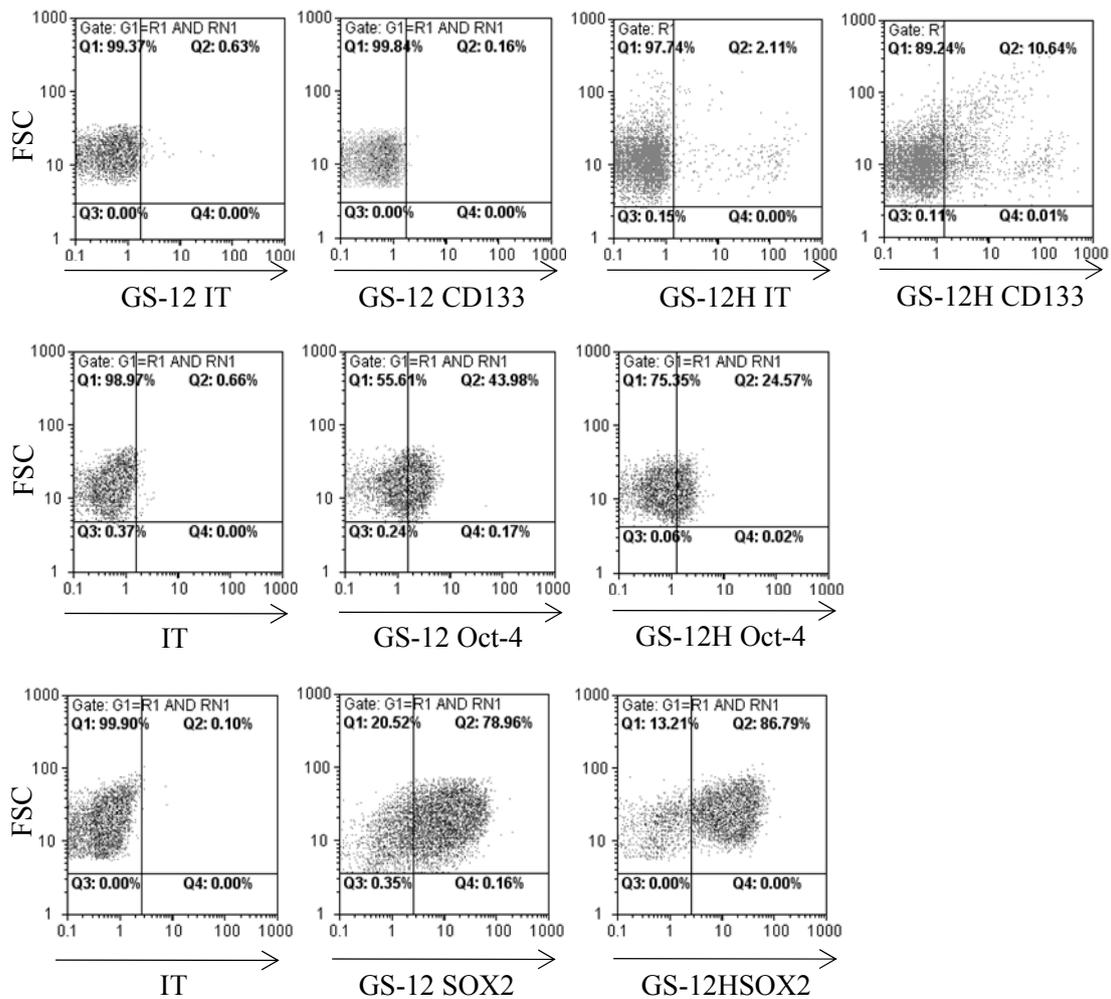


Abb. 6.7. FACS-Dot-Plots der GS-12, GS-12H und den entsprechenden Isotypkontrollen für Abb. 3.9. Dargestellt sind die positiven Zellen in Prozent bei Färbungen gegen CD133, Oct-4 und SOX2 in Q2.

