

# **Die Rolle von Ephrin-B2 in der Invasion maligner Gliome**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

von  
**Cornelia Depner**  
geboren in Stuttgart

Mainz, den 01.08.2011

Dekan:.....

1. Berichtstatter:.....

2. Berichtstatter:.....

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2011

***Meiner Familie***





---

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
3.1	Übersicht und Klassifikation von Gliomen .....	3
3.1.1	Molekularpathologie des <i>Glioblastoma multiforme</i> .....	4
3.1.2	Histopathologie des <i>Glioblastoma multiforme</i> .....	7
3.2	Tumorangiogenese .....	9
3.3	Anti-angiogene Therapie .....	12
3.4	Hypoxie in der Tumorbilogie .....	17
3.5	Tumorinvasion .....	21
3.6	Epitheliale-Mesenchymale Transition .....	23
3.7	Eph und Ephrine .....	25
3.7.1	Eph-Rezeptor-Struktur .....	26
3.7.2	Ephrin-Liganden-Struktur .....	26
3.7.3	Eph-Rezeptor Signalweg .....	27
3.7.4	Ephrin-reverse Signalkaskade .....	29
3.7.5	Adhäsives versus repulsives Signal .....	31
3.7.6	<i>Cis</i> versus <i>trans</i> -Interaktionen .....	32
3.7.7	Eph und Ephrine in der Tumorbilogie .....	32
3.7.8	EphB4 und Ephrin-B2 in der Tumorbilogie .....	33
3.8	Zielsetzung .....	36
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>37</b>
4.1	Materialien .....	37
4.1.1	Chemikalien .....	37
4.1.2	Antibiotika .....	37
4.1.2.1	Antibiotika zur bakteriellen Selektion .....	37
4.1.2.2	Antibiotika für die Selektion von transduzierten Zelllinien .....	38
4.1.3	Antikörper .....	38
4.1.3.1	Primärantikörper .....	38
4.1.3.2	Sekundärantikörper .....	39
4.1.4	Größen- und Molekulargewichtsstandards .....	40
4.1.4.1	DNA-Leitern .....	40
4.1.4.2	Protein-Größenstandards .....	40
4.1.5	Lösungen, Puffer und spezifische Reagenzien .....	40
4.1.5.1	Für Tierversuche .....	40
4.1.5.2	Für Bakterielle Kulturen .....	41
4.1.5.3	Für Zellkultur .....	41
4.1.5.4	Für Färbungen .....	42

4.1.5.5 Für <i>Western-Blot</i> -Analysen .....	43
4.1.6 Plasmide .....	44
4.1.6.1 Im Verlauf der Arbeit hergestellte Plasmide .....	46
4.1.7 miRNA, shRNA und siRNA Sequenzen .....	50
4.1.7.1 miRNA Oligos (Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit) .....	50
4.1.7.2 shRNA Oligos (Trans-Lentiviral™shRNA Bulk Packaging System) .....	52
4.1.7.3 siRNA Oligos von Eurogentec S.A. (Seraing) .....	53
4.1.7.4 siRNA Oligos von Dharmacon (Thermo Fisher) .....	53
4.1.8 Oligonukleotide (Primer) .....	53
4.1.9 Bakterien .....	56
4.1.10 Zelllinien .....	57
4.1.10.1 Im Verlauf der Arbeit hergestellte Überexpression- und <i>knock-down</i> -Zellen .....	58
4.1.11 Weitere Informationen zu Materialien .....	59
4.2 Methoden .....	59
4.2.1 Arbeiten mit RNA .....	59
4.2.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren .....	59
4.2.1.2 RNA-Extraktionen .....	59
4.2.1.3 Reverse Transkription .....	60
4.2.2 Arbeiten mit DNA .....	60
4.2.2.1 Herstellung von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1985) .....	60
4.2.2.2 Transformation von Bakterien .....	61
4.2.2.3 Plasmidpräparationen („Mini- und Maxi-Präp“) .....	61
4.2.2.4 Restriktionsspaltungen .....	62
4.2.2.5 Herstellung von „blunt ends“ .....	62
4.2.2.6 Dephosphorylierung .....	62
4.2.2.7 Ligation .....	62
4.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese .....	63
4.2.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	63
4.2.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	63
4.2.2.11 Quantitative <i>real time</i> Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) .....	64
4.2.2.12 Sequenzierung .....	65
4.2.2.13 Methylierungs-spezifische PCR .....	65
4.2.2.14 Ephrin-B2-Promotor-CpG-Hypermethylierung .....	66
4.2.2.15 Komparative genomischen Hybridisierung ( <i>Comparative Genomic                 Hybridization</i> [CGH]) .....	66
4.2.3 Arbeiten mit Proteinen .....	66
4.2.3.1 Protein-Extraktionen .....	66
4.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	67
4.2.3.3 SDS-PAGE ( Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyakrylamid-Gelelektrophorese) 67	
4.2.3.4 <i>Western-Blot</i> -Analyse .....	68
4.2.3.5 Stripping .....	69
4.2.3.6 Immunpräzipitation und <i>pull-down</i> von endogenen Proteinen .....	69
4.2.3.7 Detektion von Ephrin-B2-Clustern an der Zellmembran .....	70

---

---

4.2.3.8 Luciferase-Assay .....	70
4.2.3.9 ELISA ( <i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i> ) .....	71
4.2.3.10 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) .....	72
4.2.4 Arbeiten mit Zellen .....	72
4.2.4.1 Kultivierung von Zellen .....	72
4.2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	73
4.2.4.3 Zellzählung .....	74
4.2.4.4 Isolierungen von primären murinen Astrozyten und Herstellung der Gliomazellen .....	74
4.2.4.5 Transiente Transfektionen .....	76
4.2.4.6 Transiente siRNA-Transfektion .....	76
4.2.4.7 Hypoxie-Behandlung .....	77
4.2.4.8 Lentivirale Transduktion .....	77
4.2.4.8.1 Herstellung von lentiviralen miR-Konstrukten mit Hilfe des Block-it-Systems von Invitrogen .....	77
4.2.4.8.2 Herstellung lentiviraler Konstrukte mit dem Trans-Lentiviral™ GIPZ-Packaging-System von Open Biosystem .....	78
4.2.4.8.3 Produktion von lentiviralen Partikeln mit der Calcium- phosphat-vermittelten Transfektionsmethode .....	79
4.2.4.8.4 Titerung des lentiviralen Überstandes .....	80
4.2.4.8.5 Transduktion der Zielzellen .....	81
4.2.4.9 Kollagen-Invasion-Assay .....	81
4.2.4.10 Transwell-Invasion-Assay .....	82
4.2.5 Intrakranielle <i>in vivo</i> -Tumor-Xenograft-Modelle .....	83
4.2.5.1 Transplantation der Zellen und anti-angiogene Behandlung .....	83
4.2.5.2 Perfusion der Tiere und Präparation der Gehirne .....	83
4.2.5.3 Gewebeaufbereitung der Gehirne in Dickschnitten .....	84
4.2.5.4 Gewebeaufbereitungen für histologische und immunhistochemische Färbung .....	84
4.2.5.5 Stereologische Quantifizierung des Tumervolumens (H/E-Färbung) .....	84
4.2.6 Färbungen .....	85
4.2.6.1 Immunhistochemische CD34-Färbung .....	85
4.2.6.2 LargeT/ Podocalyxin-Doppelimmunfluoreszenzfärbung .....	86
4.2.6.3 Podocalyxin-Immunfluoreszenzfärbung .....	87
4.2.6.4 HIF-1 $\alpha$ / hNuclei-Doppelimmunfluoreszenzfärbung .....	87
4.2.6.5 Histon-H3/ hNuclei-Doppelimmunfluoreszenzfärbung .....	88
4.2.7 Statistische Auswertungen .....	88
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>89</b>
5.1 Die Rolle der Eph-Rezeptoren und deren Ephrin-Liganden im Glioblastom .....	89
5.1.1 Hypoxie erhöht das invasive Verhalten humaner Glioblastomzellen <i>in vitro</i> .....	89
5.1.2 Expression von Eph und Ephrinen in humanen Glioblastomzelllinien .....	90
5.1.3 Akute Hypoxie führt zu einer verminderten Expression der EphB-Rezeptoren und deren Ephrin-B-Liganden in humanen Glioblastomzellen .....	91
5.1.4 HIF-1 $\alpha$ -abhängige Verminderung der EphB- und Ephrin-B-Expression .....	94

5.1.5	Genetische Aberrationen von EphB und Ephrin-B in Gliomen .....	95
5.1.6	Die Aktivierung der reversen Ephrin-B2-Signaltransduktion führt zu einer verringerten Invasion humaner Glioblastomzellen <i>in vitro</i> .....	99
5.1.7	Der Verlust von Ephrin-B2 erhöht die Invasion von murinen Gliomazellen <i>in vitro</i> .....	100
5.1.8	Der Verlust von Ephrin-B2 führt zu einem vergrößerten Tumolvolumen und einer erhöhten Invasion <i>in vivo</i> .....	102
5.2	Die Rolle des HIF-1 $\alpha$ -regulierten Repressors ZEB2 im Glioblastom .....	105
5.2.1	Untersuchungen zur Hypoxie-abhängigen Regulation von EMT-Repressoren im Glioblastom .....	105
5.2.2	Die Inhibition von TWIST1, TWIST2 und ZEB2 hebt die Hypoxie-induzierte Repression von Ephrin-B2 auf .....	106
5.2.3	Nachweis der Regulation von ZEB2 durch HIF-1 $\alpha$ .....	110
5.2.3.1	Herstellung von stabilen HIF- <i>knock-downs</i> in humanen LN-229- und SNB19-Glioblastomzellen .....	112
5.2.3.2	Herstellung der stabilen HIF-Überexpression in humanen LN-229-Glioblastomzellen .....	114
5.2.3.3	ZEB2 wird in hypoxischen humanen Glioblastomzellen durch HIF-1 $\alpha$ reguliert .....	117
5.2.4	Nachweis der Regulation von Ephrin-B2 durch ZEB2 .....	118
5.2.4.1	Ephrin-B2 wird auf transkriptioneller Ebene durch ZEB2 reguliert .....	118
5.2.4.2	ZEB2 reprimiert die Promotoraktivität von Ephrin-B2 .....	119
5.2.4.3	Mutierte ZEB2-Bindestellen im Ephrin-B2-Promotor verhindern dessen Repression durch Hypoxie und durch ZEB2 .....	121
5.2.4.4	ZEB2 bindet direkt an die hochkonservierten Bindestellen im Ephrin-B2-Promotor .....	123
5.2.5	In humanen ZEB2- <i>knock-down</i> Glioblastomzellen ist die Repression von Ephrin-B2 unter Hypoxie aufgehoben .....	124
5.2.5.1	Herstellung von stabilen ZEB2- <i>knock-downs</i> in humanen LN-229- und G55TL-Glioblastomzellen .....	124
5.2.5.2	Die Repression von Ephrin-B2 und EphB4 wird in den ZEB2- <i>knock-down</i> -Zellen aufgehoben .....	125
5.2.6	Die Rolle von ZEB2 in anti-angiogen-behandelten Tumoren <i>in vivo</i> .....	127
5.2.6.1	Der Verlust von ZEB2 führt zu einem verringerten Tumolvolumen und verhindert den invasiven Phänotypen nach anti-angiogener Behandlung von humanen Glioblastomen <i>in vivo</i> .....	128
5.2.6.2	Die anti-angiogen-behandelten humanen Glioblastomen entwickeln hypoxische Bereiche am Tumorrand .....	133
5.3	Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse .....	135
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	136
6.1	Ephrin-B2 agiert als Tumorsuppressor in Gliomen .....	136
6.1.1	Der Verlust von Ephrin-B2 erhöht das Tumorstadium und die Tumordinvasion .....	141
6.2	Ephrin-B2 wird HIF-1 $\alpha$ -abhängig durch ZEB2 reprimiert .....	150
6.3	ZEB2 als Schlüsselfaktor der evasiven Resistenz nach anti-angiogener Behandlung .....	154
6.4	Abschließende Bemerkung .....	158

<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	162
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	180
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	180
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	183
8.3	Tabellenverzeichnis .....	186
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	187
<b>10</b>	<b>Curriculum Vitae</b> .....	189

---

---

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit wird gegenwärtig zur Einreichung vorbereitet:

**EphrinB2 repression mediates evasive tumour resistance to anti-angiogenesis**

H. zum Buttel<sup>1\*</sup>, C. Depner<sup>2\*</sup>, F. Finkelmeier<sup>2</sup>, B. Garvalov<sup>2</sup>, M. Wolter<sup>3</sup>, S. Barbus<sup>4</sup>, G. Reifenberger<sup>3</sup>, A. Acker-Palmer<sup>1\$&</sup> and T. Acker<sup>2\$&</sup> (\*\$ These authors contributed equally to this work; Manuskript in Präparation).

Diese Arbeit wurde am Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Arbeitsgruppe von Prof. Till Acker, in Kollaboration mit Helge zum Buttel aus der Arbeitsgruppe Prof. Amparo Acker-Palmer, Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, angefertigt. Innerhalb der Kollaboration wurden die Daten folgender Abbildungen von Helge zum Buttel erstellt: Abb. 5.7, Abb. 5.8, Abb. 5.9, Abb. 5.22, Abb. 5.25.

Weiterhin entstanden innerhalb der Kollaboration mit Helge zum Buttel folgende Abbildungen in gemeinschaftlicher Arbeit, wobei die Färbungen der Tumoren von Cornelia Depner und die Aufnahmen von Helge zum Buttel durchgeführt wurden: Abb. 5.29, Abb. 5.30, Abb. 5.31, Abb. 5.32, Abb. 5.33

## 1 Zusammenfassung

Das *Glioblastoma multiforme* zählt zu den häufigsten glialen Neoplasien des Menschen und weist zudem unter den Gliomen die höchste Malignität auf. Glioblastompatienten haben trotz aggressiver therapeutischer Ansätze eine mittlere Überlebenszeit von weniger als einem Jahr. Die diffuse Invasion in das umliegende Hirngewebe ist einer der Hauptgründe für die Rezidivbildung und die infauste Prognose von Glioblastompatienten. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass die starke Invasion auch einer der Gründe für die beobachtete anti-angiogene Resistenz bei der Behandlung von Glioblastomen ist. Das bidirektionale EphB/Ephrin-B-System wurde bei der axonalen Wegfindung als Vermittler repulsiver Signale identifiziert und auch im Zusammenhang der Migration und Invasion von Zellen überprüft. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Funktion der bidirektionalen Eph- und Ephrin-Signaltransduktion in Bezug auf die Glioblastominvasion und Progression untersucht werden.

Genetische und epigenetische Untersuchungen der EphB/Ephrin-B-Familie in einer Kohorte von Gliompatienten unterschiedlicher Malignitätsgrade identifizierten Ephrin-B2 als mögliches Tumorsuppressorgen. In Übereinstimmung damit führte die Inaktivierung von Ephrin-B2 in einem murinen Gliommodell zu einer verstärkten Invasion und einem erhöhtem Tumorwachstum *in vivo*. Dies konnte in verschiedenen Invasion-Assays *in vitro* bestätigt werden. Weiterhin zeigten unsere Untersuchungen, dass Ephrin-B2 transkriptionell durch das hypoxische Mikromilieu HIF-1 $\alpha$ -vermittelt reprimiert wird. Da HIF-1 $\alpha$  als transkriptioneller Aktivator Ephrin-B2 nicht direkt reprimieren kann, wurden potentielle HIF-1 $\alpha$ -regulierte Repressoren untersucht, die für die Ephrin-B2 Herunterregulation verantwortlich sein könnten. Dabei wurde anhand von Ephrin-B2-Promotoranalysen und CHIP-Assays ZEB2 als HIF-1 $\alpha$ -induzierbarer Repressor von Ephrin-B2 identifiziert. Zur Bestätigung der Hypothese, dass ZEB2 ein wichtiger Regulator der Tumordinvasion ist, wurden humane ZEB2-Knockdown-Glioblastomzellen generiert und *in vitro* sowie *in vivo* untersucht. Im Hinblick auf mögliche therapeutische Anwendungen wurden die ZEB2-Knockdown-Glioblastomzellen zusätzlich im Zusammenhang anti-Angiogenese-induzierter Invasion analysiert. Der Verlust von ZEB2 führte dabei zu einer verringerten Glioblastominvasion und Progression in einem Maus-Xenograft Modell. Die Behandlung der Tumoren mit dem anti-VEGF-Antikörper Avastin resultierte in einer stark erhöhten Invasion, die durch die Inaktivierung von ZEB2 und der dadurch reaktivierten repulsiven Signale von Ephrin-B2 wieder aufgehoben werden konnte. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Ephrin-B2 als Tumorsuppressor in Gliomen agiert und durch verschiedene Mechanismen wie der genetischen und epigenetischen Kontrolle, aber auch der HIF-1 $\alpha$ -vermittelten, ZEB2-abhängigen Repression inaktiviert wird. Dies resultiert in einer Blockade repulsiver Signale, so dass Tumorzellen diffus in das Parenchym und zu den Blutgefäßen migrieren können. Der in dieser Arbeit neu identifizierte Signalweg stellt ein attraktives therapeutisches Ziel zur Inhibition der Tumorzellinvasion dar und ermöglicht darüber hinaus der Ausbildung von Resistenzen gegenüber anti-angiogener Behandlung entgegenzuwirken.

## 2 Summary

*Glioblastoma multiforme* is the most common and most malignant glial neoplasia. Glioblastoma patients have a poor prognosis with a median survival time of less than a year, even with aggressive surgical, radio- and chemotherapeutic treatments. Diffuse invasion of the surrounding brain parenchyma is one of the main reasons for tumor relapse and thus a major obstacle in the treatment of glioblastoma. Recent evidence suggests that increased invasiveness also allows glioblastomas to evade anti-angiogenic therapies. The bidirectional EphB/ephrin-B system has been shown to mediate repulsive signals in axon pathfinding and may also control cell migration and invasion. The aim of this study was to decipher the role of the bidirectional Eph and ephrin signal transduction system in glioblastoma invasion and progression.

Genetic and epigenetic analysis of the EphB/ephrin-B family in a panel of glioma biopsies of different grades revealed a potential tumor suppressor function of ephrin-B2. In support of this, loss of ephrin-B2 in a mouse glioma model accelerated tumor growth and invasion *in vivo*. These results were validated in various invasion assays *in vitro*. In addition to the genetic inactivation, ephrin-B2 expression could also be downregulated by a hypoxic microenvironment in a HIF-1 $\alpha$ -dependent manner. Since HIF-1 $\alpha$  is a transcriptional activator, we postulated an indirect mechanism of ephrin-B2 regulation and searched for putative HIF-1 $\alpha$ -controlled transcriptional repressors that would block the expression of ephrin-B2. We identified ZEB2 as a HIF-1 $\alpha$ -inducible repressor of ephrin-B2, as demonstrated by promoter transactivation analyses and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. To examine whether ZEB2 could thus act as an important regulator of tumor invasion, human ZEB2-knockdown glioblastoma cells were generated and analyzed both *in vitro* and *in vivo*. With regard to possible future therapeutical applications, the tumor-bearing mice were additionally treated with anti-angiogenic agents. We found that ZEB2-silencing resulted in reduced growth and decreased invasion of human glioblastoma tumors in a mouse xenograft model. Treatment with the anti-VEGF antibody Avastin strongly increased invasion, but this effect was fully abolished following the knockdown of ZEB2 and the reactivation of ephrin-B2 repulsive signaling.

In summary, this work demonstrates that ephrin-B2 acts as a tumor suppressor in glioma and gets inactivated through various mechanisms, including genetic deletion, epigenetic silencing and microenvironmental downregulation via HIF-1 $\alpha$ -induced repression by ZEB2. The resulting cessation of repulsive signals represents a crucial initial step that promotes diffuse invasion into the parenchyma and along vascular scaffolds. This novel pathway may represent an attractive therapeutic target for inhibiting tumor invasion and counteracting tumor resistance mechanisms against current anti-angiogenic treatment strategies.



## 3 Einleitung

### 3.1 Übersicht und Klassifikation von Gliomen

Das *Glioblastoma multiforme* (GBM) zählt zu den häufigsten glialen Neoplasien des Menschen und weist zudem unter den Gliomen die höchste Malignität auf. Es zeichnet sich insbesondere durch starke Vaskularisierung und diffuse Invasion in das benachbarte Hirngewebe (Parenchym) aus (1, 2).

Generell bestehen primäre Tumoren des zentralen Nervensystems aus heterogenen Gruppen benigner und maligner Neoplasien, von denen die meisten Tumoren glialen Ursprungs sind und somit als Gliome bezeichnet werden (3). Diese wiederum werden nach dem ursprünglichen glialen Zelltyp weiter in astrozytäre, oligodendrozytäre und ependymale Gruppen, sowie Mischformen hieraus unterteilt (4).

Ende der 1970er Jahre wurden Gliome von der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) für eine weltweit einheitliche Klassifikation in vier Malignitätsgrade (WHO-Grade I - IV) eingeteilt. Diese Klassifikation repräsentiert einen zuverlässigen Indikator für das biologische und klinische Verhalten von Gliomen und die Langzeitüberlebenschancen eines Patienten (5).

Die WHO trennt zwischen den bei Kindern und Jugendlichen auftretenden niedriggradigen, benignen Gliomen (WHO-Grad I) und den diffus infiltrierenden Astrozytomen der Erwachsenen (WHO-Grad II - IV) (siehe Tabelle 3.1). Eine Tendenz zur Tumorprogression ist lediglich für die Gliome der WHO-Grade II - IV beschrieben, bei der das Glioblastom als maligner Endpunkt angesehen wird. So haben WHO-Grad II Gliome die Tendenz, sich zu einem WHO-Grad III und schließlich weiter zu einem sekundären Glioblastom des WHO-Grades IV zu entwickeln (4, 6).

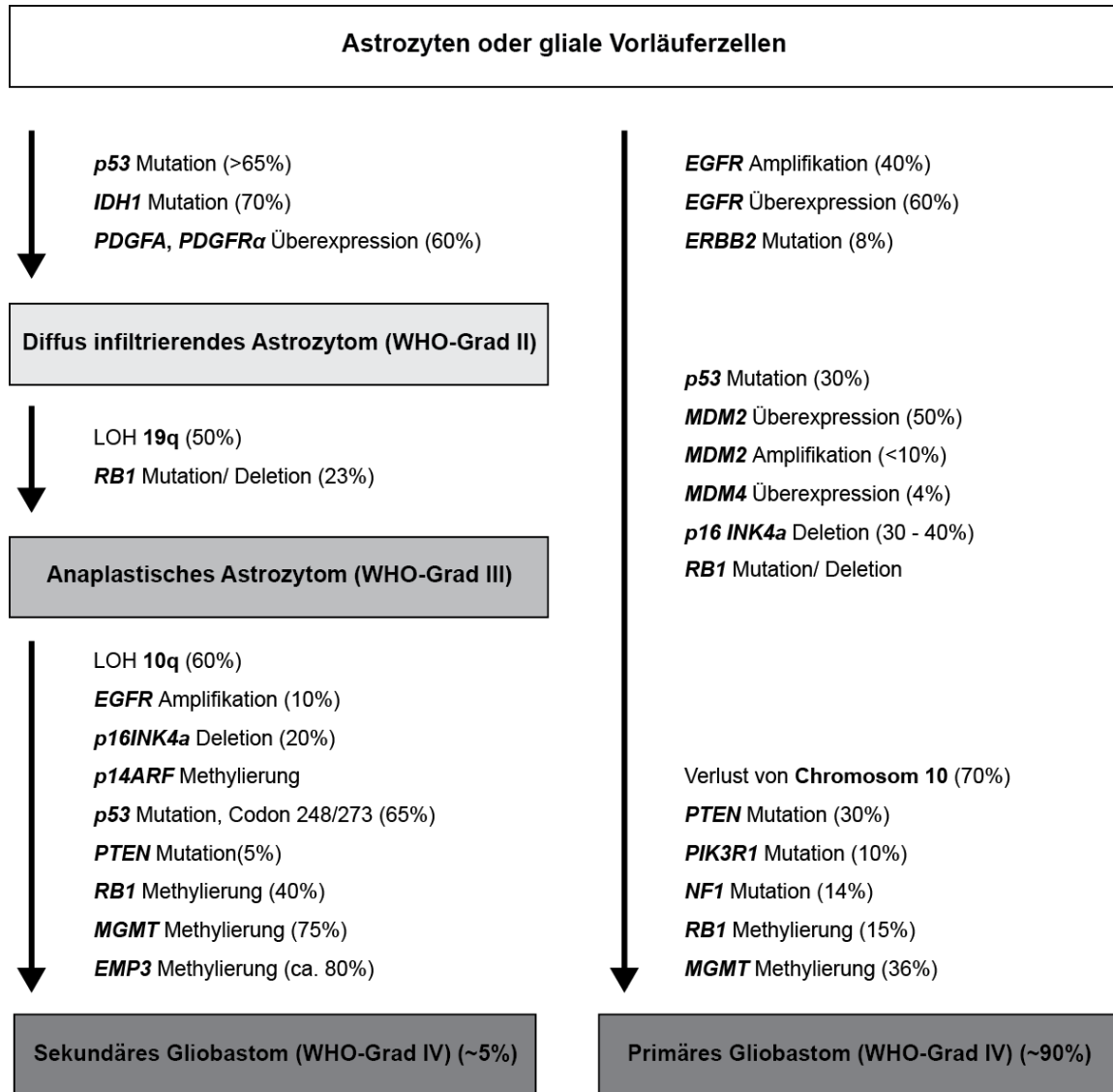
WHO-Grad	Tumortyp
I	Pilozytisches Astrozytom, subependymales Riesenzell- astrozytom, Subependymom
II	Diffus infiltrierendes Astrozytom, Oligodendrogliom, Ependymom, Oligoastrozytom
III	Anaplastisches Astrozytom, Oligodendrogliom, Oligoastrozytom, Ependymom
IV	Glioblastom

**Tabelle 3.1: Klassifikation und Graduierung der Gliom-Subtypen gemäß der WHO-Klassifikation von 2007 (6).**

Histologisch zeigen Astrozytome vom WHO-Grad II meist ein isomorphes Erscheinungsbild, wogegen man beim anaplastischen Astrozytom vom WHO-Grad III eine Zunahme der Zelldichte, der Mitosen und der Zellkerne findet. Maßgeblich für die Unterscheidung eines anaplastischen Astrozytoms WHO-Grad III zum Glioblastom WHO-Grad IV sind wiederum die flächenhaften Nekrosen und mikrovaskuläre Proliferate sowie die pathologische Blutgefäßbildung im Tumor (4, 7).

### **3.1.1 Molekularpathologie des *Glioblastoma multiforme***

Glioblastompatienten haben unabhängig von der Tumorentstehung meist einen schnell fortschreitenden Krankheitsverlauf mit schlechten Heilungsprognosen, ungeachtet der multimodalen aggressiven Behandlungen. Die mediane Überlebenszeit beträgt ein Jahr nach der Erstdiagnose. Beim GBM unterscheidet man ferner zwischen primären und sekundären Glioblastomen, wobei der Anteil primärer Glioblastome über 90% beträgt. Beide Glioblastomtypen zeigen Deletionen auf Chromosom 10 (6, 8, 9). Glioblastome entstehen meist in der frontalen Hemisphäre, kommen jedoch auch in temporaler und parietaler Lage vor. Der Okzipitallappen ist in nur etwa 5% betroffen (10). Die in der Molekularpathologie der Gliome und deren Entstehung involvierten Kernkomponenten sind in Abbildung 3.1 und 3.2 schematisch dargestellt und werden im Folgenden kurz erläutert.



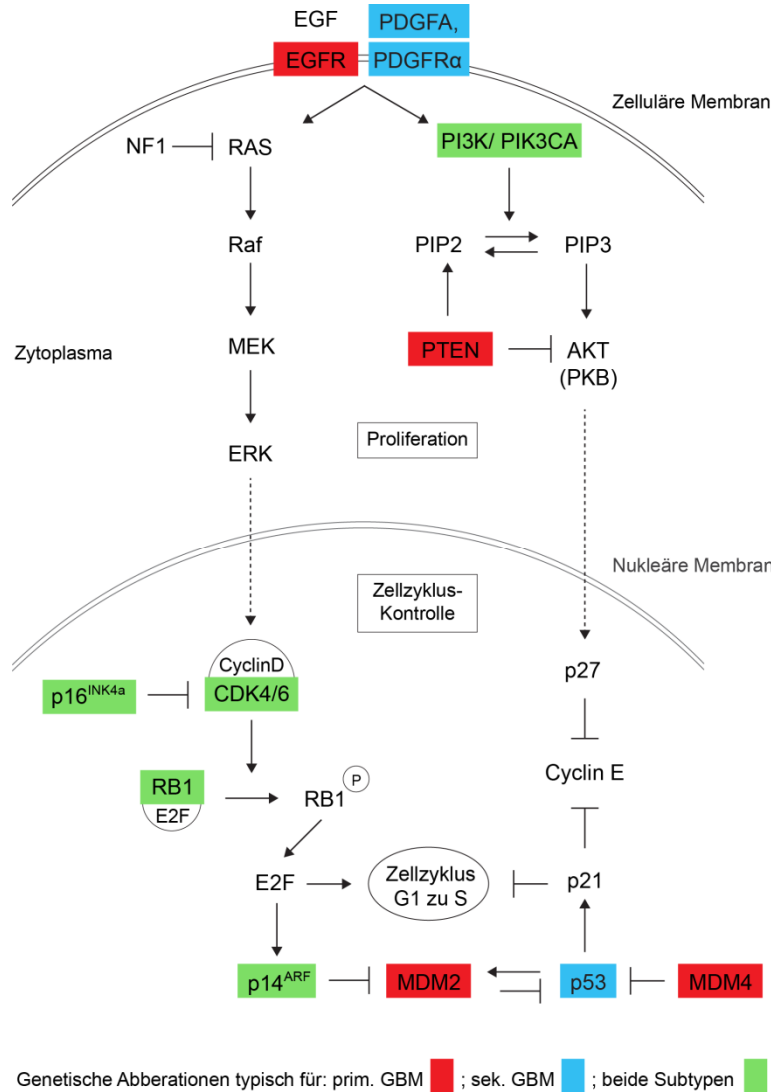
**Abbildung 3.1: Schematische Übersicht der molekularen Pathogenese in der Tumorprogression von Gliomen.** Beschreibung siehe Text. Übernommen und modifiziert aus Reifenberger *et al.*, 2009 (6).

Primäre Glioblastome entstehen *de novo* nach einer Reihe von genetischen Veränderungen und werden in der Regel in einem mittleren Diagnosealter von 62 Jahren festgestellt. Sie sind gekennzeichnet durch den Verlust der Heterozygotie (*Loss of Heterozygosity* [LOH]) aufgrund der Deletionen von 10p und auch von 10q. Weiterhin weisen sie Amplifikationen der Gene *EGFR* (*Epidermal Growth Factor-Receptor*), *MDM2* oder *MDM4*, homozygote Deletionen von *CDKN2A p16*, *p16<sup>INK4a</sup>* und *p14<sup>ARF</sup>*, Mutationen und/ oder homozygote Deletionen von *RB1* sowie Mutationen von *PTEN* und gelegentlich auch von *ERBB2* auf. Eine Mutation im *p53*-Tumorsuppressorgen ist in weniger als einem Drittel aller primären Glioblastome vorhanden (6, 9, 11, 12).

Die *p53*-Mutation ist auch Grundlage der genetischen Unterscheidung der Glioblastome, da in mehr als zwei Drittel aller sekundären Glioblastome eine *p53*-

Mutation vorliegt. Das sekundäre Glioblastom entsteht aus einem bereits vorhandenen, niedrigmalignen Astrozytom und hat ein durchschnittliches Diagnosealter von 45 Jahren (9, 13). Seltener kann man auch die sekundäre Malignisierung eines Oligodendroglioms beobachten (14). Auch ist meist nur eine Deletion (LOH) von 10q und nicht von 10p, sowie von 19q und 13q vorhanden (15, 16). Die Mutation des für die Isocitrat-Dehydrogenase-kodierenden Gens *IDH1* und eine Überexpression des *PDGF* (*Platelet-Derived Growth Factor*)-Rezeptors  $\alpha$  tritt in ähnlicher Häufigkeit auf. Außerdem konnten in sekundären Glioblastomen auch epigenetische Geninaktivierungen (*silencing*) durch Promotorhypermethylierung von *RB1* und *MGMT* (*O*<sup>6</sup>-*Methylguanine-DNA-Methyltransferase*) nachgewiesen werden. Die *MGMT*-Methylierung wird inzwischen auch als diagnostischer Marker für die Glioblastomtherapie verwendet, da Patienten mit methyliertem *MGMT*-Promotor höhere Überlebenschancen besitzen (9, 13, 17, 18).

Die molekularen Signalwege sind trotz der unterschiedlichen genetischen Hintergründe letztlich an denselben Signaltransduktionswegen beteiligt; die Signaltransduktion von p53 für Zellproliferation und Zelltod, CDK/ Cyclin/ CDK/ RB1 für Zellproliferation, PTEN/ PI3K/ AKT für die Regulierung von Wachstumsfaktoren sowie Zellproliferation oder der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) führen bei primären und sekundären Glioblastomen zu ähnlichen funktionellen und zellulären Konsequenzen (19) (siehe Abbildung 3.2).



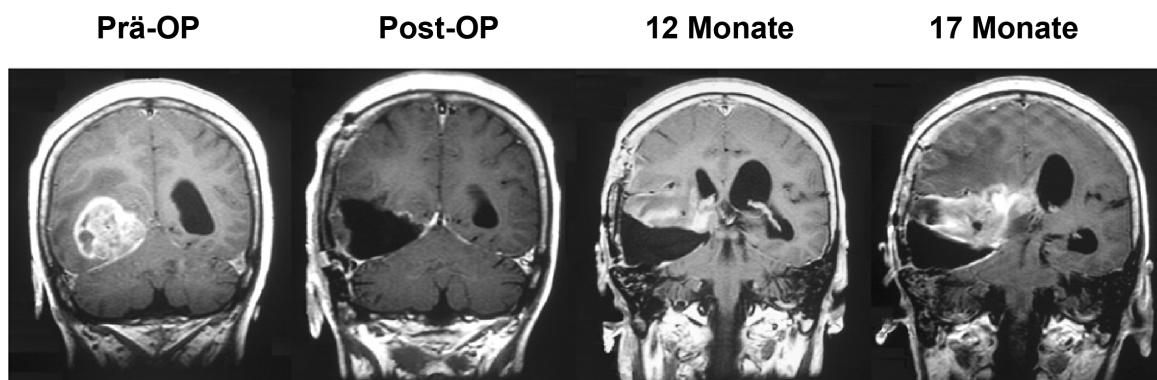
**Abbildung 3.2: Wichtige Signalwege in der Pathogenese von Glioblastomen.** Dargestellt sind die genetischen Aberrationen im Glioblastom im Zusammenhang mit deren Signaltransduktionswegen. Hierbei sind die Zusammenhänge zwischen den p53, RB1 sowie PI3K-AKT-mTOR als auch den RAS-Raf-ERK Signalwegen erkennbar. Die Tyrosin-Kinase-Rezeptorvermittelte Signaltransduktion wie beispielsweise von EGFR beeinflusst sowohl den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg als auch den RAS-Raf-ERK-Signalweg hinsichtlich der Proliferation der Glioblastomzellen. Der RAS-Signalweg kann alternativ durch Mutationen von *NF1* aktiviert werden und der PI3K-Signalweg durch *PTEN*-Mutationen. Während die Alterationen von *p53*, *MDM2/MDM4* oder *p14ARF* die Apoptose inhibieren, fördern die *RB1*- und *p16INK4a*-Deletionen den Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. *RB1* schützt die Zelle davor, beschädigte DNA zu replizieren, indem die Zelle am Durchlaufen des Zellzyklus durch die G1- zur S-Phase gehindert wird. Das *RB*-Protein bindet und inhibiert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, die aus Heterodimeren des E2F-Proteins bestehen. Übernommen und modifiziert aus Ohgaki *et al.*, 2007 (9).

### 3.1.2 Histopathologie des *Glioblastoma multiforme*

Ungeachtet der unterschiedlichen molekularen Hintergründe der Glioblastom-entstehung, ist die Histologie der beiden Glioblastom-Subtypen einheitlich. Sie zeichnet sich durch heterogene, gering differenzierte Astrozyten mit einer hohen mitotischen und niedrigen apoptotischen Aktivität sowie einer Pleomorphie der Zellen und Zysten aus. Der heterogene histologische sowie zytologische Hintergrund war namensgebend für das *Glioblastoma multiforme* (3, 6, 12).

*Like guerilla warriors, in large areas of diffuse gliomas the tumor cells tend to invade individually or in small groups in "foreign" territory and to abuse pre-existent supply lines.* (Claes *et al.*, 2007 (20))

Obwohl auf dem Gebiet der Glioblastomforschung in den letzten 30 Jahren viele Fortschritte gemacht wurden, ist keine signifikante Verbesserung der Überlebensraten von Glioblastompatienten erkennbar. Der maßgebliche Grund hierfür ist die hohe Invasivität der Glioblastomzellen. Sie zeigen eine hohe Motilität und können sich vom primären Tumorverband lösen und diffus singular oder in kleinen Gruppen entlang der weißen Substanz, myelinisierten Fasern, den Meningen oder perivaskulär entlang der Blutgefäße in das umliegende Parenchym einwandern. Dabei streuen sie bis in die kontralaterale Hemisphäre des Gehirns und bilden so die Grundlage der Rezidiven (Rückkehr der Erkrankung). Die Rezidive sind bislang selbst nach der bestehenden Behandlung von Glioblastomen durch Tumorresektion, Bestrahlung (Radiotherapie) und Chemotherapie meist unvermeidbar (siehe Abbildung 3.3). Die entstehenden Mikrosatelliten können weder intraoperativ noch kernspintomographisch sicher von dem umliegenden gesunden Nervengewebe abgegrenzt werden (5, 20-22). Obwohl Glioblastome innerhalb des Gehirns stark invadieren, konnte eine extraneurale Metastasierung bisher nur sehr selten beobachtet werden (23).



**Abbildung 3.3: Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen eines Glioblastompatienten vor und nach dessen Behandlung.** Links sieht man das GBM vor der Resektion und die vollständige Entfernung des Tumors rechts daneben. Der Patient wurde anschließend mit Chemotherapie und Röntgentherapie behandelt. Zwölf Monate nach dem operativen Eingriff konnte man anhand der MRT den Rezidivtumor bereits erkennen. Nach weiteren fünf Monaten verstarb der Patient an den Folgen der Erkrankung. Übernommen und modifiziert aus Nakada *et al.*, 2007 (24).

Darüber hinaus sind Glioblastome durch flächenhafte nekrotische Bereiche gekennzeichnet, die häufig von perifokaler Zelldichtesteigerung umgeben sind, den sogenannten Pseudopalisaden. Diese bestehen aus perinekrotischen, nur gering proliferationsaktiven Zellen und weisen eine höhere Apoptoserate auf als Tumorzellen, die sich entfernter von den nekrotischen Bereichen befinden. Die hohe Zelldichte in den Pseudopalisaden wird durch eine aktive Migration von Zellen aus dem nekrotischen Bereich erklärt. Dies wiederum führt zu der Hypothese, dass es sich bei der Entstehung

nekrotischer Bereiche um eine Art Selektion der Tumorzellen handelt, die der Nekrose durch Migration entkommen und dadurch eine höhere Aggressivität beziehungsweise Malignität aufweisen und auch resistenter gegenüber Therapieansätzen sind (20, 25).

Da in dieser Arbeit die Untersuchung der Glioblastominvasion im Zusammenhang mit dem hypoxischen Mikromilieu und der anti-angiogenen Therapie im Fokus stand, wird in den folgenden Kapiteln näher auf die Hintergründe des aggressiven Wachstums von Glioblastomen eingegangen, wie die Tumorangio-genese, die anti-angiogene Therapie, die Hypoxie und die molekularen Prozesse der Tumorinvasion.

### **3.2 Tumorangio-genese**

Aufgrund des schnellen und aggressiven Wachstums von Glioblastomen ist die bestehende Blutversorgung für eine Tumorprogression generell nicht ausreichend, was zu den erwähnten Nekrosen und auch hypoxischen Bereichen im Tumor führt. Demzufolge wird die Angio-genese für eine komplexe Gefäßneubildung initiiert und so die Blutversorgung der Tumorzellen weiterhin gewährleistet. Dabei sprossen neue Kapillaren von bereits vorhandenen ausgereiften Kapillaren und postkapillaren Venolen aus (26, 27). Im gesunden Gewebe unterliegt die Angio-genese strengen Kontrollen aus Angio-genese-Inhibitoren und Angio-genese-Stimulatoren. Für die Aktivierung der Angio-genese wird das Gleichgewicht von Angio-genese-Inhibitoren zu Angio-genese-Stimulatoren verlagert, was als *angiogenic switch* beschrieben wird (28). Durch einen weiteren noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus, der Vaskulogenese, können auch Zellen bzw. Vorläuferzellen in den Tumor wandern und die umfangreiche Gefäßneubildung unterstützen. Bei den endothelialen Vorläuferzellen handelt es sich wahrscheinlich um zirkulierende Zellen aus dem Rückenmark (29-31).

Für die Aktivierung der Angio-genese wird die Expression von pro-angiogenen Faktoren und die Freisetzung angiogener Zytokine von den Tumorzellen erhöht, um in einer parakrinen Signalschleife die Blutgefäße in Richtung des Tumors migrieren und aussprossen zu lassen. Hypoxie ist dabei ein wichtiger Regulator, indem es VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A*) und dessen Rezeptor VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2), dem hauptsächlichen Vermittler der Angio-genese von malignen Gliomen, induziert. Glioblastome zeigen daher vor allem an den Rändern der nekrotischen und hypoxischen Bereiche, den Pseudopalisaden, eine erhöhte Expression von VEGF-A. In Glioblastomen konnte im Vergleich zu Astrozytomen vom WHO-Grad III eine Überexpression von VEGF detektiert werden (32). In der Tumorangio-genese und auch Vaskulogenese im Glioblastom werden vor allem den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK)

der VEGF/ VEGFR und Angiopoietin/ Tie-Familien sowie der Eph/ Ephrin-Familie eine besondere Rolle beigemessen. Die Expression von Angiopoietin-2, das ebenfalls durch Hypoxie induziert wird, fördert zusammen mit VEGF maßgeblich die vaskuläre Umgestaltung und Sprossung der Gefäße im Glioblastom (33-36). Das Eph/ Ephrin-System fördert die Tumorangiogenese und kann auch mit VEGF und VEGFR-2 interagieren (37, 38). Dieses System wird am Ende der Einleitung detailliert beschrieben.

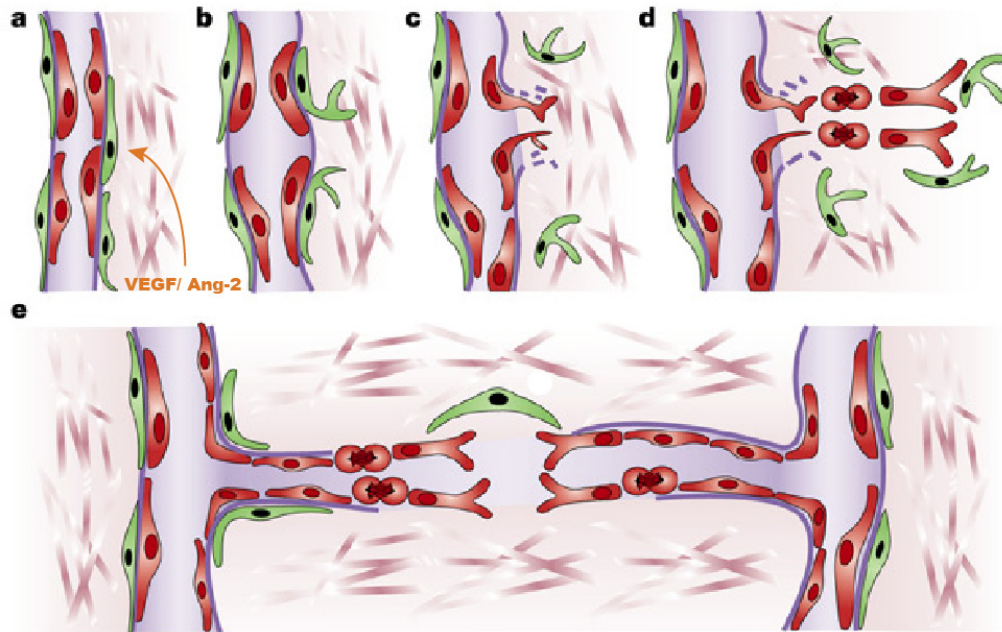
VEGF gehört zur Familie der Wachstumsfaktoren und besteht aus VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, und PIGF (*Placenta-like Growth Factor*). Die Liganden binden die fünf verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR), VEGFR-3 (Flt-4), Neuropilin-1 (NRP-1) und Neuropilin-2 (NRP-2). Jeder Rezeptor besitzt spezifische Bindungseigenschaften für die verschiedenen VEGF-Liganden. VEGFR-1 und VEGFR-2 sind die wichtigsten Rezeptoren und werden auf allen Endothelzellen exprimiert, wogegen VEGFR-3 meist auf lymphatischen Endothelzellen, aber auch auf aktivierten Tumorendothelzellen exprimiert wird. Der vorwiegende Rezeptor für die Bindung von VEGF ist VEGFR-2 (39-41). Bis heute wurden beim Menschen insgesamt sechs verschiedene VEGF-A-Isoformen entdeckt, deren Entstehung auf alternatives Spleißen der mRNA aus demselben Gen beruht und die unterschiedliche Bindungseigenschaften sowie biologische Aktivitäten besitzen (42, 43). Das VEGF-System ist wesentlich bei der Angiogenese und Vaskulogenese aller Tumorarten beteiligt. Im GBM korrelieren die VEGF-Level mit dem Malignitätsgrad des Tumors (44).

Angiopoietin-2 (Ang-2) ist ein Endothel-spezifischer Ligand und bindet an die Tie Rezeptor-Tyrosinkinase Tie2 (tek). Ang-1 und Ang-2 haben gegensätzliche Effekte auf die Blutgefäße. Während Ang-2 die Angiogenese fördert, stabilisiert Ang-1 die vorhandenen Gefäße und inhibiert die Angiogenese. Zusammen mit dem Tie1-Rezeptor regulieren die Angiopoietin Liganden die Umgestaltung der Blutgefäße und die Gefäßstabilisierung in Tumoren (35, 45).

Der komplexe Prozess der Angiogenese kann in mehrere Phasen unterteilt werden und ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt. Zu Beginn stimuliert die Sezernierung von VEGF-A der Glioblastomzellen in parakriner Funktion die Endothelzellen, die daraufhin verschiedene Proteasen freisetzen. Die Basalmembran und extrazelluläre Matrix (EZM) werden proteolytisch abgebaut, sodass die Endothelzellen zunehmend die Zell-Zell-Kontakte und ihre Bindungsfähigkeit verlieren, die Endothelzellschicht dadurch durchlässig wird und die Endothelzellen in das umliegende Gewebe einsprossen können. Anschließend beginnen die aktivierten, proliferierenden Endothelzellen die den VEGF Rezeptor-2 exprimieren unter Ausbildung



von Filopodien in Richtung des angiogenen Signals von VEGF zu migrieren. Die Endothelzellen adhäreren schließlich aneinander und lagern sich zu einer geschlossenen Schicht zusammen. Zuletzt folgt die Ausbildung einer länglichen, kapillaren Struktur, die ein Lumen ausbildet. Die Reifung des neu entstandenen Gefäßes erfolgt durch eine erneute Ausbildung der Basalmembran und Anlagerung von Perizyten und glatten Muskelzellen (46-48).



**Abbildung 3.4: Angiogenese durch Gefäßsprossung.** a) und b) Zu Beginn der Angiogenese produzieren Tumorzellen pro-angiogene Faktoren wie VEGF und Ang-2 und zeigen ihre parakrine Wirkung, indem sich die Perizyten (grün) von den Gefäßen lösen und diese sich weiten. c) Danach kommt es zum raschen Abbau der Basalmembran und der extrazellulären Matrix (EZM). Die Endothelzellen (rot) migrieren daraufhin dem angiogenen Stimulus entgegen. d) Die proliferierenden Endothelzellen folgen den ersten Zellen, was zur Ausbildung der Gefäßsprossung führt. e) Die Gefäßsprosse fusionieren zu einem Lumen und bilden nach dem Wiederaufbau der Basalmembran und der Auskleidung mit Muskelzellen und Perizyten ein neues Blutgefäß. Übernommen und modifiziert aus Bergers *et al.*, 2003 (35).

Das neu gebildete Gefäßsystem zeigt allerdings keinen normalen Phänotyp auf, sondern erscheint als Netzwerk unregelmäßig geformter, dilatierter, undichter und gewundener Gefäße die nicht gänzlich perfundiert sind. Zudem ist auch keine Ausbildung von definierten Venolen, Arteriolen und Kapillaren erkennbar. Im Vergleich zu normal konfigurierten Gefäßen ist auch die Basalmembran der Tumorgefäße unvollständig ausgebildet und unregelmäßig, da ihnen eine kontinuierliche Ummantelung durch Perizyten fehlt (49-51). Dies resultiert in einer hohen Permeabilität und auch Undichtheit der Tumorgefäße und hat ein erhöhtes Risiko intratumoraler Blutungen zur Folge. Die defekte Blut-Hirn-Schranke, die im Glioblastom beschrieben wird, lässt sich

auch teilweise auf dieses Phänomen zurückführen (52, 53). Die gleichzeitige Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen erhöht zusätzlich die Gefäßpermeabilität, was zu einem perifokalen Ödem führen kann, welches für die typisch gesteigerte Kontrastmittelaufnahme bei der Magnetresonanztomographie verantwortlich ist (54-56).

### 3.3 Anti-angiogene Therapie

Aufgrund der starken Vaskularisierung der meisten Tumoren kam bereits zu Beginn der 1970er Jahre von Folkman der Vorschlag, dieser mit anti-angiogenen Wirkstoffen entgegenzutreten. Dem zugrunde war die Idee mit Hilfe von Angiogenese Inhibitoren die Gefäßneubildung lokal im Tumorgewebe zu verlangsamen oder sogar ganz zu verhindern, indem in einzelne oder mehrere Prozesse der Angiogenese hemmend eingegriffen wird. Durch die fehlenden Blutgefäße und der daraus resultierenden fehlenden Substratversorgung sollten Tumoren „ausgehungert“ und im weiteren Wachstum gestört werden (57, 58). Zwanzig Jahre später wurde schließlich VEGF-A als bedeutender pro-angiogener Faktor für die anti-angiogene Therapie in Betracht gezogen und ein humanisierter monoklonal-rekombinanter Antikörper namens Bevacizumab aus der Gruppe der Immunglobuline (IgG1) gegen VEGF-A entwickelt. Bevacizumab blockiert die Bindung von VEGF-A an die Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 und verhindert so die Bildung neuer Blutgefäße (59-61). In Deutschland wird Bevacizumab als Medikament von Roche unter dem Namen Avastin® vertrieben (siehe URL unter <http://www.avastin.de/>).