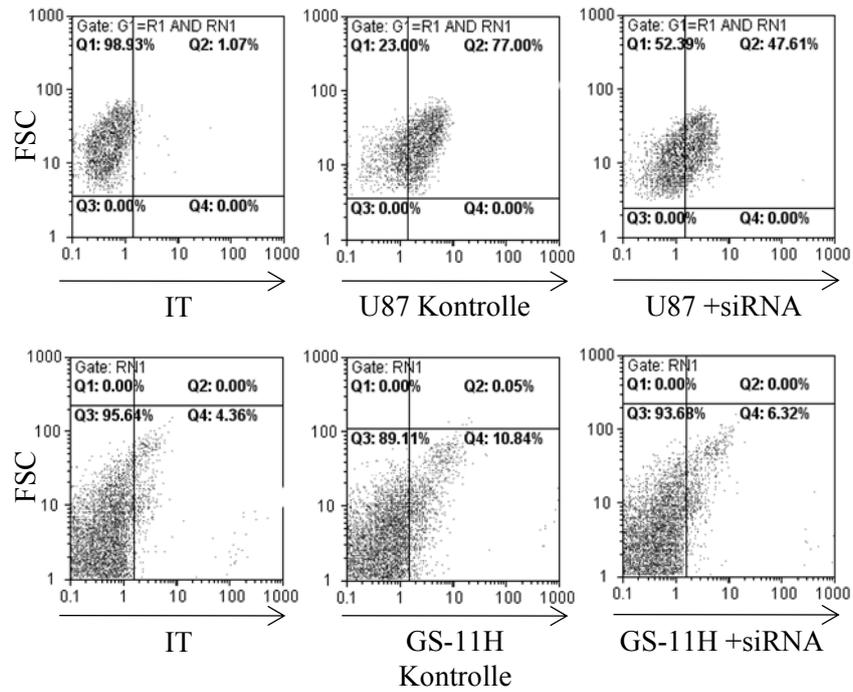


Abb. 6.8. FACS-Dot-Plots der U87 und GS-11H für Abb. 3.12. und Abb. 3.13. Dargestellt sind in Q2 (U87, oben) und Q4 (GS-11H, unten) die HIF1 α positiven Zellen in Prozent.

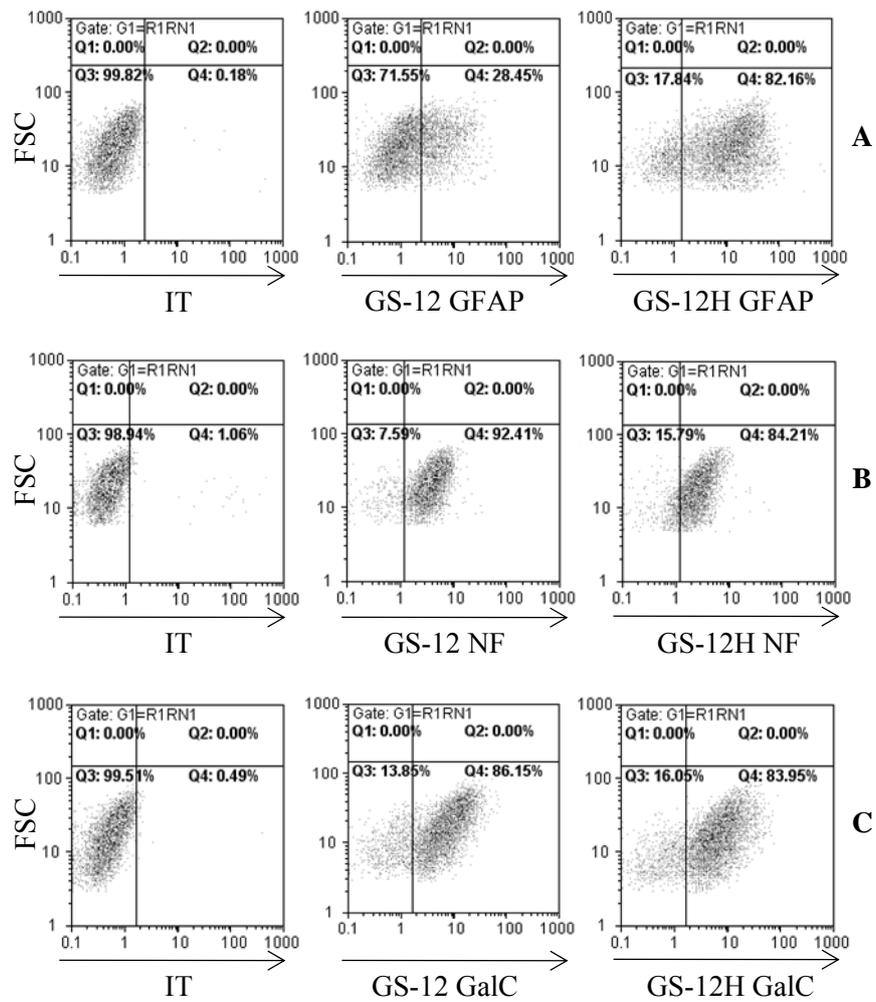


Abb. 6.9. FACS-Dot-Plots der GS-12 und GS-12H exemplarisch von Tag 4 nach Differenzierungsinduktion für Abb. 3.16. Dargestellt sind in Q4 die GFAP (A), NF (B) und GalC (C) positiven Zellen in Prozent.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

ADAM10	A Disintegrin And Metalloproteinase 10
ATP	Adenosin-Triphosphat
BamHI	Restriktionsendonuklease aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
CD44	Cluster of Differentation Protein 44
CD133	Cluster of Differentation Protein 133
cDNA	komplementäre DNA
c-myc	Onkogen der Helix-Loop-Helix-Familie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTP	Cytidin-Triphosphat
t	Tag / Tage
DAPI	4',6-Diamin-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCR	forward scatter
FCS	Fötale Kälberserum
FGF (4)	Fibroblast Growth Factor (4)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung / Gramm
GalC	Galactosylceramidase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GSH-Linien	Glioblastomstammzelllinien, von Beginn an in 1%O ₂ kultiviert
GS-Linien	Glioblastomstammzelllinien
GTP	Guanosin-Triphosphat
H	Hypoxie
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HIF1 α	Hypoxia-inducible Factor 1 Alpha
HIF2 α	Hypoxia-inducible Factor 2 Alpha
HMG	high mobility group
IDH-1	Isozitatdehydrogenase-1
IDH-2	Isozitatdehydrogenase-2
Ig	Immunglobuline
IHC	Immunhistochemie
IT	Isotypkontrolle
IU	Internationale Units
Klf4	Kruppel-like-factor 4
LB-Medium	Lysogeny broth Nährmedium
m	Monat
MET	mesenchymal-epithelial transition factor

mg	Milligramm
MIB-1	mindbomb homolog 1
min	Minute / Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
N	Normoxie
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NBM	Neurobasalmedium
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NTP	Nukleosidtriphosphate
O ₂	Sauerstoff
Oct4	Octamer binding transcriptionfactor 4
OLIG2	Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2
P	Passage
P53	Protein 53
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
POU	P für hypophysenspezifischen Transkriptionsfaktor Pit-1, O für Octamer Transkriptionsfaktoren und U für Unc-86-Transkriptionsfaktor
RealTime-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.O.C. Medium	SOB-Medium (Super Optimal Growth) inclusive Glukose
siRNA	Small interfering RNA
SOX2	(Sex determining region Y)-box 2 – Transkriptionsfaktor
SSC	Sodium Chloride, Sodium Citrate Buffer
TTP	Thymidin-Triphosphat
VEGFC	vascular endothelial growth factor C
w	Wochen
XhoI	Restriktionsendonukleasen aus Xanthomonas vasicola
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikrolitter

6.3 Literaturverzeichnis

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8.

Alqawi O, Wang HP, Espiritu M, Singh G. Chronic hypoxia promotes an aggressive phenotype in rat prostate cancer cells. *Free Radic Res*. 2007 Jul;41(7):788-97.

Anker L, Ohgaki H, Ludeke BI, Herrmann HD, Kleihues P, Westphal M. p53 protein accumulation and gene mutations in human glioma cell lines. *Int J Cancer*. 1993 Dec 2;55(6):982-7.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):756-60.

Bauer N, Fonseca AV, Florek M, Freund D, Jaszai J, Bornhauser M, et al. New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133). *Cells Tissues Organs*. 2008;188(1-2):127-38.

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007 May 1;67(9):4010-5.

Blazek ER, Foutch JL, 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*. 2007 Jan 1;67(1):1-5.

Bleau AM, Huse JT, Holland EC. The ABCG2 resistance network of glioblastoma. *Cell Cycle*. 2009 Sep 15;8(18):2936-44.

Blouw B, Song H, Tihan T, Bosze J, Ferrara N, Gerber HP, et al. The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell*. 2003 Aug;4(2):133-46.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730-7.

Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res*. 2004 Feb 1;64(3):920-7.