Nach zahlreichen klinischen Studien erhielt Avastin im Februar 2004 durch die *United States Food and Drug Administration* (FDA) die klinische Zulassung als Medikament in Kombination mit zytotoxischen Chemotherapien zur Behandlung von metastatischen Kolonkarzinomen, Lungenkarzinomen, Nierenzellkarzinom und Brustkrebs. Die FDA erteilte schließlich im Mai 2009 die Freigabe für die Behandlung von *Glioblastoma multiforme* mit Avastin. Es wurde bereits vor der Zulassung in den USA und in einigen europäischen Ländern gegen sehr schwere Fälle von *Glioblastoma multiforme* eingesetzt (62, 63) (siehe *FDA approval of bevacizumab*; URL unter <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-bevacizumab>).

Die Behandlung mit Avastin wird relativ gut vertragen. Nebenwirkungen sind vor allem Hypertension und Proteinuria. Die Befürchtung, dass behandelte Patienten starke intrakranielle Blutungen nach einer Behandlung mit Avastin entwickeln, konnte nicht bestätigt werden. Positiv bei der Behandlung aufgefallen sind hingegen die verringerten

peritumoralen Ödeme. Auch die Verabreichung von Kortikosteroiden konnte während der Avastin-Behandlung im Vergleich zu Kontrollpatienten vermindert werden (64).

Da Tumoren aufgrund der induzierten angiogenen Faktoren wie vor allem VEGF die Angiogenese einleiten und dies in einem anormalen, nicht effizienten Gefäßnetzwerk resultiert, standen vor allem die Auswirkungen einer anti-angiogenen Therapie auf die Tumorgefäßentwicklung im Fokus der Forschung. Untersuchungen konnten die Hypothese unterstützen, dass eine anti-angiogene Behandlung zu einer vaskulären Normalisierung führen kann. Dies hat eine verbesserte Wirkung der komplementär verabreichten Zytostatika und verringerte Hypoxie zur Folge und kann so die Sensitivität zur Radio- und Chemotherapie erhöhen. Diese Normalisierung ist jedoch nur temporär und kann Tage bis Monate andauern (65-68).

Beim GBM wiederum verschlechterte die Normalisierung der Gefäße nach anti-angiogener Behandlung den Effekt der gleichzeitig verabreichten Chemotherapie. Die Theorie ist, dass die Funktion der Blut-Hirn-Schranke durch die Gefäßnormalisierung wiederhergestellt wurde und so die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und dadurch auch die Zytostatika-Verteilung in den Tumorzellen vermindert wurden (69, 70). Bestätigt wurde dies durch die Beobachtung von Norden *et al.*, die bei der GBM-Behandlung mit Avastin und gleichzeitig verabreichter Chemotherapie keine signifikante Stabilisierung oder gar Verbesserung des Krankheitsverlaufes beim Rezidiv nachweisen konnten (64).

Neben Avastin wurde auch ein löslicher Decoy-VEGF-Rezeptor (Aflibercept) entwickelt, der eine hundertfach höhere Affinität zu VEGF-A hat als Avastin. Außerdem kann Aflibercept auch an VEGF-B und PlGF binden und befindet sich momentan in Untersuchungen der klinischen Phase II (62). Es sind auch zahlreiche Versuche unternommen worden Inhibitoren von VEGF-Rezeptoren oder pro-angiogenen Wachstumsfaktoren herzustellen (siehe Tabelle 3.2). Gut untersucht sind davon die VEGF-Kinase-Rezeptor-Inhibitoren Sorafenib und Sunitinib. Diese werden bei der Behandlung von Nierenzellkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen und gastrointestinalen Stromatumoren verwendet (71, 72). Der Nachteil bei der Verwendung von Kinase-Rezeptor-Inhibitoren ist, dass diese nicht spezifisch auf einen Rezeptor wirken, sondern sogenannte „Multi-Kinase“-Inhibitoren darstellen und eine Reihe von Kinasen inhibieren. Dies kann zwar, wie im Fall von Sunitinib, einen therapeutischen Vorteil haben, indem auch PDGF-Rezeptor (PDGFR) inhibiert werden, jedoch auch neue Toxizitäten hervorrufen (73). In einem Tumor-Xenograft-Modell konnte die Behandlung mit Sunitinib die Aufnahme des Zytostatikums Temozolomide kurzzeitig verbessern (74). Es ist also anzunehmen, dass es ein zeitliches Fenster gibt, in dem die Verabreichung von zytotoxischer Chemotherapie oder Radiotherapie am Effektivsten ist. Weiterhin

werden auch Kombinationen von anti-VEGF und anti-VEGFR beziehungsweise anti-PDGFR Therapien untersucht, die auch alternative pro-angiogene Signalwege inhibieren (62, 75, 76).

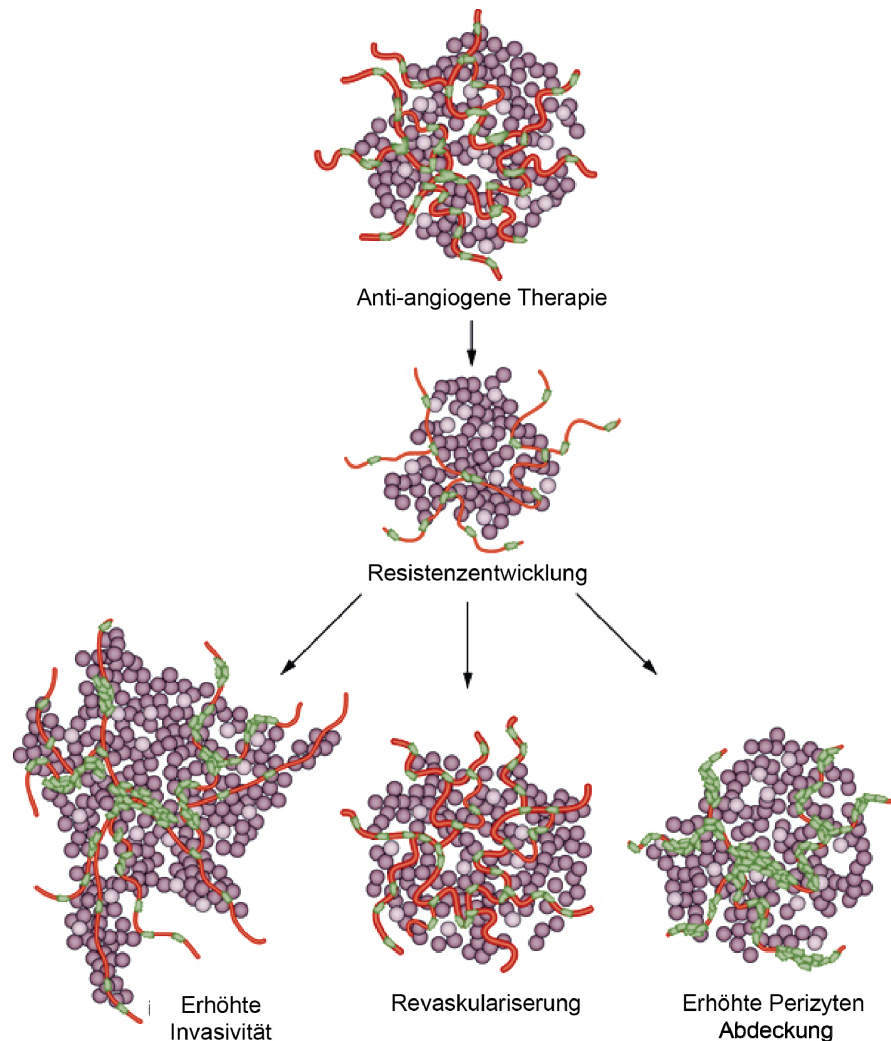
**Table 1** | Antiangiogenic agents in clinical trials for high-grade glioma

Primary target	Agent	Other targets	Mechanism of action
VEGFA	Aflibercept (VEGF Trap)	VEGF-B, PlGF	Soluble decoy receptor
VEGFA	Bevacizumab	None	Monoclonal antibody
VEGFR-2	Cediranib (AZD2171)	All VEGFR subtypes, PDGFR $\beta$ , c-Kit	Tyrosine kinase inhibitor
VEGFR-2	CT-322	All VEGFR subtypes	Adnectin
VEGFR-2	Pazopanib	All VEGFR subtypes, PDGFR $\alpha$ and $\beta$ , c-Kit	Tyrosine kinase inhibitor
VEGFR-2	Sorafenib	VEGFR-3, B-Raf, PDGFR $\beta$ , c-Kit, Ras, p38 $\alpha$	Tyrosine kinase inhibitor
VEGFR-2	Sunitinib	PDGFR $\beta$ , FLT3, c-Kit	Tyrosine kinase inhibitor
VEGFR-2	Vandetanib (ZD6474)	EGFR	Tyrosine kinase inhibitor
VEGFR-2	XL-184	c-Met, RET, c-Kit, FLT3, TIE2	Tyrosine kinase inhibitor
CD36 receptor	ABT-510	None	Thrombospondin-1 mimetic peptide
FGFR	Brivanib	VEGFR-2	Tyrosine kinase inhibitor
HGF	AMG102	None	Monoclonal antibody
Integrins $\alpha\beta$ 3 and $\alpha\beta$ 5	Cilengitide (EMD121974)	None	Synthetic Arg–Gly–Asp peptide
PDGFR $\beta$	Dasatinib	Src, BCR–ABL1, c-Kit, ephrin A2	Tyrosine kinase inhibitor
PDGFR $\beta$	Imatinib	BCR–ABL1, c-Kit	Tyrosine kinase inhibitor
PDGFR $\beta$	Tandutinib (MLN518)	FLT3, c-Kit	Tyrosine kinase inhibitor

Abbreviations: BCR, breakpoint cluster region protein; EGFR, epidermal growth factor receptor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; FLT3, FL cytokine receptor; HGF, hepatocyte growth factor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PlGF, placental growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

**Tabelle 3.2: Auflistung der anti-angiogenen Reagenzien die in klinischen Studien zur Behandlung des Glioblastoms untersucht werden.** Übernommen aus Norden *et al.*, 2009 (62).

Die Entwicklung von molekularen anti-tumoralen Therapien ist problematisch, da Tumorzellen genetisch instabil und heterogen sind und eine hohe Mutationsrate besitzen, sodass sich während der Behandlung resistente Tumorzellpopulation bilden können, die schließlich selektioniert werden und weiterwachsen. Da Endothelzellen genetisch stabil sind und spontane Mutationen sehr selten auftreten, wurde zu Beginn der Therapieentwicklung angenommen, dass die Inaktivierung von Tumorendothelzellen eine effiziente Alternative zur Behandlung von Tumoren bildet (72, 77). Trotz der vielen unterschiedlichen Behandlungsansätze mit Avastin und anderen anti-angiogenen Faktoren ist die Tumorprogression *per se* jedoch weiterhin unvermeidlich. Studien haben gezeigt, dass die Inhibition der Tumorangiogenese durch VEGF das Tumorstadium zu Beginn zwar hemmt, jedoch die Zellen während der andauernden anti-angiogenen Behandlung ausweichende (evasive) Mechanismen entwickeln, die zu anti-angiogenen Resistenzen führen. Dies kann unterschiedliche Hintergründe haben und wird in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt (62, 72).



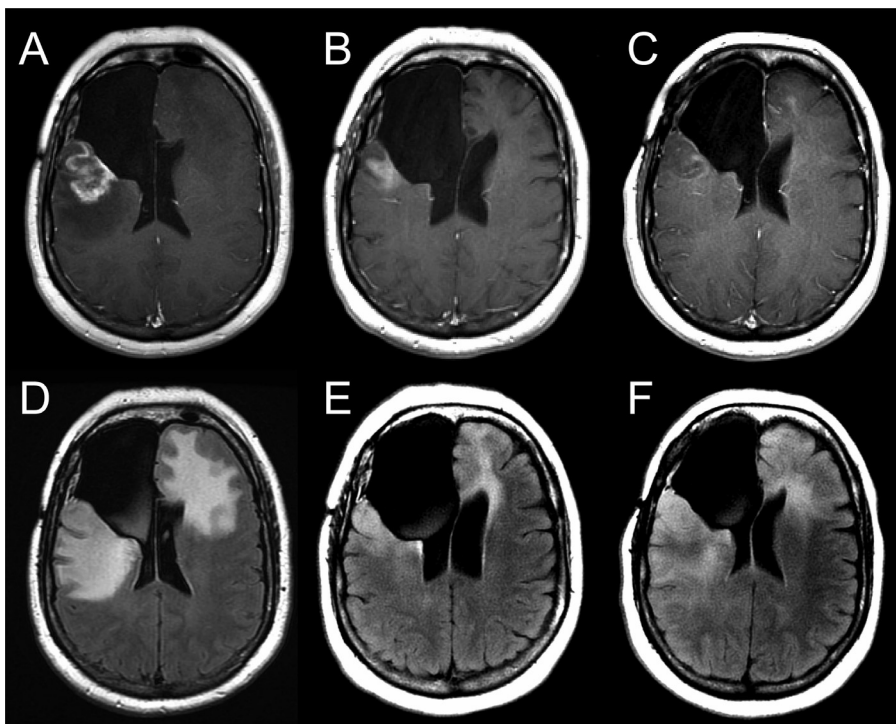
**Abbildung 3.5: Mechanismen der anti-angiogenen Resistenzentwicklung im GBM.** Schematische Darstellung der adaptiven Ereignisse nach Verabreichung von VEGF/ VEGFR Inhibitoren. Zunächst ist eine Tumorrogression erkennbar, die mit einer reduzierten Blutgefäßstruktur (rot) einhergeht. Bei einer weiteren Verabreichung der angiogenen Inhibitoren werden jedoch Mechanismen zur Resistenzentwicklung aktiviert. Dazu gehört die Induktion der Invasivität der Glioblastomzellen (lila), die Revaskularisierung oder auch eine erhöhte Perizyten Abdeckung der Gefäße (grün). Übernommen und modifiziert aus Norden *et al.*, 2009 (62).

Zum einen wurde nach der anti-angiogenen Therapie eine Induktion von alternativen pro-angiogenen Signalwegen festgestellt, die unabhängig von der VEGF-Signaltransduktion zur Revaskularisierung des Tumors führen kann. So konnten erhöhte Level von FGF (*Fibroblast Growth Factor*), SDF-1 $\alpha$  (*stromal cell-derived factor-1 $\alpha$* ), PDGF, Ephrin-A1 sowie zirkulierenden Endothelzellen nach anti-angiogener Behandlung nachgewiesen werden, die auf alternative pro-angiogene Signalwege hinweisen und so der gegen VEGF-gerichteten, anti-angiogenen Therapie entgegenwirken (55, 72, 78, 79).

Zum anderen wurde eine erhöhte Perizyten-Bedeckung der Tumorgefäße beobachtet und als mögliche Erklärung der Resistenz gegenüber anti-angiogener Therapie in Betracht gezogen, da die Tumorgefäße dadurch stabilisiert werden und so unabhängig von VEGF-Signalen sind (66, 80).

Vor allem jedoch zeigen Glioblastome, wie auch andere Tumorarten, eine anti-angiogene Resistenz, indem sie in einen invasiven und Blutgefäß-assoziierten Phänotyp übergehen, was sie unabhängig von der Bildung neuer Blutgefäße macht und auch eine erhöhte Malignität bewirkt. Dieser ausweichende invasive, Blutgefäß-assoziierte Phänotyp wird auch perivaskuläre Invasion genannt und konnte im GBM bereits in mehreren Studien der anti-VEGF und anti-VEGFR Therapie gezeigt werden (81-85). Ebenso wurde dies bei der Inhibition des Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktors HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*) beobachtet, der die Expression von VEGF und VEGFR2 reguliert (86, 87). *In vivo* Mausmodelle für Melanoma und Brustkrebs zeigten nach anti-angiogener Therapie daneben auch eine erhöhte Metastasierung (75).

Das erhöhte diffus infiltrative Wachstum im GBM nach Avastin-Behandlung kann anhand von FLAIR (*Fluid-Attenuated Inversion Recovery*) MRT-Aufnahmen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Entwicklung eines diffus infiltrierenden GBM-Rezidiv nach einer Avastin-Behandlung.** (A) Zu Beginn der Avastin-Behandlung sieht man in der T1-gewichteten MRT-Aufnahme und (D) der FLAIR MRT-Aufnahme das Rezidiv. (B) 6 Wochen nach der Behandlung ist eine Tumorregression erkennbar. (E) Auch die FLAIR-Hyperintensität ist vergleichsweise geringer. (C) 6 Monate nach der Behandlung hat sich die Größe des Rezidivs weiterhin verringert, (F) jedoch ist die Hyperintensität in der T1-gewichteten MRT-Aufnahme erhöht und zeigt eine verstärkte diffuse Tumordinvasion. Aus Norden *et al.*, 2008 (64).

Mehrere Studien konnten dadurch zeigen, dass Avastin das Tumorwachstum des Rezidivs zwar inhibieren konnte, jedoch gleichzeitig auch ein erhöhtes invasives Wachstum erfolgte (64, 88, 89).

Die Mechanismen der Resistenz durch eine erhöhte Tumorzellinvasion sind bisher weitestgehend unbekannt. Jedoch wiesen Studien einen Zusammenhang mit einer erhöhten Hypoxie auf. In verschiedenen Mausmodellen assoziierten die erhöhte Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen mit erhöhten Hypoxie-Leveln und könnten demnach eine Erklärung für die limitierte Wirksamkeit anti-angiogener Therapien sein (75, 78, 83, 90). Bisher konnten keine effektiven anti-angiogenen Therapien, auch in Kombination mit Bestrahlung, Chemotherapie oder anderen molekularen Reagenzien entwickelt werden, die die Behandlung von Glioblastomen und das Überleben der Patienten nachweislich verbessern. Ungeachtet der bisher gefundenen Nachteile sind die angiogenen Inhibitoren dennoch wichtige Meilensteine in der Tumorkrebsforschung. Der klinische Stellenwert angiogener Inhibitoren hinsichtlich der molekularen Signale und der Tumorprogression ist demnach noch nicht geklärt und bedarf weiterer intensiver Forschung.

### **3.4 Hypoxie in der Tumorbilogie**

Im Glioblastom sind die funktionellen Eigenschaften der Blutgefäße wie bereits beschrieben nicht ausreichend, so dass die Neubildung von Blutgefäßen nicht mit adäquater Geschwindigkeit dem Tumorzellwachstum folgen kann, um die Zellen ausreichend zu oxygenieren und mit Nährstoffen zu versorgen. Dieser Sauerstoffmangel führt zu Hypoxie (91). Das respiratorische und kardiovaskuläre Gefäßsystem sorgt für eine angemessene Verteilung des lebenswichtigen Sauerstoffs ( $O_2$ ) und der Nährstoffe in den Geweben und Zellen. Die Zellfunktionen sind stark von einer konstanten Sauerstoff- und Glukoseversorgung abhängig. Für die Einhaltung dieser engen physiologischen Grenzen in den Zellen ist ein streng kontrolliertes System zur Sauerstoffmessung vorhanden, bei dem das HIF-Transkriptionssystem ein Schlüsselfaktor ist (92). Der reguläre Sauerstoffpartialdruck ist organspezifisch und liegt im menschlichen Gehirn bei 1% bis 5% (93, 94).

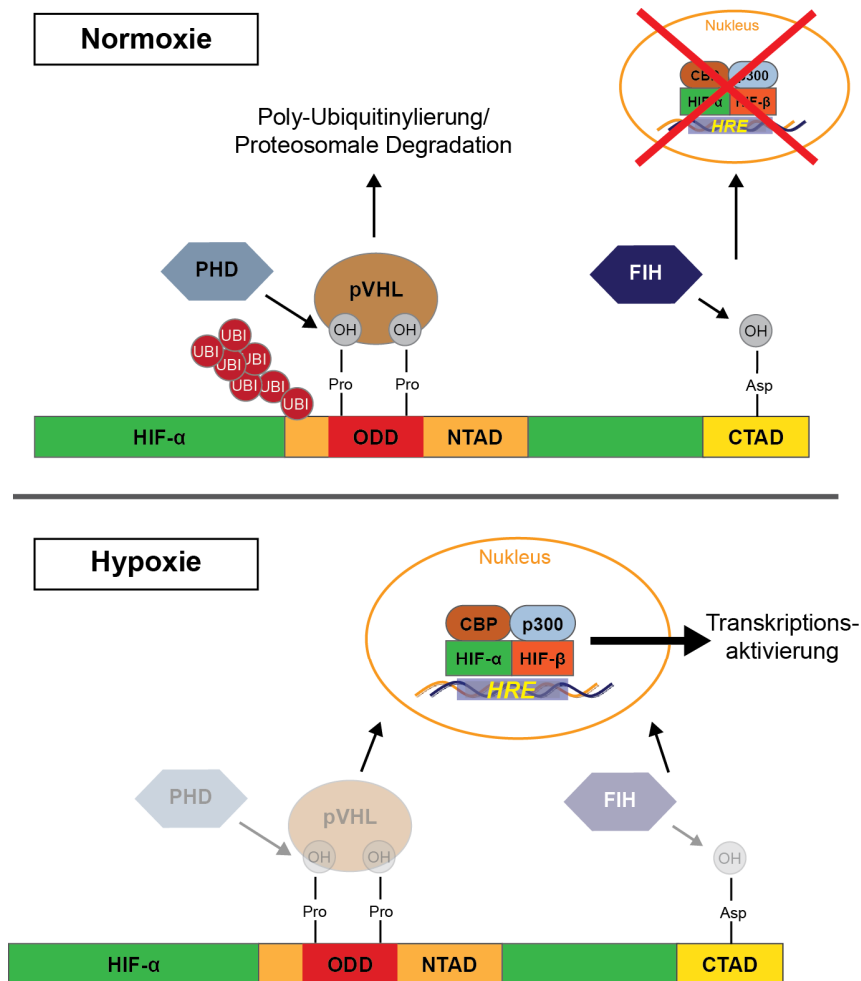
HIF ist der wichtigste Regulator der Sauerstoff-regulierten Genexpression und induziert bei Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes adaptive Mechanismen, um die zelluläre  $O_2$ -Homöostase einzuhalten (95, 96). HIF ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, bestehend aus drei regulierten Untereinheiten (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ ) und einer konstitutiv exprimierten Untereinheit HIF-1 $\beta$ , auch ARNT

(*Arylhydrocarbon-Receptor Nuclear Translocator*) genannt (95, 97-99). Die HIF- $\alpha$  Untereinheiten bestehen am N-terminalen Ende aus einer *basic Helix-loop-Helix* (bHLH) und PAS (Per-ARNT-Sim) Domäne, die die DNA-Bindung beziehungsweise die Heterodimerisierung vermitteln. Das C-terminale Ende besteht aus einer Domäne, die die sauerstoffabhängige Stabilität und transkriptionelle Aktivität reguliert (100-102) (Abbildung 3.7). Die Aktivität des Transkriptionsfaktors wird durch die Stabilisierung von HIF- $\alpha$  bestimmt, das unter normoxischen Bedingungen mit einer der kürzesten Halbwertszeiten aller zellulären Proteine in weniger als 5 Minuten ubiquitinyliert und anschließend abgebaut wird. Unter hypoxischen Bedingungen hingegen ist HIF- $\alpha$  stabil (103-105). Für die rasche Degradierung und Hemmung der Transkriptionsaktivität sorgen die zwei intrazelluläre Enzymklassen PHD (Prolyl-Hydroxylase-Domäne-Proteine) und FIH (HIF-inhibierender Faktor [*Factor Inhibiting HIF*]), die als Sauerstoffsensoren fungieren. In Gegenwart von Sauerstoff wird HIF- $\alpha$  posttranslational durch die sauerstoff-sensitiven 2-Oxoglutarat- und Eisen-abhängigen Prolyl-Hydroxylasen modifiziert, indem je ein Hydroxylrest auf Prolin 402 und Prolin 564 innerhalb der ODD (*Oxygen Dependent Degradation*)-Domäne übertragen wird (106-109). Der ElonginB-ElonginC-RBX1-CUL2-Komplex kann daraufhin mit der  $\beta$ -Domäne von dem VHL (von Hippel-Lindau)-Protein über Wasserstoffbrücken an den Prolylrest binden. Anschließend kann die E3-Ubiquitinligase Ubiquitinmoleküle auf HIF- $\alpha$  übertragen, wodurch es dann letztlich durch das 26S-Proteasom abgebaut wird (103, 110-112). Es existieren drei PHD-Isoformen (PHD1-3), von denen PHD2 das wichtigste Enzym für die Degradierung von HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen ist (113).

Bei einer Abnahme des zellulären Sauerstoffpartialdruckes verringert sich die HIF- $\alpha$  Hydroxylierung, wodurch das Protein stabilisiert wird und nach einer Phosphorylierung in den Zellkern transloziert. Dort bindet es mit HIF-1 $\beta$  als Heterodimer und den Koaktivatoren CBP/p300 in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne an die HRE (*hypoxia responsive element*) Sequenz mit dem 5'-RCGTG-3' Motiv und aktiviert über 100 Zielgene (97, 98, 110, 114). Einen weiteren Kontrollmechanismus stellt FIH durch die Regulierung der transkriptionellen Aktivität von HIF dar. Unter normoxischen Bedingungen wird durch FIH die C-terminale Transaktivierungsdomäne von HIF an einem Asparaginrest (N803) hydroxyliert, wodurch die Interaktion der Koaktivatoren CBP/p300 mit HIF-1 $\alpha$  und dadurch die transkriptionelle Aktivität von HIF verhindert wird (115). Im Glioblastom sind auch sauerstoff-unabhängige Signalwege zur Regulierung des HIF-Systems vorhanden die durch onkogene Aktivierungen oder Wachstumsfaktor-abhängigen Signalwegen hervorgerufen werden, wie die PI3K-AKT-FRAP oder RAS-MEK-MAPK Kaskaden, die unter anderem aus den Mutationen von ERBB2 und EGFR



resultieren, sowie *loss-of-function* Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie PTEN. (116-119).



**Abbildung 3.7: Schematische Darstellung funktioneller Domänen von HIF- $\alpha$ , die für die Regulation durch VHL und die Transkriptionsregulation von Zielgenen relevant sind.** Unter normoxischen Bedingungen wird HIF- $\alpha$  durch PHD (Prolyl-Hydroxylase-Domäne)-Proteine an bestimmten Prolylresten (Pro) in der ODD (Oxygen Dependent Degradation)-Domäne innerhalb der NTAD (N-Terminal Transactivation Domain) hydroxyliert und anschließend durch den pVHL-Komplex ubiquitinyliert (UBI) und abgebaut. Zusätzlich hydroxyliert FIH (HIF-inhibierender Faktor [Factor Inhibiting HIF]) in der CTAD-Domäne einen Asparaginrest (Asp), wodurch die Interaktion der Koaktivatoren CBP/p300 mit HIF-1 $\alpha$  und dadurch die transkriptionelle Aktivität von HIF verhindert wird. Unter hypoxischen Bedingungen liegt HIF- $\alpha$  stabilisiert vor und reguliert durch die Bindung der Koaktivatoren CBP/p300 an CTAD (C-Terminal Transactivation Domain) die Transkription der Zielgene. Übernommen und modifiziert aus Kim *et al.*, 2004 (120).

In Tumorzellen wird durch die Stabilisierung von HIF unter hypoxischen Bedingungen eine Reihe von adaptiven Mechanismen aktiviert, die das Tumorstadium begünstigen. Dazu gehören vor allem die Induktion der Angiogenese (durch VEGF) und auch der Selbsterneuerung der Tumorstammzellen (durch Oct-4, Notch), sowie die Umstellung von der oxydativen Phosphorylierung zur anaeroben Glykolyse und folglich auch die pH-Regulierung (durch CA-IX), die Steigerung der Sauerstoffzufuhr durch die

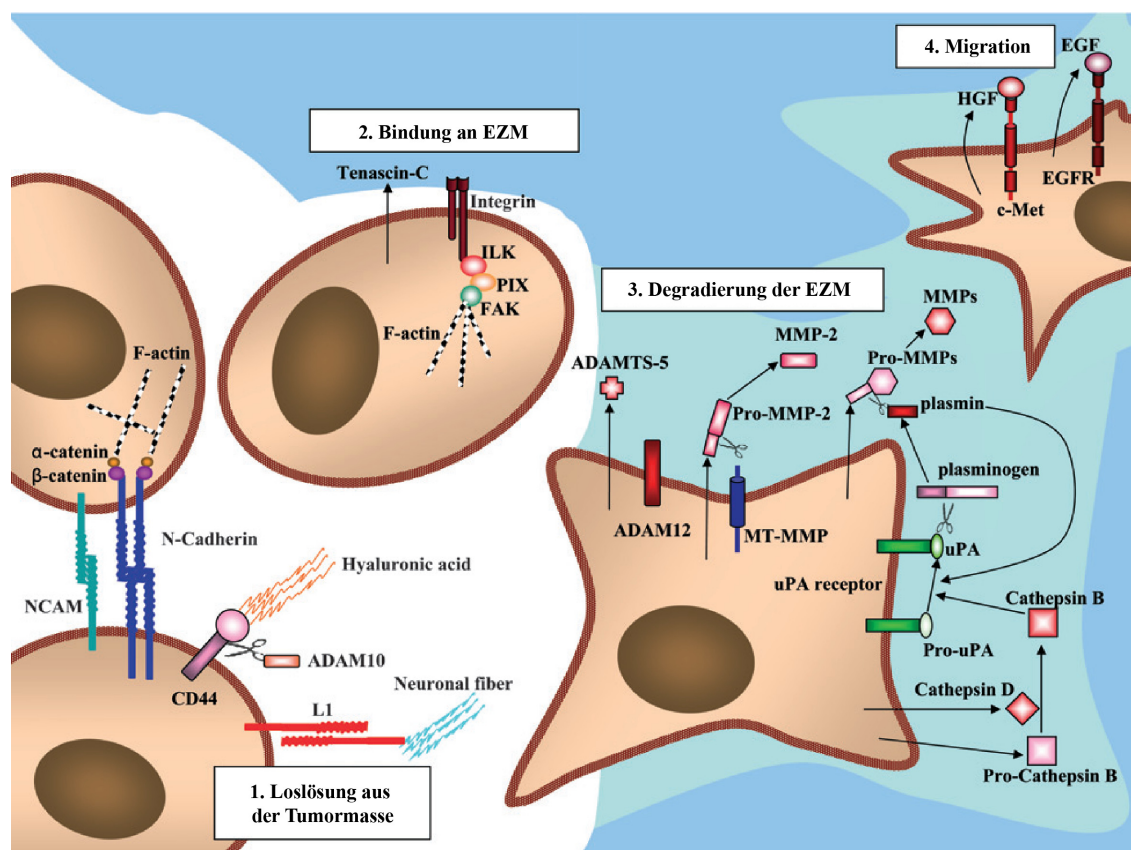
Erythropoese (durch EPO) und die Erhöhung des Energie- (durch GLUT1) und Eisenmetabolismus (102, 121-126).

HIF-1 $\alpha$  wird ubiquitär exprimiert, wogegen HIF-2 $\alpha$  bevorzugt in Endothelzellen exprimiert wird (127, 128). HIF-3 $\alpha$  besitzt keine Transaktivierungsdomäne, sondern fungiert wahrscheinlich als Antagonist des HIF-Systems durch seine Funktion als dominant negativer Regulator von HIF-1 $\alpha$  (99, 129). HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  haben verschiedene, nicht-redundante Funktionen (130). Abgesehen von der Induktion der Angiogenese durch VEGF-A, Ang-2, VEGFR-1 und -2 (33-36, 126, 131) fördert HIF-1 $\alpha$  auch die Migration und Invasion durch die Regulierung der Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) und der Basalmembran und induziert insbesondere die Proteasen Cathepsin D, Matrixmetalloproteinase (MMP)-2 und wichtige Moleküle, wie den Urokinase Plasminogenaktivator Rezeptor (uPAR), Fibonektin 1, Keratine, Vimentin und TGF (*Transforming growth factor*)- $\alpha$  und - $\beta$  (102, 132, 133). Daneben induziert HIF-1 $\alpha$  auch die beiden bekannten pro-invasiven Rezeptorsysteme c-Met und den Chemokin Rezeptor CXCR4 (134, 135). Interessanterweise reguliert HIF-1 $\alpha$  neben den pro-onkogenen Signalwegen auch pro-apoptotische Gene wie BNIP3, die zu Autophagie und Apoptose führen (102, 136). Überdies inhibiert HIF-1 $\alpha$  c-Myc, wogegen HIF-2 $\alpha$  die c-Myc Transkriptionsfunktion fördert (137, 138). Interessant ist auch, dass HIF-2 $\alpha$  bei chronischer Hypoxie aktiv ist (*long term hypoxia*), wogegen HIF-1 $\alpha$  vorwiegend bei akuter Hypoxie exprimiert wird (139). Weiterhin werden HIF-2 $\alpha$  auch durch die Induktion von Apoptose Tumorsuppressor Eigenschaften in Gliomen zugewiesen (140).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Tumorzellen zu Beginn ihrer Entwicklung für ihren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf um die vorhandenen Blutgefäße herum oder entlang der Blutgefäße wachsen, was in der Literatur auch als *vessel co-option* beschrieben wird (141). Aufgrund des rapiden Wachstums des Tumors reichen die vorhandenen Ressourcen jedoch nicht aus und induzieren daher die Angiogenese. Diesem angiogenen Phänotypen (*angiogenic switch*) folgt nach der weiterhin unzureichenden Versorgung der Tumorzellen ein invasiver Phänotyp, der unter anderem auch HIF-abhängig ist. Tatsächlich sind an der invasiven Front von Gliomen und dem Bereich der Pseudopalisaden hohe HIF-1 $\alpha$ - und VEGF-Level vorhanden, die auch mit der Malignität und Blutgefäßdichte der Gliome korrelieren und auf die Relevanz von HIF-1 $\alpha$  in der Tumordinvasion hinweisen (142-144). Die HIF-1 $\alpha$ -Hochregulation/Überexpression korreliert auch mit einer erhöhten Mortalität und schlechten Behandlungserfolgen in verschiedenen Karzinomen (102). Daher ist es nahe liegend, dass Hypoxie in der Literatur als wichtiger Indikator für die Prognose von malignen Tumoren beschrieben wird (145).

### 3.5 Tumorinvasion

Eine aktive Invasion in das Tumorstroma, das aus parenchymalen Zellen und der EZM besteht, setzt eine Zelllösung von der Tumormasse durch Veränderungen der Rezeptor-vermittelten Adhäsion an die EZM-Proteine und Zell-Zell-Kontakte voraus. Die Vorgänge sind in Abbildung 3.8 dargestellt und werden im Folgenden beschrieben.



**Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Invasion von Glioblastomzellen.** Die Gliominvasion kann grob in vier Schritte eingeteilt werden: **1.** Die Loslösung der Zellen aus der Tumormasse. **2.** Die Annäherung an die EZM. **3.** Die Abbau der EZM. **4.** Die Migration der Zellen. Die zellulären Ereignisse sind im Text beschrieben. Übernommen aus Nakada *et al.* 2007 (24).

Für die Loslösung der Zellen müssen zunächst Zelladhäsionsmoleküle gespalten werden (24). Im GBM findet man zum Beispiel das transmembrane Glykoprotein CD44, das als Adhäsionsmolekül mit der Hyaluronsäure der EZM interagiert. Dieses Protein kann durch die Proteasen ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) 10 und 17 gespalten werden (146, 147). Weiterhin kann im GBM auch eine Reduzierung des Adhäsionsmoleküls NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) beobachtet werden (148). Auch die Veränderungen der Cadherine sind bei der GBM-Invasion relevant. Von diesen Kalzium-abhängigen transmembranen Adhäsionsproteinen ist vor allem E-Cadherin und N-Cadherin aus der Epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) im Zusammenhang

mit Invasion und Metastasierung bekannt. E-Cadherin bindet in einem Cadherinkomplex direkt an das Aktin-Zytoskelett und vermittelt so die Zell-Zell-Adhäsion. Die Runterregulierung von E-Cadherin in epithelialen Tumoren korreliert mit einem invasiven Phänotypen und erhöhter Metastasierung. Parallel zur Herunterregulierung von E-Cadherin kommt es zu einer erhöhten N-Cadherin Expression, die die Zellbeweglichkeit und Migration fördert (149, 150). Die veränderte Cadherin Expression resultiert in einer Instabilität der Zellverbindungen durch den Verlust der *adherens junction* und Desmosomen (151). Auch bei der EMT spielt HIF eine Rolle, worauf später ausführlicher eingegangen wird.

Nach der Loslösung nähert sich die Tumorzelle der EZM an. Im Gehirn fungiert die EZM als physikalisches Gitter bei der Invasion der Gliomzellen. Die Mehrheit der EZM-Proteine befindet sich im perivaskulären Raum, bestehend aus Fibronectin, Laminin, Kollagen und Vitronectin, sowie im Parenchym (Glykosaminoglykane) (21, 152). Bei der Invasion kann die EZM, abhängig von den verschiedenen Proteinen, aktive Bewegungen fördern oder auch inhibieren (24). So wird in invasiven Glioblastomzellen das Protein Tenascin-C hochreguliert, das durch den RhoA-Signalweg die Bildung von aktinreichen Filopodien fördert (153, 154). Die Familie der Integrine schafft durch Interaktionen mit EZM-Liganden wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin oder Kollagen Verbindungen mit dem intrazellulären Aktinzytoskelett und schafft so die Voraussetzung zur Migration und Invasion (155, 156). Eine deutliche Vermehrung des transmembranen Adhäsionsproteins Integrin  $\beta 1$  konnte auch bei der Invasion von Glioblastomzellen beobachtet werden (157).

Nach Annäherung an die EZM muss der intrazelluläre Raum für die Migration der Zellen geschaffen werden, was durch die proteolytische Degradierung der EZM geschieht. Bei der Gliominvasion konnten vor allen die Proteinasen MMP-2 und -9, ADAM10, 12m und 17, die Serinproteinase uPA (*urokinase-type Plasminogen Activator*) und dessen Rezeptor uPAR und Cysteinproteinase (Cathepsin B, L und S) nachgewiesen werden (24).

Schließlich wird die Motilität der Zelle durch parakrine und autokrine Signalproteine (z.B. Scatter Faktor) (158-161) stimuliert. Eine Gruppe von Signalproteinen die eine bedeutende Rolle in der Migration von Tumorzellen spielen, sind die Eph-Rezeptoren und deren Ephrin-Liganden, die später detaillierter beschrieben werden (24, 162). Diese und weitere Signalproteine verändern die Zellmorphologie, indem die Zelle polarisiert wird und es daraufhin zur Bildung von Membranausstülpungen kommt, die aus aktinreichen Pseudopodien, Lamellipodien und Filopodien bestehen. Abgeschlossen wird die Migration durch die Bildung von Membranankern, die eine

---

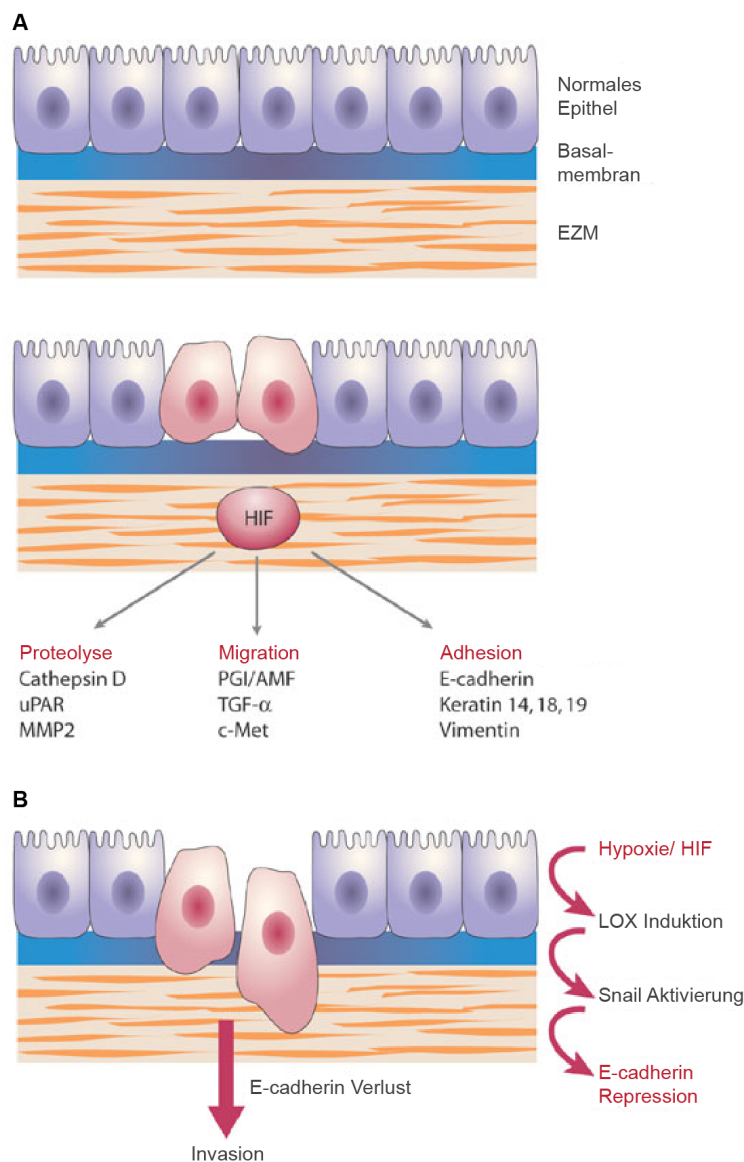
Kontraktion des Zytoskeletts hervorrufen, wodurch sich die Zelle letztlich vorwärts bewegt (24, 163).

### 3.6 Epitheliale-Mesenchymale Transition

Die wichtigste morphologische Veränderung bei der Transition eines benignen zu einem malignen und metastatischen epithelialen Tumor ist die Veränderung der Tumorzelle von einem hoch differenzierten, epithelialen Phänotypen in einen migratorischen, invasiven mesenchymalen Phänotypen. Dieser Prozess wird Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) genannt. Auch hier spielt HIF-1 $\alpha$  eine Rolle, worauf noch näher eingegangen wird. Bei der EMT werden die engen Zell-Zell-Verbindungen von benachbarten Zellen durch *adherens junction*, *tight junctions*, und Desmosomen aufgehoben, sodass die Zellen nur lose in der EZM organisiert sind. Auch während der embryonalen Entwicklung ist die EMT äußerst relevant für die Differenzierung von Zelltypen und der Bildung der komplexen dreidimensionalen Strukturen innerer Organe, wie bei der Gastrulation und der Ausbildung des Neuralrohrs (150). Tumorzellen die die EMT durchlaufen sind durch den Verlust von Zell-Zell-Adhäsion und Polarität charakterisiert und zeigen auch Veränderungen im Zytoskelett. Dabei regulieren sie ihre apikalen und basolateralen epithel-spezifischen *adherens* und *tight junction* Proteine herunter, zu denen auch E-Cadherin gehört, und exprimieren stattdessen mesenchymale Moleküle wie Vimentin und N-Cadherin. Diese Veränderungen führen zu gestörten Zellverbindungen und dem Verlust der Zell-Zell-Kontakte sowie zu einer erhöhten Motilität der Zellen (161, 164, 165).

Der funktionelle Verlust von E-Cadherin ist eines der wichtigsten Ereignisse während der EMT und korreliert auch mit einer erhöhten Tumorprogression und Metastasierung (166, 167). E-Cadherin wird in Tumorzellen durch eine Reihe von EMT-Repressoren auf transkriptioneller Basis reguliert. Dazu gehören die Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren der Snail-Familie (SNAI1 und SNAI2) (168-170), der ZEB-Familie (ZEB1, alias deltaEF1 und ZEB2, alias *SMAD-Interacting Protein 1* [SIP1]) (164, 171, 172) sowie die Id-Helix-loop-Helix-Familie, wie E47 (auch als TCF3 bekannt) (173). Diese Transkriptionsfaktoren binden an die E-Box Konsensussequenz CANNT(G) in der E-Cadherin Promotorregion und reprimieren die Transkription (168, 169). Der Verlust von E-Cadherin hat auch einen Einfluss auf Signalwege die in die Tumorzellmigration und das Wachstum involviert sind, wie der kanonische Wnt-Signalweg und die Rho-Familie-GTPase-vermittelte Modulation des Aktinzytoskeletts (149, 151). Einige Repressoren sind vermehrt an der invasiven Front von Tumoren exprimiert und werden

auch von den bekannten tumorfördernden Signalwegen wie dem HIF, TGF- $\beta$ , STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) und NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B*) Signalweg reguliert (174-179). Daneben spielen noch andere autokrine Wachstumsfaktoren (z.B. HGF/SF, EGF, FGF) eine Rolle, die entweder von der Tumorzelle *per se* oder von den umliegenden stromalen Zellen produziert werden und die letztlich die EMT und Migration fördern (176, 180). SNAI1, SNAI2, ZEB1 und ZEB2 spielen auch bei der epigenetischen Regulierung von E-Cadherin eine Rolle, indem sie spezifische Chromatin-Remodelling-Komplexe rekrutieren (164, 181).



**Abbildung 3.9: Hypoxie-induzierter E-Cadherin Verlust in der EMT. (A)** HIF induziert Faktoren, die zur Proteolyse der Basalmembran und der EZM und zur Migration beitragen. Weiterhin fördert HIF die Invasion der Tumorzellen durch die Herunterregulation von E-Cadherin und der Regulation von Keratinen und Vimentin. **(B)** Dabei induziert HIF die Expression von LOXL2, welches dann SNAI aktiviert. SNAI reprimiert schließlich die E-Cadherin Expression und aktiviert die EMT. Übernommen aus Pouyssegur *et al.*, 2006 (182).

Neben TGF- $\beta$  reguliert auch HIF-1 $\alpha$  einige der E-Cadherin Repressoren und damit die EMT während der Tumorprogression (siehe Abbildung 3.9) (164). So kann

HIF-1 $\alpha$  SNAI1 direkt aktivieren und fördert so die Malignität im Ovarialkarzinom (183, 184) oder aber indirekt über VEGF, welches wiederum SNAI1 aktivieren kann (185). SNAI1 kann auch indirekt reguliert werden, indem HIF-1 $\alpha$  die Expression von LOXL2 (*Lysyl Oxidase-Like 2*) induziert und die Stabilität von SNAI1 beeinflusst, indem LOXL2 die GSK3- $\beta$ -abhängige Degradierung von SNAI1 verhindert (186, 187). Die Mitglieder der LOX (*Lysyl Oxidase*)-Familie sind extrazelluläre Enzyme, die für die Modifizierung von extrazellulären Matrixkomponenten bekannt sind (188). LOX ist auch bei der Hypoxie-induzierten Metastasierung von Brustkrebszellen beteiligt (189). Einige bHLH-Proteine wie TWIST1 und TWIST2 sind ebenfalls in der Runterregulierung von E-Cadherin involviert und werden direkt von HIF-1 $\alpha$  reguliert. Sie spielen bei der Migration und Metastasierung von verschiedenen Tumorzellen wie HNSCC (*Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*), Brust oder Lungenkrebs eine Rolle (190-192).

Der Prozess der EMT ist umkehrbar. Nachdem Tumorzellen ihren Primärtumor verlassen haben und in andere Organe invadiert oder metastasiert sind, können sie durch Interaktionen mit der veränderten Tumormikroumgebung wieder ihren epithelialen Phänotyp erwerben, indem sie eine mesenchymale-epitheliale Transition (MET) durchlaufen (150, 177). Dies bedeutet, dass der Prozess der EMT an der invasiven Front nur transient aktiviert ist und durch Faktoren aus der Tumorumgebung reguliert wird (193). Die regulatorischen Mechanismen der EMT im Zusammenhang mit HIF sind komplex und konnten trotz zahlreicher Untersuchungen noch nicht vollständig geklärt werden.

### **3.7 Eph und Ephrine**

Eph-Rezeptor-Tyrosinkinasen (*Erythropoietin-producing human hepatocellular*) und die dazugehörigen Ephrin-Liganden (*Eph receptor interacting protein*) bilden die größte Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie (194, 195). Sie wurden zunächst als Vermittler bei der axonalen Migration und bei der Entwicklung des Nervensystems identifiziert (196, 197). Außerhalb des zentralen Nervensystems sind Eph und Ephrine auch in Immunzellen, Knochenzellen, Stammzellen, Epithelzellen und vielen Tumorzellen exprimiert. Dabei haben sie in der Entwicklung und im adulten Organismus viele unterschiedliche Funktionen auf der Ebene der Zell-Zell-Kommunikation, wie zum Beispiel die Regulation der vaskulären Entwicklung, Gewebebildung, Zellproliferation und -migration, Axonlenkung, synaptische Plastizität und Angiogenese (198-202). Somit sind Eph und Ephrine wesentliche Regulatoren von Zell-Zell-Interaktionen, die sie durch abstoßende und adhäsive Signale vermitteln.