Burkhard C, Di Patre PL, Schuler D, Schuler G, Yasargil MG, Yonekawa Y, et al. A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma. *J Neurosurg*. 2003 Jun;98(6):1170-4.

Cattaneo E, McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature*. 1990 Oct 25;347(6295):762-5.

Chan N, Koritzinsky M, Zhao H, Bindra R, Glazer PM, Powell S, et al. Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance. *Cancer Res.* 2008 Jan 15;68(2):605-14.

Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2010 Apr 13;17(4):362-75.

Cheng L, Sung MT, Cossu-Rocca P, Jones TD, MacLennan GT, De Jong J, et al. OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia. *J Pathol.* 2007 Jan;211(1):1-9.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10946-51.

Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem.* 2000 Feb 25;275(8):5512-20.

Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009 Dec 10;462(7274):739-44.

Deb KD, Jayaprakash AD, Sharma V, Totey S. Embryonic stem cells: from markers to market. *Rejuvenation Res.* 2008 Feb;11(1):19-37.

Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1835-42.

Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K. Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int J Cancer.* 2007 Jul 15;121(2):276-83.

Elstner A, Holtkamp N, von Deimling A. Involvement of Hif-1 in desferrioxamine-induced invasion of glioblastoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(1):57-66.

Episkopou V. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci.* 2005 May;28(5):219-21.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008 Mar;15(3):504-14.

Evans SM, Judy KD, Dunphy I, Jenkins WT, Nelson PT, Collins R, et al. Comparative measurements of hypoxia in human brain tumors using needle electrodes and EF5 binding. *Cancer Res.* 2004 Mar 1;64(5):1886-92.

Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 29;102(13):4783-8.

Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells*. 2009 Jan;28(1):5-16.

Fang M, Hu Z, Li Y, Li J, Yew DT, Ling S. Nestin positive cells in the retina and spinal cord of the sturgeon after hypoxia. *Int J Neurosci*. 2009;119(4):460-70.

Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:11-6.

Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, et al. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*. 2004 Aug;131(15):3805-19.

Frezza C, Tennant DA, Gottlieb E. IDH1 mutations in gliomas: when an enzyme loses its grip. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):7-9.

Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 1;27(28):4733-40.

Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, et al. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells*. 2009 Jan;27(1):40-8.

Gillespie DL, Whang K, Ragel BT, Flynn JR, Kelly DA, Jensen RL. Silencing of hypoxia inducible factor-1alpha by RNA interference attenuates human glioma cell growth in vivo. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2441-8.

Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, Macdonald-Goodfellow S. Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer*. 1999 Feb 9;80(4):617-23.

Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jul 6;358(3):948-53.

Greenberger S, Adini I, Boscolo E, Mulliken JB, Bischoff J. Targeting NF-kappaB in infantile hemangioma-derived stem cells reduces VEGF-A expression. *Angiogenesis*. 2010 Dec;13(4):327-35.

Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, Marcorelles P, Benos DJ, Lancaster JR, Jr., et al. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS One*. 2008;3(11):e3655.

Grimm M, Kim M, Rosenwald A, Heemann U, Germer CT, Waaga-Gasser AM, et al. Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133+ cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumorigenesis and tumour progression. *Eur J Cancer*. 2010 Oct;46(15):2849-57.

Günther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, et al. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*. 2008 May 1;27(20):2897-909.

Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 2005 Nov;9(5):617-28.

Hagel C, Park SH, Puchner MJ, Stavrou D. CD44 expression and tumour cell density correlate with response to tamoxifen/carboplatin chemotherapy in glioblastomas. *J Neurooncol*. 2004 Jan;66(1-2):139-46.

Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer*. 2010 Mar 2;102(5):789-95.

Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*. 2009 Oct 15;8(20):3274-84.

Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 9;100(25):15178-83.

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007 Sep 13;1(3):313-23.

Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*. 2006 Nov;10(5):413-23.

Huang EH, Wicha MS. Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy. *Trends Mol Med*. 2008 Nov;14(11):503-9.

Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002 Sep;39(3):193-206.

Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol*. 1999 Jul;9(3):469-79.

Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):567-82.

Jensen RL. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J Neurooncol*. 2009 May;92(3):317-35.

Jensen RL, Ragel BT, Whang K, Gillespie D. Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas. *J Neurooncol.* 2006 Jul;78(3):233-47.