### 3.7.1 Eph-Rezeptor-Struktur

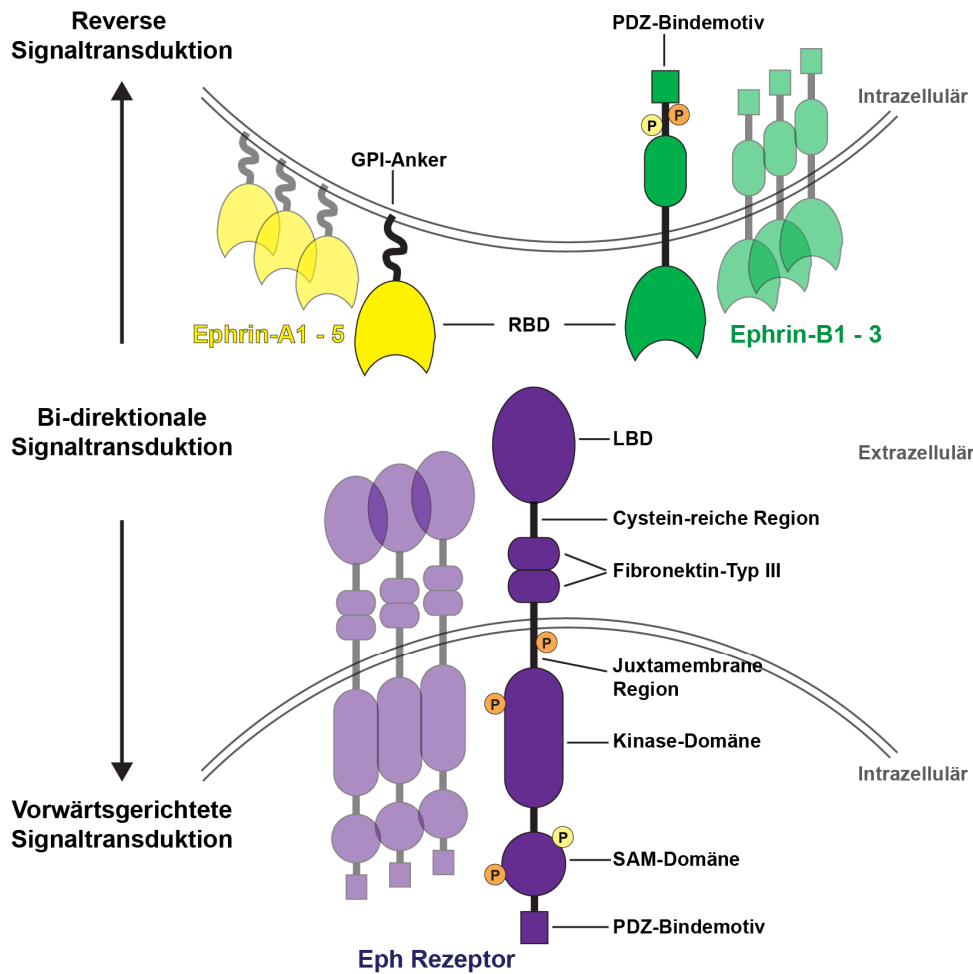
Aufgrund unterschiedlicher Sequenzähnlichkeiten und Bindungsaffinitäten zu ihren jeweiligen Liganden unterteilt man Eph-Rezeptoren in zwei Klassen. Bisher konnten beim Menschen neun A-Klassen (EphA1-8 und EphA10) und fünf B-Klassen (EphB1-4 und EphB6) identifiziert werden (203). Die extrazelluläre Region des transmembranen Eph-Rezeptors besteht aus einer N-terminalen, Liganden-bindenden globulären Domäne, einer anschließenden Zystein-reichen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-ähnlichen Region und zwei Fibronectin Typ III-Wiederholungen (siehe Abbildung 3.10). Dem Membran-durchspannenden Segment folgt der zytoplasmatische Teil, der in vier Einheiten eingeteilt werden kann: die juxtamembrane Region, die zwei konservierte Tyrosine beinhaltet, eine Tyrosinkinase-Domäne, ein steriles  $\alpha$ -Motiv (SAM) und ein postsynaptisches PDZ (*PSD 95/Disc large/ZO-1*)-Bindemotiv (198, 204). Die juxtamembrane Region reguliert durch Autophosphorylierung der zwei Tyrosinkinasen die Tyrosinkinaseaktivität. Die SAM-Domäne ist wahrscheinlich an der Protein-Protein-Interaktion zur Bildung von Dimeren und Oligomeren beteiligt (202, 205).

### 3.7.2 Ephrin-Liganden-Struktur

Im Gegensatz zu den meisten Tyrosinkinasefamilien die monomere lösliche Liganden binden, sind die Ephrin-Liganden wie die Eph-Rezeptoren membrangebunden (siehe Abbildung 3.10). Dies setzt den Zell-Zell-Kontakt für eine Interaktion von Rezeptor und Ligand voraus, weshalb das Eph/ Ephrin-System hervorragend für Entwicklungsprozesse der Zellgrenzbildung und Axonlenkung und generell für die Vermittlung von kurzen Signalwegen geeignet ist (206).

Ephrine sind ebenso wie die Eph-Rezeptoren in zwei Gruppen aufgeteilt und durch unterschiedliche extrazelluläre N-terminale Rezeptor-Bindedomänen und Bindungsaffinitäten zueinander charakterisiert (207, 208). Alle Ephrine besitzen eine hochkonservierte extrazelluläre Rezeptor-Bindedomäne. Ephrin-A-Liganden (Ephrin-A1-Ephrin-A5) sind durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran verankert, wogegen Ephrin-B-Liganden (Ephrin-B1-Ephrin-B3) eine Membran-durchspannende Helix besitzen, die in einer kurzen aber hoch konservierten cytoplasmatischen Region endet, bestehend aus 83-90 Aminosäuren. Diese Region wiederum setzt sich aus einem C-terminalen PDZ-Bindemotiv und fünf konservierten Tyrosinresten zusammen, die die Phosphorylierungs-Domäne darstellt (199, 204, 209, 210).





**Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Eph-Rezeptor und Ephrin-Liganden Strukturen.** Die Eph-Rezeptor-Familie und deren Ephrin-Liganden sind Membran-gebundene Moleküle, sodass ein Zell-Zell-Kontakt Voraussetzung für eine Aktivierung der Signaltransduktion ist. Das EphB- und Ephrin-B-System besitzt die Möglichkeit der bi-direktionalen Signaltransduktion. Dabei werden die vorwärtsgerichtete Signaltransduktion in der EphB-exprimierenden Zelle und die reverse Signaltransduktion in der Ephrin-B-exprimierenden Zelle aktiviert. Eph und Ephrine sind aufgrund unterschiedlicher Sequenzähnlichkeiten und Bindungsaffinitäten in A-Klassen und B-Klassen unterteilt. Ephrin-A-Liganden sind durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Membran gebunden und interagieren mit EphA-Rezeptoren. Ephrin-B-Liganden besitzen eine kurze zyttoplasmatische Domäne und binden EphB-Rezeptoren. Die hochaffine Bindung zwischen Eph und Ephrinen findet an der extrazellulären Rezeptor- bzw. Liganden-Bindedomäne (RBD/ LBD) statt. Die Aktivierung der Tyrosin-Kinase kann einerseits durch die Phosphorylierung der Tyrosinreste hervorgerufen werden (orangenes P) oder auch durch die Phosphorylierung von Serin/ Threoninresten (gelbes P). Abkürzungen: RBL: Rezeptor-Bindedomäne; LBD: Liganden-Bindedomäne; SAM: steriles  $\alpha$ -Motiv; PDZ: PSD 95 (*Postsynaptic Density 95*) Dlg (*Drosophila discs large*) ZO-1 (*Zonula Occludens-1*)-Bindemotiv. Übernommen und modifiziert aus Pasquale *et al.*, 2010 (198).

### 3.7.3 Eph-Rezeptor Signalweg

Voraussetzung für eine Aktivierung der Kinase-Aktivität der Eph-Rezeptoren ist der Zell-Zell-Kontakt, sodass die Membran-gebundenen Rezeptoren und Liganden interagieren können, was zu einer Multimerisierung und Zusammenlagerung und dadurch zur Aktivierung der Signaltransduktion führt (211). Eine intermediäre Bindung

der Subklassen findet bis auf wenige Ausnahmen nicht statt. EphA-Rezeptoren binden bevorzugt Ephrin-A-Liganden, wogegen EphB-Rezeptoren bevorzugt Ephrin-B-Liganden binden. Ausnahmen bilden der EphA4-Rezeptor, der alle Ephrin-B-Liganden binden kann und der EphB2-Rezeptor, der auch den Ephrin-A5-Liganden binden kann. EphB4 bildet unter den Eph-Rezeptor-Tyrosinkinasen eine Ausnahme, da es ausschließlich Ephrin-B2 mit hoher Affinität bindet (212). Dahingegen kann Ephrin-B2 alle EphB-Rezeptoren wie auch EphA4 binden (198, 210, 213).

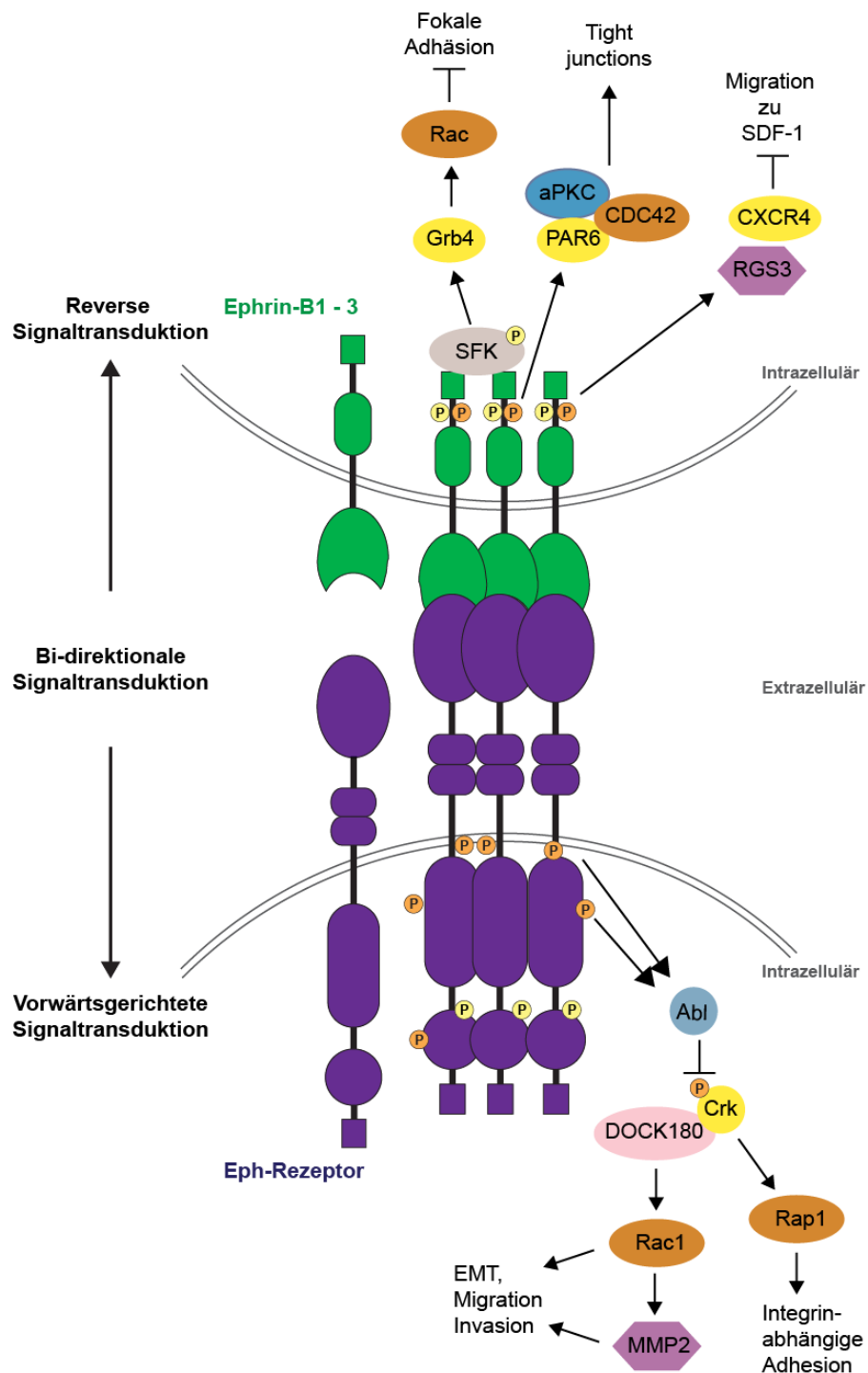
Die Tyrosinkinase-Domäne in der cytoplasmatischen Region der Eph-Rezeptoren ist bei Abwesenheit der Ephrin-Liganden durch die inhibitorische Interaktion mit der eigenen juxtamembranen Domäne inaktiv (205). Durch die Bindung von Liganden, werden Eph-Rezeptoren stabilisiert und bilden daraufhin hochaffine Heterodimere. Die Eph- und Ephrin-Moleküle sind innerhalb des Komplexes genau positioniert, was letztlich zu einer Bildung von Tetrameren und zur Aggregation und sogenannten höhergeordneten-Clustern führt (211, 214). Dadurch wird die trans-Aktivierung des Rezeptors durch die Autophosphorylierung von zwei juxtamembranen Tyrosinresten initiiert (215, 216). Durch die Tyrosinphosphorylierung wird dann die intermolekulare Inhibition zwischen der juxtamembranen Domäne und der Kinase-Domäne unterbrochen, sodass die Kinase-Domäne durch Veränderung des Konformationszustandes in die aktive Form konvertiert und so die Affinität zur Substratbindung erhöht wird (205, 214, 215). Die aktive Tyrosinkinase wiederum phosphoryliert weitere Moleküle, unter anderem auch die Tyrosinkinase-Domänen von benachbarten Eph-Rezeptoren. Dadurch binden Phosphotyrosin-bindende Adaptormoleküle mit ihren Src-homologe-2 (SH2)- und SH3-Domänen oder PDZ-Domänen an die juxtamembrane Domäne beziehungsweise das PDZ-Bindemotiv der Eph-Rezeptoren und initiieren so die nachgeschalteten Signalkaskaden (199, 204) (Abbildung 3.11).

Eines der wichtigsten Signalkaskaden von Eph-Rezeptoren ist die Umgestaltung des Aktinzytoskelett. Somit beeinflusst Eph auch die Zellmorphologie, Adhäsion, Migration und Invasion der Zellen. Eph und Ephrine agieren generell eher durch eine Umgestaltung des Zytoskeletts, als durch eine transaktive Genregulation (217, 218). Auf zellularer Ebene bedeutet dies die Organisation von Lammellopodien- und Filopodienretraktion durch die Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts. Die Eph-Rezeptoren können dabei die Umbauprozesse des Zytoskeletts während der Migration durch die Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie (RhoA, Rac1 und Cdc42) beeinflussen, indem sie repulsive Signale aktivieren, die die Zellbindung an die EZM schwächen. Die dynamischen Veränderungen des Aktinzytoskeletts führen dann zur Kontraktion der Eph-exprimierenden Zelle gegenüber der Ephrin-exprimierenden Zelle

(217, 219). Die Rho-Familie GTPasen werden durch Rho-Familie Guanin Nukleotid Austauschfaktoren (Rho-GEF) kontrolliert, die wiederum den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriophosphat (GTP) vermitteln. So befinden sich die RHO-GTPasen entweder in einer aktiven GTP-gebundenen oder einer inaktiven GDP-gebundenen Konformation. Generell können die Rho-Proteine die Migration und Adhäsion der Zytoskelettmoleküle beeinflussen. Im Gehirn reguliert aktiviertes Rho die Aktinfilamente namens *stress fiber* und die Bildung der fokalen Adhäsion sowie den Kollaps des Wachstumskegels. Aktiviertes Rac und Cdc42 hingegen vermitteln die Extension von Lamellipodien beziehungsweise von Filopodien (220, 221). Auch hier ist jedoch weitestgehend unklar wie die Signalgebung der verschiedenen Eph und Ephrine in unterschiedlichen Zelltypen erfolgt. So wird Rac1 durch EphB-Rezeptoren aktiviert, wogegen die Rac1-Aktivität in intestinalen Epithelzellen durch Ephrin-B1 verringert wird (218, 222). Interessanterweise aktivieren die EphA- und EphB-Rezeptoren unterschiedliche Rho-GTPasen. EphA-Rezeptoren können RhoA direkt durch den konstitutiv gebundenen Austauschfaktor Ephexin (*Eph-interacting exchange protein 1*) aktivieren und so den Austausch von GDP zu GTP katalysieren (219, 223). EphB-Rezeptoren hingegen interagieren mit Intersectin, einem Austauschfaktor von Cdc42 und Kalirin, dem Austauschfaktor von Rac (224-226). Außer den Rho-GTPasen sind die Eph-Rezeptoren auch in die Regulation von Ras-GTPasen wie H-Ras involviert und in den Integrin-vermittelten Signalweg über FAK und JNK zur Adhäsion der Zellen (217, 227).

#### **3.7.4 Ephrin-reverse Signalkaskade**

Die Besonderheit der Ephrin-B Gruppe ist, dass sie die Möglichkeit einer bidirektionalen Signalverarbeitung besitzt, wobei die Ephrin-B-Liganden die Signaltransduktion der Eph-Rezeptoren induzieren und auch eine Signaltransduktion in der Zelle aktivieren, auf der die Liganden exprimiert werden. Somit agieren sie als Ligand und gleichzeitig als Rezeptor mit der Fähigkeit zur vorwärts-gerichteten, wie auch einer reversen Signalgebung (Abbildung 3.11). Ephrin-Liganden bilden auch hochaffine Heterodimere, wodurch die Bindung an Eph-Rezeptoren ausgelöst wird (211, 217). Die Oligomerisierung und Anhäufung der Rezeptoren und Liganden an der Oberfläche ist wichtig für die Aktivierung der reversen Signalfunktion (204).



**Abbildung 3.11: Tumorsuppressor-vermittelte Signalwege von EphB und Ephrin-B.** Ephrin-B wird von Src-Familie-Kinasen (SFK) phosphoryliert und aktiviert, indem sie an die Ephrin-B-Cluster binden. Die SFK interagieren mit den phosphorylierten Tyrosinresten (orangenes P) der Ephrin-B-Liganden über ihre SH2-Domänen. Ephrin-B reguliert die Umgestaltung des Zytoskeletts durch die Bindung mit Grb4 oder auch der inhibierten Bindung an PAR6 aufgrund der Phosphorylierung von Ephrin-B. Ephrin-B kann auch die Migration von Zellen inhibieren, indem es RGS3 bindet, welches das CXCR4-gekoppelten G-Protein inhibiert. EphB wiederum kann die Signalwege von Abl-RAC1-MMP2, den RAS-Raf-ERK regulieren und inhibiert letztlich über verschiedene molekulare Prozesse die Tumorprogression und Migration. Übernommen und modifiziert aus Pasquale *et al.*, 2010 (198).

Die zytoplasmatische Domäne der Ephrin-B-Liganden enthält fünf hoch konservierte Tyrosinreste, die durch die Bindung der Ephrin-B-Liganden an EphB-Rezeptoren aktiviert und phosphoryliert werden (209). Allerdings fehlt Ephrinen eine intrinsische Kinase-Domäne, weshalb sie keine katalytische Aktivität besitzen. Für die Signaltransduktion ist daher eine Zusammenarbeit zytoplasmatischer, Phosphotyrosin-bindender Proteine essentiell. Die Phosphorylierung wird von Src-Familie-Kinasen vermittelt (SFK), die durch die Bindung von Eph-Rezeptoren aktiviert werden und dadurch an die Ephrin-B-Cluster binden. Die zytoplasmatischen Proteine interagieren mit den phosphorylierten Tyrosinresten der Ephrin-B-Liganden über ihre SH2-Domänen (198, 228, 229). Bisher konnten PDZ-Domäne-Proteine, und Src-homologe-2 (SH2)-Domäne-Proteine bei der Bindung an Ephrin-B identifiziert werden. SH2-Domäne-Proteine interagieren mit den phosphorylierten Tyrosinresten im cytoplasmatischen Teil der Ephrin-B-Liganden, wie zum Beispiel Grb4 (*Growth-factor-receptor-bound protein 4*) (230).

Wie die Eph-Rezeptoren sind auch Ephrin-B-Liganden in der Umgestaltung des Aktinzytoskelett involviert. Hierbei spielen die zytoplasmatischen PDZ-Domäne-Proteine eine Rolle wie die Tyrosin-Phosphatase PTP-BL (229), GRIP1 und GRIP2, Pick1 (*protein kinase C-interacting*), PAR6 (*partitioning-defective protein 6*) und PDZ-RGS3, die mit den Ephrin-B-Liganden interagieren (204, 218, 231-233). Die Interaktionen mit den Proteinen sind essentiell für eine Reihe von Signalkaskaden, die in der Regulierung von Zell-Zell-Kontakten (232), der migratorischen Regulation (233) und auch in der Stabilisierung anderer Membranproteine beteiligt sind (234).

### 3.7.5 Adhäsives versus repulsives Signal

Die Folge der Eph- und Ephrin-Interaktionen sind meist repulsive zelluläre Signale, wie bei der Bildung des neuronalen Wachstumskegels (235). Es konnten jedoch auch Beispiele von adhäsiven Eph- und Ephrin-vermittelten zellulären Antworten gezeigt werden (236). Wie genau die Entscheidung der zellulären Antwort für ein repulsives oder adhäsives Signal entsteht, konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden. Der Clustering-Grad der Eph/ Ephrin-Komplexe und die daraus resultierende Signalstärke sind wohl ausschlaggebend für die variablen Signale (201, 210). Interessanterweise resultiert ein Verlust der zytoplasmatischen Ephrin-B-Domäne in einer Adhäsion der Zellen (236). Ein alternativer Mechanismus der Signalgebung für ein repulsives Signal wurde durch proteolytische Spaltung der extrazellulären Domänen und Endozytose von Eph- und Ephrin-Komplexen nachgewiesen. So konnten in endozytotischen Vesikeln von

Eph- und Ephrin-exprimierenden Zellen nach erfolgreicher Zell-Zell-Interaktion und Signalaktivierung, intakte Rezeptor-Liganden-Komplexe und auch Fragmente der Plasmamembran gefunden werden. Die Endozytose und Internalisierung von Eph/Ephrin-Komplexen resultierte in einer Degradierung, was zu verringerten Eph-Leveln führte. Dies stellt einen alternativen Mechanismus für die Änderung der adhäsiven Interaktion in ein repulsives Signal dar (198, 237).

### **3.7.6 *Cis* versus *trans*-Interaktionen**

Da Eph und Ephrine in derselben Zelle exprimiert werden können, wurde untersucht, ob eine *cis*-Phosphorylierung durch laterale Bindungen auftreten kann, in der Eph und Ephrine an derselben Zelloberfläche interagieren. Im axonalen Wachstumskegel von retinalen Ganglienzellen konnte eine *cis*-Interaktion von EphA3 und Ephrin-A5 beobachtet werden, die beide simultan exprimiert wurden. Derartige *cis*-Interaktionen inhibieren wahrscheinlich interzelluläre *trans*-Interaktionen. Jedoch sind die meisten Eph und die dazugehörigen Ephrine in getrennten Subdomänen der Plasmamembran exprimiert und dadurch nicht in der Lage *cis*-Interaktionen einzugehen, wie in motorischen Neuronen des Rückenmarks gezeigt werden konnte (210, 238, 239).

### **3.7.7 Eph und Ephrine in der Tumorbilogie**

Da Eph und Ephrine sowohl in Tumorzellen als auch in Blutgefäßen stark exprimiert werden, ist eine relevante Funktion innerhalb der Tumorentwicklung naheliegend. Eph und Ephrine haben nachweislich Einfluss auf Wachstum, Migration, Invasion und Angiogenese von Tumoren. Jedoch sind die zellulären Abläufe sehr komplex. Aufgrund der Vielzahl an Eph und Ephrinen und ihren unterschiedlichen Aufgaben in den Geweben, konnten auch gegensätzliche Effekte nachgewiesen werden. So konnten sowohl eine erhöhte wie auch eine verminderte Expression von Eph und Ephrinen in Tumorzellen gezeigt werden. Dabei können sie die onkogenen Signalwege entweder aktivieren oder reprimieren, abhängig von der Eph- und Ephrin-Zusammensetzung in den Zellen und dem umliegenden Gewebe (198, 240-242).

Die divergenten Subpopulationen von Tumorzellen exprimieren meist unterschiedliche Kombinationen von Eph-Ephrin-Komplexen. Die daraus resultierenden repulsiven wie auch adhäsiven Signale können die Trennung von Zellpopulationen hervorrufen und damit auch die Migration und die Invasion fördern (210, 243). Außerdem werden Eph und Ephrine sowohl auf Tumorzellen als auch in der Mikroumgebung des Tumors unterschiedlich exprimiert, was in abweichenden Zell-Zell-Kommunikationen

zwischen den Tumorkompartimenten resultieren kann (240, 244, 245). Es ist auch wahrscheinlich, dass Mutationen und epigenetische Regulationen von Eph und Ephrinen bei der Tumorentwicklung eine Rolle spielen. Tatsächlich wurden bisher in den meisten Tumorzellen Mutationen der Eph-Rezeptoren gefunden die mit Beeinträchtigung der Eph-Kinasefunktion oder auch einem Verlust der Heterozygotie (LOH) einhergehen (246-248). Auch wenn die Eph-Rezeptor-Expression in Tumoren oft erhöht ist, sind sie meist nur schwach durch Ephrine aktiviert, was anhand des Tyrosinphosphorylierungs-Niveaus gezeigt werden konnte (202, 240, 249).

Im Glioblastom konnte für EphB2 eine Migration- und Invasion-fördernde Wirkung *in vivo* nachgewiesen werden, indem R-Ras aus der GTPase-Familie den MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)-Signalweg inhibierte und so die Zellproliferation und Zelladhäsion reduzierte (162, 250). Jedoch konnte für EphB-Rezeptoren im Kolonkarzinom eine Tumorsuppressorfunktion gezeigt werden, indem die EphB-Rezeptoren, durch eine E-Cadherin-abhängige Adhäsion zwischen den Tumorzellen, die Tumorzellen und das Parenchym in Kompartimente aufgeteilt haben. Durch die repulsiven Signale von EphB gegenüber Ephrin-B1 konnten die EphB-exprimierenden Zellen nicht in die Ephrin-B1-exprimierenden Bereiche eindringen. Außerdem korrelierte der Malignitätsgrad des Kolonkarzinoms in mehreren Untersuchungen stark mit einem Verlust der EphB-Expression (242, 243, 251, 252). Auch wurden erhöhte EphA2-Niveaus in Tumorgefäßen und erhöhte Ephrin-A1-Niveaus in Tumorzellen und auch Tumorgefäßen verschiedener Karzinomkrankungen im Zusammenhang mit einer anti-angiogenen Resistenz aufgrund von Ephrin-A1-induzierter Revaskularisierung beschrieben (202, 253).

### **3.7.8 EphB4 und Ephrin-B2 in der Tumorbilogie**

In der Tumorbilogie spielen EphB4 und dessen Ligand Ephrin-B2 eine wichtige, wenn auch kontroverse Rolle. EphB4 zeigt in verschiedenen Tumorarten unterschiedliche Expressionsmuster. So konnte im Ovarialkarzinom eine erhöhte EphB4-Expression nachgewiesen werden (249). Im kolorektalen Karzinom hingegen konnte eine Runterregulation oder eine LOH von EphB4 gezeigt werden (242, 243, 252). In Melanomzellen hat EphB4 durch die Reorganisation des Rho-vermittelten Aktinzytoskeletts die Migration der Tumorzellen gefördert (254). EphB4 zeigt jedoch auch Tumorsuppressor-Funktionen. In Brustkrebszellen hat EphB4 eine Ephrin-B2-unabhängige Inhibition der Migration gezeigt, indem Integrin- $\beta$ 1 runterreguliert und dadurch die Zelladhäsion verringert wurde (255). Die Tumorsuppressor-Aktivität von EphB4 konnte auch in Brustkrebszellen über die Aktivierung des Abl-Crk-Signalweges

nachgewiesen werden, was zur verminderten Tumorzellproliferation wie auch zur verminderten Invasion führte (256). Zusätzlich haben *EphB4*<sup>+/-</sup>-Mäuse bei Dopeso *et al.* 2009 eine umfassende transkriptionelle Reprogrammierung in Darmkrebszellen gezeigt, die ebenfalls eine anti-proliferative und auch anti-invasive Funktion von EphB4 vermuten lässt (257).

Ephrin-B2 spielt ebenso eine kontroverse Rolle in der Tumorbologie. In Prostatakrebszellen förderte Ephrin-B2 die Migration (258) und auch in Glioblastomzellen hatte Ephrin-B2 eine Invasions-fördernde Wirkung und zeigte erhöhte Expressionslevel (259). Jedoch besitzt auch Ephrin-B2 tumorsuppressive Eigenschaften. In Brustkrebszellen von transgenen Mäusen beispielsweise erhöhte die Expression von mutiertem Ephrin-B2 das Tumorwachstum und die Metastasierung. Die Ephrin-B2-Moleküle der mutierten transgenen Mäuse war am C-terminalen Ende verkürzt, wodurch die konservierten Tyrosinreste und das PDZ-Bindemotiv fehlten und die reverse Signaltransduktion unterbunden wurde. Dagegen war die extrazelluläre Domäne von Ephrin-B2 intakt und so die Rezeptoraktivierung weiterhin gewährleistet (260).

Vor allem in der Blutgefäßentwicklung wurde der Einfluss von EphB4 und Ephrin-B2 ausgiebig untersucht. Während sich die Expression von EphB4 auf endotheliale Zellen beschränkt, wird Ephrin-B2 neben Endothelzellen auch in Perizyten und vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert (261, 262). Die schweren Defekte bei Tieren mit einer Ephrin-B2- und EphB4-Null-Mutation (*knock-out*) weisen auf die besondere *in vivo*-Relevanz des Ligand-Rezeptorpaares hin. Die Phänotypen der Ephrin-B2- und EphB4-*knock-out*-Tiere sind vergleichbar. Die Mäuseembryos sterben zwischen Tag 9,5 und 10 mit schweren Defekten in der Vaskularisierung sowie mangelhafter Ausbildung von Trabekeln und Endokardkissen am Herzen (262, 263). Für Ephrin-B2 konnte durch eine Entfernung der zytoplasmatischen Domäne ein ähnlicher Phänotyp wie bei den Ephrin-B2-*knock-out*-Tieren gezeigt werden, was auf eine wesentliche Bedeutung der Ephrin-B2 reversen Signalgebung hinweist (264). In der Blutgefäßentwicklung werden EphB4 und Ephrin-B2 unterschiedlich in venösen und arteriellen Endothelzellen exprimiert und sind an der arteriovenösen Differenzierung beteiligt. Dabei vermittelt EphB4 die Bildung von venösen Gefäßen, Ephrin-B2 hingegen die Bildung von arteriellen Gefäßen (265-267). Ephrin-B2 ist auch in der Lage indirekt über die Internalisierung von VEGFR2 und VEGFR3 die Signaltransduktion im Zusammenhang mit Rac1, Akt und Erk zu beeinträchtigen und somit auch die Angiogenese und Lymphangiogenese zu kontrollieren (38).

Durch die unterschiedlichen Wirkmechanismen treten die Eph und Ephrine als entscheidende Regulatoren in der Tumorbologie auf. Dabei ist ihre exakte biologische



Rolle noch nicht endgültig geklärt, da sie onkogene Signale wie auch tumorsuppressive Signale vermitteln können. Die Aufklärung der komplexen molekularen Eph- und Ephrin-Abläufe wird zum Verständnis der Pathophysiologie von verschiedenen Karzinomarten und zur Entwicklung neuer Therapieformen beitragen.

### 3.8 Zielsetzung

Das *Glioblastoma multiforme* zeichnet sich durch zentrale Nekrosen, hypoxische Bereiche und periphere Tumorzellinvasion in das umliegende Hirngewebe aus. Glioblastompatienten haben trotz der aggressiven therapeutischen Ansätze, die derzeit aus einer Kombination von Tumorresektion, Radiotherapie und Chemotherapie bestehen, eine sehr geringe Überlebensrate. Die diffuse Invasion in das umliegende Hirngewebe ist einer der Hauptgründe für die Rezidivbildung und die infauste Prognose von Glioblastompatienten. Daher ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die die Tumorzellinvasion steuern, entscheidend für die Optimierung der therapeutischen Ansätze in der Glioblastomtherapie. Die Rolle des hypoxischen Mikromilieus in der Induktion eines aggressiven Tumorphänotyps ist gut validiert und wird insbesondere über die Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  reguliert. Bisher ist allerdings wenig über die HIF-abhängigen Zielgene, die zur Induktion eines invasiven Tumorphänotyps führen, bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, dass Tumorzellen repulsive Signale überwinden müssen, um in das umliegende Gewebe zu invadieren. Hierzu wurde die Funktion und insbesondere die Hypoxie-abhängige Regulation des bidirektionalen EphB/Ephrin-B-Systems, das repulsive Signale bei der Axonfindung vermittelt, in der Glioblastominvasion untersucht. Zunächst sollte die Regulation der Eph und Ephrine auf genetischer und epigenetischer, sowie Hypoxie-abhängig auf molekularer Ebene untersucht werden. Hierfür sollte neben *in vitro*-Untersuchungen auch ein *knock-out*-Mausgliomamodell für *in vivo*-Analysen hergestellt werden. Anschließend sollten Eph- und Ephrin-vorgesaltete, regulatorische Mechanismen untersucht und entsprechende humane *knock-down*-Glioblastomzelllinien generiert werden, um die funktionellen Vorgänge während der Glioblastominvasion und auch deren Progression weiter zu entschlüsseln. Im Hinblick auf eine eventuelle klinische Relevanz der generierten Daten, sollten in den *in vivo* Versuchen die Tumoren zusätzlich im Zusammenhang mit der anti-angiogenen Therapie untersucht werden. Hiermit sollten Signalwege aufgedeckt werden, die möglicherweise ein attraktives therapeutisches Ziel zur Inhibition der Tumorzellinvasion darstellen und darüber hinaus den Tumor-resistenten Mechanismen während der anti-angiogenen Behandlung entgegenwirken könnten.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien

Lösungsmittel sowie Standardchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Germany) und Applichem (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

#### 4.1.2 Antibiotika

Alle Lösungen wurden steril-filtriert (0,22 µm, # SLGV033RS Millipore).

##### 4.1.2.1 Antibiotika zur bakteriellen Selektion

Antibiotika	Stammlösungen	Endkonzentration
Ampicillin (# A9598, Sigma-Aldrich)	50 mg/ml in <i>aqua dest.</i>	50 - 100 µg/ ml
Kanamycin sulfate (# K-1377, Sigma-Aldrich)	50 mg/ml in <i>aqua dest.</i>	50 µg/ ml
Spectinomycin Dihydrochloride (# S4014, Sigma-Aldrich)	10 mg/ml in <i>aqua dest.</i>	50 µg/ ml

Tabelle 4.1: Liste der Antibiotika zur bakteriellen Selektion

### 4.1.2.2 Antibiotika für die Selektion von transduzierten Zelllinien

Antibiotika	Stammlösungen	Konzentration zur Selektion	Konzentration zur Kultivierung der Zellen
Blasticidin S HCL (# R210-01, Invitrogen)	6 mg/ml in <i>aqua dest.</i>	6 mg/ml für SNB19 und LN-229 Zellen	6 µg/ml für SNB19 und LN-229 Zellen
Puromycin (#P9620, Sigma-Aldrich)	10 mg/ml Fertiglösung	4 µg/ml for G55TL cells	2 µg/ml für G55TL und LN-229 Zellen
G418 (Geneticin) (# 11811-064, Invitrogen)	50 mg/ml in <i>aqua dest.</i>	200 µg/ml	100 µg/ml

Tabelle 4.2: Liste der Antibiotika für die Selektion von transduzierten Zelllinien

### 4.1.3 Antikörper

#### 4.1.3.1 Primärantikörper

Primärantikörper, Wirt (Anwendung)	Bestellnummer	Hersteller
anti-CD34 (MEC 14.7), Ratte (IHC)	#ab8158	Abcam
anti-ephrin-B2, Ziege (IP)	#AF496	R&D Systems
anti-GFAP, Maus (WB)	#G 3893	Sigma
anti H-Ras, Maus (WB)	#OP23	Calbiochem (Merk)
anti-human HIF-1 $\alpha$ , Maus (WB)	#610959	Becton Dickinson
anti-HIF-1 $\alpha$ , Kaninchen (IF)	#10006421	Cayman chemical
anti-human HIF-2 $\alpha$ , Kaninchen (WB)	#NB 100-122	Novus Biologicals
anti-Histon H3, Kaninchen (IF)	# IHC-00061	Bethyl lab
anti-human-Nuclei, Maus (IF)	# MAB4383	Millipore

Anti-human IgG Fc-fragment cy3, Ziege	#109-165-098	Dianova (Jackson)
Anti-human IgG Fc-fragment, Esel	#709-005-098	Dianova (Jackson)
Anti-human IgG- Fc-fragment cy2, Esel	#709-225-098	Dianova (Jackson)
anti-Myc-tag, Kaninchen (ChIP)	#ab9106	Abcam
anti-murin Podocalyxin, Ziege	# AF1556	R&D Systems
anti-SNAI1 (Snail), Ratte (WB)	#4719	Cell Signaling
anti-SNAI2 (Slug), Kaninchen (WB)	#ab38551	Abcam
anti-SV40-large-T-antigen, Maus (WB)	#DP02	Calbiochem (Merk)
anti-Tubulin- $\alpha$ AB-2, Maus (WB)	#DNL-09992	Dianova (Jackson)
anti-TWIST1, Kaninchen	#sc15393	Santa Cruz
anti-TWIST2, Maus	#ab57997	Abcam
anti-ZEB2, Kaninchen (WB)	#sc48789	Santa Cruz
anti-ZEB2, Kaninchen, (ChIP)	#SAB2102760	Sigma
anti-V5, Maus (WB)	#R960-25	Invitrogen

Tabelle 4.3: Liste der verwendeten Primärantikörper

#### 4.1.3.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper, Wirt, Anwendung	Bestellnummer	Hersteller
Esel anti-Ziege IgG (H+L) HRPO konjugiert (WB)	#705-035-003	Dianova (Jackson)
Ziege anti-Maus IgG (H+L) HRPO konjugiert (WB)	#115-035-003	Dianova (Jackson)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) HRPO konjugiert (WB)	#111-035-003	Dianova (Jackson)
Ziege anti-Ratte IgG (H+L) HRPO konjugiert (WB)	#112-035-062	Calbiochem (Merk)
Esel anti-Ziege Alexa 488	#A-11055	Invitrogen
Esel anti-Ziege Alexa 568	#A-11057	Invitrogen
Esel anti-Maus Alexa 488	#A10037	Invitrogen
Esel anti-Maus Alexa 568	#A10037	Invitrogen
Ziege anti-Maus Alexa 488	#A-11029	Invitrogen

Ziege anti-Kaninchen 568	#A-11011	Invitrogen
Maus Ephrin-B2-Fc	#496-EB-200	R&D

**Tabelle 4.4:** Liste der verwendeten Sekundärantikörper

#### **4.1.4 Größen- und Molekulargewichtsstandards**

##### **4.1.4.1 DNA-Leitern**

**10 bp DNA-Leiter:** # 10821-015, Invitrogen

**100 bp DNA-Leiter:** # 15628-018, Invitrogen

**1 kb DNA-Leiter:** # 15615-024, Invitrogen

##### **4.1.4.2 Protein-Größenstandards**

**Spectra Multicolor High Range Protein-Leiter:** #SM1851, Fermentas Life Science

**PageRuler Prestained Protein-Leiter:** #SM0671, Fermentas Life Science

#### **4.1.5 Lösungen, Puffer und spezifische Reagenzien**

**DEPC-H<sub>2</sub>O:** 1 ml Diethylpyrocarbonat (#K028, Roth) wurde in 1l *aqua dest.* über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert. Lagerung bei RT.

##### **4.1.5 1 Für Tierversuche**

**Anästhesie:** 9 ml 0,9% NaCl-Lösung, 2 ml Ketamin 10% (# FS1670041 bela-pharm GmbH) und 0,5 ml Xylazin 2% (CEVA Tiergesundheit GmbH).

**4% Paraformaldehyd (PFA):** 80 g PFA gelöst in 1,5 ml *aqua dest.* und auf 70°C erhitzt, mit NaOH auf pH 11 eingestellt (bis Lösung klar war), 100 ml 20x PBS dazugegeben und der pH mit HCl final auf 7,4 eingestellt. Lagerung bei -20°C.

**0,5 M PB, pH 7,4:** 115 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 385 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, pH 7,4. Lagerung bei RT.

**Cryo-Protection-Lösung (CPS):** 500 ml 0,1M PB pH 7,4, 250 ml Ethylenglycol (# 9516.1 Roth), 250 ml Glycerin (# 3783.1 Roth). Lagerung bei RT.

**30% Saccharose in 0,1 M PB pH 7,4:** 0,1 M D (+)-Sucrose (# 84099 Fluka). Steril-filtriert und bei 4°C gelagert.

**Avastin® (Bevacizumab):** fertig gestellte anti-human-VEGF-Antikörper-Lösung (25 mg/ml), Roche

**Gamunex®:** fertig gestellte human-IgG-Lösung (100 mg/ml), Talecris Biotherapeutics

#### 4.1.5.2 Für Bakterielle Kulturen

**LB-Agar (Luria-Bertani-Agar):** 32g LB-Agar-Puder (# 22700025, Invitrogen) wurde in 1l *aqua dest.* gelöst, die Lösung bei 121°C für 15 min autoklaviert und nach Abkühlung auf ca. 60°C in sterile Platten gegossen. Lagerung bei 4°C.

**LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):** 20g LB-Puder (#X964.1, ROTH) wurde in 1l *aqua dest.* gelöst, die Lösung bei 121°C für 15 min autoklaviert und bei 4°C gelagert.

#### 4.1.5.3 Für Zellkultur

**Accutase:** # L11-007, PAA Laboratories GmbH

**Astrozytenmedium:** 422 ml Basal Medium Eagle (BME) (#41010, Gibco), 15 ml 20% Glukose (#G-8270, Sigma) in *aqua dest.* gelöst, steril-filtriert (0,22 µm), 5 ml Natrium Pyruvat (#11360, Gibco), 5 ml HEPES (#15630, Gibco), 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin (#P11-010, PAA), 50 ml Pferdeserum (#H1270, Sigma), 500 µl Mitoserum-Extender (#355006, BD)

**2,5 M CaCl<sub>2</sub>:** steril-filtriert (0,22 µm) und bei 4°C gelagert.

**10 mM Chloroquine:** steril-filtriert (0,22 µm) und bei -20°C gelagert (#C6628-25G, SIGMA).

**CO<sub>2</sub>-unabhängiges Medium ohne L-Glutamine:** # 18045-054 Gibco, Invitrogen,

**Dimethyl sulfoxide (DMSO):** # D2650, Sigma-Aldrich

**D-MEM/F-12 (1:1) (with GlutaMAX™ I):** # 31331-028, Gibco, Invitrogen

**D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose (with GlutaMAX™ I, 4500 mg/L D-Glucose, Sodium Pyruvate):** # 31966-021, Gibco, Invitrogen

**FCS (Fetal calf serum, fötales Kälberserum):** PAN-Biotech GmbH, Aidenbach.

**Generelles Zellkulturmedium:** 500 ml DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), 10%FCS, 1% Penicillin-Streptomycin (# P0781, Sigma-Aldrich)

**2x HBS:** 281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,12, steril-filtriert (0,22 µm) und bei -20°C gelagert.

**Opti-MEM® I Reduced Serum Medium:** # 11058, Gibco, Invitrogen

**Neurosphären-Medium:** 500 ml D-MEM/F-12, 10 ml B-27 Serum-Free Supplement (# 17504-044, Invitrogen), 5 ml Amphotericin B solution (# A2942, Sigma- Aldrich), 2,5 ml 1 M HEPES (# 511-001 PAA Laboratories GmbH), 0,5 ml Gentamicin (# 15750037, Invitrogen), EGF (20 ng/ml, frisch dazugeben) (#AF-100-15, PeproTech), FGF (20 ng/ml, frisch dazugeben) (#100-18B, PeproTech)

**PBS (Phosphate Buffered Saline):** #H15-002, PAA

**Polybrene (Hexadimethrine bromide):** 6 mg/ml in *aqua dest.* gelöst, steril-filtriert (0,22 µm) und bei -20°C gelagert (#H9268-5G, SIGMA).

**Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA):** 10 mg/ml (pHEMA # P3932-256 Sigma-Aldrich) in 95% Ethanol gelöst, steril-filtriert (0,22 µm) und bei RT gelagert.

**Trypsin/EDTA:** # 25300-62, Gibco, Invitrogen

#### 4.1.5.4 Für Färbungen

**Ammoniumwasser:** 0,5 ml Ammonium (25% ammonia-Lösung) in 200 ml *aqua dest.* verdünnt.

**Citrat-Puffer (0,01 M) pH 6,0:** 1,47g tri-sodium citrate (dihydrate) (MW 294,1, Sigma) wurde in 500 ml *aqua dest.* gelöst und auf pH 0.6 eingestellt.

**Cytoseal XYL:** #8312-4, Richard-Allan Scientific

**DAB-Lösung:** # K3467, Dako (1 ml DAB-Substrat pro Tropfen DAB chromogen)

**DAPI:** # A1001/0010 Applichem (5 mg/ml)

**Eosin:** 1% Eosin Y disodium salt (# E4382-256, Sigma-Aldrich) wurde in 70% Ethanol gelöst. 1 Tropfen Eisessig wurden pro 100 ml Lösung dazugegeben.

**Fluorescent mounting medium:** #S3023, Dako

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%):** #8070.2, Roth

**Mayer's Haematoxylin:** #A 4840-500, Applichem

**normales Ziegen (goat) Serum:** #B11-035, PAA Laboratories GmbH



**normales Esel (donkey) Serum:** #017-00-121, Dianova (Jackson)

**20x PBS:** 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4. Lagerung bei RT.

**TBS:** 0,05 M Tris, 0,3 M NaCl, in *aqua dest.* gelöst und auf pH 7,6 eingestellt.

**TBST:** TBS + 0,1% Triton in *aqua dest.* gelöst

**Tissue Tek®:** #4583, Sakura

**To-pro-3 iodide:** #T3605, Invitrogen (1mM Lösung in DMSO)

**Tris/EDTA (TE) Puffer pH 8,0:** 10 mM Tris Base, 1 mM EDTA Lösung, 0,05% Tween 20, pH 8,0

**Xylol:** #8685, Merck

#### 4.1.5.5 Für *Western-Blot*-Analysen

**30% Acrylamide/Bis-Lösung:** #161-0157, Bio-Rad

**TEMED:** #161-0801, Bio-Rad

**Bio-Rad DC Protein Assay:** #500-116, Bio-Rad

**Laemmli-Puffer:** 10mM Tris/HCl (pH 7,5), 2% SDS, 2mM EGTA, 20 mM NaF

**Lower Puffer:** 1,5 M Tris Base (121,6 g/mol), pH to 8,8 mit 5 M HCL einstellen;  
0,4% SDS (Lagerung bei 4°C)

**Lysis-Puffer:** 50 mM TrisHCL pH7,5, 150 mM NaCl, 0,5% TritonX-100, 10% Glycerol (Lagerung bei 4°C) + (je Frisch dazugegeben) 100 µM *p*-APMSF Hydrochloride (# 178281, Calbiochem) und Complete Inhibitor Cocktail (# 11697498001, Roche)

**10% Na-Azid:** 10g NaN<sub>3</sub> in 100 ml *aqua dest.* (Lagerung bei 4°C)

**20x PBS (Phosphate Buffered Solution):** 140 mM NaCl (58,44 g/mol) 2,7 mM KCl (74,55 g/mol) 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (177,99 g/mol) und 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (136,09 g/mol). pH 7,4

**10x Laufpuffer:** 250 mM Tris Base (121,1 g/mol), 2 M Glycin (75,07 g/mol) und 1% SDS

**8% Trenngel:** 2,7 ml 30% Acrylamid, 2,6 ml Lower-Puffer, 4,5 ml *aqua dest.*, 100 µl APS (10%), 10 µl TEMED

**12% Trenngel:** 4 ml 30% Acrylamid, 2,6 ml Lower-Puffer, 3,5 ml *aqua dest.*, 100 µl APS (10%), 10 µl TEMED

**Sammelgel:** 0,65 ml 30% Acrylamid, 1,3 ml Upper-Puffer, 4,5 ml *aqua dest.*, 100 µl APS (10%), 10 µl TEMED

**4X-Proben-Puffer:** 40 ml 10% SDS, 16 ml 1M Tris pH 6.8, 20 ml Glycerol 100%, 19 ml *aqua dest.* Lagerung bei -20°C. Für die Proteinlysate wurde kurz vor dem Auftragen angesetzt: 800µl 4x Proben-Puffer + 200 µl 1% Bromphenolblau + 50µl β-Mercaptoethanol und 30 µl von der Mixtur mit 90 µl Proteinlysate gemischt.

**Stripping-Puffer:** 200 mM glycine (pH 2,5) und 0,05% Tween 20 (# A4974,0100, Applichem)

**10x Transferpuffer:** 200 mM Tris Base (121,1g/mol), 1,5 M Glycine (75,07 g/mol) and 1% SDS

**Upper-Puffer:** 0,5 M Tris Base (121,6 g/mol), adjust the pH to 6,8 with 5 M HCL, 0,4% SDS (storage at 4°C)

#### 4.1.6 Plasmide

**Ad-CMV-GFP:** GFP-Expressionskassette im Adenovirus-Type5 (dE1/E3)-Vektor, (#1060, Vector Biolabs)

**Ad-Cre-GFP:** Cre recombinase/GFP-Expressionskassette im Adenovirus Type5 (dE1/E3) (#1700, Vector Biolabs)

**Ephrin-B2-pGL3:** Luciferase-Reporter-Konstrukt unter der Kontrolle des Ephrin-B2-Promotors (*EFNB2*, 1.7 kb DNA-Sequenz oberhalb der TSS, Helge zum Buttler, Frankfurt)

**Ephrin-B2-mut-pGL3:** Luciferase-Reporter-Konstrukt unter der Kontrolle des mutierten Ephrin-B2-Promotors (Mutation der ZEB2-Bindestelle im Ephrin-B2-Promotor [5'-CACCTG-3' zu 5'-GGTACC-3'], Helge zum Buttler, Frankfurt)

**pBABE-puro-H-Ras-V12:** H-Ras-Expressionsvektor (#9051, Addgene)

**pBluescript II KS+ (pbs II KS+):** eukaryotischer Expressionsvektor, mit T3- und T7-Promotoren zur *in vitro* Transkription von RNA (Stratagene).

**pcDNA3.1™ D/V5-His-TOPO®:** eukaryotischer Expressionsvektor; das eingefügte Gen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors; enthält ein V5-Epitop sowie ein Polyhistidin (6xHis)- Tag (#K4900, Invitrogen).

- pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA:** In der Sequenz von hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PP-V5 (humane HIF-1 $\alpha$ -Sequenz mit mutierten Prolyl-Bindungsstellen [W. Kaelin]) wurde mittels einer Punktmutagenese an der Bindungsstelle von FIH der Asparaginrest 803 zu Alanin mutiert (Doktorarbeit Julia Wenner).
- pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA:** In der Sequenz von hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PP-V5 (humane HIF-2 $\alpha$ -Sequenz mit mutierten Prolylbindungsstellen [W. Kaelin]) wurde mittels einer Punktmutagenese an der Bindungsstelle von FIH der Asparaginrest 847 zu Alanin mutiert (Doktorarbeit Julia Wenner).
- pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-miR:** Ermöglicht die Expression von pre-miRNA-Sequenzen in Säugetierzellen nach stabiler- oder transienter Transfektion (K#4938-00, Invitrogen).
- pCM8.91:** lentivirales Helferplasmid (core-packaging Plasmid) zur Expression der Nukleokapsidproteine (*gag*) und der viralen Enzyme (*pol*) (M. Grez, Frankfurt).
- pCS3-mSIP1FL** muriner ZEB2-Expressionsvektor (G. Berx, Belgien).
- pDONR<sup>TM</sup>221:** Intermediäres Plasmid um eine pre-miRNA-Expressionskassette aus pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR mit Hilfe der Gateway-Technologie in einen lentiviralen Expressionsvektor zu klonieren. (#12536-017, Invitrogen).
- pEF6/Myc-His-hSip1FL** humaner ZEB2-Expressionsvektor (G. Berx, Belgien).
- pENTR<sup>TM</sup>4-Vektor:** Ermöglicht die Klonierung des erwünschten Genfragments in das Gateway® System. Enthält *attL1* und *attL2* Rekombinationssequenzen des Bakteriophagen  $\lambda$  für rekombinale Klonierungen in Destination-Vektoren (#11818-010, Invitrogen).
- pGIPZ-non-silencing-control:** Lentiviraler shRNAmir-Vektor der zur Kontrolle bei der Herstellung stabiler *knock-down*-Zellen diente (#RHS4346, Thermo fisher/ Open Biosystems).
- pGIPZ-shZEB2mir (human):** Short-hairpin-RNA-ZEB2-Sequenz (NM\_14795) im lentiviralen pGIPZ-Vektor (#TLP4691, Open Biosystems)

- (#RHS4430-98520521, Thermo fisher/ Open Biosystems).  
shRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.2.
- pGL2:** *Firefly*-Luciferase-Vektor (#E1641, Promega).
- pGL3:** *Firefly*-Luciferase-Vektor (#E1751, Promega).
- pLenti6/V5-DEST-Gateway®:** Lentiviraler Destination-Vektor, das eingefügte Gen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors, enthält ein V5-Epitop und lentivirale Verpackungs-Signale (#K4938-00, Invitrogen).
- pLenti6/UbC/V5-DEST-Gateway®:** Lentiviraler Destination-Vektor, das eingefügte Gen steht unter der Kontrolle des UbC-Promotors, enthält ein V5-Epitop und lentivirale Verpackungs-Signale (#K4990-00-00, Invitrogen).
- pLenti6/V5-GW/lacZ:** Lentiviraler Vektor der zur Kontrolle bei der Herstellung stabiler Überexpressionszellen diente, enthält ein V5-Epitop und lentivirale Verpackungs-Signale (#K4938-00, Invitrogen).
- pMD2-VSV-G** lentivirales Helferplasmid (ENV-Plasmid) zur Expression des Hüllproteins Glykoprotein-G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) (M. Grez, Frankfurt).
- pOT-largeT:** Large-T-antigen-Expressionsvektor (Hanahan *et al.*, 1980 (268)).
- pRL-SV40:** *Renilla*-Luciferase-Vektor zur internen Kontrolle, mit einem SV40-early-enhancer-Promoter (#E2231, Promega).
- psiCheck™-1:** *Renilla*-Luciferase-Konstrukt zur Optimierung von RNA-Interferenzen (RNAi) (#C8011, Promega).
- pVEGF13-Luci:** Luciferase-Reporter-Konstrukt unter der Kontrolle des VEGF-Promotors (M. Krieg/R. Wenger).

#### 4.1.6.1 Im Verlauf der Arbeit hergestellte Plasmide

**pENTR4™-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5:** Das hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-Fragment wurde mit *Bam*HI/ *M*ssI (*P*meI)-Schnittstellen aus pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA isoliert und über die *Bam*HI/ *E*coRV-Schnittstellen in den Gateway-pENTR™4 Vektor kloniert.

**pENTR4<sup>TM</sup>-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5:** Das hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-Fragment wurde mit *Bam*HI/ *M*ssI (*P*meI)-Schnittstellen aus pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA isoliert und über die *Bam*HI/ *E*coRV-Schnittstellen in den Gateway-pENTR<sup>TM</sup>4 Vektor kloniert.

**pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-HIF-1 $\alpha$  #1:** Für die Herstellung des pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Konstrukts welches die HIF-1 $\alpha$ -miRNA-Sequenz #1 exprimiert, wurde das Block-iT<sup>TM</sup> Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (K#4938-00, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. miRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.1.

**pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-HIF-1 $\alpha$  #2:** Für die Herstellung des pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Konstrukts welches die HIF-1 $\alpha$ -miRNA-Sequenz #2 exprimiert, wurde das Block-iT<sup>TM</sup> Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (K#4938-00, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. miRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.1.

**pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-HIF-1 $\alpha$  #3:** Für die Herstellung des pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Konstrukts welches die HIF-1 $\alpha$ -miRNA-Sequenz #3 exprimiert, wurde das Block-iT<sup>TM</sup> Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (K#4938-00, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. miRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.1.

**pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-HIF-1 $\alpha$  #4:** Für die Herstellung des pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Konstrukts welches die HIF-1 $\alpha$ -miRNA-Sequenz #4 exprimiert, wurde das Block-iT<sup>TM</sup> Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (K#4938-00, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. miRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.1.

**pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-HIF-2 $\alpha$  #1:** Für die Herstellung des pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Konstrukts welches die HIF-2 $\alpha$ -miRNA-Sequenz #1 exprimiert, wurde das Block-iT<sup>TM</sup> Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (K#4938-00, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. miRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.1.

**pcDNA™6.2-GW/EmGFP-HIF-2α #2:** Für die Herstellung des pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Konstrukts welches die HIF-2α-miRNA-Sequenz #2 exprimiert, wurde das Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (K#4938-00, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. miRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.1.

**pcDNA™6.2-GW/EmGFP-HIF-2α #3:** Für die Herstellung des pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Konstrukts welches die HIF-2α-miRNA-Sequenz #3 exprimiert, wurde das Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (K#4938-00, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. miRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.1.

**pcDNA™6.2-GW/EmGFP-HIF-2α #4** Für die Herstellung des pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Konstrukts welches die HIF-2α-miRNA-Sequenz #4 exprimiert, wurde das Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (K#4938-00, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. miRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.1.

**pcDNA™6.2-GW/EmGFP-SIMA:** Für die Herstellung des pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-Konstrukts welches die SIMA-miRNA-Sequenz exprimiert, wurde das Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (K#4938-00, Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. miRNA-Sequenz-Information siehe 4.1.7.1.

**pLenti6/V5-GW/EmGFP-HIF-1α-miR:** Für die Herstellung des pLenti6/V5-GW/EmGFP-HIF-1α-miR Konstrukts wurde die Rapid BP/LR Rekombination-Reaktion (Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit [K#4938-00, Invitrogen]) zwischen dem pDONR 221 Vektor, dem pcDNA™6.2-GW/EmGFP-HIF-1α #1 Vektor und dem pLenti6/V5-DEST-Gateway® Vektor nach Herstellerangaben durchgeführt.

**pLenti6/V5-GW/EmGFP-HIF-2α-miR:** Für die Herstellung des pLenti6/V5-GW/EmGFP-HIF-2α-miR-Konstrukts wurde die Rapid BP/LR Rekombination-Reaktion (Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit [K#4938-00, Invitrogen]) zwischen dem pDONR 221 Vektor, dem pcDNA™6.2-GW/EmGFP-

HIF-2 $\alpha$  #2 Vektor und dem pLenti6/V5-DEST-Gateway® Vektor nach Herstellerangaben durchgeführt.

**pLenti6/V5-GW/EmGFP-SIMA-miR:** Für die Herstellung des pLenti6/V5-GW/EmGFP-SIMA-miR-Konstrukts wurde die Rapid BP/LR Rekombination-Reaktion (Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit [K#4938-00, Invitrogen]) zwischen dem pDONR 221 Vektor, dem pcDNA™6.2-GW/EmGFP-SIMA Vektor und dem pLenti6/V5-DEST-Gateway® Vektor nach Herstellerangaben durchgeführt.

**pLenti6/V5-DEST-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5:** Für die Herstellung des pLenti6/V5-DEST-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5-Überexpressionkonstrukts wurde die LR Rekombination-Reaktion (Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit [K#4938-00, Invitrogen]) zwischen dem pENTR4™-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5 Vektor und dem pLenti6/V5-DEST-Gateway® Vektor nach Herstellerangaben durchgeführt.

**pLenti6/V5-DEST-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5:** Für die Herstellung des pLenti6/V5-DEST-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5-Überexpressionkonstrukts wurde die LR Rekombination-Reaktion (Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit [K#4938-00, Invitrogen]) zwischen dem pENTR4™-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5 Vektor und dem pLenti6/V5-DEST-Gateway® Vektor nach Herstellerangaben durchgeführt.

**pLenti6/UbC/V5-DEST-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5:** Für die Herstellung des pLenti6/UbC/V5-DEST-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5-Überexpressionkonstrukts wurde die LR Rekombination-Reaktion (Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit [K#4938-00, Invitrogen]) zwischen dem pENTR4™-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5 Vektor und dem pLenti6/UbC/V5-DEST-Gateway® Vektor nach Herstellerangaben durchgeführt.

**pLenti6/UbC/V5-DEST-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5:** Für die Herstellung des pLenti6/UbC/V5-DEST-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5-Überexpressionkonstrukts wurde die LR Rekombination-Reaktion (Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit [K#4938-00, Invitrogen]) zwischen dem pENTR4™-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5 Vektor und

dem pLenti6/UbC/V5-DEST-Gateway® Vektor nach Herstellerangaben durchgeführt.

**psiCheck™-1-HIF-1α-V5:** Das hHIF-1α-ΔPPA-Fragment wurde mit *Bam*HI-Schnittstellen aus pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-hHIF-1α-ΔPPA isoliert, ein Klenow-Fill-in für *Blunt ends* durchgeführt (Klenow fragment (#EP0051, Fermentas) worauf ein *Not*I-Verdau folgte und schließlich über die *Pme*I/ *Not*I-Schnittstellen in den psiCheck™-1 Vektor kloniert.

**psiCheck™-1-HIF-2α-V5:** Das hHIF-2α-ΔPPA-Fragment wurde mit *Bam*HI-Schnittstellen aus pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-hHIF-2α-ΔPPA isoliert, ein Klenow-Fill-in für *Blunt ends* durchgeführt (Klenow fragment (#EP0051, Fermentas) worauf ein *Not*I-Verdau folgte und schließlich über die *Pme*I/ *Not*I-Schnittstellen in den psiCheck™-1 Vektor kloniert.

#### 4.1.7 miRNA, shRNA und siRNA Sequenzen

##### 4.1.7.1 miRNA Oligos (Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit [K#4938-00, Invitrogen])

Farbcode: Nukleotide von miR-155 abgeleitet, antisense-Zielsequenz, loop von miR-155 abgeleitet, sense-Zielsequenz (Nukleotide 1-8 und 11-21)

**HIF-1α-miR #1** (human) obere Sequenz:

5'-TGCTGATCAAGATGCGAACTCACATTGTTTTGGCCACTGACTGACAATGTGAGCG  
CATCTTGAT-3'

**HIF-1α-miR #1** (human) untere Sequenz:

5'-CCTGATCAAGATGCGCTCACATTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAATGTGAGTTCGC  
ATCTTGATC-3'

**HIF-1α-miR #2** (human) obere Sequenz:

5'-TGCTGCCTCAAGTTGCTGGTCATCAGGTTTTGGCCACTGACTGACCTGATGAGC  
CAACTTGAGG-3'



**HIF-1 $\alpha$ -miR #2** (human) untere Sequenz:

5'-CCTGCCTCAAGTTGCGTCATCAGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTGATGACCAGC  
AACTTGAGGC-3'

**HIF-1 $\alpha$ -miR #3** (human) obere Sequenz:

5'-TGCTGTAAAGCATCAGGTTCTTCTTGTTTTGGCCACTGACTGACAAGAAGGACT  
GATGCTTTA-3'

**HIF-1 $\alpha$ -miR #3** (human) untere Sequenz:

5'-CCTGTAAAGCATCAGTCCTTCTTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAAGAAGGAACCT  
GATGCTTTAC-3'

**HIF-1 $\alpha$ -miR #4** (human) obere Sequenz:

5'-TGCTGATAACTGGTCAGCTGTGGTAAGTTTTGGCCACTGACTGACTTACCACATG  
ACCAGTTAT-3'

**HIF-1 $\alpha$ -miR #4** (human) untere Sequenz:

5'-CCTGATAACTGGTCATGTGGTAAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTTACCACAGCTG  
ACCAGTTATC-3'

**HIF-2 $\alpha$ -miR #1** (human) obere Sequenz:

5'-TGCTGCCACTGCTATCAAAGATGCTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAGCATCTG  
ATAGCAGTGG-3'

**HIF-2 $\alpha$ -miR #1** (human) untere Sequenz:

5'-CCTGCCACTGCTATCAGATGCTGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCAGCATCTTTGA  
TAGCAGTGGC-3'

**HIF-2 $\alpha$ -miR #2** (human) obere Sequenz:

5'-TGCTGATTCTTCTCAATCTCACTCAGGTTTTGGCCACTGACTGACTGAGTGATT  
GAGAAGAAT-3'

**HIF-2 $\alpha$ -miR #2** (human) untere Sequenz:

5'-CCTGATTCTTCTCAATCACTCAGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTGAGTGAGATT  
GAGAAGAATC-3'

**HIF-2 $\alpha$ -miR #3** (human) obere Sequenz:

5'-TGCTGTTAGCTTGGTGAATAGGAAGTGTTTTGGCCACTGACTGACACTTCCTACA  
CCAAGCTAA-3'

**HIF-2 $\alpha$ -miR #3** (human) untere Sequenz:

5'-CCTGTTAGCTTGGTGTAGGAAGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACACTTCCTATTCAC  
CAAGCTAAC-3'

**HIF-2 $\alpha$ -miR #4** (human) obere Sequenz:

5'TGCTGAAATCCAGAGAGATGATGGCGTTTTGGCCACTGACTGACCGCCATCATC  
TCTGGATTT-3'

**HIF-2 $\alpha$ -miR #4** (human) untere Sequenz:

5'-CCTGAAATCCAGAGATGATGGCGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCGCCATCATCTC  
TCTGGATTT-3'

**SIMA-miR** (*Drosophila melanogaster*) obere Sequenz:

5'-TGCTGCATGAATATCTGTCTCCTTGTTTTGGCCACTGACTGACAAGGAGACAG  
ATATTCATG-3'

**SIMA-miR** (*Drosophila melanogaster*) untere Sequenz:

5'-CCTGCATGAATATCTGTCTCCTTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAAGGAGACAGAG  
ATATTCATGC-3'

#### 4.1.7.2 shRNA Oligos (Trans-Lentiviral™ shRNA Bulk Packaging System, #TLP4691, Open Biosystems/ Thermo Fisher)

Hairpin-Sequenz Farbcode: Nukleotide von mi-30 abgeleitet, sense-Zielsequenz, loop, antisense-Zielsequenz

**shZEB2** (human; Hairpin sequence for V2LHS\_268826; Accession-Nummer NM\_14795, #RHS4430-98520521):

5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGAGACAGATCAGTAATATAATAGTGAAGCCACAG  
ATGTATTATATTACTGATCTGTCTCCTTGCCTACTGCCTCGGA-3'

#### 4.1.7.3 siRNA Oligos von Eurogentec S.A. (Seraing)

Die siRNA's für HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und der Kontrolle SIMA wurden von der Firma Eurogentec S.A. bezogen und waren im Labor zu Beginn dieser Arbeit bereits vorhanden.

#### 4.1.7.4 siRNA Oligos von Dharmacon (Thermo Fisher)

EphB4 (murin):	Accession-Nummer: NM_010144
Ephrin-B2 (murin, <i>EFNB2</i> ):	Accession-Nummer: NM_010111
LOXL2 (human):	Accession-Nummer: NM_002318
LOXL3 (human):	Accession-Nummer: NM_032603
scrambled-Kontrolle (murin, <i>DAB1</i> ):	#L-043867-01
SNAI1 (human):	Accession-Nummer: NM_005985
SNAI2 (human, <i>Slug</i> ):	Accession-Nummer: NM_003068
TWIST1 (human):	Accession-Nummer: NM_000474
TWIST2 (human):	Accession-Nummer: NM_057179
ZEB2 (human, <i>ZFH1B</i> , <i>SIP-1</i> ):	Accession-Nummer: NM_014795

#### 4.1.8 Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden bei Sigma-Aldrich bestellt.

Name	Sequenz (5'-3')	Anwendung
116- for	CCCGCGGTCGCCGAGGCCAGGTGCGCTCAC CCTGCGCGT	Mutagenese
116- rev	ACGCGCAGGGTGAGCGCACCTGGCCTCGGC GACCGCGGG	Mutagenese
792- for	GAGGTAGGGCGCCCCTGAGGTACCAGCCCC GCCCCAGGACG	Mutagenese
792- rev	CGTCCTGGGGGCGGGGCTGGTACCTCAGGG GCGCCCTACCTC	Mutagenese
877- for	CTCGCACCAAGCAGGGTGGTACCGCCCCGCA AGTGCCTGTG	Mutagenese
877- rev	CACAGGCACTTGCCGGGCGGTACCACCCTGC TGGTGCGAG	Mutagenese
b2up	GACTCGTCTCTCC	Sequenzierung
hCA-IX	AAGAAGAGGGCTCCCTGAAG	qRT-PCR
hCA-IX	TAGCGCCAATGACTCTGGTC	qRT-PCR
CMV-seq_for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Sequenzierung
EmGFP-seq_for	GGCATGGACGAGCTGTACAA	Sequenzierung
GLprimer2_rc	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA	Sequenzierung
hephrin-B1_for	ACCTGGAGCCCGTATCCTG	qRT-PCR
hephrin-B1_rev	CAGATGATGTCCAGCTTGTCTCC	qRT-PCR
hephrin-B2_for	AGTTCGACAACAAGTCCCTTTG	qRT-PCR
hephrin-B2_rev	AGCAATCCCTGCAAATAAGG	qRT-PCR
hephrin-B3_for	GAGCCTGTCTACTGGAACCTCG	qRT-PCR
hephrin-B3_rev	CCCGATCTGAGGGTACAGC	qRT-PCR
hEphA4_for	CCAAATATAACCCTAACCCAGACC	qRT-PCR
hEphA4_rev	CTTGTGACTTCTTTAGCCTGGAC	qRT-PCR
hEphB1_for	TCGTGTTGTTGTGTCCTTG	qRT-PCR

hEphB1_rev	CCTGTGCTGTAATGCTGGAG	qRT-PCR
hEphB2_for	GACTCCACTACAGCGACTGC	qRT-PCR
hEphB2_rev	CGTAGCCACTCACCTCTTCC	qRT-PCR
hEphB3_for	CTGAGTTGGCGTGGACATC	qRT-PCR
hEphB3_rev	ATTCATGGCCTCATCGTAGC	qRT-PCR
hEphB4_for	AGAACTCTTCCGATCCCACCTAC	qRT-PCR
hEphB4_rev	ATCACCTCCCACATCACAATC	qRT-PCR
hebox2b_2_for	GTGGAAACAGCGACGGCCGAGTAG	ChIP
hebox2b_2_rev	ATCTGCGGAGAAGGGACGCCGAG	ChIP
HIF1- $\alpha$ for	CCATTAGAAAGCAGTTCGCGC	qRT-PCR
HIF1- $\alpha$ rev	TGGGTAGGAGATGGAGATGC	qRT-PCR
HIF2- $\alpha$ for	CGAACACACAAGCTCCTCTC	qRT-PCR
HIF2- $\alpha$ rev	GTCACCACGGCAATGAAAC	qRT-PCR
hHPRT for	CCGGCTCCGTTATGGC	qRT-PCR
hHPRT rev	GGTCATAACCTGGTTCATCATCA	qRT-PCR
hLOXL2 for	CAAGCACACGGAGGATGTC	qRT-PCR
hLOXL2 rev	TGCGGTAGGTTGAGAGGATG	qRT-PCR
hLOXL3 for	GAGCTGGGCTTCACAGAGG	qRT-PCR
hLOXL3 rev	GGGAGGCACATTCAGTCACAC	qRT-PCR
hN-Cadherin for	GGTGGAGGAGAAGAAGACCAG	qRT-PCR
hN-Cadherin rev	GGCATCAGGCTCCACAGT	qRT-PCR
hSNAI1 for	GCGCTCTTTCCTCGTCAG	qRT-PCR
hSNAI1 rev	GTAGGGCTGCTGGAAGGTAAC	qRT-PCR

hSNAI2 for	CGGACCCACACATTACCTTG	qRT-PCR
hSNAI2 rev	CAAATGCTCTGTTGCAGTGAG	qRT-PCR
hTWIST1 for	CTACGCCTTCTCGGTCTGG	qRT-PCR
hTWIST1 rev	CTCCTTCTCTGGAAACAATGAC	qRT-PCR
hTWIST2 for	AGCAAGATCCAGACGCTCAAG	qRT-PCR
hTWIST2 rev	GGAGAAGGCGTAGCTGAGG	qRT-PCR
hVimentin for	GAGGAGATGCTTCAGAGAGAGG	qRT-PCR
hVimentin rev	AGATTCCACTTTGCGTTCAAG	qRT-PCR
hZEB1 for	CCTGAAGAGGACCAGAGG	qRT-PCR
hZEB1 rev	TATCACAATATGGACAGGTGAG	qRT-PCR
hZEB2 for	AACAAGCCAATCCCAGGAG	qRT-PCR
hZEB2 rev	ACCGTCATCCTCAGCAATATG	qRT-PCR
RVprimer3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC	Sequenzierung
seqb2Ebox2	GGCCACTAAGCAGTCAGGAG-	Sequenzierung
seqb2Hif	GCCTACCGGTTACAGGATCA	Sequenzierung
seqb2Ebox3	TTTCTACAACAGAGGCACAGG-	Sequenzierung

Tabelle 4.5: Liste der verwendeten Primer

#### 4.1.9 Bakterien

##### *Escherichia coli* DH5 (Invitrogen)

**One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*** (Invitrogen). Genutzt für die Transformation von pDONR<sup>TM</sup>221 (miR-RNAi-Expressionskasette), pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-miR Expressionsklone und pcDNA3.1D/V5-His-TOPO Expressionsklone.

**One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E. coli*** (Invitrogen). Genutzt für die Transformation von lentiviralen Vektoren (miR RNAi Expressionskassette).

**Library Efficiency® DB3.1™ Competent Zellen** (Invitrogen). Genutzt für die Vermehrung von pDONR™221 und pLenti6/V5-DEST. Library Efficiency® DB3.1™ Competent Zellen.

#### 4.1.10 Zelllinien

Zelllinien	Zellart	Hersteller
G55TL, G141	Humane Glioblastomzelllinien	M. Westphal (Hamburg, Deutschland), K. Lamszus (Hamburg, Deutschland) (269-271)
U87	Humane Glioblastomzelllinie	ATCC No. HTB-14 (272, 273)
SNB19	Humane Glioblastomzelllinie	ATCC No. CRL-2219 (274, 275).
LN-229	Humane Glioblastomzelllinie	M. Weller (Tübingen, Deutschland) (276)
hGBM	Humane Glioblastomzelllinie	H.Weich (Braunschweig, Deutschland)
293T	Human Embryonic Kidney (HEK) Zellen	Invitrogen
Ephrin-B2-WT/ - KO Gliomazellen	Astrozytomazellen	Helge zum Buttell (Frankfurt, Deutschland)

**Tabelle 4.6:** Liste der verwendeten Zelllinien

#### 4.1.10.1 Im Verlauf der Arbeit hergestellte Überexpression- und *knock-down*-Zellen

stabile polyklonale *knock-down*-Zellen

Zelllinien	<i>knock-down</i>	System	MOI
LN-229/ SNB19	shHIF-1 $\alpha$	CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	60
LN-229/ SNB19	shHIF-2 $\alpha$	CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	60
LN-229/ SNB19	shHIF-1 $\alpha$ / shHIF-2 $\alpha$	CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	30/ 30
LN-229/ SNB19	Kontrolle	CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	60
LN-229/ G55TL	shZEB2/ non- silencing-control	pGIPZ lentiviraler Vektor (turboGFP) (Puromycin Selektion)	50/ 50
LN-229/ G55TL	non-silencing-control	pGIPZ lentiviraler Vektor (turboGFP) (Puromycin Selektion)	100

Tabelle 4.7: Liste der hergestellten stabilen polyklonalen *knock-down*-Zellen

stabile polyklonale Überexpression-Zellen (Zellen mit den besten Überexpression-  
Ergebnissen sind **rot** markiert)

Zelllinien	Überexpression	System	MOI
LN-229	hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5	CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	5
<b>LN-229</b>	<b>hHIF-1<math>\alpha</math>-<math>\Delta</math>PPA-V5</b>	<b>UbC-pLenti6/V5-Dest (EmGFP)</b> <b>(Blasticidin Selektion) Invitrogen</b>	<b>5</b>
LN-229	GW/lacZ Kontrolle	CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	5
LN-229	hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5	CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	1
LN-229	hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5	UbC-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	1
<b>LN-229</b>	<b>hHIF-2<math>\alpha</math>-<math>\Delta</math>PPA-V5</b>	<b>CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP)</b> <b>(Blasticidin Selektion) Invitrogen</b>	<b>2</b>
LN-229	hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA-V5	UbC-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	2



LN-229	GW/lacZ Kontrolle	CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	1
LN-229	GW/lacZ Kontrolle	CMV-pLenti6/V5-Dest (EmGFP) (Blasticidin Selektion) Invitrogen	2

**Tabelle 4.8:** Liste der hergestellten stabilen polyklonalen Überexpression-Zellen

#### 4.1.11 Weitere Informationen zu Materialien

Informationen über Reagenzien die nicht in dem Material-Kapitel gelistet sind, können in dem jeweiligen Methoden-Kapitel gefunden werden.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Arbeiten mit RNA

#### 4.2.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Da die aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidin-Basen von Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 255 - 260 nm haben, kann die gegen H<sub>2</sub>O gemessene Absorption nach dem Gesetz von Lambert-Beer zur Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration genutzt werden. Die Konzentrationsmessung erfolgte im UV- Spektrophotometer (Spektrometer Ultrospec 3000 pro, Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Durch die zusätzliche Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm, können eventuelle Verunreinigungen durch Proteine gemessen werden. Der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> liegt dabei bei reinen DNA-Präparationen bei 1,8 - 2,0 und bei reinen RNA-Präparationen bei 1,9 - 2,1. Ein OD<sub>260</sub>-Wert von 1 entspricht dem Gegenwert von ca. 50 µg/ml (Multiplikationsfaktor) doppelsträngiger DNA und ca. 40 µg/ml (Multiplikationsfaktor) RNA. Die Messung erfolgte üblicherweise bei einer Verdünnung von 1:50 in einer Quarzküvette. Die Konzentration (c) der DNA/ RNA wurde mit folgender Formel berechnet:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \times \text{Multiplikationsfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### 4.2.1.2 RNA-Extraktionen

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurden je nach Versuchsdauer zwischen 50.000 und 250.000 Zellen auf zwei 6-well-Platten ausgebracht. Nach entsprechender

Behandlung (Transfektionen, Hypoxiebehandlung) wurden die Zellen vor der Ernte zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann in RLT-Puffer aus dem RNeasy® Mini Kit abgeschabt (# 74104, Qiagen; 1ml RLT + 10 µl β-Mercaptoethanol). Die weitere RNA-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben und beinhaltete einen DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (#79254, Qiagen) auf den RNeasy® Mini-Säulen. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde photometrisch bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die RNA-Konzentrationsbestimmung wurde wie unter 4.2.1.1 beschrieben durchgeführt.

#### **4.2.1.3 Reverse Transkription**

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde jeweils 1 µg RNA und 1 µl random hexamer (25 nM; # 1034731, Roche) eingesetzt und zu einem Gesamtvolumen von 12 µl mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O (DEPC-H<sub>2</sub>O) aufgefüllt. Der RNA-Mix wurde für 5 min. bei 70°C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis gegeben, wodurch eine Rückfaltung der RNA-Tertiärstrukturen verhindert wurde. Daraufhin konnten 7 µl der kurz zuvor gemischten Mixtur aus 5x Reverse Transcriptase reaction buffer (4 µl), dNTP-Mix (2 µl) (10 mM; # 55082-5, Invitrogen) und RNase-Inhibitor (1 µl) (20 U; # 03335402001, Roche) zugegeben werden. Der RNA-Mix wurde für 5 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl der Revert Aid™ H Minus M-MuLV-Reversen Transkriptase (200 U; # EP0451, Fermentas Life Science) hinzugefügt und nach einer kurzen Zentrifugation für 10 min bei 25°C inkubiert. Die Erststrangsynthese wurde für 60 min bei 42°C durchgeführt. Zur Inaktivierung der M-MuLV-Reversen Transkriptase erfolgte noch eine abschließende Erhitzung des Reaktionsansatzes auf 70°C für 10 min bevor der Ansatz auf 4°C abgekühlt wurde. Zur Entfernung restlicher RNA wurde 1µl RNase H (# 10786357001, Roche) zugegeben und der gesamte Ansatz für 20 min bei 37°C inkubiert. Die cDNA- Konzentrationsbestimmung wurde wie unter 4.2.1.1 beschrieben durchgeführt.

### **4.2.2 Arbeiten mit DNA**

#### **4.2.2.1 Herstellung von kompetenten Bakterien (nach Hanahan, 1985)**

Um die verwendeten Bakterien (DH5α-E.coli) für die Aufnahme von Plasmid-DNA vorzubereiten, wurden 5 ml LB-Medium mit 5 µl der Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C und ca. 220 rpm geschüttelt. 2 ml dieser Vorkultur wurden auf 100 ml LB-Medium verdünnt und erneut bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>550</sub> = 0,4-0,5 inkubiert (etwa

2 h). Nach Abkühlen der Kultur (10 min in Eiswasser) erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei 5000 rpm und 4°C für 15 min in vorgekühlten Gefäßen. Das Pellet wurde in 30 ml TfBI-Puffer (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 30 mM Kac, 10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 15% Glycerin; pH 5,8, steril-filtriert, 4°C) resuspendiert und 15 min bis zu 1,5 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 15 min wurde das Pellet in kaltem TfBII-Puffer (stets frisch angesetzt: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin; pH 7,0, steril-filtriert) resuspendiert, in vorgekühlte Reaktionsgefäße zu je 200 µl aliquotiert und sofort bei –80°C eingefroren.

#### **4.2.2.2 Transformation von Bakterien**

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde diese in chemisch kompetente Bakterien eingebracht. Hierzu wurden 100 µl der Bakterien mit 10 ng Plasmid-DNA, bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock (42°C für 90 sec) erfolgte für die Transformation von Plasmid-DNA eine erneute Inkubation auf Eis für 10 min und 50 µl der Suspension wurden schließlich auf vorgewärmte LB-Platten, die ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei einer Transformation von DNA aus einem Ligationsansatz erfolgte nach dem Hitzeschock eine 5-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und bei 37°C für 40 bis 60 min schüttelnd inkubiert. Hiervon wurden schließlich 500 µl auf vorgewärmte LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen. Nach 12 – 16 Stunden Inkubation wurden Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 4 ml LB-Medium für eine Vorkultur angeimpft.

#### **4.2.2.3 Plasmidpräparationen („Mini- und Maxi-Präp“)**

Für die Isolation geringerer Mengen von Plasmid-DNA wurde eine sog. „Mini-Präp“ mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas Life Science) durchgeführt. Hierzu wurden ca. 1,5 ml einer Vorkultur (4 ml LB-Medium mit Antibiotika wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert) in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Plasmidpräparation wurde nach Herstellerangaben (Fermentas Life Science) über Säulen durchgeführt. Für die Isolation größerer Mengen von Plasmid-DNA („Maxi-Präp“) aus Bakterien wurde das PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet.

#### **4.2.2.4 Restriktionsspaltungen**

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen zur Vorbereitung auf eine Ligation oder zur Überprüfung nach erfolgter Klonierung eines Konstruktes geschnitten. Hierzu wurden für Ligationsansätze in einem Gesamtvolumen von 50 µl 10 µg Plasmid-DNA mit 1,75 µl des entsprechenden Enzyms und 5 µl geeignetem Puffer in der Regel bei 37°C für 3 h inkubiert. Als Kontrollverdau nach erfolgten Klonierungen wurde 1 µl der Plasmidpräparation in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 0,35 µl Restriktionsenzym für 1 h bei 37°C inkubiert. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas bezogen.

#### **4.2.2.5 Herstellung von „blunt ends“**

Gegebenenfalls konnten 5'-überhängende Enden doppelsträngiger DNA mit 2,5 µl dNTPs (1mmol; # 55082-5, Invitrogen) aufgefüllt werden. Dies erfolgte mittels 1,5 µl des Klenow Fragments (# EP0051, Fermentas) der DNA-Polymerase I und wurde für 10 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 10 min bei 75°C inaktiviert. Der DNA-Mix wurde schließlich über eine Säule nach Herstellerangaben aufgereinigt (Gel Extraction Kit, Qiagen).

#### **4.2.2.6 Dephosphorylierung**

Um eine Religation der geschnittenen Plasmid-DNA (beispielsweise ein Vektor vor der Ligation) zu verhindern, wurde diese mit alkalischer Phosphatase (CIAP, calf intestine alkaline phosphatase, MBI Fermentas) nach Herstellerangaben behandelt.

#### **4.2.2.7 Ligation**

Ein Standard-Ansatz für die Ligation zweier DNA-Fragmente setzte sich wie folgt zusammen:

50 ng linearisierter Vektor

x µl linearisiertes Insert

2 µl T4-Ligase (# EL0011, Fermentas)

2 µl 10 x Ligase-Puffer

auf 20 µl mit *aqua dest.* auffüllen

Das zu klonierende Fragment (Insert) wurde hierbei in etwa dreifachem molarem Überschuss eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei RT für 1 h oder bei 14°C über Nacht inkubiert.

#### 4.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Hierzu wurden, abhängig von der Fragmentgröße, 0,8 bis 4 % Agarose (Agarose, high, #01280, Biomol) in 1 X TBE-Puffer (890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 25 mM EDTA) aufgekocht und zur späteren Detektion der DNA mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (# 2218.2, Roth) vermischt. Die Proben wurden mit 5 X Probenpuffer (2 mg Xylencyanol, 2 mg Bromphenolblau, 10 µl 20% SDS, 1 ml 0,5M EDTA pH 8, 5 ml Glycerin) versetzt und bei ca. 80 V aufgetrennt. Als Größenstandards dienten, abhängig von der Größe des jeweiligen Fragments, die 1kplus-Ladder, die 1kbExtension-Ladder, die 100bp-Ladder oder die 10bp-Ladder von Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.).

#### 4.2.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurde mit Hilfe des Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 4.2.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR, Mullis *et al.*, 1986 (277))

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient der enzymatischen Amplifizierung von Gensequenzen zwischen zwei Oligonukleotiden (Primer), die den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Für die Reaktion wurden 200 µM dNTPs, 200 pm 5'-Primer, 200 pm 3'-Primer, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase mit 1x PCR-Puffer (Invitrogen) vermischt und auf 20 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Die Reaktionsbedingungen lauteten wie folgt:

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initial-Denaturierung	94°C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	1 min	} 25 – 40 Zyklen
Annealing	TX°C	1 min	
Elongation	72°C	tY	
Finale Elongation	72°C	10 min	1 Zyklus
Abkühlung	∞ 4°C	-	-

Die Elongationszeit  $t_Y$  war abhängig von der Größe des Amplifikates. Pro 1000 Nukleotide wurde 1 min Elongationszeit gerechnet. Die Annealingtemperatur  $T_X$  war abhängig vom der jeweiligen Schmelztemperatur  $T_m$  der verwendeten Primer. Die Anzahl der verwendeten Zyklen war abhängig von der Expressionsstärke des untersuchten Gens.

#### 4.2.2.11 Quantitative *real time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative *real time* PCR ermöglicht eine exakte Quantifizierung von PCR-Produkten über die Detektion von Fluoreszenzsignalen, die mit der PCR-Produktbildung einhergehen. Dabei wird zur Reaktion entweder ein an den Doppelstrang bindender Fluoreszenz-Farbstoff (SYBR green) zugegeben oder eine ebenfalls Fluoreszenz-markierte Hybridisierungssonde, die an das PCR-Produkt binden kann. Die PCR-Reaktion wurde mit dem ABsolute™ QPCR SYBR® Green Fluorescein Mix QPCR SYBR Green Mix (# AB-1220, ABgene) in einem iCycler™ System (BIO-RAD) oder dem ABsolute™ QPCR SYBR® Green ROX Mix (# AB-1162/a, ABgene) in einem OneStepPlus System (Applied Biosystems) mit denselben Protokollen durchgeführt.

Für die Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l 100 nM forward (for)-Primer, 100 nM reverse (rev)-Primer und 1  $\mu$ l cDNA (100ng/ $\mu$ l) mit 12,5  $\mu$ l ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix und 6,5  $\mu$ l DEPC-Wasser gemischt. Die Reaktionsbedingungen lauteten dabei wie folgt:

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Enzymaktivierung	95°C	15 min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	30 sec	} 50 Zyklen
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	35 sec	
Denaturierung	95°C	1 min	1 Zyklus
Annealing/Elongation	60°C	1 min	1 Zyklus
Schmelzkurve	55°C	10 sec	80 Zyklen; Erhöhung der Temperatur in 0,5°C-Schritten

Die Quantifizierung erfolgt dabei über eine Software-gestützte Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes. Der Zyklus, in dem eine zu untersuchende Probe diesen Schwellenwert (der das Zehnfache der Fluoreszenz während der ersten PCR-Zyklen beträgt) überschreitet, wird als Schwellenwertzyklus (Threshold Cycle, Ct) der jeweiligen Probe zugewiesen. Über diesen Ct-Wert des zu untersuchenden Gens (*gene of interest*, GOI) und dem Ct-Wert eines im gleichen Durchlauf parallel amplifizierten Haushaltsgens (*housekeeping gene*, HKG) kann nun anhand der Differenz die relative Expression mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode errechnet werden. Dies geschieht mit Hilfe der Formel:

$$\text{Relative Expression} = \frac{(E_{\text{GOI}})^{\Delta\text{Ct GOI}}}{(E_{\text{HKG}})^{\Delta\text{Ct HKGS}}}$$

Eine Kontrolle jeder PCR-Reaktion erfolgte über die Analyse der Schmelzkurven, bei der ebenfalls die Bildung von Primer-Dimeren und anderen unspezifischen Nebenprodukten erkennbar ist.

#### 4.2.2.12 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt.

#### 4.2.2.13 Methylierungs-spezifische PCR

Die Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin und dem Histon-Deacetylasen (HDAC)-Inhibitor Trichostatin A (TSA) wurde innerhalb der Kooperation von der Gruppe von Prof. Reifenberger (Inst. für Neuropathologie, Düsseldorf) durchgeführt und die Zellen zur quantitativen Überprüfung der Transkriptionsaktivität zur Verfügung gestellt. 5-Aza-2'-Deoxycytidin verhindert sowohl die Replikation-gekoppelte Erhaltung als auch die *de novo* DNA-Methylierung. Während der Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren werden sie in die DNA integriert und binden irreversibel die Methyltransferaseenzyme, was letztlich zu einem Abbau des Enzyms und einer passiven Demethylierung führt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen 5-Aza-2'-Deoxycytidin Konzentrationen behandelt. Dabei wurden zum einen 20  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'-Deoxycytidin + 1  $\mu\text{M}$  Trichostatin A (A+T) und zum anderen 500 nM 5-Aza-2'-Deoxycytidin + 1  $\mu\text{M}$  Trichostatin A (A+T1) oder 1  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'-Deoxycytidin + 1  $\mu\text{M}$  Trichostatin A (A+T2) eingesetzt. Ein Teil der G55TL Zellen wurde zusätzlich für

24h unter hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> inkubiert (Versuchsdauer insgesamt 72h). Die qRT-PCR wurde wie unter 4.2.2.11 beschrieben durchgeführt.

#### **4.2.2.14 Ephrin-B2-Promotor-CpG-Hypermethylierung**

Die Ergebnisse zur Überprüfung des Ephrin-B2-Promotor-Methylierungsstatus wurden von der Gruppe von Prof. Reifenberger (Inst. für Neuropathologie, Düsseldorf) durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Zur Analyse wurde genomische DNA mit Natriumbisulfit behandelt und eine PCR-Amplifikation des Ephrin-B2-CpG-Insel-Fragments innerhalb des ersten Intron des Ephrin-B2 Gens (Nukleotide 107186130-107186371 auf Chromosom 13) durchgeführt (Primer: EFNB2-bisu-F3 [GttttttttAGAGtttAttAGTttt] und EFNB2-bisu-R3 [ATTTCACTAaaTaaAaACTCCTC]). Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und sequenziert. Die Proben mit einer Methylierung von mindestens 3 der 14 CpG-Dinukleotide wurden als methyliert eingestuft. Konnte keine oder eine schwache Methylierung von <3 CpG-Dinukleotide festgestellt werden, wurden die Proben als unmethyliert eingestuft. Zur Analyse standen 3 gesunde Gehirne (N), 3 Astrozytome WHO-Grad II (AII), 3 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III (AAIII), 10 primäre Glioblastome WHO-Grad IV (pGBM), und 10 sekundäre Glioblastome WHO-Grad IV (sGBM) zur Verfügung.

#### **4.2.2.15 Komparative genomischen Hybridisierung (*Comparative Genomic Hybridization* [CGH])**

Die Ergebnisse der Analyse der Ephrin-B/EphB-Genkopienzahl wurden von der Gruppe von Prof. Reifenberger (Inst. für Neuropathologie, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und können in Toedt *et al.*, 2011 (278) eingesehen werden. Die Gen-Loci-Amplifikation und Deletions-Frequenz der EphB/Ephrin-B-Familie wurde in einer Kohorte von 127 Grad II – IV Gliompatienten (12 Astrozytome WHO-Grad II [AII], 18 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III [AAIII], 11 sekundäre Glioblastome WHO-Grad IV [sGBM] und 86 primäre Glioblastome WHO-Grad IV [pGBM]) analysiert.

### **4.2.3 Arbeiten mit Proteinen**

#### **4.2.3.1 Protein-Extraktionen**

Zur Herstellung von Zelllysaten aus adherenten Zellen wurden diese (70-80% konfluent) mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 250 µl PBS aufgenommen



und mit einem Zellschaber auf Eis von der Kulturschale gelöst. Diese Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl kalten Lysis-Puffer oder Laemmli-Puffer resuspendiert. Die Proteinlysate im Laemmli-Puffer wurden bei -20°C eingefroren. Die Lysate im Lysis-Puffer wurden für 15 min bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Der Proteinüberstand wurde nach kurzer Zentrifugation in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

Für Suspensionskulturen (siehe 4.2.4.1) wurden  $1 \times 10^6$  Zellen auf pHEMA-beschichteten 10cm-Platten ausgebracht und für 48h bei 37°C kultiviert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml-Gefäß überführt und bei 4°C für 3 min und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in 300 µl Lysis-Puffer oder Laemmli-Puffer resuspendiert. Die weitere Bearbeitung wurde wie für die adherenten Zellen beschrieben durchgeführt.

#### **4.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur quantitativen Bestimmung der isolierten Proteine wurde eine Lowry-Analyse (279) mit dem kolorimetrischen *DC Protein Assay Reagents Package* (# 500-0116, BIO-RAD) durchgeführt. Dazu wurden das Reagenz A mit dem Reagenz S nach Herstellerangaben angesetzt und 125 µl dieser Mischung mit 5 µl Proteinextrakt und 20 µl Lysis-Puffer gemischt. Dieser Mix wurde mit 1 ml Reagenz B für 15 min bei RT inkubiert. Als Leerwert diente eine Probe mit 5 µl Wasser anstelle des Proteinextraktes. Nach dem Farbumschlag, der durch die Reaktion des Biorad Protein Assay-Reagenz mit dem Protein entstand, konnte die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 750 nm im Photometer gemessen werden. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden durch den Vergleich mit einer BSA (*bovine serum albumin*)-Eichkurve, die zuvor mit steigender BSA-Konzentration erstellt worden war, berechnet.

#### **4.2.3.3 SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyakrylamid-Gelelektrophorese)**

Durch die SDS-PAGE werden Proteine aufgrund ihrer Molekülgröße unter denaturierenden Bedingungen in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Proteine werden durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) gleichmäßig negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Es wurde nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese gearbeitet (280). Hierbei wandern die Proteine zunächst durch ein weitporiges Sammelgel (4%) und anschließend durch ein

8%- oder 12%-iges Trenngel, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins. Nach der Polymerisation wurden die Gele in Mini-PROTEAN 3 und Mini-Protean Tetra cells (BIO-RAD) eingebaut und mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Zur Denaturierung vor dem Auftragen wurden die aufgetauten Proteinproben für 5 min bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt, anschließend auf Eis wieder abgekühlt. Das Proteinlysate wurde schließlich in einem 3:1 Verhältnis mit Proben-Puffer versetzt. Zur Proteinauftrennung wurden 15 – 25 µg Proteinlysate auf das Gel geladen. Zum Größenvergleich wurde zusätzlich ein Größenstandard (Fermentas) auf das Gel mit aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über 2-4 h Stunden bei 80-120 V (alle Reagenzien siehe Material 4.1.5.5).

#### **4.2.3.4 Western-Blot-Analyse**

Proteine, die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können durch ein elektrisches *Semi-Dry-Blotting*-Verfahren auf eine Nylon- oder Nitrozellulose-Membran transferiert werden. In dieser Arbeit wurden Hybond™-ECL™-Nitrozellulosemembranen (Amersham Bioscience) verwendet. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern in Richtung der Anode und binden an die Membran. Der Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulosemembran erfolgte mit zwei spezifischen Antikörpern. Dabei binden Erstantikörper an das zu detektierende Protein, während Zweitantikörper an die Erstantikörper binden und mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*; HRP) gekoppelt sind, so dass die gebundenen Antikörper mithilfe einer Chemilumineszenzreaktion detektiert werden können.

Vor dem Transfer wurden das Trenngel, die Nitrozellulosemembran und die 3 mm-Whatmanpapiere für 10 min zum Äquilibrieren in 1x Transferpuffer gelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,5 h bei 100 pro Gel mA in einem Novex® Semi-Dry Blotter (Invitrogen). Danach wurde der *Blot* für 1h in einer Blocklösung (5% Magermilchpulver/ PBS/ 0,1% TWEEN-20) bei RT inkubiert, um unspezifische Bindestellen für Antikörper abzusättigen. Die Erstantikörper (siehe Material 4.1.3.1) wurden in Blocklösung verdünnt und die Membranen ÜN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *Blots* dreimal 30 min mit PBS/ 0,1% TWEEN-20 gewaschen und 1 h bei RT mit dem Zweitantikörper (1:2500 verdünnt in Blocklösung) (siehe Material 4.1.3.2) auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden die *Blots* dreimal für 15 min mit PBS/ 0,1% TWEEN-20 und abschließend für 10 min mit PBS gewaschen. Für die Detektion der Proteinbanden wurden 3 ml frisch angesetzte ECL-Lösung (ECL Western blotting detection reagents and analysis system™ oder ECL plus system™, Amersham Bioscience) für 5 min auf dem *Blot* verteilt und dieser anschließend in eine

Expositionskassette gelegt. Die Lichtemissionen, die durch die Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase und das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol und der folgenden Chemilumineszenzreaktion entstanden sind, wurden durch Exposition (10 sek – 1h) eines Röntgenfilms (Hyperfilme, Amersham Bioscience) in einer Dunkelkammer sichtbar gemacht. Tubulin (1:8000) diente generell als interne Ladekontrolle für die auf dem *Blot* befindliche Proteinmenge.

#### 4.2.3.5 Stripping

Für eine erneute Inkubation der geblotteten Membran mit einem weiteren Antikörper wurde die Membran für 1h bei RT in Stripping-Puffer (siehe Material 4.1.5.5) inkubiert um die zuvor gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der *Blot* dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 7,5% Magermilchpulver/ PBS/ 0,1% TWEEN-20 für 1,5h bei RT geblockt.

#### 4.2.3.6 Immunpräzipitation und *pull-down* von endogenen Proteinen

Die Immunpräzipitation (IP) der EphB4-Proteine wurde von Helge zum Buttell innerhalb der Kooperation durchgeführt. Hierfür wurden 80%-ig konfluente Zellen einer 10 cm Schale in 1 ml kalten Lysis-Puffer aufgenommen und bei 10.000x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde wie unter 4.2.3.2 beschrieben durchgeführt. 25 µl Protein-G-Sepharose 4 Fasto Flow Beads (GE Healthcare) wurden vor der Nutzung 3x mit PBS gewaschen und bei RT für 1h mit dem gewünschten Antikörper auf einem Rotator inkubiert. Die Lysate wurden mit gleichen max. Konzentrationen zu den Beads gegeben und bei 4 °C für 18h auf einem Rotator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 2x Proben-Puffer vermischt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde eine *Western-Blot*-Analyse wie unter 4.2.3.4 beschrieben durchgeführt.

Für die Detektion von Ephrin-B2 wurde ein EphB4-Fc-*pull-down* durchgeführt. Bis auf die hier genannten Unterschiede ist das gleiche Protokoll wie für die Immunpräzipitation anzuwenden. Die Zellen wurden vor der Lyse mit geclustertem EphB4-Fc stimuliert. Rekombinantes EphB4-Fc (#446-B4-200, R&D Systems) wurde in einer finalen Konzentration von 1 µg/ml mit anti-humanen-Fc-Antikörper in einem Verhältnis von 10:1 geclustert („*pre-coupled*“) indem der Mix für 1 h bei RT inkubiert wurde. Daraufhin wurden die Zellen für 1 h mit den geclustertem EphB4-Fc bei 37°C inkubiert. Für den *pull-down* wurden 10 µg EphB4-Fc mit Protein-G-Sepharose 4 Fasto

Flow Beads wie oben beschrieben angesetzt, bei 4°C für 1h inkubiert und anschließend mit den Lysaten vermischt.