Joo KM, Kim SY, Jin X, Song SY, Kong DS, Lee JI, et al. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest.* 2008 Aug;88(8):808-15.

Kang Y, Greaves B, Perry RR. Effect of acute and chronic intermittent hypoxia on DNA topoisomerase II alpha expression and mitomycin C-induced DNA damage and cytotoxicity in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 1996 Aug 23;52(4):669-76.

Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell.* 2007 May 4;129(3):465-72.

Kelly JJ, Stechishin O, Chojnacki A, Lun X, Sun B, Senger DL, et al. Proliferation of human glioblastoma stem cells occurs independently of exogenous mitogens. *Stem Cells.* 2009 Aug;27(8):1722-33.

Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell.* 2009 Feb 6;136(3):411-9.

Kolenda J, Jensen SS, Aaberg-Jessen C, Christensen K, Andersen C, Brunner N, et al. Effects of hypoxia on expression of a panel of stem cell and chemoresistance markers in glioblastoma-derived spheroids. *J Neurooncol.* 2010 May;103(1):43-58.

Koochekpour S, Pilkington GJ, Merzak A. Hyaluronic acid/CD44H interaction induces cell detachment and stimulates migration and invasion of human glioma cells in vitro. *Int J Cancer.* 1995 Nov 3;63(3):450-4.

Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 2003 Mar 1;63(5):1138-43.

Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 17;106(7):2353-8.

Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; 4. überarbeitete Auflage, 2008, ISBN9783131324146; Georg Thieme Verlag Stuttgart

Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunic P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006;5:67.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109.

Lu H, Li Y, Shu M, Tang J, Huang Y, Zhou Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha blocks differentiation of malignant gliomas. *FEBS J.* 2009 Dec;276(24):7291-304.

Ma HI, Chiou SH, Hueng DY, Tai LK, Huang PI, Kao CL, et al. Celecoxib and radioresistant glioblastoma-derived CD133+ cells: improvement in radiotherapeutic effects. Laboratory investigation. *J Neurosurg.* 2010 Mar;114(3):651-62.

MacKenzie ED, Selak MA, Tennant DA, Payne LJ, Crosby S, Frederiksen CM, et al. Cell-permeating alpha-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol.* 2007 May;27(9):3282-9.

Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, et al. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci.* 2005 Jul 1;118(Pt 13):2849-58.

McCord AM, Jamal M, Shankavaram UT, Lang FF, Camphausen K, Tofilon PJ. Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol Cancer Res.* 2009 Apr;7(4):489-97.

Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol.* 2005 Apr;20(2):665-71.

Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer.* 2007 Mar;43(5):935-46.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007 Jan 4;445(7123):106-10.

Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, Fusco D, Lopez K, Ellis JA, et al. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery.* 2008 Feb;62(2):505-14; discussion 14-5.

Pires IM, Bencokova Z, Milani M, Folkes LK, Li JL, Stratford MR, et al. Effects of acute versus chronic hypoxia on DNA damage responses and genomic instability. *Cancer Res.* 2010 Feb 1;70(3):925-35.

Platet N, Liu SY, Atifi ME, Oliver L, Vallette FM, Berger F, et al. Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett.* 2007 Dec 18;258(2):286-90.

Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006 May 25;441(7092):437-43.

Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol.* 2006 Jan 20;494(3):415-34.

Rampling R, Cruickshank G, Lewis AD, Fitzsimmons SA, Workman P. Direct measurement of pO₂ distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994 Jun 15;29(3):427-31.

Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, Selby M, Sausville EA, Shoemaker RH, et al. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res*. 2002 Aug 1;62(15):4316-24.

Rapisarda A, Zalek J, Hollingshead M, Braunschweig T, Uranchimeg B, Bonomi CA, et al. Schedule-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1alpha protein accumulation, angiogenesis, and tumor growth by topotecan in U251-HRE glioblastoma xenografts. *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):6845-8.

Raychaudhuri B, Han Y, Lu T, Vogelbaum MA. Aberrant constitutive activation of nuclear factor kappaB in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. *J Neurooncol*. 2007 Oct;85(1):39-47.

Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Aug 18;347(1):12-21.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.

Ropolo M, Daga A, Griffiero F, Foresta M, Casartelli G, Zunino A, et al. Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Mol Cancer Res*. 2009 Mar;7(3):383-92.