#### **4.2.3.7 Detektion von Ephrin-B2-Clustern an der Zellmembran**

Die Expression von Ephrin-B2 konnte durch eine Immunfärbung der Zellen nachgewiesen werden und wurde von Helge zum Buttler innerhalb der Kooperation durchgeführt. Hierfür wurden 20.000 Zellen auf Glasplättchen im 24-*well* ausgebracht und für 48h inkubiert (18h davon teilweise unter hypoxischen Bedingungen bei 1% O<sub>2</sub>). Für die Detektion der Ephrin-B2-Cluster wurde Ephrin-B2 mit EphB4-Fc stimuliert, indem 4 µg/ ml des rekombinanten EphB4-Fc (R&D), geclustert durch Cy3-gekoppelten anti-humanen-Fc-Antikörper in einem Verhältnis von 10:1 (Jackson ImmunoResearch) (siehe Abschnitt 4.2.3.6) für 1h bei 37°C auf die Zellen gegeben wurde. Mikroskopische Aufnahmen der Zellen wurden in einer 100-fachen Vergrößerung an einem Zeiss Axio Imager M1 Mikroskop gemacht. Die Quantifizierung wurde mit der ImageJ Software durchgeführt.

#### **4.2.3.8 Luciferase-Assay**

##### Ephrin-B2- und VEGF-Promoteraktivität

Der Luciferase-Assay dient dazu, die Aktivität eines bestimmten Promotors zu untersuchen. Dazu wird die Promotorsequenz des zu untersuchenden Gens in ein Luciferase-Konstrukt kloniert. In dem Ephrin-B2- und VEGF-pGL3-Luciferase-Reporter-Konstrukt liegt das *Firefly*-Luciferase-Gen unmittelbar hinter dem zu untersuchenden Promotor. Auf diese Weise ließ sich die gemessene Luciferase-Aktivität als ein Maß für die Promotor-Aktivität nutzen. In dem System wird das SV40-*Renilla*-Luciferase-Konstrukt zur Normalisierung der gemessenen Werte und internen Kontrolle verwendet. 3 x 10<sup>4</sup> Zellen/ *well* wurden auf 48-*well*-Platten ausgebracht und mit 250 ng pGL3-Luciferase-Reporter-Konstrukt, 300 ng pcDNA3.1-D/V5-His-TOPO sowie 2,5 ng pSV40-*Renilla* als interne Kontrolle pro *well* transient transfiziert. Für die dreifache transiente Transfektion zur Überprüfung der ZEB2-abhängigen Repression des Ephrin-B2-Promotors wurde statt pcDNA3.1 das murine ZEB2-Expressionskonstrukt pCS3-mSIP1FL ZEB2 verwendet. Die Transfektion wurde mit dem Superfect Transfection Reagenz (#301305, Qiagen) durchgeführt (DNA/Superfect Verhältnis 1:3). (detailliertes Protokoll zur Transfektion siehe 4.2.4.5). In den Kontrollzellen diente pcDNA als Kontrollplasmid, das anstelle des ZEB2-Konstruktes transfiziert wurde, damit die in die

Zellen eingebrachte DNA-Menge in allen Zellen konstant war. Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion (18h davon unter Hypoxie bei 1% O<sub>2</sub>) mit dem passiven Lysispuffer (Verwendung nach Angaben des Herstellers, Dual-Luciferase® Reporter Assay System, #E1910, Promega) inkubiert und die lysierten Zellen bei -80°C aufbewahrt. Die *Renilla*-Luciferase- und *Firefly*-Luciferase-Aktivität wurde mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) in einem Tristar LB941 *platereader* (Berthold Technologies) gemessen. Die Werte der *Firefly*-Luciferasemessung wurden zu der jeweiligen Aktivität der *Renilla*-Luciferase normalisiert, in Prozent zu den normoxischen Kontrollen verrechnet und in relativen Lumineszenzeinheiten (*relative luminescence units*, RLU) angegeben.

#### Überprüfung der *knock-down*-Effizienz von lentiviralen miR-Konstrukten

Zur Überprüfung der *knock-down*-Effizienz von lentiviralen miR-Konstrukten wurden pGL2-*Firefly*-Luciferase-Reporter-Vektoren (Promega), psiCheck™-1 *Renilla* Vektoren und die zu testenden miRNA Expressionskonstrukte co-transfiziert. In dem System wird die stillzulegende Sequenz, in diesem Fall die humane HIF-1α und HIF-2α Sequenz, in psiCheck™-1 Vektor kloniert. Die co-transfizierte miRNA bindet dann im Versuch an das HIF-Zielgen, das mit der *Renilla* Luciferase im psiCheck™-1 Vektor gekoppelt ist und initiiert den RNAi Prozess der zur Spaltung und schließlich zur Degradierung der HIF mRNA führt. Die Degradierung der mRNA wird durch das verringerte *Renilla*-Luciferase-Signal sichtbar. Dabei dient pGL2 zur internen Kontrolle der Transfektionseffizienz. Zur Überprüfung mit dem psiCheck-System wurden ebenfalls 3 x 10<sup>4</sup> Zellen/ *well* wurden auf 48-*well*-Platten ausgebracht und mit 10 ng HIF-psiCheck™-1-Vektor, 300 ng des miR-Konstrukts sowie 150 ng pGL2 *Firefly*-Luciferase-Reporter-Konstrukt als interne Kontrolle pro *well* transient transfiziert (Superfect Transfection Reagenz, # 301305, Qiagen; DNA/Superfect Verhältnis 1:3) und nach 48h die Proteine wie oben beschrieben geerntet und die Luciferase-Aktivität gemessen.

#### **4.2.3.9 ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay)**

Zur Analyse von sezernierten VEGF-Proteinen wurden diese aus dem Zellkulturüberstand gefällt. Dazu wurden 2 x 10<sup>5</sup> der zu untersuchenden Zellen auf 6-*well*-Platten ausplattiert und ÜN bei 37°C in DMEM-Vollmedium inkubiert. Am nächsten Tag konnte das Nährmedium gegen 2 ml serumfreies DMEM-Medium ausgetauscht werden. Nach 48h (24h davon teilweise unter hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub>) wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Zur Analyse von

sezerniertem humanen VEGF wurde das VEGF DuoSet® ELISA Development System (#DY293B, R&D) nach Angaben des Herstellers verwendet und die Messung in einem Tristar LB941 *platereader* (Berthold Technologies) vorgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine im Überstand diente eine Standardkurve mit rekombinantem Protein aus dem Kit. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit Microsoft® Office Excel.

#### **4.2.3.10 Chromatin-Immunopräzipitation (*Chromatin immunoprecipitation* [ChIP])**

Die Chromatin-Immunopräzipitation wurde von Helge zum Buttell innerhalb der Kooperation durchgeführt. Um die Bindung von ZEB2 an den Ephrin-B2-Promotor zu analysieren wurde der EZ-Magna ChIP™ A (#17-408, Millipore) nach Herstellerangaben verwendet. Das Grundprinzip der Chromatin-Immunopräzipitation beruht darauf, die zu einem Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA-Bindungen durch Fixierung mit Formaldehyd festzuhalten. Anschließend wird das Chromatin mittels Ultraschall in Stücke von einigen hundert Basenpaaren Länge zertrümmert. Jene DNA-Stücke, die das gewünschte Protein gebunden haben, werden mit einem für das Protein spezifischem Antikörper immunopräzipitiert. Die isolierten DNA-Protein-Komplexe werden schließlich mittels einer PCR unter Verwendung von spezifischen Primern untersucht. Für die ChIP wurden die Zelllysate auf Eis mit einem Branson SONIFIER 250 10-mal für 10 sek mit einer 30 sek Pause behandelt, um die DNA Stränge zu brechen. Die IP wurde mit 500 µl Lysat, 45 µl Proteaseinhibitor, 405 µl dilution-Puffer, 50 µl beads und 10 µg anti-ZEB2-Antikörper oder einer IgG-Kontroll-Antikörper für 20h bei 4°C durchgeführt. Die qRT-PCR wurde mit den Primern (hebox2b\_2\_for, hebox2b\_2\_rev) durchgeführt, die spezifisch bei den ZEB2-Bindestellen b und c (siehe Ergebnisse, 5.2.4.2) im Ephrin-B2 Promotor binden. Für die Überexpression von ZEB2 wurde das myc-tag-konjugierte ZEB2-Plasmid pCS3-SIP1FL 48 h vor der IP wie unter 4.2.3.6 beschrieben transient transfiziert. Für die IP wurde ein anti-Myc-Antikörper oder ein IgG-Kontroll-Antikörper verwendet.

### **4.2.4 Arbeiten mit Zellen**

#### **4.2.4.1 Kultivierung von Zellen**

Die verwendeten humanen Glioblastomzelllinien wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (HERAEUS, Hanau) mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei

37°C kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM (Gibco, Invitrogen) verwendet, das mit 10% FCS (PAN Systems), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (PAN Systems) ergänzt wurde. In Abhängigkeit der Teilungsrates wurden die Zellen im Rhythmus von 2 - 5 Tagen, ab einer Konfluenz von 80%, passagiert. Dazu wurde das DMEM-Vollmedium abgezogen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (PAN Systems) 4 – 10 min bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert, wodurch sie sich von den Zellkulturflaschenböden ablösten. Die Zellen wurden mit 5 – 10 ml DMEM-Vollmedium vereinzelt und für 3 min in 15 ml PP-Röhrchen bei 350 g und RT abzentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in frischem DMEM-Vollmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 ausplattiert. Für 10 cm Zellkulturschalen wurden 10 – 12 ml, für 6-well-Platten 2 ml Medium eingesetzt.

Für die Kultivierung der Zellen unter Sphären-formierenden Bedingungen wurden 10 cm Platten mit 10 mg/ml pHEMA (Poly[2-hydroxyethyl methacrylate]) beschichtet, üN bei RT getrocknet und vor Benutzung mit PBS gespült. Das Neurosphären-Medium wurde mit 2% B-27 Serum-Free Supplement (Gibco), 20 ng/ml bFGF und 20 ng/ml EGF (PeproTech) ergänzt. Zur Subkultivierung wurden Neurosphären-Kulturen für 3 min bei 350 g abzentrifugiert, in PBS gewaschen und mit Akkutase für 15 min bei 37°C verdaut. Anschließend konnten die vereinzelteten Zellen in frischem Neurosphären-Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 ausplattiert werden.

Für die Kultivierung der murinen Ephrin-B2 WT- und KO-Gliomazellen wurde Astrozytenmedium verwendet, bestehend aus Basal Medium Eagle (Gibco) 0.6% Glucose, 1mM Sodium Pyruvate, 10mM HEPES, 0.5% Penicillin /Streptomycin, 10% Horse serum (Sigma oder Biochrom) und 0.1% MITO+ Serum Extender (BD). Die Zellen wurden ansonsten unter denselben Bedingungen wie die humanen Glioblastomzellen kultiviert. Nähere Informationen zu den Reagenzien siehe Material 4.1.5.3.

#### **4.2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die 80 – 90%-konfluenten Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin von der Platte gelöst, in warmem Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Pellet einer 10 cm Platte wurde dann in 2 ml Medium mit 20% FCS und 10% DMSO resuspendiert und 1 ml der Zell.Suspension sofort in CryoS-Röhrchen (Greiner) transferiert. Diese wurden dann mit Hilfe von Cryo-Freezing Containern (Nalgene, Nalge Nunc, Rochester, NY, U.S.A.) zunächst bei -80°C gelagert und nach 72h zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 9 ml vorgewärmtes DMEM-Medium ohne Antibiotika gegeben und abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml frischem DMEM-Medium resuspendiert. Nach 24h wurde ein Medienwechsel vorgenommen.

#### **4.2.4.3 Zellzählung**

Die Konzentration der Zellen, wurde entweder mit einem CASY Cell Counter + Analyzer System Model TT (Innovatis AG) oder mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellzahl mit dem CASY Cell Counter wurden 100 µl der zu messenden Zellsuspension in 10 ml Casyton-Lösung (Innovatis AG) verdünnt und nach Herstellerangaben im Zellzähler Casy1 (Innovatis AG) analysiert.

Für die Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl der Zellen mit 50 µl Trypanblau (#T8154, Sigma Aldrich), 40 µl HBSS-Puffer (#H9269, Sigma Aldrich) gemischt und 10 µl Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Anhand der Trypanblau-Färbung können abgestorbene Zellen durch eine Blaufärbung erkannt und von der Zählung ausgeschlossen werden. Die Zellen aus 4 eingeschliffenen Großquadraten wurden zusammengezählt. Da die Kammer ein Fassungsvermögen von  $v = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ µm}^3$  besitzt und allgemein Konzentration ( $c$ ) = Gesamtzellzahl ( $n$ )/Volumen ( $v$ ) gilt, ist die Konzentration wie folgt auszurechnen:

$$c \text{ (Zellzahl/ml Zellsuspension)} = n/4 \times 10^4 \text{ (Verdünnung)} \times 10^4$$

#### **4.2.4.4 Isolierungen von primären murinen Astrozyten und Herstellung der Gliomazellen**

Zur Herstellung der Ephrin-B2-WT- und KO-Gliomazellen wurden die Astrozyten aus Ephrin-B2<sup>loxP/loxP</sup> Mäusen (Ralf Adams generiert [Max Planck Institut für molekulare Biomedizin, Münster, Deutschland) isoliert. Die Herstellung der Zellen wurde von Helge zum Buttler innerhalb der Kooperation durchgeführt. Nach Entfernung der Meningen wurden die Hemisphären bei 37°C für 30 min in Trypsin (# Invitrogen 25200-056) lysiert. Nach Entfernung des Trypsins folgten drei Waschschrte in Basal Medium Eagle (BME;Invitrogen) mit 10% Horse-Serum, 1% Streptomycin/Penicillin, 1% Natriumpyruvat, 0,6% Glucose und 0,1% Mito-Serum Extender (Becton Dickinson). Um eine Einzelzelllösung zu erhalten wurden die Hemisphären zwanzig Mal durch eine Pasteur Pipette (1/3 Durchmesser) gesaugt. Nach der Zentrifugation (5 min bei 79x g)



wurde das Zellpellet der beiden Hemisphären resuspendiert und in einer 75 cm<sup>2</sup> NUNC EasY Zellkulturflasche mit 12 ml BME in einem 5% CO<sub>2</sub> Inkubator in Kultur genommen. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt und die Zellen wurden bis zu einer 80-100%igen Konfluenz (4-8 Tage) wachsen gelassen. Um die Astrozyten aufzureinigen wurde die Zellkulturflasche zwei Tage bei 37C° und 250 rpm auf einem horizontalen Schüttelbrett belassen. Einmal am Tag wurde das Medium gewechselt, um abgelöste Zellen zu entfernen. Die Reinheit der Astrozyten wurde per Immunfluoreszenz für GFAP getestet.

Die Zellimmortalisierung erfolgte durch Co-Electroporation (AMAXA) von zwei Plasmiden in einem 3:1 Verhältnis, von denen Eines Träger des Large-T Antigen (pOT-largeT) und das Andere Träger des Resistenz Genes zur Selektion mit G418 (pEYFP-N1 neo) war. Drei Tage nach der Transfektion, wurde die Selektion mit Geneticin (150µg/ml) durchgeführt. Nach 1 bis 3 Wochen, wurden die immortalisierten Kolonien in einem nicht selektiven Medium in Kultur genommen.

Anschließend erfolgte die Transformation zu hochgradigen Astrozytomzellen durch das Onkogen H-Ras V12 durch den retroviralen Vektor pBabe puro H-Ras V12. Zur Herstellung des nicht replikationsfähigen Virus wurde die Hilfszelllinie Phoenix A mit dem obigen Vektor in 10 cm Petrischalen transfiziert. Nach 12h wurde die Transfektionsmischung durch 4 ml frisches Medium ersetzt. Der Zellkultur-Überstand wurde nach weiteren 24h abgeerntet. Nach der Filtration (0,2 µm Porengröße, niedrige Proteinbindung) wurde entweder direkt infiziert oder der Virus eingefroren bei -80C°. Ein 40-60% konfluentes 25cm<sup>2</sup> Flakon mit immortalisierten Astrozyten wurde mit 2 ml des Virus enthaltenden Überstandes plus 2,5 ml BME und 5 µl Polybren infiziert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Medienwechsel. Die Selektion mit 2 µg / ml Puromycin erfolgte nach weiteren 2 - 4 Tagen. 2 - 3 Wochen nach Selektionsbeginn wurden die gewachsenen Zellkolonien vereinigt und erneut in nicht-selektivem Medium in Kultur genommen. Die Expression der SV40 large T antigen and H-Ras V12 Proteine wurden in einer *Western-Blot*-Analyse (siehe 4.2.3.4) überprüft. Die Zellen wurden schließlich mit 200 PFU/ Zelle (plaque forming units) GFP-Cre-Rekombinase-Adenoviren und GFP-Adenoviren (Ad-Cre-GFP, Ad-CMV-GFP, Vector Biolabs) infiziert, um letztlich die Ephrin-B2-KO- und WT-Zellen zu erhalten. Das Medium wurde nach 12 Stunden gewechselt. Um eine zu 99% reine Knockout Zelllinie zu erhalten wurden alle GFP positiven Zellen durch eine FACS-Analyse identifiziert und isoliert. Der *knock-out* von Ephrin-B2 wurde über den EphB4-*pull-down* wie unter 4.2.3.6 beschrieben überprüft.

#### 4.2.4.5 Transiente Transfektionen

Für transiente Transfektionen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen (pro *well* in 6-*well*-Platten für *Western-Blot*- oder RNA-Präparationen) oder  $3 \times 10^4$  Zellen (pro *well* in 48-*well*-Platten für Luciferase-Assays) 24h vor der Transfektion ausgebracht. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, pro *well* 1,5  $\mu\text{g}$  DNA (für den Luciferase-Assay siehe 4.2.3.8) in 50  $\mu\text{l}$  DMEM aufgenommen und mit der drei-fachen Menge SuperFect™ (Qiagen) (3  $\mu\text{l}$ /  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Anschließend wurde die DNA-Superfect™-Mischung zusammen mit 0,75 ml DMEM-Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 3 h bei 37°C inkubiert, dann mit warmen PBS gewaschen und bis zur Ernte nach 24 - 48 h in frischem DMEM-Medium inkubiert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde jeweils ein *well* mit der gleichen Menge CMV-GFP-Plasmid transfiziert und am nächsten Tag die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen ermittelt.

#### 4.2.4.6 Transiente siRNA-Transfektion

Das Prinzip der angewandten Methode beruht darauf, dass die in die Zelle eingebrachten siRNA (small interfering RNA) den Abbau der komplementären mRNA des Zielgens durch eine Nuklease initiieren. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche siRNA-Systeme verwendet. Die siRNAs wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Um die Effizienz des *knock-downs* zu testen, wurden qRT-PCRs (siehe 4.2.2.11) durchgeführt. Alle verwendeten Sequenzen führten zu einer Verringerung der Expression von mindestens 70%.

- Für die Inhibierung von HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  wurden siRNAs von Eurogentec (Seraing) verwendet. 24h vor der Transfektion wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro *well* in 6-*well*-Platten ausgebracht. Für die Transfektion, die an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt wurde, wurden pro *well* 100 nM siRNA verwendet. Die siRNA wurde dazu in 144  $\mu\text{l}$  OptiMEM®-Medium verdünnt, ebenso das Transfektionsreagenz Oligofectamin (#12252-011, Invitrogen) (2,5  $\mu\text{l}$  Oligofectamin in 13,5  $\mu\text{l}$  OptiMEM®). Beide Ansätze wurden 5 min bei RT inkubiert und anschließend vereinigt. Diese Mischung wurde dann weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit warmem DMEM ohne FCS gewaschen. Anschließend wurde die siRNA-Oligofectamine-Mischung zusammen mit 640  $\mu\text{l}$  DMEM auf die Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 4 h wurden 400  $\mu\text{l}$  DMEM mit 30% FCS zugegeben,

so dass die FCS-Endkonzentration erneut 10% betrug. Etwa 24h nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen geerntet.

- Für die Inhibierung von Ephrin-B2, EphB4 und der EMT-Repressoren wurden siRNA pools von ON-TARGETplus siRNA Oligonucleotiden (Thermo scientific) verwendet. Hierfür wurden die  $2,5 \times 10^5$  Zellen 24h vor der Transfektion pro *well* in 6-*well*-Platten ausgebracht. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 0,75 ml DMEM-Medium ohne Antibiotika auf die Zellen gegeben. Für die Transfektion wurden 8,5  $\mu$ l Oligofectamine(Invitrogen) in 33,5  $\mu$ l Opti-MEM I (Gibco) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden 8  $\mu$ l der siRNA (20 pmol/ $\mu$ l) mit 139  $\mu$ l Opti-MEM I gemischt. Für die Bildung der siRNA-Oligofectamine-Komplexe wurden die beiden Ansätze vereint und für 20 min bei RT inkubiert. 190  $\mu$ l des Mix wurden pro *well* auf die Zellen gegeben und für 48 – 72h inkubiert.

#### 4.2.4.7 Hypoxie-Behandlung

Zur Kultivierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen wurden die Zellen direkt vor Versuchsbeginn einem Medienwechsel unterzogen, wobei allen Zellen dieselbe Menge an Medium verabreicht wurde, und anschließend in einer Hypoxie-Kammer (Inkubator C42, Labotek) oder einer Hypoxie- Workstation Invivo2 500 (Ruskin Technology) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> sowie 1% O<sub>2</sub> für die angegebenen Zeiten inkubiert.

#### 4.2.4.8 Lentivirale Transduktion

##### 4.2.4.8.1 Herstellung von lentiviralen miR-Konstrukten mit Hilfe des Block-it-Systems von Invitrogen

Zur Herstellung lentiviraler Konstrukte für die stabile Ausschaltung beziehungsweise stabile Überexpression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in Glioblastomzellen wurde das Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit von Invitrogen verwendet. Dieses System basiert auf der Verwendung von microRNAs (miRNA) zur Genexpressionshemmung durch RNS-Interferenz (RNSi). Die Konstruktion von Gateway®-adaptierten Expressionsvektoren ermöglicht dabei eine effiziente stabile Expression der spezifischen miRNA zur Genausschaltung. Zu Beginn wurden nach der Anleitung von Invitrogen doppelsträngige Knockdown-Sequenzen für HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und SIMA, das HIF- $\alpha$ -Ortholog aus *Drosophila melanogaster* welches als Kontrolle diente, generiert und diese in pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR Vektoren von Invitrogen kloniert. Die Sequenz von SIMA zeigte in einem Datenbankvergleich keine Homologie zum humanen

Gen ((281), siehe Doktorarbeit Julia Wenner). Die Konstrukte wurden über qRT-PCR (siehe Abschnitt x) und Luciferase Assays (psiCheck System, siehe 4.2.3.8) auf ihre Knockdown-Effizienz überprüft. Die miRNA-Sequenz konnte anschließend mit dem Gateway-System nach Anleitung des BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression Systems von Invitrogen (#K4938-00) mit der Standard BP- und LR-Rekombinationsreaktion in den pLenti6/V5-DEST Gateway Expressionsvektor kloniert werden.

Zur Herstellung der HIF-Überexpressionskonstrukte wurden die Vektoren pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-hHIF-1 $\alpha$ - $\Delta$ PPA und pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-hHIF-2 $\alpha$ - $\Delta$ PPA (siehe Abschnitt x und Doktorarbeit Julia Wenner) verwendet und die humanen HIF-1 $\alpha$ - und der HIF-2 $\alpha$ -Sequenzen in den Gateway-pENTR™4 Vektor von Invitrogen umkloniert. Die klonierten Sequenzen waren Mutanten deren Prolylreste, an denen normalerweise die Hydroxylierung durch die PHDs stattfindet, zu Alanin mutiert sind, so dass sie einem PHD-vermittelten Abbau gegenüber resistent sind und somit die konstitutive HIF- $\alpha$  Expression in den Zellen sichergestellt ist. Weiterhin ist neben den Prolylresten auch der Asparaginrest, an dem normalerweise FIH (Factor Inhibiting HIF) bindet, so verändert, dass keine Erkennung mehr erfolgen kann. Mit Hilfe des Gateway®-Systems von Invitrogen konnten schließlich über die LR-Rekombinationsreaktion mit den klonierten humanen HIF-pENTR™4 Konstrukten und dem pLenti6/V5-DEST beziehungsweise dem pLenti6/UbC/V5-DEST™ Gateway® Vektor die Überexpressionskonstrukte generiert werden. Da eine Überexpression, im Gegensatz zu einer Inaktivierung von HIF- $\alpha$ , meist toxisch für die Zellen ist, wurden unterschiedliche Promotorkonstrukte ausgetestet. Der CMV-Promotor ermöglicht eine sehr hohe, konstitutive Expression des zu untersuchenden Gens in den Zielzellen (282, 283). Der UbC-Promotor hingegen ermöglicht eine konstitutive Expression, die eher den physiologischen Expressionsleveln des zu untersuchenden Gens in den Zellen entspricht. Verglichen mit dem CMV-Promotor ist der UbC-Promotor generell 2-4 fach weniger aktiv (284). Als Kontrolle wurde der pLenti6/V5-GW/lacZ-Vektor von Invitrogen verwendet. Das  $\beta$ -Galactosidase-Protein wird von dem pLenti6/V5-GW/lacZ Kontrollvektor unabhängig von Normoxie oder Hypoxie konstitutiv sehr stark exprimiert und besitzt wie auch HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  eine ungefähre Proteingröße von 121 kDa.

#### 4.2.4.8.2 Herstellung lentiviraler Konstrukte mit dem Trans-Lentiviral™ GIPZ-Packaging-System von Open Biosystem

Die lentiviralen Partikel zur Herstellung der stabilen ZEB2-Knockdown-Glioblastomzellen wurden mit den Expression Arrest pGIPZ lentiviral shRNAmiR

Vektoren von Open Biosystems (Trans-Lentiviral™shRNA Bulk Packaging System, #TLP4691, Open Biosystems/ Thermo Fisher) generiert. Die *short-hairpin*-RNA (shRNA)-Konstrukte sowie das Kontrollkonstrukt pGIPZ™ Non-Silencing Control wurden als Glycerolstock von Open Biosystems geliefert.

#### 4.2.4.8.3 Produktion von lentiviralen Partikeln mit der Calciumphosphat-vermittelten Transfektionsmethode

Alle Schritte wurden in einer S2-Sterilbank durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden  $4 \times 10^6$  293T-HEK Zellen in t-75-Zellkulturflaschen mit DMEM-Vollmedium ausplattiert und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium 2h vor der Transfektion durch 9 ml Antibiotika-freies Medium ersetzt. Das Transfektionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 1 ml enthielt 10 µg Plasmid-DNA des entsprechenden Konstrukts, 3,5 µl pMD2.VSV-G (ENV-Plasmid) und 6,5 µg pCM8.91 (core-packaging Plasmid) und wurde mit 50 µl 2.5 M CaCl<sub>2</sub> und 450 µl steril-filtriertem Aqua dest. in einem 15 ml Falcon-Gefäß sorgfältig gemischt. Zur Präzipitation der DNA wurden anschließend 500 µl 2x-HBS-Puffer tropfenweise zu dem Plasmid-DNA/CaCl<sub>2</sub>/dH<sub>2</sub>O-Gemisch hinzugefügt. Währenddessen wurden mit Hilfe einer 2 ml Pipette für eine Minute Luftblasen erzeugt. Das Transfektionsgemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde Chloroquine mit einer Endkonzentration von 10 µM zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde 1 ml des inkubierten Ansatzes gleichmäßig auf die ausplattierten 293T-HEK Zellen verteilt und ÜN für maximal 16h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 12 - 16h konnte das Transfektionsmedium durch 11 ml DMEM-Vollmedium ersetzt werden. Das mit Lentiviren angereicherte Medium wurde 48, 72 und 96h nach der Transfektion gesammelt und in einem sterilen 50 ml Falcongefäß bei 4°C bis zur Viruskonzentration aufbewahrt. Das abgenommene Medium wurde jeweils durch 11 ml DMEM-Vollmedium ersetzt. Die Transfektionseffizienz konnte in den Knockdown-Konstrukten mikroskopisch durch die Expression von EmGFP in den pLenti6/V5-DEST-infizierten Zellen und TurboGFP in den pGIPZ-infizierten Zellen überprüft werden.

Vor der Virusanreicherung wurden die gesammelten Virusüberstände bei 250x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und dann durch einen sterilen 0,45 µm niedrig-Protein-bindenden Zellulosefilter (Millex-HV 0,45 µm PVDF filters, #SLHVR25LS, Millipore) gegeben um restliche Zelltrümmer zu beseitigen. Der gefilterte Überstand wurde anschließend in ein steriles Ultrazentrifugengefäß (38,5 ml PA thin-walled-UC-Gefäß, Herolab) überführt und für die Zentrifugation auf bis zu 0,1 g unter der Sterilbank exakt ausgewogen. Die Ultrazentrifugation wurde bei 55.000x g für 2h bei +4°C in einer Sorval

Pro 80 Ultrazentrifuge und einem AH 629 Rotor durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand schnell jedoch vorsichtig verworfen und das Gefäß für wenige Minuten umgestülpt auf einem UV-belichteten Papiertuch platziert, um restliche Flüssigkeit zu entfernen. Das gewünschte Resuspensionsvolumen von 100 – 250 µl DMEM-1% BSA oder PBS-1% BSA (hier 130; da Doppelansatz Gesamtvolumen von 260 µl) wurde auf das Viruspellet am Gefäßboden gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Pellet ca. 30-mal resuspendiert, wobei darauf zu achten war, dass sich keine Luftblasen bildeten. Der gelöste konzentrierte Virus wurde in ein steriles 1,5 ml Gefäß überführt und bei maximaler Geschwindigkeit für 4 min bei +4°C zentrifugiert um Proteinreste zu pelletieren. Der virale Überstand wurde schließlich in 10 – 40 µl Mengen steril aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Es wurden meist Doppelansätzen angesetzt und der konzentrierte Virus nach der Ultrazentrifugation vereint, um höhere Virustiter zu erlangen.

#### 4.2.4.8.4 Titerung des lentiviralen Überstandes

- *BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression und Gateway®-System (Invitrogen)*

Zur Virustiterbestimmung wurden  $5 \times 10^4$  G55TL Zellen pro well 24h vor der Transduktion auf 6-well-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden mit einer seriellen Verdünnung von  $10^{-2}$  –  $10^{-9}$  mit Virusüberstand versehen, wobei pro well 8 µg/ml Polybrene hinzugefügt wurden. Nach 24h konnte der Virusüberstand gegen Vollmedium ausgewechselt werden, worin die Zellen für weitere 24h kultiviert wurden. Die Selektion konnte 48h nach der Transduktion mit 6 µg/ml Blasticidin beginnen. Die Zellen wurden 11 - 14 Tage in Selektionsmedium kultiviert, bis Zellkolonien eindeutig sichtbar waren. Die Zellkolonien wurden mit einer Crystal-Violett-Färbung (0,5% crystal violet (# 61135, Fluka) in 20% Methanol, 0,22 µm steril-filtriert ) für 10 min bei 37°C gefärbt, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und ausgezählt. Für die Berechnung des Titers in *transducing units* (TU)/ml wurde der Durchschnitt von zwei seriellen Verdünnungen verwendet und folgende Formel angewendet: Anzahl der Kolonien x Verdünnungsfaktor. Beispiel:  $(42 \times 10^7) + (5 \times 10^8) / 2 = 4,6 \times 10^8$  TU/ ml. Nähere Details sind dem Handbuch BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System zu entnehmen.

- *Trans-Lentiviral™ shRNA Bulk Packaging System (Open Biosystem)*

Zur Virustiterbestimmung wurden  $3 \times 10^4$  G55TL Zellen pro *well* 24h vor der Infektion auf 24-*well*-Platten ausplattiert. Die Transduktion und Titerung wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (Trans-Lentiviral™shRNA Bulk Packaging System). Bei jeder Transduktion wurden noch  $8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Polybren pro *well* hinzugefügt. Die transduzierten Zellkolonien konnten mit Hilfe der Expression von TurboGFP mikroskopisch gezählt und mit folgender Formel berechnet werden: Anzahl der TurboGFP-positiven Kolonien x Verdünnungsfaktor x 40 = # TU/ ml.

#### 4.2.4.8.5 Transduktion der Zielzellen

Für die Transduktion der Zielzellen wurden 5.000 – 20.000 Zellen pro *well* in einer 24-*well*-Platte ausgebracht, abhängig von der gewünschten Viren-Kopienzahl pro Zelle (Multiplicity of Infection [MOI]). Für die Transduktion wurde folgende Formel verwendet: Zellzahl x MOI/ TU der Titerbestimmung = Menge an Virus in ml. Die Gesamtmenge sollte möglichst klein gehalten werden. Es wurden erneut pro *well*  $8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  Polybrene hinzugefügt. Virusüberstände wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig resuspendiert bevor sie auf die Zellen gegeben wurden. Die Inkubationszeit betrug für die pLenti6/V5-DEST Konstrukte nach Anleitung des Herstellers (BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System, Invitrogen) 24h und für die pGIPZ Konstrukte nach Anleitung des Herstellers (Trans-Lentiviral™shRNA Bulk Packaging System, Open Biosystem) 8h bei  $37^\circ\text{C}$ . Das virale Medium wurde nach der Inkubation durch Vollmedium ausgetauscht. Die Selektion zur Herstellung resistenter polyklonaler Zellen konnte 48h nach der Transduktion mit  $6 \mu\text{g}/\text{ml}$  Blastocidin für die pLenti6/V5-DEST Konstrukte und  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  Puromycin für die pGIPZ Konstrukte beginnen. Bei einer Konfluenz der überlebenden Zielzellen von über 80 %, wurden diese bis zur Analyse in größere *wells* überführt und schließlich eingefroren. Die Genexpression wurde mit Hilfe von *Western-Blot*- und qRT-PCR-Analysen ermittelt.

#### **4.2.4.9 Kollagen-Invasion-Assay**

Die Invasion der Ephrin-B2-WT und -KO Gliomazellen wurde mit einem dreidimensionalen Kollagen-Invasion-Assay von Helge zum Buttler innerhalb der Kooperation durchgeführt. Die Sphäroide wurden mit 5000 Zellen in einem Tropfen von  $25 \mu\text{l}$  Astrozytenmedium in der Zellkulturschale produziert („hanging drop“-Methode). Nach 2 – 3 Tagen wurden 1 Sphäroid pro *well* in einer 96-*well*-Platte in Kollagen I-Gel eingebettet ( $1.53 \text{ mg}/\text{ml}$  rat tail collagen type I, 1.8% horse serum, 136 mM HEPES in  $1 \times$

DMEM). Nach 1h und nach 24h wurden Abbildung der invadierten Tumorzellen mit einer 4-fachen Vergrößerung Leica DM IL invertierten Mikroskop aufgenommen. Die Fläche der invadierten Tumorzellen wurde mit der ImageJ Software quantifiziert und zum ursprünglichen Umfang des Sphäroids normalisiert.

Zur Herstellung von Sphäroiden der humanen SNB19 Glioblastomzellen wurden diese unter Sphären-formierenden Bedingungen (siehe 4.2.4.1) für 78 – 96h kultiviert und 1 Sphäroid pro *well* in einer 24-*well*-Platte in Kollagen I-Gel pH 7.4 eingebettet (80% PureCol® bovine collagen type I [Nutacon], 10% DMEM [serum free], 10% NaHCO<sub>3</sub> Puffer in 1x PBS und 10 µg/ ml Fibronectin from bovine plasma [#F4759, Sigma-Aldrich]). Das Kollagen-Gel wurde für 1h bei 37°C auspolymerisiert und daraufhin die Abbildungen der Sphäroide in einem Leica DM IL invertierten Mikroskop aufgenommen, bevor die *wells* mit 10%igem FCS-Medium überschichtet wurden (500 µl). Nach 24h wurden Aufnahmen der invadierten Tumorzellen mit einer 4-fachen Vergrößerung gemacht. Die Fläche der invadierten Tumorzellen wurde mit der ImageJ Software quantifiziert und zum ursprünglichen Umfang des Sphäroids normalisiert.

#### **4.2.4.10 Transwell-Invasion-Assay**

Die Invasionskapazität der untersuchten Zellen wurde in einem Transwell-Invasions-Assay von Helge zum Buttell innerhalb der Kooperation durchgeführt (285). Vor dem Versuch wurden die Zellen mit 1% FCS-Medium für 24h kultiviert. Die Transwell-Filter wurden mit einer Schicht von 40 µl Matrigel (0.18 µg/µl; #354230, Becton Dickison) beschichtet und für 16 – 20h getrocknet. Anschließend wurde der Filter mit 40 µl Medium für 1h bei 37°C rehydriert und  $4 - 7.5 \times 10^4$  Zellen im 1%-igen FCS-Medium auf den Filter ausgebracht. Die untere Kammer wurde mit FCS-haltigem Medium gefüllt. Um zu dem nährreichen Medium zu gelangen, mussten die Zellen durch das Matrigel invadieren. Matrigel ist ein Gel-artiges Gemisch aus extrazellulären Matrixproteinen und stellt eine Art künstliche Basalmembran dar. Im Matrigel waren die EphB4-beziehungswise Ephrin-B2-Fc Proteincluster (1µg/ ml) enthalten, sodass Ephrin-B2 beziehungsweise EphB4 in den Zellen bei der Proteolyse und Migration durch das Matrigel stimuliert wurden. Die Zellen sind schließlich durch die Poren der Filtermembran migriert und hafteten auf der Unterseite fest, wo sie nach 8 – 15h mit EtOH für 5 min fixiert wurden. Die Filter wurden mit Wasser gewaschen und für 5 min in Hematoxylin/ Eosin oder DAPI (Applichem) gefärbt. Die Zellen auf der ungefärbten Seite des Filters wurden mit einem feuchten Wattestäbchen vorsichtig entfernt. Die Auswertung erfolgte über Aufnahmen am Zeiss Axio Imager M1 in 4-facher oder 2.5-facher Vergrößerung. Die Zahl der invadierten Zellen wurde mit der ImageJ Software quantifiziert.



## 4.2.5 Intrakranielle *in vivo*-Tumor-Xenograft-Modelle

### 4.2.5.1 Transplantation der Zellen und anti-angiogene Behandlung

Für die intrakraniellen Tumor-Xenograft-Modelle wurden NMRI-nu (nu/nu) Mäuse (#SM-NU-5S-F, Javier) verwendet. Zur Anästhesie und Muskelrelaxierung erhielten die Mäuse mit 150µl/ 20g Körpergewicht der Anästhesie Lösung ( 2ml Ketavet und 0,5 ml Rompun auf 9ml 0,9% NaCl) intraperitoneal und wurden in einem Stereotakt (Kopf Instruments) befestigt. Der Skalp wurde mit dem Skalpell längs eröffnet, die Schädeldecke mit einem Wattestäbchen und 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gesäubert und ein Bohrloch mit einem Zahnbohrer (Durchmesser 0,7mm, MicroDrill, FST) 2mm links der Sutura sagitalis und 0,5 mm anterior des Bregma gebohrt. Die Zellen wurden mit einer 2,5 µl Hamilton Spritze und einer nicht-konischen 33G Nadel in einer Tiefe von 3,5 µm ab Dura implantiert. 5x10<sup>4</sup> Ephrin-B2-WT oder -KO Gliomazellen pro 1 µl, 1x10<sup>5</sup> WT- oder shZEB2-LN-229-Zellen in 2 µl und 5x10<sup>3</sup> WT- oder shZEB2-G55TL-Zellen in 1 µl wurden pro Maus in kaltem CO<sub>2</sub>-unabhängigem Medium (Gibco) resuspendiert und langsam in das linke Striatum an den festgesetzten Koordinaten injiziert. Die Transplantationen wurden mit 5 – 10 Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Für die anti-angiogene Behandlung der Tumoren wurden die mit G55TL Zellen transplantierten Mäuse ab dem 2. Tag nach der Transplantation jeden 2. Tag jeweils mit 20 mg/kg Avastin<sup>®</sup> (Bevacizumab, Roche) oder mit einer humanen IgG-Kontrolle (Gamunex<sup>®</sup> 10%, Talecris Biotherapeutics) intraperitoneal behandelt. Für die anti-angiogene Behandlung der LN-229 Tumoren wurden die transplantierten Mäuse ab dem 7. Tag nach der Transplantation dreimal die Woche jeweils mit 10 mg/kg Avastin<sup>®</sup> (Bevacizumab, Roche) oder mit einer humanen IgG-Kontrolle (Gamunex<sup>®</sup> 10%, Talecris Biotherapeutics) intraperitoneal behandelt. Die Versuche wurden mit allen Mäusen eines Experiments ab den ersten neurologischen Symptomen zum selben Zeitpunkt beendet.

### 4.2.5.2 Perfusion der Tiere und Präparation der Gehirne

Zur Anästhesie und Muskelrelaxierung erhielten die Tiere 150µl/ 20g Körpergewicht der Anästhesie-Lösung (2ml Ketavet und 0,5 ml Rompun auf 9ml 0,9% NaCl) intraperitoneal. Der Brustkorb wurde direkt unterhalb der Rippen quer eröffnet und das Herz freigelegt. Anschließend wurde eine vaskuläre Perfusion über das Herz mit 0,9% NaCl für 4 min und folgend die Perfusion mit 4% PFA für weitere 5 min über die Perfusionspumpe durchgeführt. Das Gehirn wurde freipräpariert und für die Aufbereitung von Dickschnitten max 18h bei 4°C in 4% PFA nachfixiert. Zur Entwässerung erfolgt die

Lagerung des Hirnes für 4 Tage in einer 30%-igen Saccharose-Lösung. Für die Aufbereitung von Dünnschnitten wurden die Gehirne in Tissue Tek® (Sakura) gebettet. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

#### **4.2.5.3 Gewebeaufbereitung der Gehirne in Dickschnitten**

Zunächst wurden die Gehirne aus der Saccharose-Lösung auf Tissue Tek® (Sakura) aufgefroren und nacheinander je 10 Schnitte mit dem Schlittenmikrotom SM 2000R (Leica) von 40 µm Dicke und je 4 Schnitte von 20 µm Dicke geschnitten und in Cryo-Protection-Lösung in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei -20°C aufbewahrt. Dies bedeutet, dass in jedem Tube, je nach Größe des Gehirns, Schnitte mit 480 µm Abstand zueinander lagen (jeder 12. Schnitt).

#### **4.2.5.4 Gewebeaufbereitungen für histologische und immunhistochemische Färbung**

Für die Herstellung von Dünnschnitten wurden die in Tissue Tek® (Sakura) eingefrorenen Gehirne in einen CM 1950 Cryostat von Leica eingespannt und 2 Schnitte mit 10 µm Durchmesser pro Objektträger geschnitten. Anschließend wurden die Objektträger für 15 min bei RT getrocknet und die Schnitte für 10 min in Aceton (Merck) bei -20°C fixiert. Die Schnitte wurden für weitere 10 min bei RT unter einem Abzug getrocknet und bei -20°C gelagert.

#### **4.2.5.5 Stereologische Quantifizierung des Tumorumfanges (H/E-Färbung)**

Zur Quantifizierung des Tumorumfanges wurde eine Hämatoxylin- Eosin Färbung durchgeführt. Hierfür wurde eine komplette Schnittfolge mit je 40µm pro Schnitt genommen. Die Schnitte aus einem Eppendorf-Gefäß wurden auf einen Objektträger gezogen und für 3h bei 37°C getrocknet. Für die Kern-Färbung werden die Objektträger 5 min in PBS gewaschen und anschließend 8 – 10 min in Hämalaun nach Mayer gefärbt. Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser gewaschen und 1 min beziehungsweise bis zu einem sichtbaren Farbumschlag der Schnitte in Ammoniumwasser (0,5ml Ammoniak in 200ml Aqua dest.) gebläut. Danach werden die Schnitte zur zytoplasmatischen Färbung 6 min in 1%igem Eosin (1%iges Eosin in 70% Ethanol reinst gelöst; 1 Tropfen Eisessig pro 100ml Eosin) inkubiert und im Anschluss nochmals für einige Sekunden in Aqua dest. eingetaucht. Die Schnitte wurden daraufhin folgendermaßen in einer Alkoholreihe dehydriert. Die gefärbten Schnitte wurden schließlich mit Cytoseal XYL (Richard-Allan scientific) eingedeckelt und unter dem Abzug getrocknet.

Reihenfolge	Substanz	Verweildauer
2 x	70% Ethanol	30 sek bis 1 min
2x	96% Ethanol	30 sek bis 1 min
2x	100% Ethanol	5 min
2x	Xylol	5 min

Die Bestimmung des Tumolvolumens erfolgte mit dem semi-automatischen stereologischen System Stereo Investigator 4.34 (MicroBrightField Inc., Williston) oder der ImageJ Software und einem Zeiss Axio phot Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), welches mit einer Hitachi HV-C20A Kamera (Hitachi) oder einer Spot Pursuit Kamera ausgerüstet war. Hierfür wurde die komplette gefärbte Schnittfolge (jeder 12. Schnitt, 480  $\mu\text{m}$  Interval) des Gehirns analysiert. Zur Bestimmung des Tumolvolumens erfolgte die Berechnung der Fläche des Tumors, indem die einzelnen Schnitte zu einer Gesamtfläche addiert und diese mit der Dicke des Schnittes (40 $\mu\text{m}$ ) und nochmals mit 12 multipliziert wurden, da nur jeder 12. Schnitt des gesamten Hirnes aufgezogen war. Dies ergab das angenäherte Volumen des Tumors in  $\mu\text{m}^3$  und wurde in  $\text{mm}^3$  umgerechnet.

## 4.2.6 Färbungen

### 4.2.6.1 Immunhistochemische CD34-Färbung

Für die Blutgefäßfärbung in den murinen Gliomazellen wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem CD34-Antigen durchgeführt. Alle Schnitte aus einem Eppendorf-Gefäß (=Schnittfolge; jeder 12. Schnitt) des Gehirns wurde dreimal in PBS gewaschen, Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,6% $\text{H}_2\text{O}_2$  für 30 min. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Schnitte auf Objektträger auf Objektträger gezogen und für 3h bei 37°C getrocknet. Die Schnitte wurden dann in PBS rehydriert und zur Antigendemaskierung in vorgekochtem (20 min) TE-Puffer(pH 8.0) für 8 min in einem Dampfgerar (Bosch) aufgekocht und danach für 20 min bei RT abgekühlt. Nach zweimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100/ PBS und einmalig in PBS wurden die Schnitte für 3h bei RT in 20% NGS/ 0,01% Triton X-100/ PBS geblockt. Anschließend wurden die Schnitte ün mit Primärantikörper in anti-CD34 Antikörper

(1:100, Abcam) in 10% NGS/ 0,01% Triton X-100/ PBS in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100/ PBS und einmalig in PBS wurden die Schnitte dann mit den sekundären Antikörpern anti-rat-HRP diluted (1:200) für 1h bei RT in 10% NGS/ 0,01% Triton X-100/ PBS inkubiert. Der Sekundärantikörper ist Peroxidase gekoppelt. Die Peroxidase oxidiert ein Fluorescein gekoppeltes Phenol (Fluorescyl-Tyramide), welches sich anlagert. („Amplification reagent“, CSA-Kit, Dako). Dieses gebundene Fluorescein wird nun mit einem weiteren, Peroxidase gekoppelten, Fluorescein spezifischen Antikörper detektiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Zugabe des „Amplification reagent“ (CSA-Kit, Dako) für 15 min. Auf Grund der Lichtempfindlichkeit des Fluoresceins muss dieser Schritt im Dunkeln erfolgen. Wieder wird in PBS gewaschen und es folgt der Anti-Fluorescein Antikörper für 1h. Nach einem letzten Waschschrift erfolgt die Färbung mit der DAB-Lösung für 5 – 10 min), welche eine bräunliche Färbung hervorruft. In einem letzten Schritt erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun (1:5 verdünnt in Aqua dest.) für 8 min. Die Bläuerung erfolgte unter fließendem Leitungswasser. Vor dem Eindeckeln wurde wie unter 4.2.5.5 beschrieben eine Dehydrierung durch eine Alkoholreihe durchgeführt.

#### **4.2.6.2 LargeT/ Podocalyxin-Doppelimmunfluoreszenzfärbung**

Für die Färbung der Blutgefäße und der Ephrin-B2-WT- und KO-Gliomazellen wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die in Tissue Tek® (Sakura) eingebetteten 10 µm Schnitte für 15 min bei RT aufgetaut und 10 min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden daraufhin ün bei 4°C in in 0.5% Triton X-100/ 1% BSA in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte ün bei RT mit dem anti-SV40 largeT antigen- Antikörper (1:200, Calbiochem) für die Tumorzellfärbung und anti-Podocalyxin Antikörper (1:100, R&D Systems) für die Blutgefäßfärbung in 0.25% Triton X-100/ 1% BSA in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100 in PBS wurden die Schnitte für 4h bei RT mit den sekundären Antikörpern Alexa-Esel-anti-Maus 488 für die Tumorzellfärbung und Alexa-Esel-anti-Ziege 568 für die Blutgefäßfärbung in 0.25% Triton X-100/ 1% BSA/ PBS inkubiert (je 1:500). Nach zweimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100/ PBS wurde eine Kernfärbung mit DAPI (1:5000, Applichem) und To-Pro-3 Iodid (1:1000, Invitrogen) für 10 min in PBS durchgeführt. Die Schnitte konnte schließlich mit in fluorescent mounting-Medium (Dako) eingedeckelt werden. Die Invasion der Zellen wurde mit der ImageJ-Software ermittelt.

#### 4.2.6.3 Podocalyxin-Immunfluoreszenzfärbung

Für die Färbung der Blutgefäßfläche in den humanen Glioblastomen wurde eine Podocalyxin-Färbung durchgeführt. Eine Schnittfolge (jeder 12. Schnitt) des Gehirns wurde dreimal in PBS gewaschen, und in 24-*well*-Platten (zwei Schnitte pro *well*) üN bei 4°C in in 0.5% Triton X-100/ 1% BSA in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte über zwei Nächte bei 4°C mit dem anti-Podocalyxin Antikörper (1:100, R&D Systems) in 0.25% Triton X-100/ 1% BSA in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100 in PBS wurden die Schnitte für 4h bei RT mit den sekundären Antikörper Alexa-Esel-anti-Ziege 568 in 0.25% Triton X-100/ 1% BSA/ PBS inkubiert (1:500). Nach zweimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100/ PBS wurde eine Kernfärbung mit DAPI (1:5000, Appllichem) und To-Pro-3 Iodid (1:1000, Invitrogen) für 10 min in PBS durchgeführt. Die Schnitte konnte schließlich mit in fluorescent mounting-Medium (Dako) eingedeckelt werden. Die Gefäßfläche der Tumoren wurde mit der ImageJ-Software ermittelt.

#### 4.2.6.4 HIF-1 $\alpha$ / hNuclei-Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Für die Färbung der hypoxischen Bereiche wurde eine HIF-1 $\alpha$ -Färbung und Tumorzell (human nuclei)- Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Eine Schnittfolge (jeder 12te Schnitt) des Gehirns wurde dreimal in PBS gewaschen, auf Objektträger gezogen und für 3h bei 37°C getrocknet. Die Schnitte wurden dann in PBS rehydriert und zur Antigendemaskierung in vorgekochtem (20 min) Citrat-Puffer (pH 6.0) für 8 min in einem Dampfgarer (Bosch) aufgekocht und danach für 20 min bei RT abgekühlt. Nach zweimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100/ PBS und einmalig in PBS wurden die Schnitte für 3h bei RT in 20% NGS/ 0,01% Triton X-100/ PBS geblockt. Anschließend wurden die Schnitte über zwei Nächte bei 4°C mit Primärantikörper in anti-human Nuclei-Antikörper (1:200, Millipore/ Chemicon) und anti-human HIF-1 $\alpha$  Antikörper (1:350, Cayman chemical) in 10% NGS/ 0,01% Triton X-100/ PBS in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100/ PBS und einmalig in PBS wurden die Schnitte mit den sekundären Antikörpern Alexa-Ziege-anti-Maus 488 und Alexa-Ziege-anti-Kaninchen 568 (je 1:500) für 4h bei RT in 10% NGS/ 0,01% Triton X-100/ PBS inkubiert. Die Schnitte wurden schließlich nach einem weiteren Waschschrift mit DAPI (1:5000, Appllichem) und To-Pro-3 Iodid (1:1000, Invitrogen) für 10 min in PBS gefärbt und die Schnitte mit fluorescent mounting-Medium (Dako) eingedeckelt. . Die Quantifizierung der HIF-1 $\alpha$ -positiven Bereiche im Tumor erfolgte mit der ImageJ-Software.

#### **4.2.6.5 Histon-H3/ hNuclei-Doppelimmunfluoreszenzfärbung**

Für die Auswertung der proliferierenden Zellen wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Histone H3 und Tumorzellen (human nuclei) durchgeführt. Eine Schnittfolge (jeder 12. Schnitt) des Gehirns wurde dreimal in PBS gewaschen, auf Objektträger gezogen und für 3h bei 37°C getrocknet. Die Schnitte wurden dann in PBS rehydriert und zur Antigendemaskierung in vorgekochtem (20 min) TE-Puffer (pH 8.0) für 8 min in einem Dampfgarer (Bosch) aufgekocht und danach für 20 min bei RT abgekühlt. Nach zweimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100/ PBS und einmalig in PBS wurden die Schnitte für 3h bei RT in 20% NGS/ 0,01% Triton X-100/ PBS geblockt. Anschließend wurden die Schnitte über zwei Nächte bei 4°C mit Primärantikörpern in anti-human nuclei Antikörper (1:200, Millipore/ Chemicon) und anti-Histone H3 Antikörper (1:200, Bethyl lab) in 10% NGS/ 0,01% Triton X-100/ PBS in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 0,01% Triton X-100/ PBS und einmalig in PBS wurden die Schnitte dann mit den sekundären Antikörpern Alexa-Ziege-anti-Maus 488 und Alexa-Ziege-anti-Kaninchen 568 (je 1:500) für 4h bei RT in 10% NGS/ 0,01% Triton X-100/ PBS inkubiert. Die Schnitte wurden schließlich nach einem weiteren Waschschriff mit DAPI (1:5000, Applichem) und To-Pro-3 Iodid (1:1000, Invitrogen) für 10 min in PBS gefärbt und die Schnitte mit fluorescent mounting-Medium (Dako) eingedeckelt. Die Anzahl an proliferierenden Zellen im Tumor wurde mit der ImageJ-Software ermittelt.

#### **4.2.7 Statistische Auswertungen**

Zur statistischen Analyse wurde der Student's T-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Die Daten sind als Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen in  $\pm$  s.e.m angegeben. Die Berechnung erfolgte mit WinStat® für Microsoft Excel. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als signifikant (\*), ein p-Wert von  $<0,001$  als hochsignifikant (\*\*) und ein p-Wert von  $<0,0001$  als höchstsignifikant (\*\*\*) betrachtet.

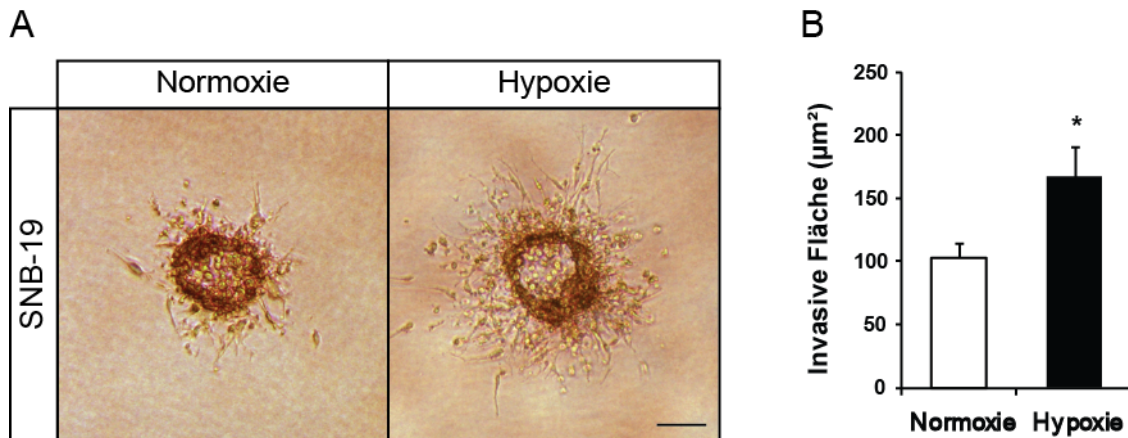
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Die Rolle der Eph-Rezeptoren und deren Ephrin-Liganden im Glioblastom

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Funktion der bidirektionalen Eph- und Ephrin-Signaltransduktion in dem malignen Glioblastom hinsichtlich der Tumorinvasion und Tumorprogression *in vitro* als auch *in vivo* analysiert werden. In diesem Zusammenhang sollte zum einen ein möglicher Einfluss der Hypoxie auf die Eph- und Ephrin-Regulation und zum anderen die genetische oder epigenetische Regulation der Eph und Ephrine untersucht werden.

#### 5.1.1 Hypoxie erhöht das invasive Verhalten humaner Glioblastomzellen *in vitro*

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Hypoxie und die dadurch aktivierte HIF-Transkriptionsfamilie ein wichtiger Faktor in der Tumormikroumgebung und gilt als zentraler Regulator der Angiogenese sowie der Invasion und Progression von Glioblastomen. Um das Hypoxie-abhängige, invasive Verhalten unserer Glioblastomzellen zu überprüfen, wurde ein 3D-Kollagenmatrix-Invasion-Assay mit SNB19-Glioblastomzellen durchgeführt (Abbildung 5.1). Hierbei stellten die Matrixproteine Kollagen und Fibronectin die extrazelluläre Matrix künstlich dar, durch die die Tumorzellen invadierten. Für den Versuch wurden die SNB19-Zellen unter Bedingungen, die eine Sphäroid-Bildung begünstigt, in Serum-freiem Medium kultiviert, um so eine tumorähnliche, drei-dimensionale Struktur zu erhalten. Die Zellen wurden für 48 Stunden (48h) unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (1% O<sub>2</sub>) kultiviert und anschließend in die Kollagen-I-Matrix eingebettet. Die Invasion der Tumorzellen wurde schließlich vom Rande des Sphäroids aus nach 24h gemessen. Eine signifikant gesteigerte Invasion um das 1,6-fache konnte für hypoxische Zellen im Vergleich zu normoxischen Zellen nachgewiesen werden.



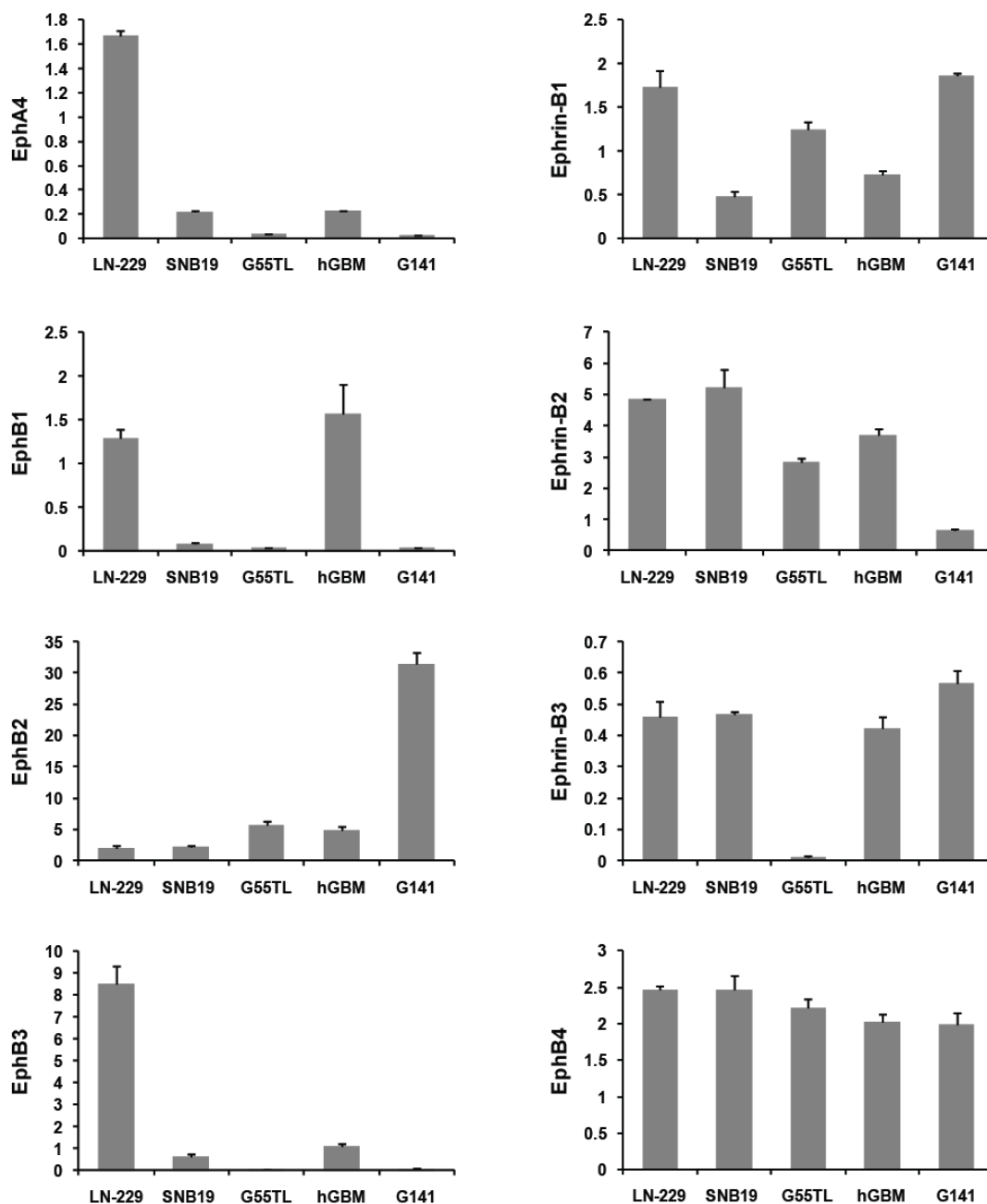
**Abbildung 5.1: Hypoxie-induzierte Invasion von Glioblastomzellen in einem Kollagen-Invasion-Assay.** Die Sphäroide wurden in pHEMA-beschichteten Platten für 48h unter normoxischen Bedingung von 21% O<sub>2</sub> oder hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend zur Messung der Invasion in ein Kollagen-I-Gel gebettet. **(A)** Repräsentative Abbildung von Sphäroiden nach 24h in der Kollagenmatrix. Die Invasionsfläche des Hypoxie-kultivierten Sphäroids ist stark vergrößert im Vergleich zum normoxischen Kontrollsphäroid (Skalierungsbalken = 100 µm). **(B)** Quantifizierung der Tumorzellinvasion im Kollagengel nach 24h. Die invasive Fläche wurde vom Sphärenrand aus gemessen und zum ursprünglichen Umfang des Sphäroids normalisiert. Die Hypoxie-induzierten Glioblastomzellen zeigten eine durchschnittliche Erhöhung der Invasionsfläche um  $64 \pm 23 \mu\text{m}^2$  im Vergleich zur Normoxie (s.e.m., n = 6, \* P < 0.05 im zweiseitigen Student-t-Test).

Dieses Experiment unterstrich die pro-invasiven Effekte der Glioblastomzellen unter Hypoxie.

### 5.1.2 Expression von Eph und Ephrinen in humanen Glioblastomzelllinien

Als Nächstes wurde die relative Expression der Eph- und Ephrin-Familie in einer Reihe von humanen Glioblastomzelllinien analysiert. Hierzu wurden für EphA4, EphB1 - 4 und Ephrin-B1 - 3 quantitative *real time* PCRs (qRT-PCR) durchgeführt (Abbildung 5.2). Zur Normalisierung der mRNA-Expressionslevel diente in der vorliegenden Arbeit stets die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT*, das für die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase kodiert. Dieses Gen wird unabhängig von äußeren Stimuli wie etwa Hypoxie in den untersuchten Zelllinien gleichbleibend stark exprimiert. Die Eph und Ephrine wurden in der Mehrheit aller untersuchten Zelllinien exprimiert, jedoch war ein recht heterogenes Expressionsmuster innerhalb der verschiedenen Glioblastomzelllinien erkennbar. Eine Ausnahme stellte der EphB3-Rezeptor dar, der weder in G55TL- noch in G141-Glioblastomzellen exprimiert wurde. Die unterschiedlichen Expressionsmuster zeigten Variationen von einer 1-fachen bis zur 30-fachen mRNA-Expression im Vergleich zu *HPRT*.





**Abbildung 5.2: EphB- und Ephrin-B-Regulierung in verschiedenen humanen Glioblastomzelllinien.** Unterschiedliche mRNA-Expressionslevel von Eph und Ephrinen in verschiedenen humanen Glioblastomzelllinien ermittelt durch quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR). Zur Normalisierung der Expressionslevel wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT* eingesetzt. (s.e.m., n=3).

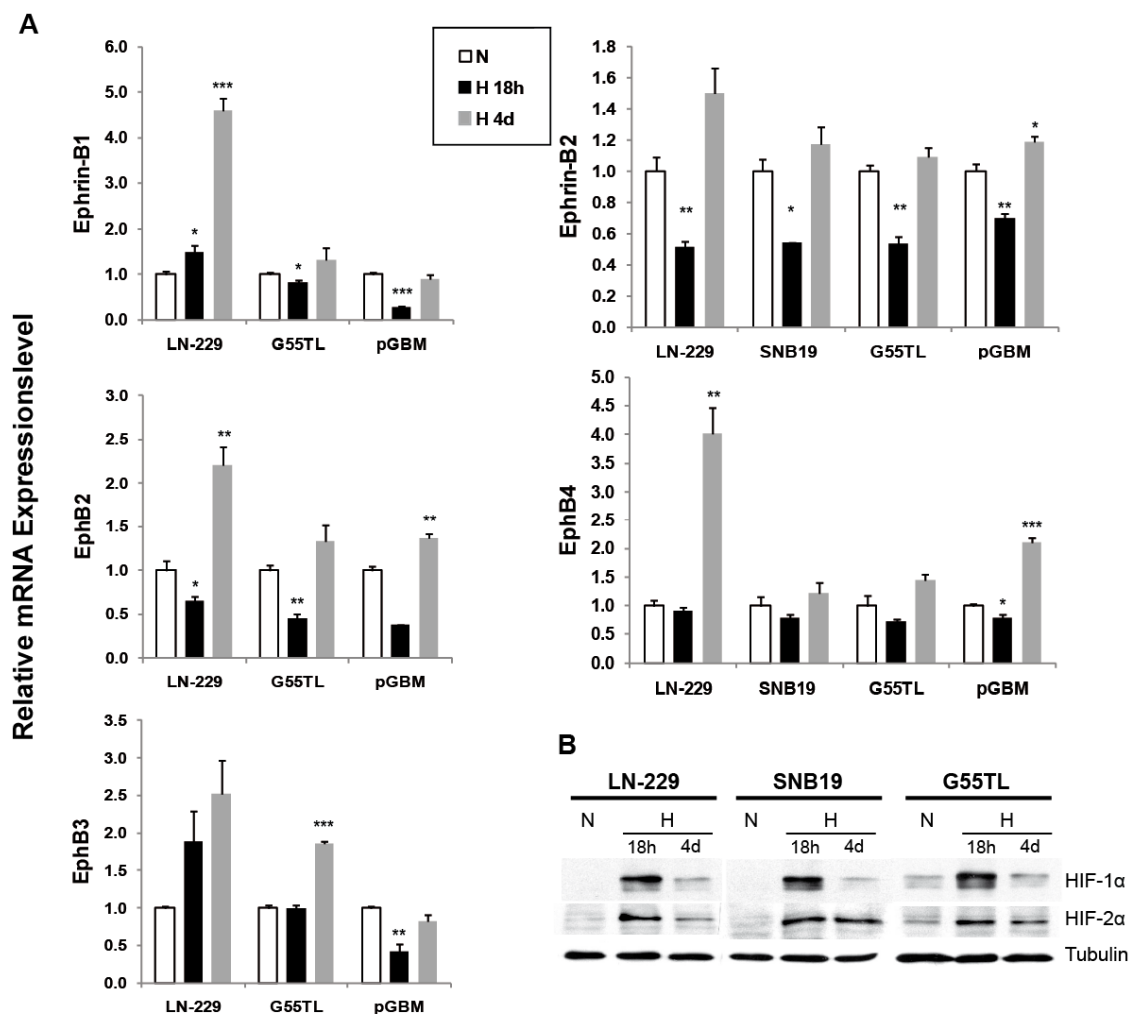
### 5.1.3 Akute Hypoxie führt zu einer verminderten Expression der EphB-Rezeptoren und deren Ephrin-B-Liganden in humanen Glioblastomzellen

Um den Einfluss der Hypoxie auf die EphB- und Ephrin-B-Expression im Glioblastom weiter zu ermitteln, wurden die mRNA-Expressionslevel der humanen

Glioblastomzelllinien LN-229, SNB19 und G55TL unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen analysiert.

Die Zellen wurden erneut unter Sphäroid-begünstigenden Bedingungen in Serum-freien Medium unter Normoxie kultiviert und zusätzlich einer akuten Hypoxie von 18h bei 1% O<sub>2</sub>, sowie einer langanhaltenden Hypoxie von 96h, beziehungsweise 4 Tagen (4d), bei 1% O<sub>2</sub> ausgesetzt. Die durchgeführte qRT-PCR ergab in den Zellen, die unter akuten hypoxischen Bedingungen (18h) kultiviert worden waren, mehrheitlich eine geringere EphB- und Ephrin-B-Transkriptionsmenge verglichen zu den normoxischen Kontrollen (Abbildung 5.3 [A]). Vor allem Ephrin-B2 zeigte in allen Zelllinien bei akuter Hypoxie eine signifikant reduzierte Expression. Für Ephrin-B2 und EphB4 wurden neben den gängigen Glioblastomzelllinien auch primäre Glioblastomzellen (pGBM) verwendet, die in unserem Labor aus einer GBM-Biopsie isoliert werden konnten. Auch diese Zellen zeigten für Ephrin-B2 und EphB4 unter Hypoxie eine signifikante Herunterregulation. Diese Repression der Eph und Ephrine wurde in allen Zelllinien unter den langanhaltenden hypoxischen Bedingungen (4d) nicht nur aufgehoben, sondern die Expression im Vergleich zur normoxischen Kontrolle teilweise signifikant erhöht.

Um herauszufinden, ob die unterschiedliche Hypoxie-abhängige Modulation der Eph- und Ephrin-Expression durch HIF reguliert wird, wurde zunächst die Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  unter den gleichen Kultivierungsbedingungen wie für die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene mRNA Expressionsanalyse auf Proteinebene untersucht (Abbildung 5.3 (B)). Dabei konnte man in einer *Western-Blot*-Analyse die Hypoxie-induzierte Stabilisierung und eine erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  nach der akuten Hypoxie von 18h gegenüber den normoxischen Kontrollen erkennen. Nach 96h wiederum war ein deutlicher Abbau von HIF-1 $\alpha$  zu erkennen, der bei den G55TL-Zellen auf den Expressionslevel der normoxischen Kontrolle abfiel. HIF-2 $\alpha$  hingegen war nach 96h noch erkennbar. Vor allem in den SNB19- und G55TL-Zellen war nach 96h eine deutlich höhere Expression von HIF-2 $\alpha$  gegenüber der normoxischen Kontrolle vorhanden. Als Kontrolle der in der SDS-PAGE aufgetragenen Proteilmengen diente in der vorliegenden Arbeit das Zytoskelettprotein Tubulin, das vergleichbar zu *HPRT* immer in gleichen Mengen in der Zelle vorliegt.

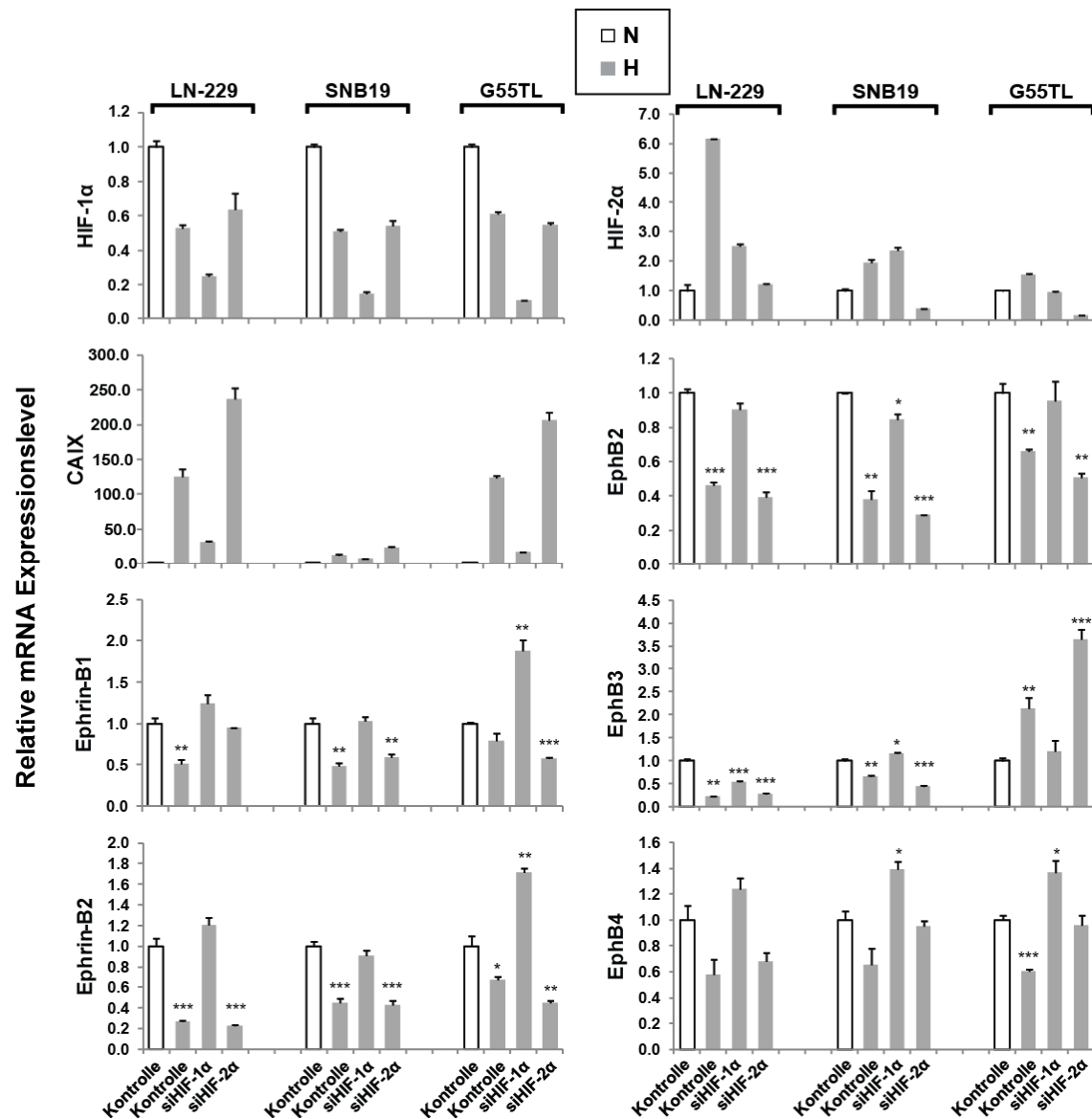


**Abbildung 5.3: Unterschiedliche Hypoxie-abhängige Regulation von EphB und Ephrin-B.** Alle Zellextrakte wurden von Glioblastomzellen bezogen, die unter Sphären-formierenden Bedingungen kultiviert worden waren. **(A)** Zur Quantifizierung der Hypoxie-abhängigen Expression von EphB und Ephrin-B, wurden die Glioblastomzellen für 18h, beziehungsweise 96h (4 Tage [d]), entweder unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) oder unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Die qRT-PCR zeigte eine Herunterregulation der relativen mRNA-Expression um durchschnittlich 50% bei 18h Hypoxie und eine bis zu 4,5-fache Hochregulation der Eph und Ephrine nach 4 Tagen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expressionsstärke des Haushaltgens *HPRT* verwendet und als x-fache Induktion zur normoxischen Kontrolle relativiert. (s.e.m., n=3, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test). **(B)** Die *Western-Blot*-Analyse der Proteinextrakte der Glioblastomzellen die durch SDS-PAGE (8%) aufgetrennt wurden, zeigte eine deutlich stärkere Expression der Proteine HIF-1α und HIF-2α (je 120 kDa) nach einer Hypoxie-Induktion von 18h bei 1% O<sub>2</sub>. Die Zellen die für 96h (4d) bei 1% O<sub>2</sub> kultiviert wurden zeigten eine stark verminderte HIF-1α-Expression im Vergleich zu der akuten Hypoxie von 18h. Die Expression von HIF-2α hingegen war kaum verändert. Tubulin (57 kDa) diente als interne Ladekontrolle für die auf dem *Blot* befindliche Proteinmenge.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Expression von EphB und Ephrin-B nur transient (18h) durch Hypoxie reprimiert und nach längerer Hypoxie (4d) wieder aufgehoben wurde. Die transiente hypoxische Repression korrelierte dabei mit der transienten Erhöhung der HIF-1α-Proteinlevel, die sich nach der länger anhaltenden Hypoxie wieder verringerte. Der Level von HIF-2α blieb dagegen unter hypoxischen Bedingungen konstant hoch. Dies deutete darauf hin, dass die Repression der Eph und

Ephrine HIF-1 $\alpha$ -abhängig ist, da mit dem Abbau von HIF-1 $\alpha$  nach längerer Hypoxie (4d) auch die Repression der Eph und Ephrine aufgehoben wurde.

#### 5.1.4 HIF-1 $\alpha$ -abhängige Verminderung der EphB- und Ephrin-B-Expression



**Abbildung 5.4: HIF-1 $\alpha$ -abhängige Verminderung der EphB- und Ephrin-B-Expression unter hypoxischen Bedingungen.** Glioblastomzelllinien wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit siRNA transient transfiziert und unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (18h, 1% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Die mRNA wurde 24h nach der 2. Transfektion geerntet. Die qRT-PCR zeigte unter hypoxischen Bedingungen für HIF-2 $\alpha$  und für das HIF-1 $\alpha$  Zielgen CAIX eine erhöhte und für EphB und Ephrin-B eine verminderte relative mRNA-Expression um das durchschnittlich 0,5-fache zu der normoxischen Kontrolle. Der siRNA-vermittelte Funktionsverlust von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  konnte jeweils bestätigt werden. Die Repression der Eph und Ephrine wurde durch den HIF-1 $\alpha$ - aber nicht den HIF-2 $\alpha$ -Funktionsverlust aufgehoben. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT* verwendet und als x-fache Induktion zur normoxischen Kontrolle relativiert. (s.e.m., n=3, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01. \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test).

Daraufhin sollte ermittelt werden, ob die beobachtete Hypoxie-abhängige Verminderung der EphB- und Ephrin-B-Expression HIF-abhängig ist. Dafür wurde in den drei Glioblastomzelllinien LN-229, SNB19 und G55TL durch eine transiente Transfektion ein siRNA vermittelter Funktionsverlust (*knock-down*) von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  erzeugt. Anschließend wurden die Zellen normoxischen (21%) oder hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> für 18h ausgesetzt und die mRNA Expression von EphB und Ephrin-B analysiert. Die siRNA-vermittelte Abschaltung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen wurde ebenso auf mRNA-Ebene überprüft.

Wie in Abbildung 5.4 zu sehen ist, war eine deutliche Verminderung der Expression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in den jeweils entsprechenden siRNA-behandelten Zellen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle erkennbar. Da die Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Expression jedoch keine Aussage über die Funktionalität des Transkriptionsfaktors liefert, wurde diese anhand des bekannten HIF-1 $\alpha$ -Zielgens Carbonanhydrase-IX (*carbonic anhydrase-IX*, *CA-IX*) überprüft. Die Aufgabe von CA-IX besteht darin, den intrazellulären pH-Wert relativ neutral zu halten, indem es die durch den sauren anaeroben Tumorstoffwechsel angefallenen Wasserstoff-Ionen neutralisiert (286). *CA-IX* zeigte eine eindeutig verstärkte Expression unter Hypoxie, die sich in den HIF-1 $\alpha$ -siRNA-behandelten Zellen, jedoch nicht in den HIF-2 $\alpha$ -siRNA-behandelten Zellen stark verringerte. Dies bewies die erfolgreiche funktionelle Reduktion der HIF-1 $\alpha$ -Aktivität durch die siRNA-Behandlung.

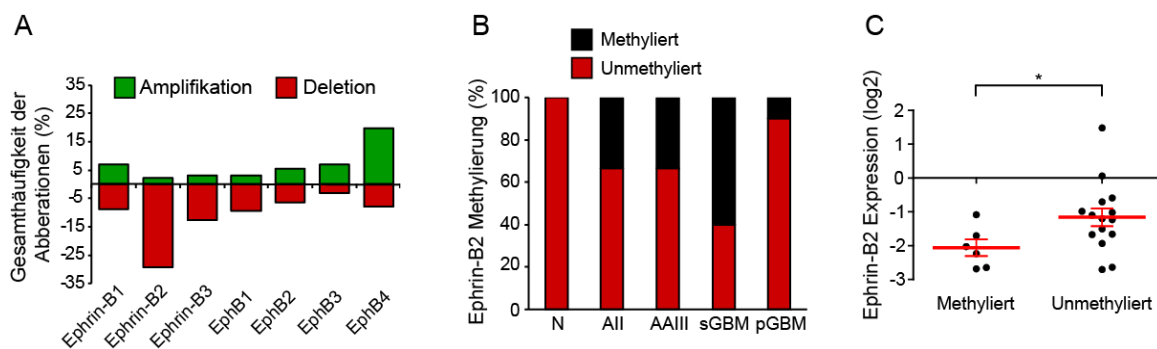
Die Analyse der Eph- und Ephrin-mRNA-Expression bestätigte die Annahme, dass unter Hypoxie die verminderte Eph- und Ephrin-Expression HIF-1 $\alpha$ -abhängig ist. In den hypoxischen Kontrollen war eine signifikante Herunterregulation von bis zu 50% der EphB- und Ephrin-B-Expression erkennbar, die durch den siRNA-vermittelten Funktionsverlust von HIF-1 $\alpha$  jedoch nicht von HIF-2 $\alpha$  aufgehoben werden konnte.

Zusammenfassend ließ sich durch die bisherigen Versuche zeigen, dass die verminderte Expression von EphB und Ephrin-B unter Hypoxie einer HIF-1 $\alpha$ -abhängigen Kontrolle unterliegt.

### 5.1.5 Genetische Aberrationen von EphB und Ephrin-B in Gliomen

Untersuchungen verschiedener Karzinome und neuronaler Erkrankungen belegen chromosomale Veränderungen der Eph und Ephrine, wie beispielsweise ein Verlust der Heterozygotie (*Loss of Heterozygosity* [LOH]) bei EpHA2, EphA8 und EphB2 (287, 288), sowie die Deletion von EphA7 (289). Neben den molekularen Analysen sollten daher zur weiteren Charakterisierung die Gen-Loci der EphB-Rezeptoren und

deren Ephrin-B-Liganden in Gliomen auf chromosomale Aberrationen überprüft werden. Mit freundlicher Unterstützung von Professor Reifenberger (Institut für Neuropathologie, Düsseldorf) wurde eine komparative genomische Hybridisierung (*Comparative Genomic Hybridization* [CGH]) in einer Kohorte von 127 Gliompatienten unterschiedlicher Malignitätsgrade durchgeführt. In Abbildung 5.5 (A) ist zu erkennen, dass generell eine Deletion von EphB und Ephrin-B häufiger auftritt als eine Amplifikation. Eine Ausnahme bildete hierbei EphB4, das die höchste Zunahme verzeichnete. Vor allem Ephrin-B2 zeigte den stärksten Verlust in Gliomen im Vergleich zu allen anderen EphB's und Ephrin-B's.



**Abbildung 5.5: Der Verlust von Ephrin-B2 ist ein häufiges Ereignis in malignen Gliomen.** (A) Analyse von Gen-Loci-Amplifikation und -Deletion-Frequenz der EphB/Ephrin-B-Familie in einer Kohorte von 127 Gliompatienten (12 Astrozytome WHO-Grad II [All], 18 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III [AAIll], 11 sekundäre Glioblastome WHO-Grad IV [sGBM] und 86 primäre Glioblastome WHO-Grad IV [pGBM]). Die komparative genomische Hybridisierung (*Comparative Genomic Hybridization* [CGH]) ergab eine hohe Deletion für Ephrin-B2 und Amplifikation von EphB4. (B) Die Frequenz der Ephrin-B2-Promotor-CpG-Hypermethylierung im gesunden Gehirn (N) und Gliomen unterschiedlicher Malignität (3 gesunde Gehirne (N), 3 Astrozytome WHO-Grad II [All], 3 anaplastische Astrozytome WHO-Grad III [AAIll], 10 primäre Glioblastome WHO-Grad IV [pGBM], und 10 sekundäre Glioblastome WHO-Grad IV [sGBM]) weist auf die Promotor-Hypermethylierung als frühes Ereignis in der Gliomprogression hin. (C) Ein Vergleich der Ephrin-B2-mRNA-Level in Gliomen zeigt eine reduzierte Ephrin-B2-Expression in Gliomen mit einer Ephrin-B2-Promotor-Hypermethylierung (s.e.m., n=6 für methylierte und 15 für nicht methylierte Gliome, \* P < 0.05 im zwei-seitigen Student-t-Test).

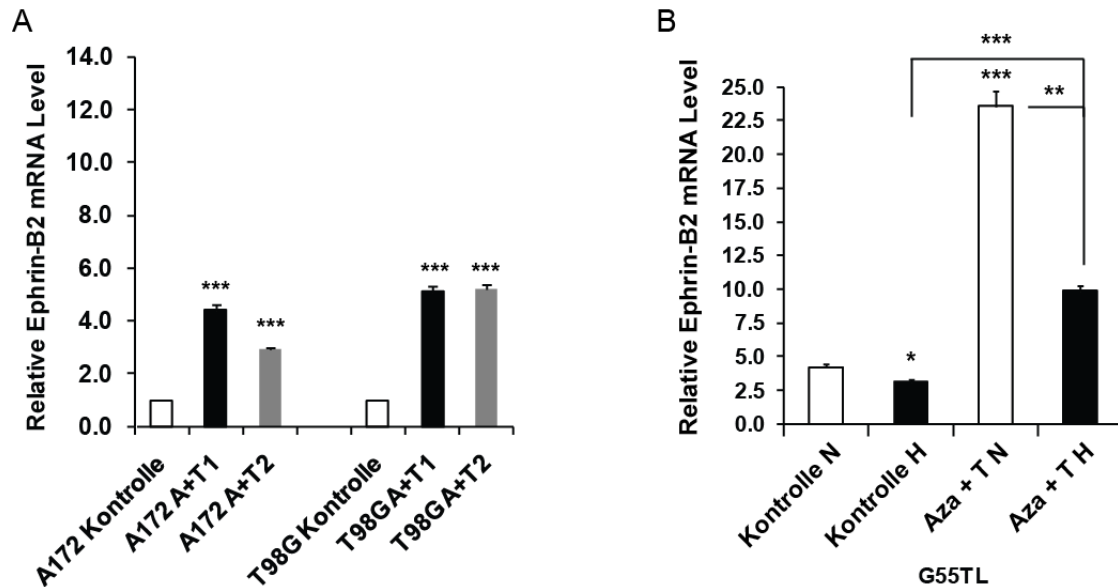
Die epigenetische Abschaltung von Genen (*silencing*) ist neben der Vervielfachung oder Deletion ein weiterer Mechanismus der chromosomalen Genregulation in Tumoren. Die Abschaltung der Gene durch Hypermethylierung oder Deacetylierung der Promotorsequenzen spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Progression von humanen Tumoren (290).

Da für Ephrin-B2 häufig eine Deletion nachgewiesen werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob in Gliomen ein Funktionsverlust von Ephrin-B2 mittels epigenetischer Abschaltung erfolgt. Hierfür untersuchte die Gruppe von Professor Reifenberger anhand einer Natriumbisulfit-Sequenzierung der Ephrin-B2-Promotorregion den CpG-Methylierungsstatus in einer Kohorte von 26 Gliompatienten unterschiedlicher

Malignitätsgrade und 3 gesunden Gehirnen (N). Dabei konnte im Vergleich zu normalen Hirnproben eine Hypermethylierung des Ephrin-B2-Promotors in Grad II und III Astrozytomen beobachtet werden, die bei der Weiterentwicklung zu einem sekundären Glioblastom weiter zunahm. Auch in primären Glioblastomen konnte im Gegensatz zum gesunden Hirngewebe eine Ephrin-B2-Hypermethylierung festgestellt werden (Abbildung 5.5 [B]). Übereinstimmend dazu zeigten die methylierten Gliome eine niedrigere Ephrin-B2-Expression (Abbildung 5.5 [C]).

Zur weiteren Überprüfung der epigenetischen Regulation von Ephrin-B2 in Gliomen wurden Glioblastomzellen mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin und dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) behandelt. 5-Aza-2'-Deoxycythydin verhindert sowohl die Replikation-gekoppelte Erhaltung als auch die *de novo* DNA-Methylierung. Während der Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren werden diese in die DNA integriert und binden irreversibel die Methyltransferaseenzyme, was letztlich zu einem Abbau des Enzyms und einer passiven Demethylierung führt (291). Die 5-Aza-2'-Deoxycythydin- und TSA-Behandlung der Glioblastomzellen A172 und T89G erfolgte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Professor Reifenberger (Institut für Neuropathologie, Düsseldorf). Im Weiteren wurden die Zellen zur quantitativen Überprüfung der Transkriptionsaktivität zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen 5-Aza-2'-Deoxycytidin Konzentrationen behandelt (siehe Abbildung 5.6). Die G55TL Zellen wurden zusätzlich für 24h unter hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> inkubiert (Versuchsdauer insgesamt 72h).

Die Behandlung aller drei Zellarten mit den Inhibitoren resultierte in einer Erhöhung der Ephrin-B2-Expression (Abbildung 5.6). Die A+T1-Bedingungen erschienen optimal für eine Behandlung der Zellen, da eine Steigerung der Dosis (A+T2) keine weitere Erhöhung der Ephrin-B2 Expression zur Folge hatte. Die A+T2-Behandlung führte stattdessen in den A172-Zellen zu einer verringerten Ephrin-B2-Expression, was sich auf eine erhöhte Toxizität der größeren 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Konzentration zurückführen lässt. Die Induktion der Expression lag durchschnittlich bei einer 5-fachen Hochregulation im Vergleich zu den Kontrollen. In den G55TL-Zellen war eine signifikante Herunterregulation der Ephrin-B2-Expression sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten Zellen unter Hypoxie erkennbar.



**Abbildung 5.6: Methylierungs- und Deacetylierungsstatus von Ephrin-B2 in Glioblastomzellen.** Relative mRNA-Expressionslevel von Ephrin-B2 ermittelt durch quantitative *real-time* PCR in Glioblastomzellen, die zum Nachweis einer Promotor-Methylierung und einer Histon-Deacetylierung von Ephrin-B2 zuvor mit 500 nM 5-Aza-2'-Deoxycytidin + 1  $\mu$ M Trichostatin A (**A+T1**), 1  $\mu$ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin + 1  $\mu$ M Trichostatin A (**A+T2**) oder 20  $\mu$ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin + 1  $\mu$ M Trichostatin A (**A+T**) Enzyminhibitoren behandelt wurden. Zur Normalisierung der Expressionslevel wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT* eingesetzt und als x-fache Induktion zur normoxischen Kontrolle relativiert. **(A)** Die Aufhebung der Methylierung und der Deacetylierung durch die Enzyminhibitoren zeigte einen hoch signifikanten Anstieg der Ephrin-B2 Expression in verschiedenen humanen Glioblastomzellen (A172 und T98 [Arbeitsgruppe Reifenberger, Düsseldorf]). **(B)** Humane G55TL-Glioblastomzellen wurden entweder für insgesamt 72h mit 20  $\mu$ M 5-Aza-2'-Deoxycytidin + 1  $\mu$ M Trichostatin A (**A+T**) behandelt oder die letzten 24h bei 1% O<sub>2</sub> kultiviert. Die Ephrin-B2 Expression war in den behandelten Zellen signifikant gegenüber den Unbehandelten erhöht, dennoch war in beiden Gruppen auch jeweils eine signifikant Herunterregulation unter Hypoxie erkennbar. Dabei zeigten die behandelten normoxischen Zellen eine hochsignifikante 5,6-fache und die hypoxischen Zellen eine hochsignifikante 3,2-fache Induktion der Ephrin-B2 Expression im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. (s.e.m., n=3, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test).

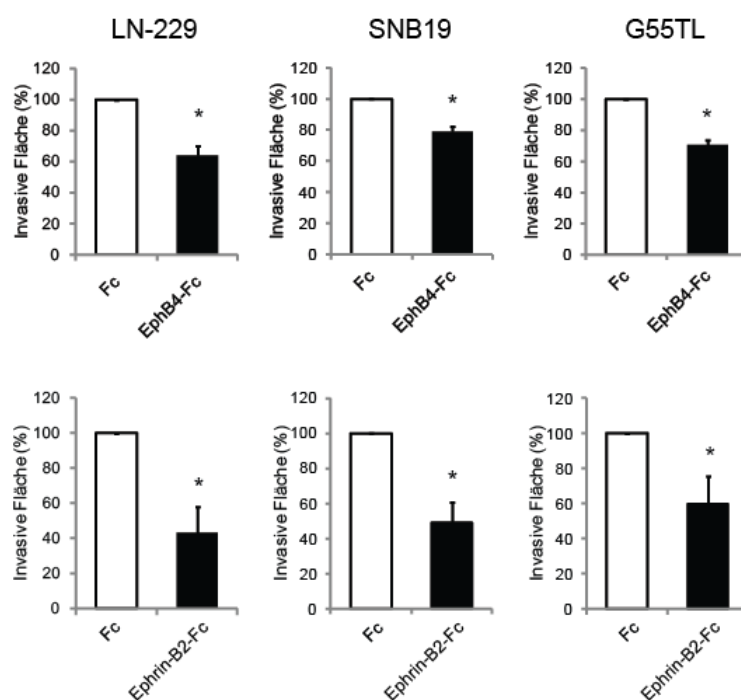
Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Genabschaltung als auch die epigenetische Regulation der Expression von Ephrin-B2 häufige Ereignisse in der Entwicklung des Glioblastoms sind und wiesen im Hinblick auf die Patientenproben in Abbildung 5.5 auf eine *in vivo* Relevanz von Ephrin-B2 hin.

Da die genetische sowie epigenetische Inhibition der Ephrin-B2-Expression zusammen mit der Hypoxie-medierten Ephrin-B2-Repression eine Tumorsuppressorrolle von Ephrin-B2 nahelegten, sollte als Nächstes auf molekularer Ebene untersucht werden, ob die Ephrin-B2-Signaltransduktion in der pro-invasiven Funktion von Hypoxie und HIF involviert sein könnte.



### 5.1.6 Die Aktivierung der reversen Ephrin-B2-Signaltransduktion führt zu einer verringerten Invasion humaner Glioblastomzellen *in vitro*

Zunächst sollte das Invasionsverhalten der humanen Glioblastomzellen LN-229, SNB19 und G55TL nach einer Aktivierung des reversen Ephrin-B2-Signalweges durch Ephrin-B2 beobachtet werden. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse, dass HIF-1 $\alpha$  die Ephrin-B2-Expression reduziert und HIF-1 $\alpha$  die Invasion von Glioblastomzellen verstärkt, sollte entsprechend eine Aktivierung von Ephrin-B2 in Glioblastomzellen zu einer verringerten Invasion der Zellen führen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist für eine Aktivierung der Eph und Ephrine die Bildung von höherwertigen Membranclustern notwendig. *In vitro* kann die Aggregation und Aktivierung der Signaltransduktion von Eph und Ephrinen durch lösliche Fc-Fusionsproteine induziert werden, die mit den entsprechenden Ephrinen beziehungsweise Eph-Rezeptoren dimerisiert sind. Diese löslichen Eph/ Ephrin-Fc-Proteine werden vor dem Versuch durch anti-Fc-Antikörper gebündelt (*pre-clustered*) und präsentieren sich so als höher geordnete Cluster. In dieser Arbeit wurde gebündeltes, rekombinantes EphB4-Fc zur Aktivierung des reversen Ephrin-B2-Signalweges und umgekehrt Ephrin-B2-Fc zur Aktivierung des EphB4-Signalweges verwendet (240, 256, 292).



**Abbildung 5.7: Durch die Aktivierung des EphB4- und reversen Ephrin-B2-Signalweges wird die Invasion der humanen Glioblastomzellen reduziert.** LN-229-, G55TL- und SNB19-Zellen wurden in einem Transwell-Filter kultiviert, der mit Matrigel und darin enthaltenem *pre-clustered* Ephrin-B2-Fc oder EphB4-Fc beschichtet war. Der Invasionsversuch wurde für die LN-229- und SNB19-Zellen nach 8,5h und für G55TL-Zellen nach 15h beendet. Die Tumorzellinvasion wurde in Prozent zu der jeweiligen Fc-Kontrolle verrechnet und die Analyse ergab eine signifikant verringerte Invasion der LN-229-, G55TL- und SNB19-Zellen sowohl in den EphB4-Fc enthaltenen Matrigelfiltern als auch in den Ephrin-B2-Fc enthaltenen Matrigelfiltern. Die Zellen wurden durchschnittlich auf vier Bildern pro Filter gezählt (s.e.m., LN-229 n = 6, SNB19 n = 10, G55TL n = 8, \* P < 0.05 im zwei-seitigen Student-t-Test).

Zur Untersuchung der invasiven Eigenschaften im Hinblick auf Ephrin-B2 und dessen Rezeptor EphB4 wurde ein Transwell-Invasions-Assay durchgeführt (285). In diesem Test wird die Translokation der Zellen durch eine Matrigel-beschichtete Filtermembran gemessen. Das Matrigel stellt dabei eine Art künstliche Basalmembran dar, durch die die Zellen invadieren müssen, um zu dem chemotaktischen Lockstoff (hier 10% FCS) zu gelangen. EphB4- beziehungsweise Ephrin-B2-Fc-Proteincluster wurden zu dem Matrigel gegeben, so dass eine Aktivierung von Ephrin-B2 beziehungsweise EphB4 während der Migration durch das Matrigel erfolgen konnte

Die Zellen zeigten sowohl bei einer Aktivierung des EphB4-Signalweges, durch Ephrin-B2-Fc, als auch bei der Aktivierung des reversen Signalweges von Ephrin-B2, durch EphB4-Fc, eine signifikant verringerte Invasion im Vergleich zur Stimulation mit der Fc-Kontrolle (Abbildung 5.7).

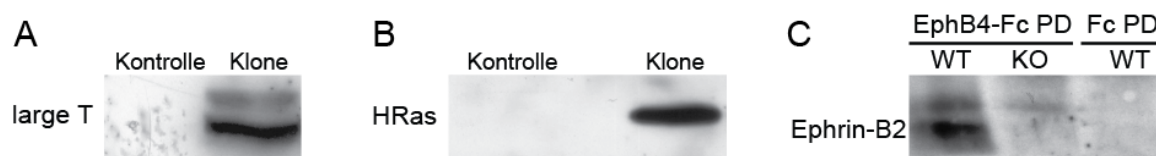
Die bisherigen Untersuchungen lieferten einen ersten Hinweis darauf, dass die negative Regulierung von Ephrin-B2 durch HIF-1 $\alpha$  und die erhöhte HIF-1 $\alpha$ -induzierte Invasion von Glioblastomzellen im Zusammenhang stehen könnten. Dies deutete auf eine repressive Funktion von Ephrin-B2 in der Glioblastomentwicklung hin.

### **5.1.7 Der Verlust von Ephrin-B2 erhöht die Invasion von murinen Gliomazellen *in vitro***

Um die bisherigen Ergebnisse *in vivo* bestätigen zu können, wurde ein malignes Ephrin-B2-*knock-out* (KO) Mausgliomamodell generiert. Dafür wurden Astrozyten aus konditionellen Ephrin-B2<sup>loxP/loxP</sup>-*knock-in*-Mäusen (R. Adams, MPI für molekulare Biomedizin, Münster) isoliert und mit dem SV40-large-T-Antigen-Konstrukt durch Selektion immortalisiert (siehe Diskussion 6.1.1). Die Transformation der Zellen zu einem hochgradigen Gliom wurde durch eine retrovirale Infektion der Zellen mit dem Onkogen H-Ras-V12 vollzogen. Diese Gliomazellen wurden in einem letzten Schritt mit Adenoviren infiziert, die entweder die Cre-Rekombinase und GFP exprimierten um Ephrin-B2-*knock-out* (Ephrin-B2-KO)-Zellen zu erhalten oder mit Kontrolladenoviren infiziert, die nur GFP exprimierten und die Ephrin-B2-Wildtypzellen (Ephrin-B2-WT) darstellten. Um reine *knock-out*- und Wildtyp-Zelllinien zu erhalten wurden alle GFP positiven Zellen mit *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) sortiert.