Santilli G, Lamorte G, Carlessi L, Ferrari D, Rota Nodari L, Binda E, et al. Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One*. 2010 Jan;5(1):e8575.

Schulte A, Gunther HS, Phillips HS, Kemming D, Martens T, Kharbanda S, 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*. 2011 Apr;59(4):590-602.

Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schanzer A, Meletis K, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain*. 2010 Apr;133(Pt 4):983-95.

Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*. 2002 Sep;64(5-6):993-8.

Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2009 Feb 4;29(5):625-34.

Sgambato A, Puglisi MA, Errico F, Rafanelli F, Boninsegna A, Rettino A, et al. Post-translational modulation of CD133 expression during sodium butyrate-induced differentiation of HT29 human colon cancer cells: implications for its detection. *J Cell Physiol.* 2010 Jul;224(1):234-41.

Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T. Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development.* 2003 Jun;130(11):2505-12.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):396-401.

Sneddon JB, Werb Z. Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2007 Dec 13;1(6):607-11.

Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene.* 2009 Nov 12;28(45):3949-59.

Song X, Liu X, Chi W, Liu Y, Wei L, Wang X, et al. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006 Dec;58(6):776-84.

Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, et al. Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol.* 2001 Aug;170(2):317-25.

Studer L, Csete M, Lee SH, Kabani N, Walikonis J, Wold B, et al. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci.* 2000 Oct 1;20(19):7377-83.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Tönnis W, Walter W. Das Glioblastoma multiforme. Bericht über 2611 Fälle. *Acta Neurochir.* 1959, 6:40-62.

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14720-5.

Valorani MG, Germani A, Otto WR, Harper L, Biddle A, Khoo CP, et al. Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential. *Cell Tissue Res.* 2010 Jul;341(1):111-20.

- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jun;6(6):425-36.
- Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*. 2008 Feb 15;122(4):761-8.
- Watson JA, Watson CJ, McCrohan AM, Woodfine K, Tosetto M, McDaid J, et al. Generation of an epigenetic signature by chronic hypoxia in prostate cells. *Hum Mol Genet*. 2009 Oct 1;18(19):3594-604.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*. 1996 Dec 1;16(23):7599-609.
- Westfall SD, Sachdev S, Das P, Hearne LB, Hannink M, Roberts RM, et al. Identification of oxygen-sensitive transcriptional programs in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008 Oct;17(5):869-81.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):5002-12.
- Ylagan LR, Quinn B. CD44 expression in astrocytic tumors. *Mod Pathol*. 1997 Dec;10(12):1239-46.
- Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(24):9533-7.
- Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, et al. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 16;105(50):19579-86.
- Zhang QB, Ji XY, Huang Q, Dong J, Zhu YD, Lan Q. Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Res*. 2006 Dec;16(12):909-15.
- Zheng X, Shen G, Yang X, Liu W. Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res*. 2007 Apr 15;67(8):3691-7.
- Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Oct;8(10):806-23.
- Zhou F, Cui C, Ge Y, Chen H, Li Q, Yang Z, et al. Alpha2,3-Sialylation regulates the stability of stem cell marker CD133. *J Biochem*. 2010 Sep;148(3):273-80.

6.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Westphal für die Bereitstellung des Promotionsthemas und seine großzügige Unterstützung während meiner Arbeit im Labor für Hirntumorbiologie der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Katrin Lamszus für ihren zahlreichen Rat und ihre ebenso großzügige Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Herzlich danken möchte ich auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für Hirntumorbiologie, die mich während meiner Zeit im Labor mit Rat und den vielen praktischen Tipps unterstützt haben. Besonders möchte ich mich dabei bei Svenja Zapf und Dr. Alexander Schulte für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeitszeit bedanken.

Herrn PD Dr. Oliver Heese möchte ich schließlich für die Überlassung des verwendeten MRT-Bildes danken.

6.5 Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

6.6 Publikationen

Teile der Arbeit wurden auf dem Kongress „The 18th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy“ im Mai 2010 in Form eines Vortrags, eines Abstracts und eines Posters veröffentlicht.

A. Schulte, L. Krawinkel, H. Günther, S. Zapf, M. Westphal, K. Lamszus; *Modulation of tumour stem cell markers in glioma stem cell-enriched cell cultures by hypoxia*; 2010, Department of Neurological Surgery, University Medical Center Hamburg- Eppendorf, Hamburg, Germany

6.7 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: Lutz Krawinkel