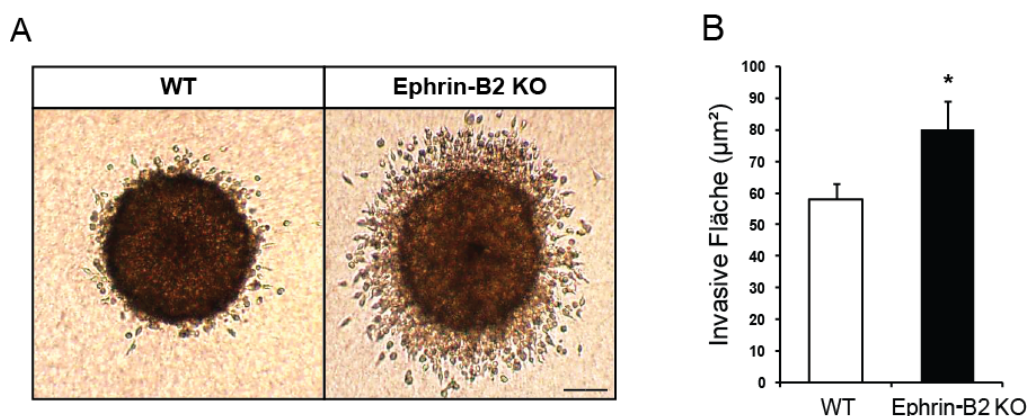
Der Nachweis der erfolgreichen Transfektion und Transduktion mit dem SV40-large-T-Antigen und dem H-Ras-V12-Onkogen wurde anhand von Immunoblot Analysen überprüft (Abbildung 5.8 [A] und [B]). Die Ausschaltung von Ephrin-B2 in den Zellen wurde mit einem EphB4-Fc-*pull-down* und einer Immunoblot Analyse validiert (Abbildung

5.8 [C]). Hier konnte man im Vergleich zu den wildtypischen Gliomazellen in den *knock-out*-Zellen die Ausschaltung von Ephrin-B2 eindeutig erkennen. Der *pull-down* mit dem reinen Fc-Protein diente als Negativkontrolle.



**Abbildung 5.8: Nachweis der Immortalisierung, Transformation und Ausschaltung von Ephrin-B2 in Gliomazellen.** (A) Anhand einer Immunoblot Analyse mit einem large-T-Antikörper konnte die Expression von SV40-large-T in den immortalisierten Zellen bestätigt werden. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Astrozytomazellen. (B) Der Immunoblot mit einem H-Ras-Antikörper zeigt die retrovirale H-Ras-Expression in den transformierten Zellkolonien im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen. (C) Die Gliomazellen wurden mit einem Cre-Rekombinase/ GFP oder nur einem GFP-exprimierenden Adenovirus infiziert um Ephrin-B2-KO beziehungsweise Ephrin-B2-WT-Zellen zu generieren. Die Zellen wurden anschließend durch FACS nach GFP-positiven Zellen aussortiert. Ein *pull-down* (PD) von Ephrin-B2 wurde mit EphB4-Fc-Proteinen durchgeführt, wobei das reine Fc-Protein als Kontrolle diente. Der Immunoblot mit dem Ephrin-B2-Antikörper zeigt die Ausschaltung von Ephrin-B2 in den *knock-out*-Zellen.

Mit den hergestellten Ephrin-B2-KO-Zellen sollte nun die repressive Funktion von Ephrin-B2 in Gliomen *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden. Für die Untersuchung der Invasionseigenschaft der Ephrin-B2-KO-Zellen wurde ein 3D-Kollagenmatrix-Invasion-Assay durchgeführt. Die Sphäroide wurden hierfür in eine Kollagen-I-Matrix eingebettet. Die Invasion der Gliomazellen wurde vom Rande des Sphäroids aus nach 24h gemessen. In den Ephrin-B2-KO-Gliomazellen war eine signifikante Erhöhung der Invasion um das 1,4-fache im Vergleich zu den Ephrin-B2-WT-Gliomazellen vorhanden (Abbildung 5.9).



**Abbildung 5.9: Der Verlust von Ephrin-B2 erhöht die Invasion der Gliomazellen *in vitro*.** Die Sphäroide wurden über 3 Tage mit der *hanging drop*-Methode aus 5000 Zellen generiert. Die Sphäroide wurden anschließend zur Messung der Invasion in ein Kollagen-I-Gel gebettet. (A) Repräsentative Abbildung von Sphäroiden nach 24h in der Kollagenmatrix. Die Invasionsfläche des Ephrin-B2-KO-Sphäroids ist stark vergrößert im Vergleich zum Ephrin-B2-WT-Sphäroid (Skalierungsbalken = 100 µm). (B) Quantifizierung der Tumorzellinvasion im Kollagengel nach 24h. Die invasive Fläche wurde vom Sphärenrand aus gemessen und zum ursprünglichen Umfang des Sphäroids normalisiert. Ephrin-B2-KO-Gliomazellen zeigten dabei eine durchschnittliche Erhöhung der Invasionsfläche um  $22 \pm 9,2 \mu\text{m}^2$  im Vergleich zu Ephrin-B2-WT-Gliomazellen (s.e.m., n = 30, \* P < 0.05 im zwei-seitigen Student-t-Test).

Durch den Invasionsversuch konnte die repressive Funktion von Ephrin-B2 in Gliomazellen bestätigt werden. Zusammenfassend deuteten diese Experimente darauf hin, dass der invasive Phänotyp durch eine mögliche HIF-1 $\alpha$ -abhängige Repression des Ephrin-B2-Signalweges gefördert wird.

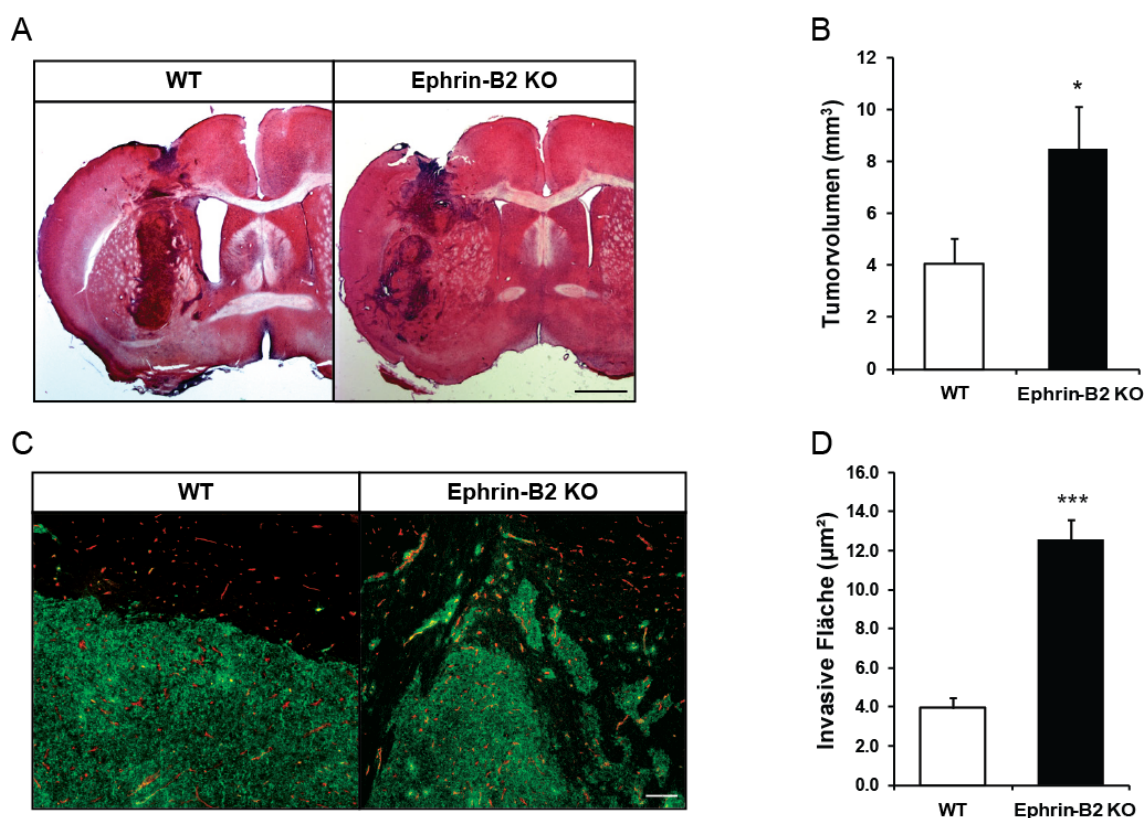
### **5.1.8 Der Verlust von Ephrin-B2 führt zu einem vergrößerten Tumolvolumen und einer erhöhten Invasion *in vivo***

Um nun die Relevanz von Ephrin-B2 im Glioblastom weiter zu entschlüsseln, wurden die hergestellten murinen Ephrin-B2-KO- und WT-Gliomazellen intrakraniell in einem orthotopen Xenograft-Modell transplantiert. Ein Vorteil dieses Transplantationsmodells ist die Anwendung der orthotopen Transplantation. Die Komponenten des Tumormikromilieus spielen eine entscheidende Rolle bei der Progression und Invasion von Glioblastomen. Bei der orthotopen Transplantation werden die Tumorzellen direkt in das Gehirn der Maus injiziert und bilden Tumoren die histologische Ähnlichkeiten mit invasiven humanen Glioblastomen aufweisen (142). Die Xenotransplantationen wurden mit immundefizienten Mäusen (*NMRI-nu* [*nu/nu*]) durchgeführt.

Die Transplantation der Ephrin-B2-WT und -KO-Zellen sowie die Bestimmung des Tumolvolumens und der Blutgefäßfläche entstanden in Zusammenarbeit mit Fabian Finkelmeier (Dr. med.) in unserem Labor. Für die Transplantation wurden 10 Mäuse pro Gruppe anästhesiert und in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Anschließend wurden je Maus  $5 \times 10^4$  Ephrin-B2-KO- oder WT-Gliomazellen pro Mikroliter CO<sub>2</sub>-unabhängigem Medium in das linke Striatum transplantiert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse zur Fixierung des Gewebes mit Paraformaldehyd (PFA) perfundiert und die Gehirne nach der Präparation in serielle Dickschnitte (40 $\mu$ m) geschnitten. Anhand einer Hematoxylin/ Eosin (H/E)-Färbung konnte dann das Tumolvolumen bestimmt werden.

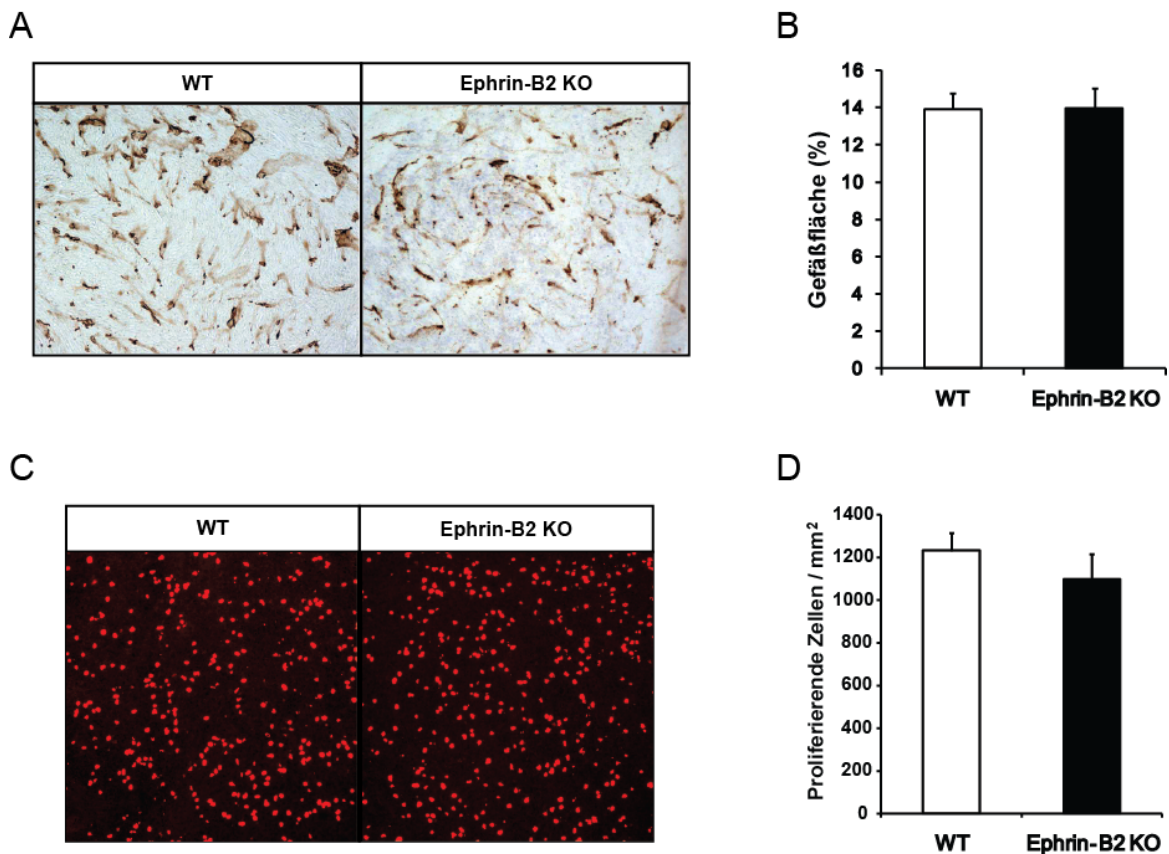
Die Ausschaltung von Ephrin-B2 bewirkte eine signifikante Vergrößerung des Tumolvolumens um durchschnittlich das Doppelte im Vergleich zu den Ephrin-B2-WT-Tumoren (Abbildung 5.10 [A] und [B]). Für die Ephrin-B2-Tumorzellen war auch die Tendenz einer erhöhten Invasion erkennbar (Abbildung 5.10 [A]). Da der Beginn der Invasion in kleineren Tumoren besser zu analysieren ist, wurde der Versuch wiederholt und 1  $\mu$ l mit  $5 \times 10^4$  Ephrin-B2-KO- oder WT-Gliomazellen in 1  $\mu$ l CO<sub>2</sub>-unabhängigem Medium pro immundefizienter Maus (5 Mäuse pro Gruppe) transplantiert. Die Mäuse wurden bereits nach 11 Tagen perfundiert. Anstelle von 40  $\mu$ m-Dickschnitten wurden nun 10  $\mu$ m dicke Schnitte am Kryostaten hergestellt und diese anhand von

Immunfluoreszenz gefärbt und ausgewertet. Durch die spezifische Anfärbung der Zellen mit Hilfe eines large-T-Antikörpers war eine eindeutige Auswertung der Tumorzellinvasion möglich. Die invasive Fläche der Ephrin-B2-KO-Tumoren war hochsignifikant durchschnittlich um das 3,2-fache vergrößert verglichen mit den Ephrin-B2-WT-Tumoren (Abbildung 5.10 [C] und [D]). Während bei den Ephrin-B2-WT-Tumoren ein relativ gleichmäßiger Tumorrand erkennbar war, kennzeichneten die Ephrin-B2-KO-Tumoren viele kleinere wie auch größere Ausbuchtungen am Tumorrand, sowie Tumorzellcluster und einzelne Tumorzellen im Parenchym. In den Färbungen wurden parallel zu large-T auch Blutgefäße mit Hilfe eines Podocalyxin-Antiköpers visualisiert. Es ließen sich jedoch keine großen Unterschiede in der Morphologie oder Anzahl der Blutgefäße erkennen.



**Abbildung 5.10: Der Verlust von Ephrin-B2 erhöht das Tumolvolumen und die Tumorzellinvasion von Gliomazellen.** Murine Gliomazellen wurden in einem intrakraniellen Tumormodell in das linke Striatum von immundefizienten Mäusen transplantiert. Die Mäuse wurden nach 14 Tagen perfundiert und die Gehirne anschließend präpariert und ausgewertet. **(A)** Repräsentative Abbildungen von H/E-gefärbten Hirnschnitten zeigen das vergrößerte Ephrin-B2-KO-Tumolvolumen verglichen mit Ephrin-B2-WT. (Skalierungsbalken = 1 mm) **(B)** Die stereologische Quantifizierung der Tumoren ergab eine Erhöhung des Ephrin-B2-KO-Tumolvolumens um  $4,4 \pm 1,6 \text{ mm}^3$  im Vergleich zur Wildtypkontrolle. **(C)** Repräsentative Abbildungen von Immunfluoreszenz gefärbten Hirnschnitten zeigen die verstärkte Invasion der Ephrin-B2-KO-Zellen verglichen mit Ephrin-B2-WT. Die Hirnschnitte wurden für eine Immunfluoreszenz mit anti-large T (grün) zur Visualisierung der large T-transfizierten Tumorzellen und mit anti-Podocalyxin (rot) zur Visualisierung der Blutgefäße inkubiert. Die Invasion wurde mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. (Skalierungsbalken = 100 µm) **(D)** Die invasive Fläche der Tumoren wurde in zufällig ausgewählten Bildvergrößerungen quantifiziert, indem die Invasion vom Tumorrand aus gemessen und zur Länge des analysierten Tumorrandes normalisiert wurde. Die invasive Fläche der Ephrin-B2-KO-Tumoren ist dabei durchschnittlich dreifach größer als in den Wildtypkontrollen (s.e.m., **(A)** + **(B)**  $n = 10$ , **(C)** + **(D)**  $n = 5$ , \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  im zweiseitigen Student-t-Test).

Um eine Aussage treffen zu können, ob das vergrößerte Tumolvolumen im Falle eines Ephrin-B2-Verlusts auf eine erhöhte Proliferation der Zellen oder eine erhöhte Anzahl von Blutgefäßen zurückzuführen ist, wurde die Proliferation und die Gefäßanzahl in den Tumoren quantifiziert. Die immunhistochemische Gefäßfärbung mit dem CD34 Antikörper ergab keinen signifikanten Unterschied in der Gefäßfläche der Tumoren (Abbildung 5.11 [A] und [B]). Dies deutete darauf hin, dass die Angiogenese nicht für das unterschiedliche *in vivo* Wachstumsverhalten der Tumoren verantwortlich war. Die *in vivo* Rate der Zellteilung wurde mit einem Histon-H3-Antikörper in einer Immunfluoreszenzfärbung analysiert. In der Anzahl der proliferierenden Zellen pro mm<sup>2</sup> konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Ephrin-B2-KO-Tumoren und den Ephrin-B2-WT-Tumoren verzeichnet werden (Abbildung 5.11 [C] und [D]).



**Abbildung 5.11: Der Verlust von Ephrin-B2 hat keinen Einfluss auf die Proliferation der Gliomazellen und die Gefäßfläche im Tumor.** (A) Repräsentative Abbildungen von CD34 immunhistochemisch-gefärbten Hirnschnitten zeigen die Ähnlichkeit der Blutgefäße bei Ephrin-B2-KO-Tumoren und Ephrin-B2-WT-Tumoren. (B) Die Quantifizierung zeigte ähnlich große Gefäßflächen in beiden Tumoren, mit  $13,94 \pm 1,09$  % für Ephrin-B2-KO und  $13,94 \pm 0,86$  % in den Ephrin-B2-WT. (C) Repräsentative Abbildungen von Immunfluoreszenz-gefärbten Hirnschnitten zeigen in den Ephrin-B2-KO wie auch in den WT-Tumoren die gleiche Anzahl an Histon H3-positiven proliferativen Zellen. Die Hirnschnitte wurden für Immunfluoreszenz mit anti-Histon H3 (rot) visualisiert und die proliferativen Zellen mittels Fluoreszenz Mikroskopie analysiert. (D) Die Quantifizierung der proliferierenden Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Ephrin-B2-KO ( $1097,3 \pm 118,2$ ) und der Wildtypkontrolle ( $1231,6 \pm 81$ ). (s.e.m., (A) + (B) n = 5, (C) + (D) n = 8-10, \* P < 0.05 im zwei-seitigen Student-t-Test)



Zusammenfassend konnte mit Hilfe der *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen eine repressive Funktion von Ephrin-B2 in der Gliomabiologie identifizieren werden. Sowohl das verstärkte Tumorwachstum als auch die erhöhte Tumordinvasion konnten nicht durch eine erhöhte Proliferation der Tumorzellen verifiziert werden. Ebenso war keine Veränderung der Gefäßdichte im Tumor nachweisbar.

## **5.2 Die Rolle des HIF-1 $\alpha$ -regulierten Repressors ZEB2 im Glioblastom**

Da HIF als Transkriptionsfaktor eine aktivierende Funktion besitzt, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit der molekulare Mechanismus der HIF-vermittelten Repression von Ephrin-B2 untersucht werden. Die HIF-abhängige Herunterregulation von Genen konnte bisher entweder durch konkurrierende Transkriptionsfaktoren wie c-Myc (137, 138) oder durch die HIF-vermittelte Aktivierung von Repressoren erklärt werden. Vor allem die Regulation von EMT-Repressoren durch HIF wurde in der Tumorbilogie bereits mehrmals nachgewiesen. Dabei wurde gezeigt, dass HIF das Zusammenspiel von Snail (SNAI), ZEB oder bHLH-Faktoren beeinflusst und somit bei der Invasion und Metastasierung von epithelialen Tumoren beteiligt ist (164, 177, 192, 293).

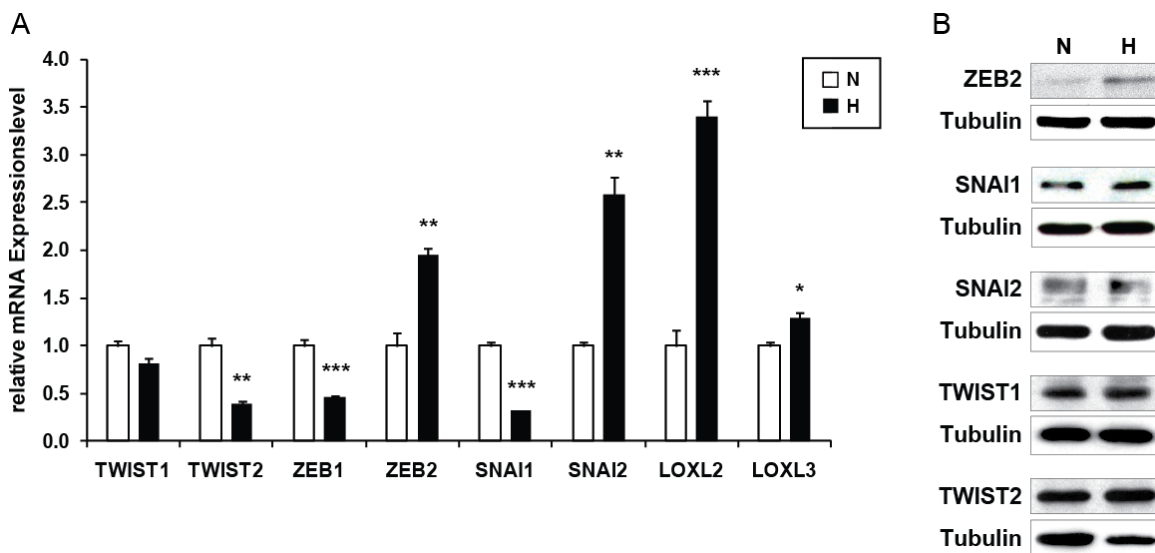
### **5.2.1 Untersuchungen zur Hypoxie-abhängigen Regulation von EMT-Repressoren im Glioblastom**

Zur Überprüfung einer möglichen Ephrin-B2-Regulation durch HIF-induzierte EMT-Repressoren, wurde die Expression verschiedener EMT-Repressorfamilien auf mRNA- und auf Proteinebene analysiert. Neben den drei Transkriptionsfamilien Twist, Snail und ZEB wurden in diesem Zusammenhang auch Mitglieder der LOX-Familie untersucht, die als Hypoxie-induzierte Regulatoren von SNAI fungieren.

Hierzu wurde die humane LN-229 Glioblastomzelllinie normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (1% O<sub>2</sub>) für 18h ausgesetzt und die mRNA-Expression der EMT-Repressoren analysiert. Die qRT-PCR zeigte eine hochsignifikante Erhöhung der Expression von ZEB2, SNAI2, LOXL2 und LOXL3 durch Hypoxie (Abbildung 5.12 [A]). Dagegen war die Expression von TWIST2, ZEB1 und SNAI1 unter Hypoxie im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen signifikant verringert.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete hypoxische Induktion der EMT-Repressoren auf mRNA-Ebene auch posttranslational nachzuweisen ist, wurden *Western-Blot*-Analysen durchgeführt. Dafür wurden LN-229-Glioblastomzellen für 18h unter hypoxischen Bedingungen (1 % O<sub>2</sub>) inkubiert und anschließend die Proteine

isoliert. Wie der Abbildung 5.12 (B) zu entnehmen ist, konnte für ZEB2, SNAI1 und SNAI2 eine Erhöhung der Proteinexpression in den LN-229-Zellen unter Hypoxie nachgewiesen werden. Bei TWIST2 war eine leichte Erhöhung der Proteinexpression unter Berücksichtigung der geringeren Proteinbeladung vorhanden. Die eindeutigste Induktion der Proteinexpression durch Hypoxie war bei ZEB2 erkennbar.



**Abbildung 5.12: Untersuchung der Hypoxie induzierten Expression von EMT-Repressoren auf mRNA- und Proteinebene.** Humane LN-229-Glioblastomzellen wurden unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (18h, 1% O<sub>2</sub>) kultiviert und anschließend zum einen die mRNA für die qRT-PCR und zum anderen die Proteine für *Western-Blot*-Analysen isoliert. **(A)** Die qRT-PCR zeigte unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Erhöhung der Expression von ZEB2, SNAI2 und LOXL2/ 3 und eine verringerte Expression von TWIST1/ 2, ZEB1 und SNAI1. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT* verwendet und als x-fache Induktion zur jeweiligen normoxischen Kontrolle relativiert. (s.e.m., n=3, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test). **(B)** Die *Western-Blot*-Analysen der Proteinextrakte die durch SDS-PAGE (8% für ZEB2 und 12% für die restlichen Repressoren) aufgetrennt wurden, ergaben eine stärkere Expression der Proteine von ZEB2, SNAI1 und SNAI2 und eine leichte Erhöhung bei TWIST2, mit Berücksichtigung der verringerten Proteinbeladung, nach einer Hypoxie Induktion von 18h bei 1% O<sub>2</sub>. Keine Hypoxie Induktion konnte bei TWIST1 festgestellt werden. Für die Proteine wurden die spezifischen Antikörper anti-ZEB2 (157 kDa), anti-SNAI1 (29 kDa), anti-SNAI2 (30 kDa), anti-TWIST1 (28 kDa), anti-TWIST2 (18 kDa) verwendet. Tubulin diente als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

Zusammenfassend zeigten die *real-time* PCR- und *Western-Blot*-Ergebnisse, dass die EMT-Repressoren in Glioblastomzellen unterschiedlich durch Hypoxie induziert werden und die ZEB2- und SNAI2-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene unter Hypoxie gesteigert ist.

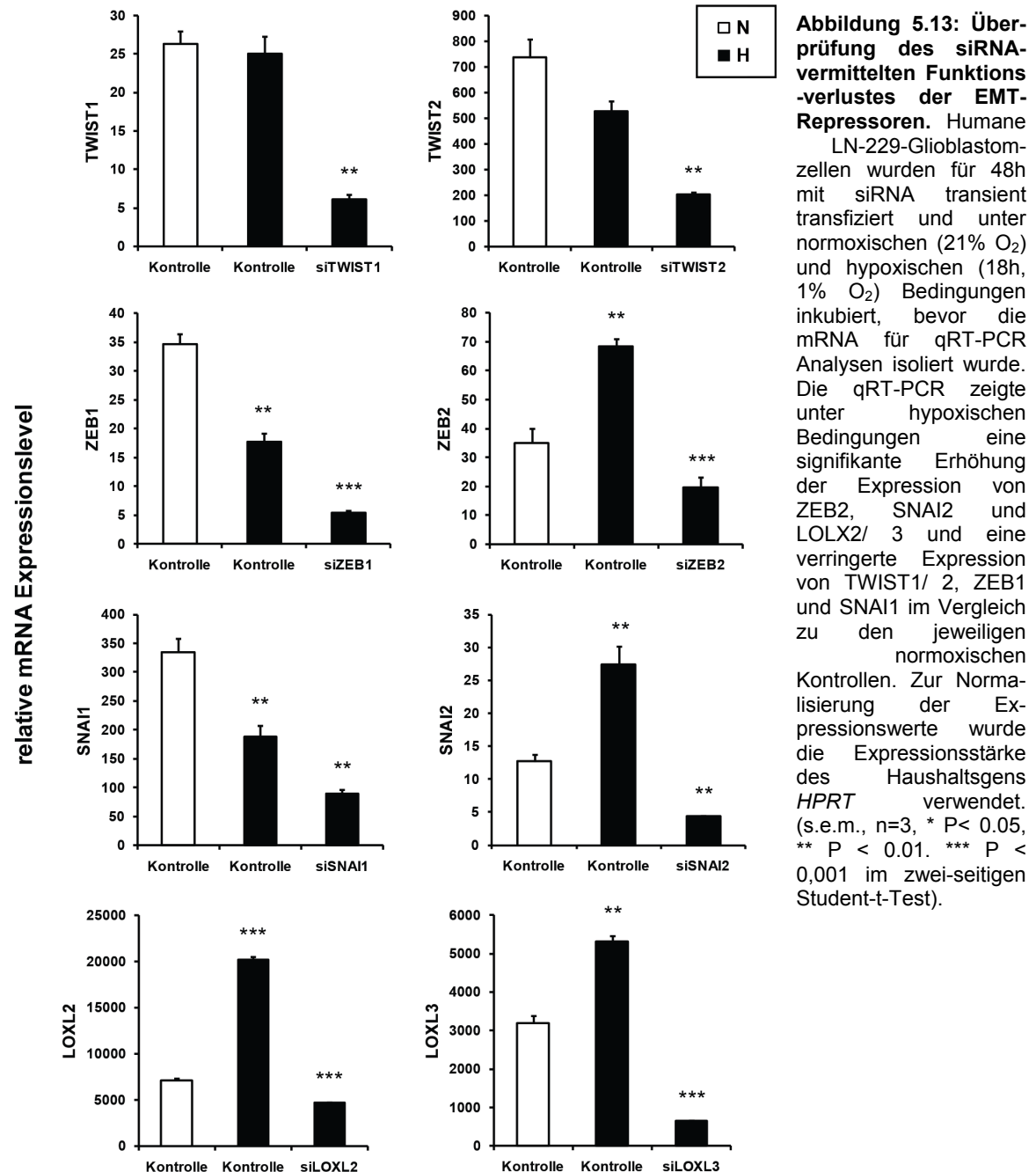
### 5.2.2 Die Inhibition von TWIST1, TWIST2 und ZEB2 hebt die Hypoxie-induzierte Repression von Ephrin-B2 auf

Um die Rolle der EMT-Repressoren als potentielle Ephrin-B2-Regulatoren genauer zu analysieren, wurde eine siRNA-vermittelte *knock-down*-Studie durchgeführt.



Hierfür wurden humane LN-229-Glioblastomzellen transient mit EMT-Repressor-spezifischen siRNAs transfiziert und die Zellen anschließend normoxischen (21%) und hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> für 18h ausgesetzt. Die *knock-down*-Effizienz der siRNAs für die jeweiligen EMT-Repressoren wurde über qRT-PCR ermittelt.

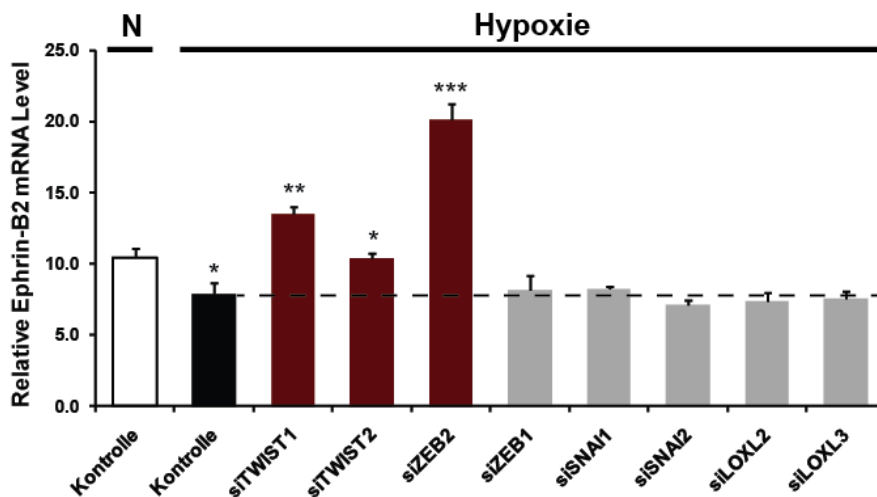
Abbildung



Neben der *knock-down*-Effizienz wurde auch die Hypoxie-vermittelte Regulation der EMT-Repressoren überprüft (Abbildung 5.13). Die qRT-PCR Daten bestätigten die

vorangegangenen Ergebnisse. Auch hier konnte wieder eine signifikante Induktion der Expression von ZEB2, SNAI2 und LOXL2 und LOXL3 nachgewiesen werden, wie auch die reduzierte Expression von TWIST, ZEB1 und SNAI1 unter Hypoxie. Die Expression der EMT-Repressoren unter Hypoxie war in allen siRNA-inkubierten Zellen signifikant verringert im Vergleich zu den jeweiligen hypoxischen Kontrollen, was die siRNA-vermittelte Inhibition der Expression belegte.

Mit den siRNA-behandelten Zellen sollte nun die Frage geklärt werden, ob und welche EMT-Repressoren die HIF-induzierte Ephrin-B2-Repression regulieren könnten. Hierzu wurde mit den Zellen eine Ephrin-B2-spezifische qRT-PCR durchgeführt (Abbildung 5.14).



**Abbildung 5.14: Die Inhibition von TWIST1, TWIST2 und ZEB2 hebt die Hypoxie-induzierte Repression von Ephrin-B2 auf.** Humane LN-229-Glioblastomzellen wurden für 48h mit siRNA transient transfiziert und unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (18h, 1% O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert, bevor die mRNA für qRT-PCR-Analysen isoliert wurde. Die Kontrolle zeigte unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Verringerung der relativen Ephrin-B2-Expression gegenüber der normoxischen Kontrolle die jedoch durch den Funktionsverlust von TWIST1, TWIST2 und ZEB2 wieder aufgehoben wurde und gegenüber der hypoxischen Kontrolle signifikant erhöht war. Die relative Ephrin-B2-Expression zeigte für die restlichen EMT-Repressor-*knock-downs* keine signifikanten Unterschiede. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT* verwendet. (s.e.m., n=3, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test).

Die qRT-PCR bestätigte erneut die bereits beobachtete reduzierte Expression von Ephrin-B2 unter hypoxischen Bedingungen. Diese Repression konnte durch den Funktionsverlust von TWIST1 und TWIST2 sowie ZEB2 aufgehoben werden. Die ZEB2 *knock-down*-Zellen zeigten dabei eine hochsignifikante Erhöhung der Ephrin-B2-Expression um das 2,5-fache gegenüber der hypoxischen Kontrolle. Im Gegensatz dazu war keine Regulation durch die restlichen EMT-Repressoren erkennbar. Dies wies TWIST1, TWIST2 und ZEB2 eine Rolle als potentielle Repressoren von Ephrin-B2 zu. Unter Berücksichtigung der gesuchten Rahmenbedingungen eines HIF-induzierten

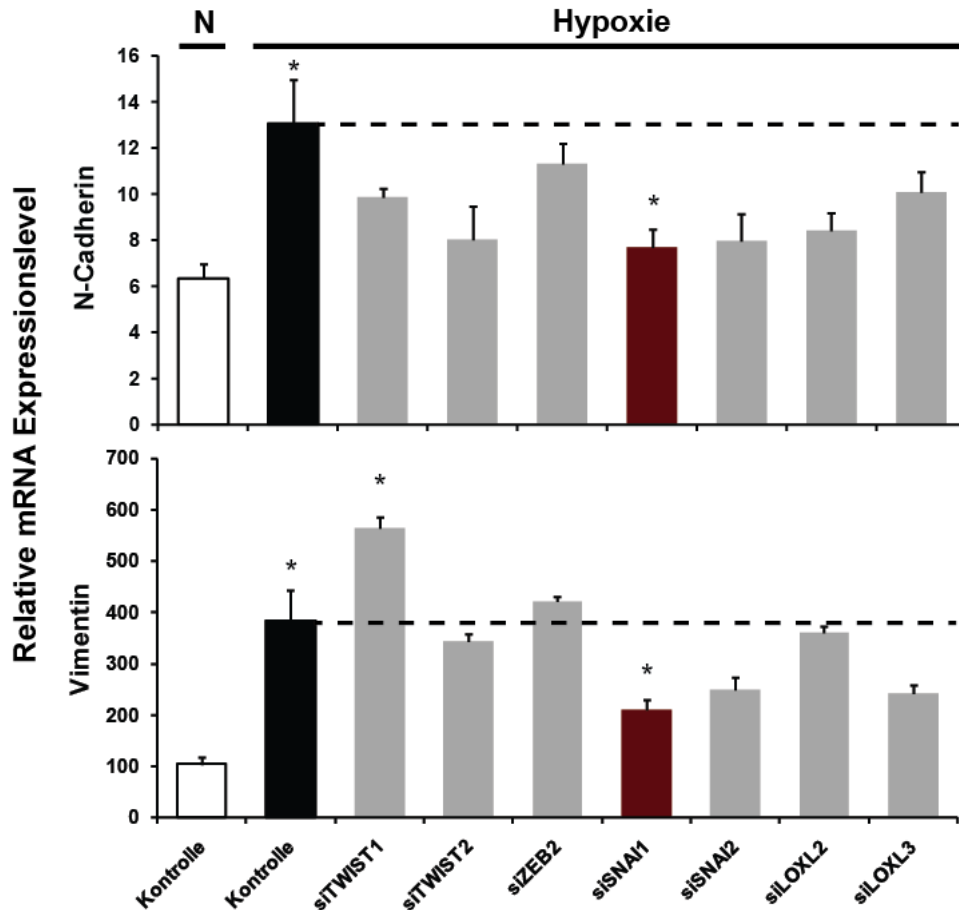
---

Repressors schränkte sich der potentielle Kandidat zur Repression von Ephrin-B2 jedoch auf ZEB2 ein, da TWIST1 und TWIST2 weder transkriptionell noch posttranslational in den untersuchten Glioblastomzellen durch Hypoxie induziert worden waren, wie in Abbildung 5.12 und 5.13 zu sehen ist.

Die wichtigste Funktion der EMT-Repressoren ist die Inhibition von E-Cadherin und damit die Einleitung der EMT. In diesem Zusammenhang wird die Expression von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin oder Vimentin in den Zellen erhöht. Durch den mesenchymalen Phänotyp der Zellen wird deren Beweglichkeit gefördert was letztlich die Migration, Invasion und Metastasierung der Zellen unterstützt. E-Cadherin konnte in den vorhandenen Glioblastomzellen, wie in der Literatur beschrieben, nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) (294). Jedoch wurde mit den vorhandenen Proben durch weitere qRT-PCRs die Regulation der mesenchymalen Marker durch Hypoxie im Glioblastom untersucht. Außerdem sollte überprüft werden, ob dieselben Repressoren für die Regulation der mesenchymalen Marker verantwortlich sind, wie für die Regulation von Ephrin-B2.

Wie in Abbildung 5.15 zu sehen ist, war die Expression der mesenchymalen Marker N-Cadherin und auch Vimentin unter Hypoxie signifikant erhöht. Die Induktion der N-Cadherin- und Vimentin-Expression unter Hypoxie konnte durch den si-RNA-vermittelten Funktionsverlust von SNAI1 signifikant aufgehoben werden. Die Expression der restlichen Repressoren zeigte bei einem Funktionsverlust zwar eine ähnliche Tendenz, jedoch keine signifikante Herunterregulation im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle. Bei dem TWIST1-*knock-down* konnte eine signifikante Erhöhung der Expression von Vimentin nachgewiesen werden.

Die bisherigen qRT-PCR Ergebnisse zeigten eine mögliche Verbindung, zwischen der Aktivierung von ZEB2 durch HIF-1 $\alpha$  und der Repression von Ephrin-B2 durch ZEB2 im Glioblastom auf. Weiterhin konnte eine erhöhte Expression mesenchymaler Marker festgestellt werden, die möglicherweise durch SNAI1 reguliert wird. Dies zeigte die Komplexität der Gliobiologie im Hinblick auf Migration und Invasion auf, die von dem Zusammenspiel der Genregulation auf verschiedenen Ebenen abhängig ist.



**Abbildung 5.15: Die Inhibition von SNAI1 hebt die Hypoxie induzierte erhöhte Expression von N-Cadherin und Vimentin auf.** Humane LN-229-Glioblastomzellen wurden für 48h mit siRNA transient transfiziert und unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (18h, 1% O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert, bevor die mRNA für qRT-PCR-Analysen isoliert wurde. Die qPCR zeigte für die Kontrolle unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Erhöhung der relativen N-Cadherin und Vimentin Expression gegenüber der normoxischen Kontrolle die jedoch durch den Funktionsverlust von SNAI1 wieder aufgehoben wurde und gegenüber der hypoxischen Kontrolle signifikant vermindert war. Die relative Expression von N-Cadherin und Vimentin zeigte für die restlichen EMT-Repressor-*knock-downs* keine signifikanten Unterschiede. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expressionsstärke des Haushaltgens *HPRT* verwendet. (s.e.m., n=3, \* P < 0.05 im zwei-seitigen Student-t-Test).

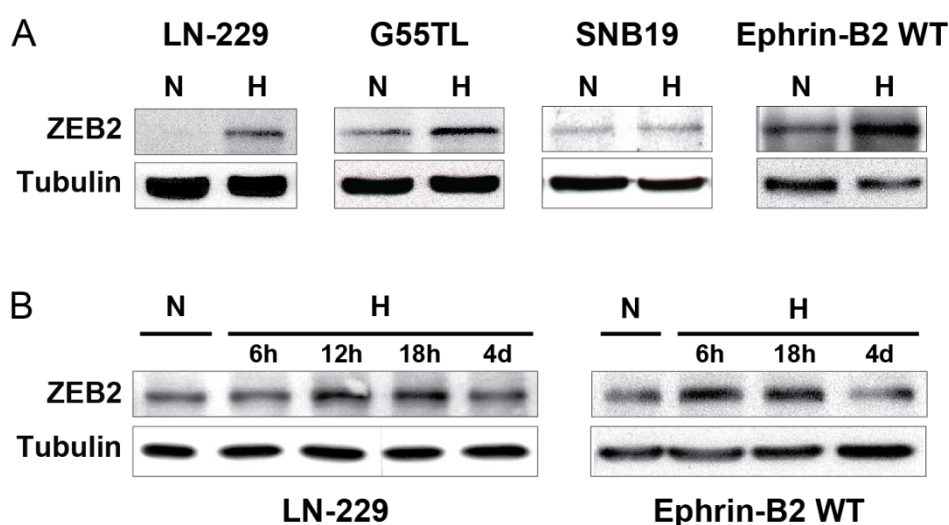
### 5.2.3 Nachweis der Regulation von ZEB2 durch HIF-1 $\alpha$

Zur Verifizierung der Hypoxie-Induzierbarkeit von ZEB2 in den Glioblastomzellen wurden weitere *Western-Blot*-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden sowohl die Glioblastomzelllinien LN-229, G55TL, SNB19 als auch die generierten murinen Ephrin-B2-WT-Gliomazellen für 18h der Hypoxie ausgesetzt und anschließend die Proteine isoliert. Wie in Abbildung 5.16 (A) zu sehen ist, konnte in allen Zelllinien eine Erhöhung der ZEB2-Proteinexpression unter Hypoxie nachgewiesen werden. SNB19-Zellen exprimierten die EMT-Repressoren generell nur sehr gering. Daher ließen sich in den SNB19-Zellen nur eine schwache ZEB2-Proteinexpression und, unter Berücksichtigung der geringeren Proteinbeladung, unter Hypoxie eine leichte Hochregulation nachweisen. Die Ephrin-B2-WT-Gliomazellen hingegen exprimierten ZEB2 bereits unter

normoxischen Bedingungen in hohem Maße und zeigten eine weitere deutliche Erhöhung der Expression unter Hypoxie.

LN-229 und Ephrin-B2-WT-Gliomazellen wurden zusätzlich für unterschiedliche Zeiträume in Sphäroid-bildendem Medium unter hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> kultiviert und im Anschluss die ZEB2-Expression in einem Immunoblot analysiert (Abbildung 5.16 [B]).

Die stärkste ZEB2-Expression lag bei den LN-229- und Ephrin-B2-WT-Sphäroiden bei etwa 18h Hypoxie. Nach 96h (4d) ging die ZEB2-Expression ungefähr auf den gleichen niedrigen Level wie in den normoxischen Kontrollen zurück.



**Abbildung 5.16: Hypoxie-induzierte Erhöhung der ZEB2-Proteinexpression in Glioblastomzellen.** (A) Humane Glioblastomzellen und murine Ephrin-B2-WT-Gliomazellen wurden unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (18h, 1% O<sub>2</sub>) kultiviert und die Proteine anschließend für *Western-Blot*-Analysen isoliert. Die *Western-Blot*-Analysen der Proteinextrakte die durch SDS-PAGE (8%) aufgetrennt wurden zeigten in allen Zellen eine stärkere ZEB2-Proteinexpression (157 kDa) nach einer Hypoxie-Induktion von 18h bei 1% O<sub>2</sub>. (B) LN-229 und Ephrin-B2-WT-Zellen wurden unter Sphären-formierenden Bedingungen für unterschiedlich lange Zeiträume unter Normoxie und Hypoxie (18h, 1% O<sub>2</sub>) kultiviert. Die *Western-Blot*-Analysen der Proteinextrakte der Glioblastomzellen die durch SDS-PAGE (8%) aufgetrennt wurden, zeigten eine Steigerung der ZEB2-Proteinexpression unter Hypoxie bis 18h. Nach 96h (4d) war die Proteinexpression wieder deutlich verringert. Tubulin (57 kDa) diente bei allen Immunoblot Analysen als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

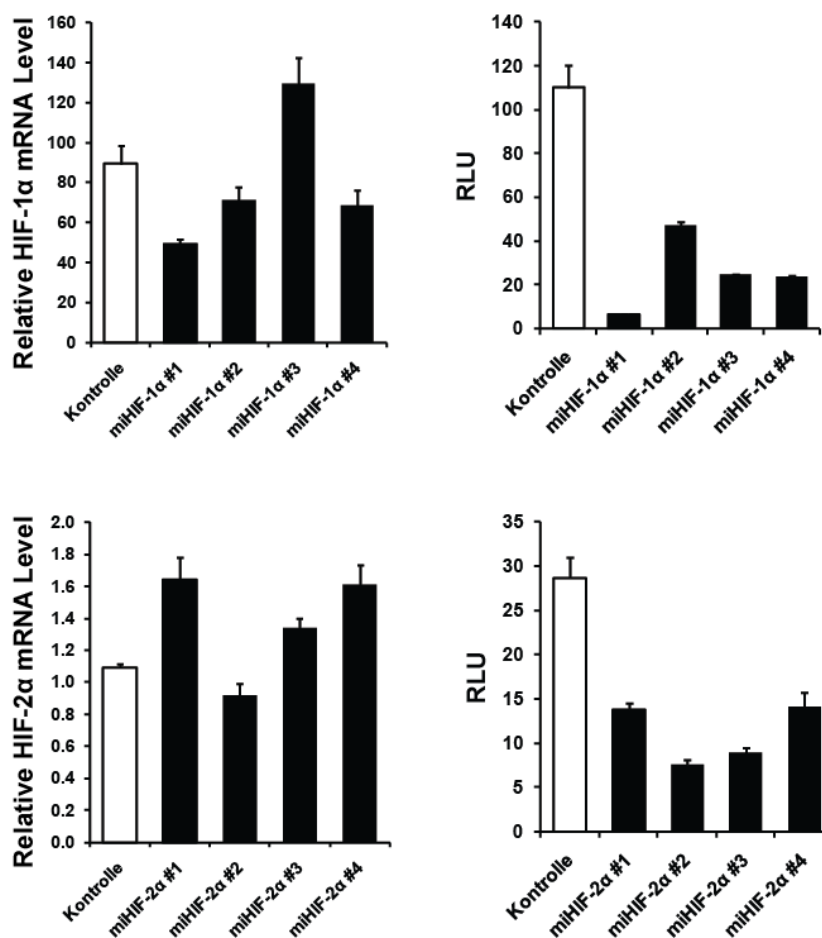
Die *Western-Blot*-Analysen deuteten auf eine HIF-1 $\alpha$ -induzierte Regulierung von ZEB2 hin, da, wie in Abbildung 5.3 (B) zu sehen ist, HIF-1 $\alpha$  nach 18h am Stärksten exprimiert und nach 96h wieder abgebaut wurde.

### 5.2.3.1 Herstellung von stabilen HIF-*knock-downs* in humanen LN-229- und SNB19-Glioblastomzellen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden parallel zu den bisher gezeigten Daten stabile HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -*knock-down*- und Überexpressionszellen generiert. Diese Zellen konnten anschließend für die Überprüfung einer HIF-abhängige Regulation von ZEB2 genutzt werden. Für die stabile Ausschaltung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  durch miRNAs in einem lentiviralen System wurde das Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit von Invitrogen verwendet, das im Material und Methoden Teil unter 4.2.4.8 ausführlich beschrieben ist. Das System verwendet microRNA (miRNA) auf der Basis der Genexpressionshemmung durch RNS-Interferenz (RNSi). In diesem System werden Gateway®-adaptierte Expressionsvektoren konstruiert, die eine effiziente stabile Expression der spezifischen miRNA zur Genausschaltung ermöglichen. Zu Beginn wurden nach der Anleitung von Invitrogen doppelsträngige *knock-down*-Sequenzen für HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  generiert und diese via qRT-PCR und dem psiCheck-System auf ihre *knock-down*-Effizienz getestet. Das psiCheck-System basiert auf dem Ansatz zur Optimierung von RNAi Sequenzen und wird mit Hilfe des Luciferase-Assays überprüft (siehe Methoden 4.2.3.8).

Für die Überprüfung der *knock-down*-Effizienz wurden G55TL-Glioblastomzellen mit dem jeweils zu untersuchenden miRNA-HIF-Expressionskonstrukt (im pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-Vektor) transient transfiziert und die RNA beziehungsweise die Proteine nach 48h isoliert. Wie in Abbildung 5.17 zu sehen ist, konnte mit der miHIF-1 $\alpha$  #1-Sequenz sowohl in der qRT-PCR als auch in dem Luciferase-Assay der beste HIF-1 $\alpha$ -*knock-down* erzielt werden. Für HIF-2 $\alpha$  wies sowohl in der qRT-PCR als auch im Luciferase-Assay die miHIF-2 $\alpha$  #2-Sequenz die beste *knock-down*-Effizienz auf.

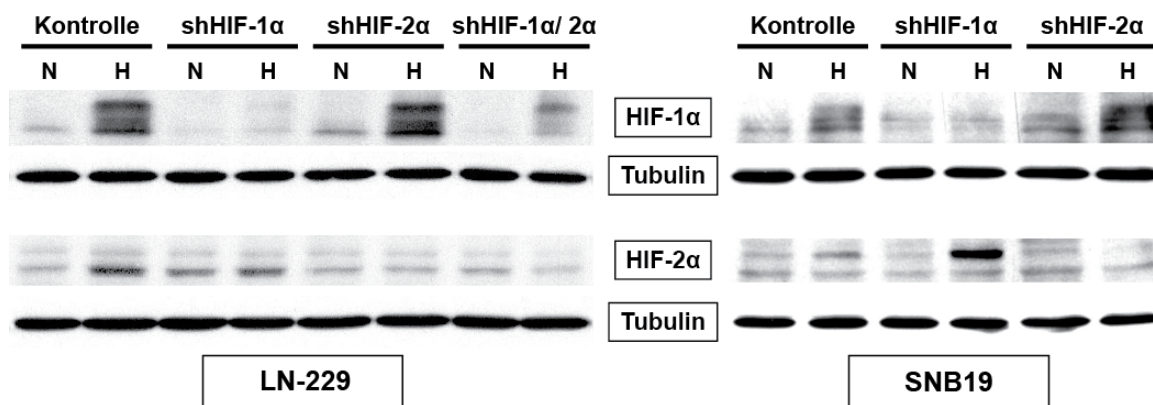
Die miHIF-1 $\alpha$  #1- und die miHIF-2 $\alpha$  #2-Sequenz konnte anschließend mit dem Gateway®-System nach Anleitung des BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression Systems von Invitrogen aus dem Expressionsvektor in den lentiviralen pLenti6/V5-DEST Gateway®-Vektor kloniert werden. Als Nächstes wurden erneut nach der Anleitung von Invitrogen mit den Vektoren Lentiviren hergestellt und die Zielzellen LN-229 und SNB19 schließlich mit einer MOI (*Multiplicity of Infection*) von 60 mit diesen Lentiviren transduziert und über Selektion (Blasticidin) polyklonale Zellpools hergestellt.



**Abbildung 5.17: Überprüfung der *knock-down*-Effizienz von HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -miRNA-Sequenzen.** G55TL-Glioblastomzellen wurden für die qRT-PCR mit dem jeweils zu untersuchenden pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-miR-HIF Expressionskonstrukt transient transfiziert. Für den Luciferase-Assay wurden G55TL-Zellen mit dem psiCheck<sup>TM</sup>-1-HIF-1 $\alpha$ -V5 bzw. psiCheck<sup>TM</sup>-1-HIF-2 $\alpha$ -V5 Vektor (*Renilla*) der jeweils zu untersuchenden miRNA-Sequenz (im pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFP-miR-Vektor) und dem pGL2-Vektor (*Firefly*) zur internen Kontrolle der Transfektionseffizienz transient transfiziert. Die relative Luciferase-Aktivität wurde nach 48h gemessen und die Werte der *Renilla*-Luciferasemessung wurden zu der jeweiligen Aktivität der *Firefly*-Luciferase normalisiert (*Renilla* Luciferase Lichteinheit/ *Firefly* Luciferase Lichteinheit; Bestimmung der Luciferase-Aktivität in RLU [*Renilla* Luciferase light Units]). Sowohl die qRT-PCR als auch die Luciferase Messung zeigten für HIF-1 $\alpha$  mit der miHIF-1 $\alpha$  #1-Sequenz und für HIF-2 $\alpha$  mit der miHIF-2 $\alpha$  #2-Sequenz die beste *knock-down*-Effizienz im Vergleich zur Kontrolle. Zur Normalisierung der Expressionswerte in der qRT-PCR wurde die Expressionsstärke des Haushaltgens *HPRT* verwendet.

Die *knock-down*-Effizienz in den Zielzellen wurde über *Western-Blot*-Analysen ermittelt. Hierfür wurden die Zellen unter Normoxie und 18h Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) kultiviert und anschließend die Proteine isoliert. Die Kontrollen zeigten in beiden Zelllinien jeweils in dem entsprechenden Immunoblot für HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  erhöhte Proteinlevel unter Hypoxie (Abbildung 5.18). Die Proteinexpression wurde im jeweiligen *knock-down* erfolgreich unter Normoxie als auch unter Hypoxie unterdrückt. In den LN-229-Zellen wurde auch ein HIF-1 $\alpha$ / HIF-2 $\alpha$ -Doppel-*knock-down* hergestellt. Hierfür wurden die Zellen mit HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Lentiviren in einer MOI von jeweils 30 transduziert, sodass in allen Zellen eine vergleichbare Virenzahl pro Zelle mit einer MOI von 60 bestand. Dieser Doppel-*knock-down* ergab für HIF-1 $\alpha$  eine verminderte

Proteinexpression unter Hypoxie im Vergleich zur Kontrolle, die jedoch nicht so stark wie die Inhibition im HIF-1 $\alpha$ -Einzel-*knock-down* war. Für HIF-2 $\alpha$  zeigte der Immunoblot für den HIF-1 $\alpha$ / HIF-2 $\alpha$ - Doppel-*knock-down* sogar das beste *knock-down*-Ergebnis. Sowohl in den LN-229- als auch in den SNB19-Zellen war eine stärkere Expression von HIF-1 $\alpha$  in den HIF-2 $\alpha$ -*knock-down*-Zellen zu erkennen. Zusätzlich ist in den SNB19-Zellen auch eine starke Erhöhung der HIF-2 $\alpha$  Expression in den HIF-1 $\alpha$ -*knock-down*-Zellen vorhanden, die jedoch nicht in den LN-229-Zellen vorkam.



**Abbildung 5.18: Überprüfung der stabilen polyklonalen HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -*knock-down*-Glioblastomzellen.** Humane LN-229- und SNB19-Glioblastomzellen wurden zur Herstellung stabiler *knock-down*-Zellen mit miRNAi-Expressionsvektoren gegen HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und der Kontrolle mit einer MOI (*Multiplicity of Infection*) von 60 stabil transduziert und selektioniert. Anschließend wurden die Zellen unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (14h, 1% O<sub>2</sub>) kultiviert und anschließend die Proteine für *Western-Blot*-Analysen isoliert. Die Immunoblots zeigten für HIF-1 $\alpha$  (120 kDa) und HIF-2 $\alpha$  (120kDa) eine deutliche Inhibition der Proteinexpression in den jeweiligen *knock-down*-Zellen unter Normoxie wie auch unter Hypoxie im Vergleich zu den Kontrollen. Die Inhibition der Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  war in dem Doppel-*knock-down* der LN-229-Zellen vorhanden, jedoch für HIF-1 $\alpha$  nicht so eindeutig wie in dem HIF-1 $\alpha$ -Einzel-*knock-down*, wohingegen der *knock-down* von HIF-2 $\alpha$  noch stärker war als in dem HIF-2 $\alpha$ -Einzel-*knock-down*. Der HIF-2 $\alpha$ -*knock-down* resultierte in den LN-229-Zellen wie auch in den SNB19-Zellen in einer erhöhten HIF-1 $\alpha$ -Expression. In den SNB19-Zellen war zudem eine stark erhöhte HIF-2 $\alpha$ -Expression in den HIF-1 $\alpha$ -*knock-down*-Zellen unter Hypoxie erkennbar. Tubulin (57 kDa) diente als interne Ladekontrolle für die auf dem *Blot* befindliche Proteinmenge.

Die hier gezeigten Immunoblots belegten die erfolgreiche Herstellung von stabil transduzierten LN-229- und SNB19-HIF-*knock-down*-Glioblastomzellen (shHIF-1 $\alpha$  und shHIF-2 $\alpha$ ).

### 5.2.3.2 Herstellung der stabilen HIF-Überexpression in humanen LN-229-Glioblastomzellen

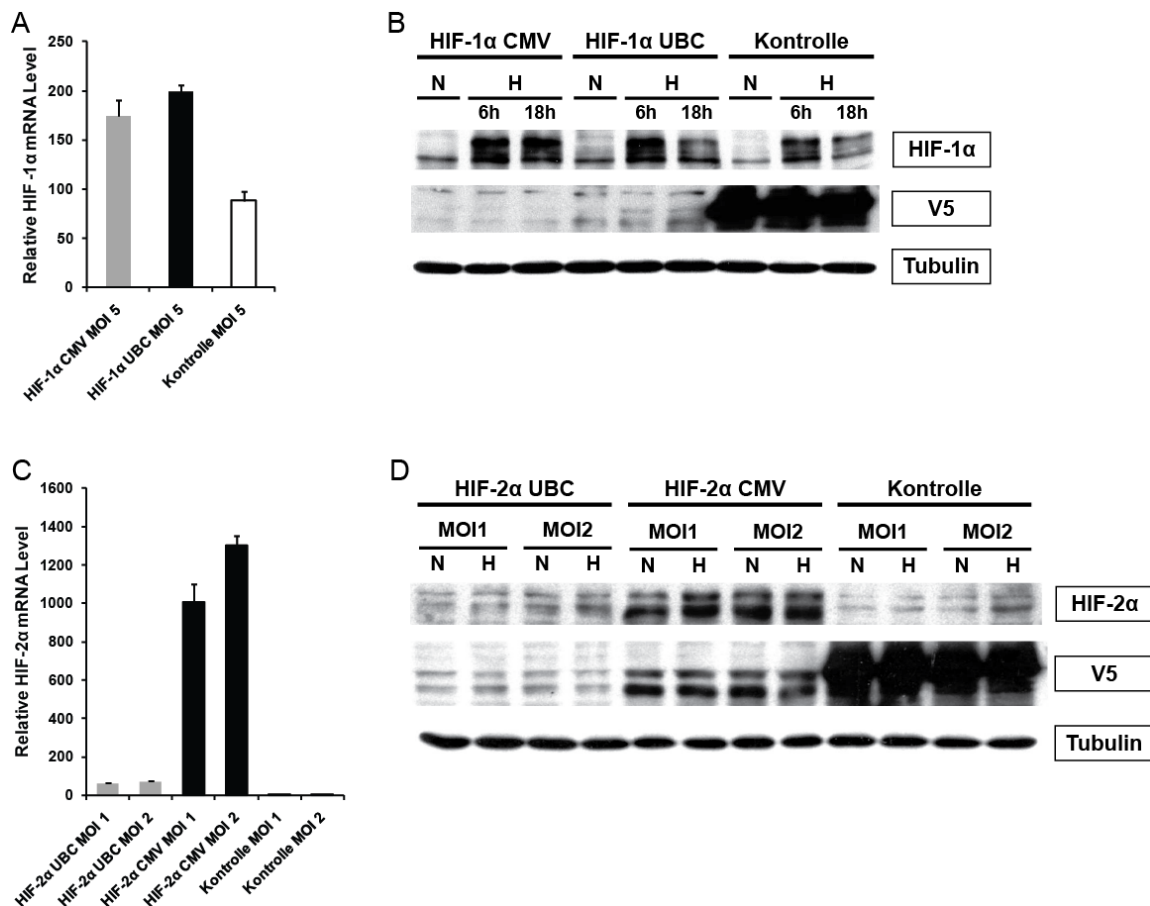
Zur Herstellung der HIF-Überexpression wurde erneut das Gateway®-Expression System von Invitrogen verwendet. Dafür wurden im Labor vorhandene HIF-Expressionsvektoren verwendet und nach Anleitung von Invitrogen in den lentiviralen pLenti6/V5-DEST Gateway®-Vektor kloniert. Die Zielzellen LN-229 wurden schließlich



mit einer MOI von 1, 2 und 5 mit den produzierten Lentiviren transduziert und über Selektion mit Blasticidin polyklonale Zellpools hergestellt (siehe Methoden 4.2.4.8). Da eine HIF-Überexpression, im Gegensatz zu einer Inaktivierung von HIF- $\alpha$ , meist toxisch für Zellen ist, wurden unterschiedliche Promotorkonstrukte ausgetestet. Der CMV-Promotor ermöglicht eine sehr hohe, konstitutive Expression des zu untersuchenden Gens in den Zielzellen (282, 283). Der UbC-Promotor hingegen ermöglicht zwar eine konstitutive Expression, die jedoch eher den physiologischen Expressionsleveln des zu untersuchenden Gens in den Zellen entspricht. Verglichen mit dem CMV-Promotor ist der UbC-Promotor generell 2-4 fach weniger aktiv und somit möglicherweise besser für die Überexpression von HIF- $\alpha$  geeignet (284).

Die erfolgreiche Überexpression wurde in den Zellen via qRT-PCR- und *Western-Blot*-Analysen ermittelt. Für die qRT-PCR wurden die stabil transduzierten, polyklonalen Zellen für 48h unter Normoxie kultiviert. Die HIF-1 $\alpha$ -CMV-transduzierten Zellen zeigten eine 2-fache Erhöhung und die HIF-1 $\alpha$ -UBC-transduzierten Zellen eine 2,25-fache Erhöhung der HIF-1 $\alpha$ -Expression im Vergleich zur der Lac-Z-Kontrolle (Abbildung 5.19 [A]). Für die HIF-2 $\alpha$ -CMV-transduzierten Zellen (MOI 1 und 2) hingegen war eine durchschnittlich 700-fache Erhöhung und für HIF-2 $\alpha$ -UBC-transduzierten Zellen (MOI 1 und 2) eine 40-fache Erhöhung der relativen HIF-2 $\alpha$ -Expression im Vergleich zu den Kontrollen erkennbar (Abbildung 5.19 [C]).

Die Immunoblots konnten die qRT-PCR-Ergebnisse hinsichtlich einer HIF-Überexpression in den HIF-1 $\alpha$ -UBC- und HIF-2 $\alpha$ -CMV-Zellen bestätigen. Hierfür wurden die Zellen zur Überprüfung der HIF-1 $\alpha$ -Überexpression neben 18h Hypoxie auch 6h Hypoxie von 1% O<sub>2</sub> ausgesetzt und mittels anti-HIF-1 $\alpha$  Antikörper visualisiert (Abbildung 5.19 [B]). Die Kontrolle zeigte eine stärkere HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression nach 6h Hypoxie als nach 18h. Die beiden stabilen HIF-1 $\alpha$ -transduzierten Überexpressionszellen exprimierten sowohl unter Normoxie, als auch unter 6h und 18h Hypoxie deutlich mehr HIF-1 $\alpha$ -Protein im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Da die Konstrukte mit einem V5-Protein-Tag markiert sind, konnte mit einem anti-V5 Antikörper zwischen dem Anteil von endogenem und exogenem, transgenem HIF unterschieden werden, da der V5-Antikörper im Gegensatz zum HIF-Antikörper nur den exogenen Anteil erkennt. Zur Überprüfung der HIF-2 $\alpha$  Überexpression via *Western-Blot* wurden die Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen von 18h und 1% O<sub>2</sub> kultiviert (Abbildung 5.19 [D]). Die Hypoxie-regulierte Induktion von HIF-2 $\alpha$  war nur in der MOI2 Kontrolle vorhanden. Umso eindeutiger war die Überexpression von HIF-2 $\alpha$  in den HIF-2 $\alpha$ -CMV-Zellen sowohl bei MOI1 als auch MOI2 unter Normoxie und Hypoxie erkennbar. Der V5-Immunoblot bestätigte die erhöhte HIF-2 $\alpha$ -Expression in den HIF-2 $\alpha$ -CMV-Zellen.

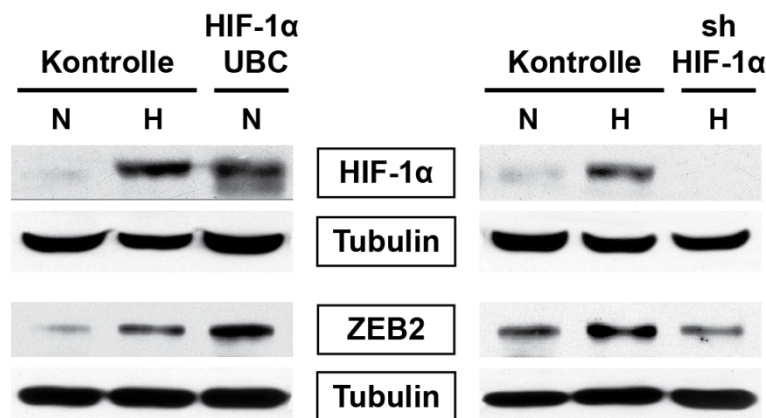


**Abbildung 5.19: Überprüfung der stabilen polyklonalen HIF-1α- und HIF-2α-Überexpression.** Humane LN-229-Glioblastomzellen wurden zur Herstellung stabiler Überexpressionszellen mit Expressionsvektoren von HIF-1α, HIF-2α und der Kontrolle pLenti6/V5-GW/lacZ in einer MOI von 1,2 oder 5 stabil transduziert und selektiert. Anschließend wurden die Zellen unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und unterschiedlichen hypoxischen Bedingungen kultiviert und die Proteine für *Western-Blot* isoliert. Für die qRT-PCR-Analysen wurden die Zellen unter normoxischen Bedingungen kultiviert. **(A)** Die relative Expression von HIF-1α zeigte in den pLenti6/V5-DEST-hHIF-1α-ΔPPA-V5 (HIF-1α CMV) MOI5 transduzierten Zellen eine 2-fache Erhöhung und in den pLenti6/Ubc/V5-DEST-hHIF-1α-ΔPPA-V5 (HIF-1α UBC) MOI5 transduzierten Zellen eine 2,25-fache Erhöhung der HIF-1α-Expression im Vergleich zur der Kontrolle. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT* verwendet. **(B)** Die Immunoblots zeigten für HIF-1α (120 kDa) sowohl in den pLenti6/V5-DEST-hHIF-1α-ΔPPA-V5 (HIF-1α CMV) MOI5 transduzierten Zellen als auch in den pLenti6/Ubc/V5-DEST-hHIF-1α-ΔPPA-V5 (HIF-1α UBC) MOI5 transduzierten Zellen unter Normoxie und nach 6h und auch 18h Hypoxie von 1% O<sub>2</sub> eine leicht erhöhte Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen. Zur Überprüfung der exogenen HIF-1α Expression wurde die Proteinexpression mit einem anti-V5-Antikörper ermittelt und zeigte nur für die HIF-1α UBC-Zellen eine erhöhte Proteinexpression gegenüber der Kontrolle. **(C)** Die relative Expression von HIF-2α zeigte in den pLenti6/V5-DEST-hHIF-2α-ΔPPA-V5 (HIF-2α CMV) MOI1 und 2 transduzierten Zellen eine durchschnittlich 700-fache Erhöhung und pLenti6/Ubc/V5-DEST-hHIF-2α-ΔPPA-V5 (HIF-2α UBC) MOI1 und 2 transduzierten Zellen eine 40-fache Erhöhung der HIF-2α-Expression im Vergleich zur den Kontrollen. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT* verwendet. **(D)** Die Immunoblots zeigten für HIF-2α (120 kDa) in den pLenti6/V5-DEST-hHIF-2α-ΔPPA-V5 (HIF-2α CMV) MOI1 und 2 transduzierten Zellen eine sehr starke und in den pLenti6/Ubc/V5-DEST-hHIF-2α-ΔPPA-V5 (HIF-2α UBC) MOI1 und 2 transduzierten Zellen eine leichte Erhöhung der Proteinexpression unter Normoxie und Hypoxie (18h 1% O<sub>2</sub>) im Vergleich zu den Kontrollen. Der V5 Immunoblot bestätigt die hohe Proteinexpression unter Normoxie und Hypoxie von HIF-2α-CMV gegenüber den LacZ-Kontrollen. Tubulin (57 kDa) diente bei allen Immunoblot Analysen als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung.

Die Ergebnisse konnten die transduzierten HIF-1 $\alpha$ -UBC-Zellen (MOI5) und HIF-2 $\alpha$ -CMV-Zellen (MOI2) als stabile polyklonale Überexpressionszellen identifizieren.

### 5.2.3.3 ZEB2 wird in hypoxischen humanen Glioblastomzellen durch HIF-1 $\alpha$ reguliert

Mit den stabilen *knock-down*- und Überexpressionszellen konnte nun die Regulierung von ZEB2 durch HIF-1 $\alpha$  überprüft werden. Hierfür wurden mit den HIF1 $\alpha$ -UBC-LN-229-Überexpressionszellen, den shHIF-1 $\alpha$ -LN-229-*knock-down*-Zellen und mit den zugehörigen Kontrollen *Western-Blot*-Analysen durchgeführt. Die HIF-1 $\alpha$ -UBC Überexpressionszellen wurden unter normoxischen, die shHIF-1 $\alpha$  *knock-down*-Zellen hingegen nur unter hypoxischen Bedingungen von 18h bei 1% O<sub>2</sub> kultiviert.



**Abbildung 5.20: ZEB2 wird in humanen Glioblastomzellen durch HIF-1 $\alpha$  reguliert.** Stabil transduzierte humane LN-229-HIF-1 $\alpha$ -*knock-down*- und Überexpressionszellen und deren Kontrollen wurden unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (18h, 1% O<sub>2</sub>) kultiviert und anschließend die Proteine für *Western-Blot*-Analysen isoliert. Die Immunoblots zeigten für HIF-1 $\alpha$  (120 kDa) in den Kontrollzellen die Hypoxie-induzierte Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ . Ebenso konnte in dem ZEB2-Immunoblot (157 kDa) eine Hypoxie-induzierte Hochregulation nachgewiesen werden. Die Expression von ZEB2 korrelierte sowohl in den HIF1 $\alpha$ -UBC-Überexpressionszellen als auch in den shHIF-1 $\alpha$ -*knock-down*-Zellen mit der HIF-1 $\alpha$ -Expression. Tubulin (57 kDa) diente als interne Ladekontrolle für die auf dem *Blot* befindliche Proteinmenge.

Wie in Abbildung 5.20 zu sehen ist, war in den Kontrollen eine deutliche Akkumulation der HIF-1 $\alpha$ - sowie der ZEB2-Proteinmenge unter Hypoxie erkennbar. Der HIF-1 $\alpha$ -Immunoblot bestätigte die Überexpression von HIF-1 $\alpha$  in den HIF-1 $\alpha$ -UBC-Zellen unter normoxischen Bedingungen. Hier konnte auch die HIF-1 $\alpha$ -abhängige, deutlich erhöhte Expression von ZEB2 unter Normoxie nachgewiesen werden im Vergleich zu den Kontrollen. In den shHIF-1 $\alpha$ -Zellen konnte ebenfalls die erfolgreiche Inhibition der HIF-1 $\alpha$ -Proteinexpression unter hypoxischen Bedingungen und die verminderte ZEB2-Expression korrelierend zur reduzierten HIF-1 $\alpha$ -Expression bestätigt werden.

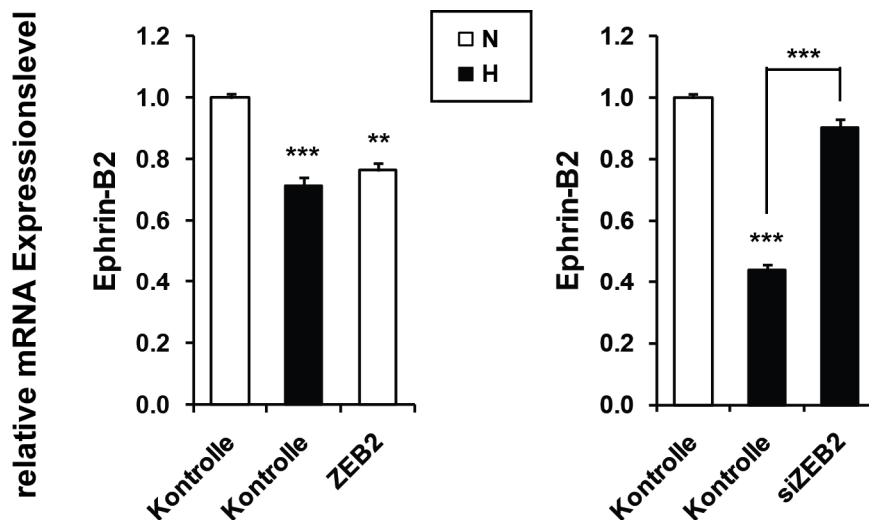
Zusammenfassend ließ sich durch diese Experimente zeigen, dass die erhöhte ZEB2-Expression unter hypoxischen Bedingungen in humanen Glioblastomzellen von HIF-1 $\alpha$  reguliert wird.

## 5.2.4 Nachweis der Regulation von Ephrin-B2 durch ZEB2

Da die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Regulation von ZEB2 erwiesen worden war, sollte nun die potentielle Repression von Ephrin-B2 durch ZEB2 anhand weiterer Experimente validiert werden. Daher wurde die Regulation von Ephrin-B2 durch ZEB2 zuerst auf transkriptioneller Ebene untersucht und daraufhin eine Promotoranalyse zur Untersuchung des Ephrin-B2-Promotors auf ZEB2-Bindestellen durchgeführt. Tatsächlich konnten E-Box-Konsensussequenzen (CANNTG) im Ephrin-B2-Promotor nachgewiesen werden, die auch in der Promotorregion von E-Cadherin vorkommen und für deren Repression durch die ZEB2-Bindung verantwortlich sind.

### 5.2.4.1 Ephrin-B2 wird auf transkriptioneller Ebene durch ZEB2 reguliert

Zur Überprüfung einer direkten oder indirekten Regulation von Ephrin-B2 durch ZEB2 wurden transiente Überexpressions- und *knock-down*-Experimente durchgeführt.



**Abbildung 5.21: Ephrin-B2 wird in Glioblastomzellen unter Hypoxie durch ZEB2 reguliert.** Humane LN-229-Glioblastomzellen wurden für Überexpressionsanalysen mit 1,5  $\mu$ g des ZEB2-Expressionsvektor pEF6/Myc-His-hSip1FL transient transfiziert (links). Parallel dazu wurden LN-229-Zellen für 48h mit siRNA gegen ZEB2 transient transfiziert (rechts). Die Zellen wurden alle unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (18h, 1% O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert, bevor die mRNA für qRT-PCR-Analysen isoliert wurde. In der ZEB2-Überexpression war unter normoxischen Bedingungen eine signifikant reduzierte Ephrin-B2-Expression im Vergleich zur normoxischen Kontrolle erkennbar. Die ZEB2-Überexpression zeigte mit einer 0,76-fachen Expression eine vergleichbare Reduktion der relativen Ephrin-B2-Expression wie die signifikante 0,71-fache Reduktion in der hypoxischen Kontrolle. Die qRT-PCR mit dem siRNA-vermittelten *knock-down* von ZEB2 bestätigte das Ergebnis. Hier konnte die signifikante Reduktion der relativen

Für die ZEB2-Überexpression wurden humane LN-229-Zellen mit dem ZEB2-Expressionsvektor pEF6/Myc-His-hSip1FL, das für die humane Sequenz von ZEB2 kodiert, transient transfiziert. Außerdem wurde eine siRNA-vermittelte ZEB2- *knock-down*-Studie durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen unter normoxischen (21%) und hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> für 18h kultiviert und die mRNA-Expression von Ephrin-B2 analysiert.

Die ZEB2-Überexpression zeigte vergleichbar mit der hypoxischen Kontrolle eine signifikante Herunterregulation von Ephrin-B2 unter normoxischen Bedingungen (Abbildung 5.21). Der siRNA-ZEB2-*knock-down* wiederum entsprach den Ergebnissen von Abbildung 5.14 und resultierte in einer Aufhebung der Hypoxie-vermittelten Reduktion der relativen Ephrin-B2-Expression. Die Hochregulation von Ephrin-B2 war in dem ZEB2-*knock-down* unter hypoxischen Bedingungen hochsignifikant.

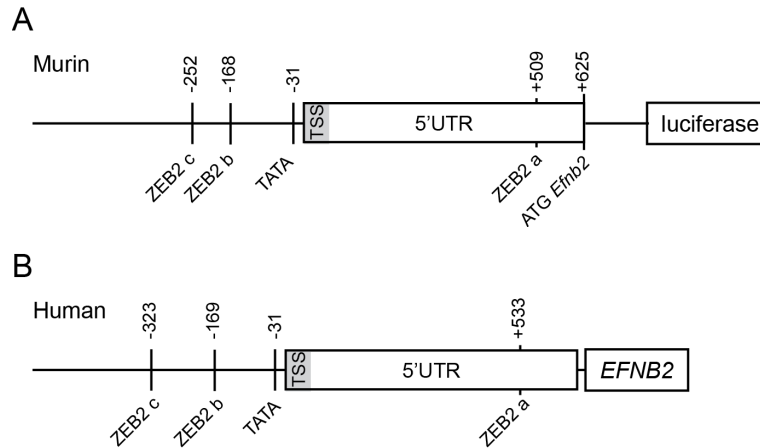
#### 5.2.4.2 ZEB2 reprimiert die Promotoraktivität von Ephrin-B2

Die Sequenz 1,2 Kilobasen (Kb) oberhalb des offenen Leserahmens von Ephrin-B2 wurde mit Hilfe des Online-Tools *VISTA Genome Browser* untersucht (295). Dafür wurde die Sequenz durch das ReadSeq Programm in ein FASTA-Format umgewandelt (296) um damit das *DNA-pattern-matching tool* von RSAT nutzen zu können (297). Anhand der Programme konnten mehrere Bindestellen für ZEB2 mit der Sequenz 5'-CACCT(G)-3' auf dem Ephrin-B2-Promotor detektiert werden. Die potentiellen Bindestellen wurden mit der Alignment-Funktion des *VISTA Genome Browsers* auf ihre Konservierung innerhalb des murinen und des humanen Genoms überprüft. Die übereinstimmenden konservierten Bindestellen sind in Abbildung 5.22 schematisch dargestellt. So konnten drei ZEB2-Bindestellen im murinen wie auch im humanen Ephrin-B2-Promotor identifiziert werden. 2009 wurde von Sohl *et al.* eine Charakterisierung des murinen Ephrin-B2-Promotors durchgeführt, wobei die Transkriptionsstartseite (TSS) identifiziert werden konnte. Die Promotorregion befindet sich bis zu 400 Bp oberhalb (*upstream*) dieser TSS. Sie besitzt hohe GC-Bereiche und enthält die TATA-BOX für die Transkriptionsaktivität (298).

Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der Hypoxie-abhängigen Repression von Ephrin-B2 durch ZEB2, wurde der oben beschriebene murine Ephrin-B2-Promotor in ein pGL3-Luciferase-Reporter-Konstrukt kloniert (Abbildung 5.22 [A]).

---

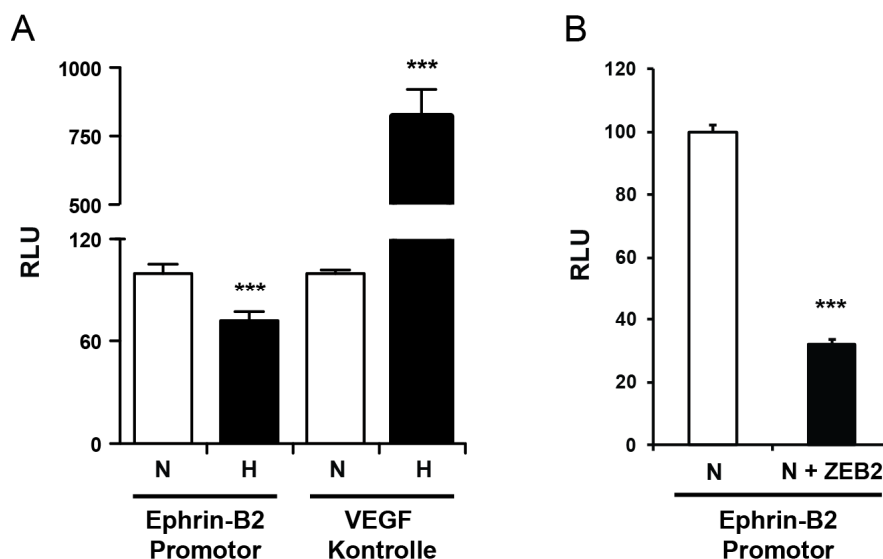
**Fortsetzung Abbildung 5.21:** Ephrin-B2-Expression in der hypoxischen Kontrolle durch den ZEB2-Verlust unter Hypoxie aufgehoben werden. Die Expression war durch den ZEB2-Verlust in Bezug auf die hypoxische Kontrolle signifikant um das 2-fache erhöht. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT* verwendet. (s.e.m., n=3, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01. \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test).



**Abbildung 5.22: Der Ephrin-B2-Promotor enthält konservierte ZEB2-Bindestellen.** Schematische Darstellung der 1,2 Kb-langen Sequenz oberhalb des ATG-Translationsstartcodons des (A) murinen (*Efnb2*) and (B) humanen (*EFNB2*) *Ephrin-B2*-Gens. Auf beiden Genombereichen sind drei konservierte ZEB2 Bindestellen (ZEB2 a, b und c) mit der Konsensussequenz (CACCT(G)) innerhalb dieser Region vorhanden. Unmittelbar nach der Transkriptionsstartseite (TSS) ist die TATA-Box zur Transkriptionsinitiation lokalisiert. Die Markierungen der beschriebenen Bereiche sind im relativen Abstand zur TSS in Basenpaaren dargestellt. Die murine Ephrin-B2-Promotorsequenz (A) wurde in ein pGL3-Luciferase-Reporter-Konstrukt kloniert.

Anhand des Luciferase-Assays konnte so der Einfluss von ZEB2 und Hypoxie auf den Ephrin-B2-Promotor genauer untersucht werden. G55TL-Glioblastomzellen wurden mit dem Ephrin-B2-Luciferase-Reporter (WT-Promotor-Konstrukt) und einem *Renilla*-Luciferase-Konstrukt zur internen Kontrolle der Transfektionseffizienz transient transfiziert und unter normoxischen von (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> für 18h kultiviert. Zur Kontrolle der vorhandenen Hypoxie und der daraus resultierenden Stabilisierung von HIF, wurde neben dem WT-Promotor-Konstrukt auch ein VEGF-Reporter-Konstrukt verwendet, da VEGF durch HIF stark induziert wird. Wie in Abbildung 5.23 (A) zu sehen ist, konnte eine hochsignifikant verminderte Ephrin-B2-Aktivität in mehreren Versuchen unter Hypoxie nachgewiesen werden. Ebenso war eine hochsignifikante 8-fach höhere Aktivität von VEGF unter Hypoxie erkennbar.

Um nun die Regulation von Ephrin-B2 durch ZEB2 zu untersuchen, wurde der Luciferase-Assay zusammen mit dem murinen ZEB2-Expressionskonstrukt pCS3-mSIP1FL durchgeführt. Die Überexpression von ZEB2 bewirkte eine noch stärkere Verminderung der Ephrin-B2-Aktivität als die Hypoxie *per se* (Abbildung 5.23 [B]). Die ZEB2-Überexpression resultierte in einer 70%-igen Verminderung der Ephrin-B2-Promotoraktivität verglichen mit der dazugehörigen normoxischen Kontrolle.



**Abbildung 5.23: Die Ephrin-B2-Promotoraktivität wird sowohl durch Hypoxie als auch durch ZEB2 stark vermindert.** G55TL-Glioblastomzellen wurden mit dem Ephrin-B2-pGL3 (*Firefly*) bzw. dem VEGF-pGL3 (*Firefly*) und dem SV40-*Renilla*-Luciferase-Konstrukt zur internen Kontrolle der Transfektionseffizienz transient transfiziert. Die relative Luciferase-Aktivität wurde nach 48h gemessen und die Werte der *Firefly* Luciferasemessung wurden zu der jeweiligen Aktivität der *Renilla*-Luciferase normalisiert und in Prozent zu den normoxischen Kontrollen verrechnet. (*Firefly* Luciferase Lichteinheit/ *Renilla* Luciferase Lichteinheit; Bestimmung der Luciferase-Aktivität in RLU). (A) Die Zellen wurden unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (18h, 1% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Die hypoxischen Glioblastomzellen zeigten eine durchschnittliche Verringerung der Ephrin-B2-Aktivität um 28 ± 5 %. Die Hypoxie-Kontrolle durch das VEGF-Reporter-Konstrukt zeigte eine Erhöhung der VEGF-Aktivität um 719 ± 100 % gegenüber der normoxischen Kontrolle. (B) Die Zellen wurden neben dem Ephrin-B2-pGL3 (*Firefly*) und dem SV40-*Renilla*-Luciferase-Konstrukt zusätzlich mit dem ZEB2-Expressionskonstrukt pCS3-SIP1FL co-transfiziert und die Zellen nur unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Die ZEB2-Überexpression resultierte in einer hochsignifikanten Reduktion der Ephrin-B2-Promotoraktivität um 68 ± 1,6 %. ([A] + [B] s.e.m., n=15, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01. \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test).

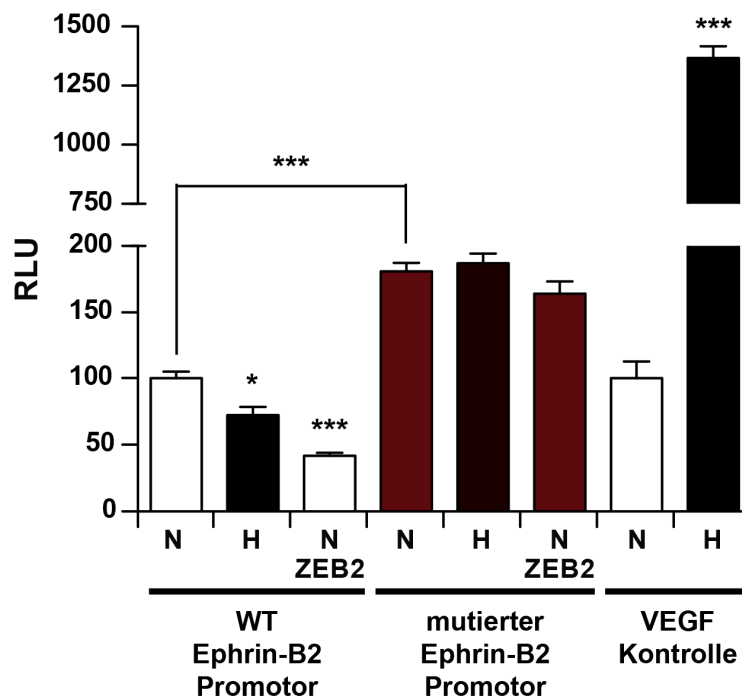
Die verringerte Ephrin-B2-Promotoraktivität, die durch Hypoxie und durch eine Überexpression von ZEB2 unter normoxischen Bedingungen hervorgerufen werden konnte, unterstützt die Hypothese, dass die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Hochregulation von ZEB2 zur Repression von Ephrin-B2 führt und bestätigen demnach die vorangegangenen qRT-PCR-Daten hinsichtlich der Repression von Ephrin-B2 durch ZEB2 unter hypoxischen Bedingungen im Glioblastom.

#### 5.2.4.3 Mutierte ZEB2-Bindestellen im Ephrin-B2-Promotor verhindern dessen Repression durch Hypoxie und durch ZEB2

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Ephrin-B2 durch ZEB2 auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, sollte die direkte Bindung von ZEB2 an den Ephrin-B2-Promotor überprüft werden. Hierfür wurden die drei in Abbildung 5.22 beschriebenen ZEB2-Konsensussequenzen 5'-CACCTG-3' auf dem murinen Ephrin-B2-Promotor durch gezielte Punktmutagenese zu 5'-GGTACC-3' mutiert, so dass ZEB2 nicht mehr an den Ephrin-B2-Promotor binden konnte. Mit dem ursprünglichen WT-

Promotor-Konstrukt und dem neuen, mutierten Ephrin-B2-Reporter-Konstrukt wurde nun in den G55TL-Glioblastomzellen ein Luciferase-Assay durchgeführt.

Wie in Abbildung 5.24 zu sehen ist, konnte die signifikant verminderte Ephrin-B2-Promotor-Aktivität sowohl unter Hypoxie als auch durch die ZEB2-Überexpression unter Normoxie in dem WT-Promotor-Konstrukt bestätigt werden. Der mutierte Ephrin-B2-Promotor hingegen zeigte keinerlei Regulation, weder unter Hypoxie noch bei einer Überexpression von ZEB2. Die Ephrin-B2-Promotoraktivität war in dem mutierten Promotor unter allen Bedingungen darüber hinaus um durchschnittlich das Doppelte erhöht im Vergleich zum WT-Promotor-Konstrukt, was auf eine basale Repression durch ZEB2 bereits unter Normoxie hindeutet. Die Hypoxie-Kontrolle zeigte eine hochsignifikante 14-fach höhere VEGF-Aktivität.



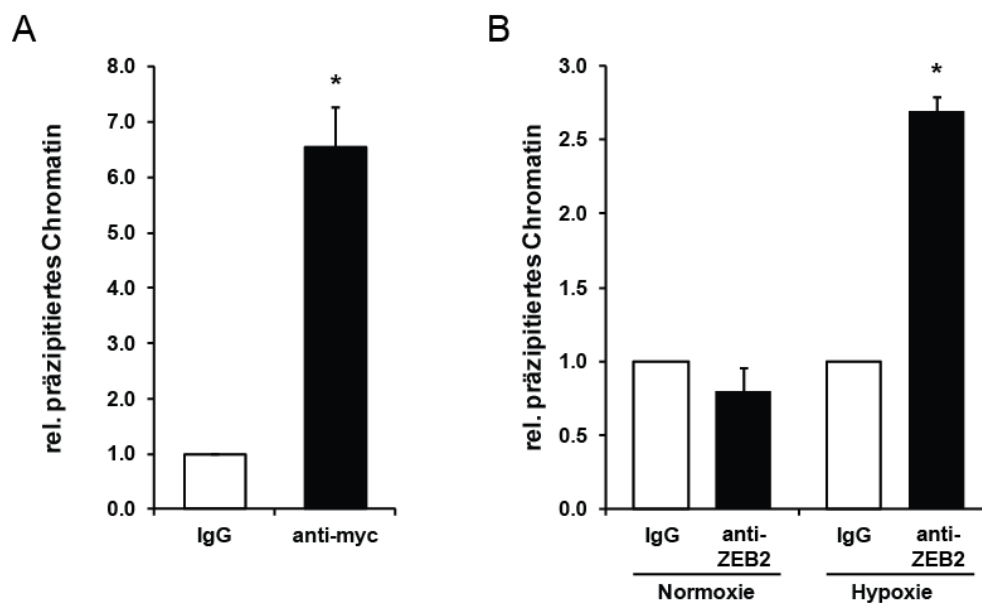
**Abbildung 5.24: Mutierte ZEB2-Bindestellen im Ephrin-B2-Promotor verhindern sowohl die Hypoxie- als auch die ZEB2-abhängige verminderte Promotoraktivität.** G55TL-Glioblastomzellen wurden mit dem Ephrin-B2-pGL3 (*Firefly*) bzw. dem VEGF-pGL3 (*Firefly*) und dem SV40-*Renilla*-Luciferase-Konstrukt zur internen Kontrolle der Transfektionseffizienz transient transfiziert. Für die ZEB2-Überexpression wurde zusätzlich das ZEB2-Expressionskonstrukt pCS3-SIP1FL co-transfiziert. Die Zellen wurden unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (18h, 1% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert. Die relative Luciferase-Aktivität wurde nach 48h gemessen und die Werte der *Firefly*-Luciferasemessung wurden zu der jeweiligen Aktivität der *Renilla*-Luciferase normalisiert und in Prozent zu den normoxischen Kontrollen verrechnet. (*Firefly*-Luciferase Lichteinheit/ *Renilla*-Luciferase Lichteinheit; Bestimmung der Luciferase-Aktivität in RLU). Die hypoxischen Glioblastomzellen zeigten eine signifikante Verringerung der Ephrin-B2-Aktivität um 30%. Die ZEB2-Überexpression resultierte in einer hochsignifikanten Reduktion der Ephrin-B2-Promotor-Aktivität um 60%. Im Gegensatz dazu zeigte der mutierte Ephrin-B2-Promotor sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie und im Zusammenhang mit einer ZEB2-Überexpression eine stark erhöhte Ephrin-B2-Promotoraktivität um durchschnittlich 80% im Vergleich zur normoxischen WT-Kontrolle. Die Hypoxie-Kontrolle durch das VEGF-Reporter-Konstrukt wies eine 14-fache Erhöhung der VEGF-Aktivität gegenüber der normoxischen VEGF-Kontrolle auf. (s.e.m., n=3, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test).



Zusammenfassend konnte anhand der Ergebnisse des Luciferase-Assays die Hypothese aufgestellt werden, dass HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie die Transkription des ZEB2-Repressors aktiviert, welcher wiederum die Expression von Ephrin-B2 direkt reprimiert.

#### 5.2.4.4 ZEB2 bindet direkt an die hochkonservierten Bindestellen im Ephrin-B2-Promotor

Zum direkten Nachweis, dass Ephrin-B2 ein Zielgen von ZEB2 darstellt, wurde nun eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt. Um die Bindung von ZEB2 an den Ephrin-B2-Promotor nachzuweisen, wurde zunächst ZEB2 durch eine transiente Transfektion mit dem Expressionskonstrukt pCS3-SIP1FL überexprimiert. Da das pCS3-SIP1FL-Konstrukt mit einem Myc-Tag markiert ist, konnten die transient-transfizierten pCS3-SIP1FL-Zellen mit einem anti-Myc-Antikörper präzipitiert werden (Abbildung 5.25 [A]).



**Abbildung 5.25: Nachweis der direkten Bindung von ZEB2 an den Ephrin-B2-Promotor durch eine ChIP-Analyse.** Präzipitiertes Chromatin der untersuchten LN-229-Glioblastomzellen wurde über qRT-PCR auf die ZEB2-Bindestellen b und c in dem Ephrin-B2-Promotor untersucht (siehe Abbildung 5.22). Die Werte wurden zu der eingesetzten Gesamtmenge an Chromatin normalisiert und zu der jeweiligen IgG-Kontrolle verrechnet. **(A)** Die Zellen wurden mit dem ZEB2-Expressionskonstrukt pCS3-SIP1FL transient transfiziert. Das überexprimierte ZEB2-Konstrukt war Myc-markiert, so dass die ZEB2 gebundenen Chromatinfragmente durch einen anti-Myc Antikörper präzipitiert werden konnten. Die Quantifizierung ergab eine  $6.5 \pm 0.74$ -fache Erhöhung des Chromatins, das die ZEB2-Bindestellen b und c beinhaltet. **(B)** Die Zellen wurden für 18h unter hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> und normoxischen Bedingungen inkubiert und anschließend für den ChIP-Assay lysiert. Die Präzipitation wurde mit einem anti-ZEB2 Antikörper und einer IgG-Kontrolle durchgeführt. In hypoxischen Zellen ist das Chromatin, das die ZEB2-Bindestellen b und c beinhaltet, signifikant um  $2.7 \pm 0.14$  gegenüber der hypoxischen Ig- Kontrolle erhöht. Unter Normoxie zeigen die Zellen keine Anreicherung des Chromatins mit den ZEB2-Bindestellen. (Die Ansätze wurden als Triplett durchgeführt; s.e.m., n=2, \* P < 0.05 im zwei-seitigen Student-t-Test).

Für den Nachweis der Bindung des endogenen ZEB2-Proteins an Ephrin-B2 wurden anschließend humane LN-229-Glioblastomzellen unter normoxischen und unter hypoxischen Bedingungen für 18h bei 1% O<sub>2</sub> kultiviert und eine Immunopräzipitation mit einem anti-ZEB2 Antikörper durchgeführt (Abbildung 5.25 [B]).

Die Experimente wurden mit dem EZ-Magna ChIP™ A Kit von Millipore nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. IgG diente in den Versuchen als Kontrolle. Zur Visualisierung des ZEB2-gebundenen Ephrin-B2-Promotors wurde eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für die ZEB2-Bindestellen b und c im Ephrin-B2-Promotor verwendet. Für den Nachweis der ZEB2-Bindung wurden die beiden nah beieinander liegenden ZEB2-Bindestellen b und c hinter der TATA-Box untersucht (siehe Abbildung 5.22), die laut Remacle *et al.* für die ZEB2-DNA-Bindung notwendig sind (299).

Der ChIP-Assay zeigte bei der Myc-spezifischen Präzipitation in den ZEB2-überexprimierenden Zellen (anti-Myc) eine signifikante Anreicherung des Ephrin-B2-spezifischen Chromatins, welches die ZEB2-Bindestellen b und c beinhaltete im Vergleich zur IgG-Kontrolle (Abbildung 5.25 [A]). Für die normoxisch kultivierten Zellen bei der ZEB2-spezifischen Präzipitation (anti-ZEB2) war keine Anreicherung des Ephrin-B2-spezifischen Chromatins vorhanden (Abbildung 5.25 [B]). In den hypoxischen Zellen konnte jedoch eine signifikante Chromatin-Anreicherung nach der ZEB2-spezifischen Präzipitation nachgewiesen werden.

Der ChIP-Assay konnte somit die vorangegangene Hypothese bestätigen und Ephrin-B2 als direktes Zielgen von ZEB2 nach dessen Induktion durch Hypoxie beziehungsweise HIF-1 $\alpha$  identifizieren.

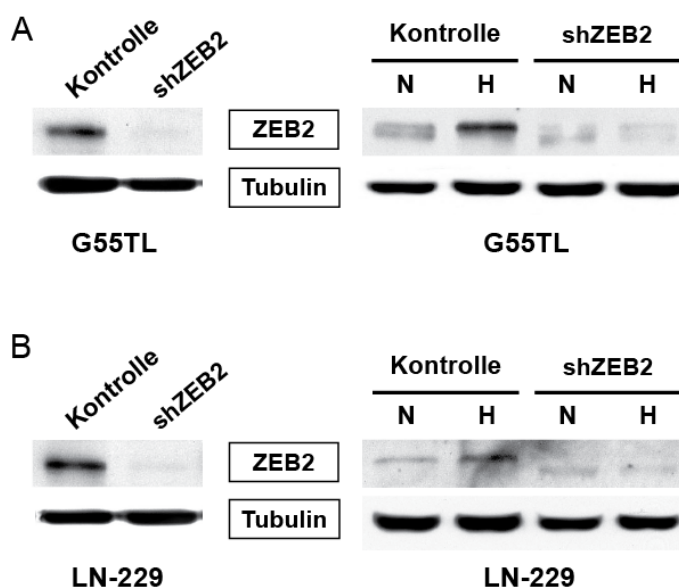
## **5.2.5 In humanen ZEB2-knock-down Glioblastomzellen ist die Repression von Ephrin-B2 unter Hypoxie aufgehoben**

### **5.2.5.1 Herstellung von stabilen ZEB2-knock-downs in humanen LN-229- und G55TL-Glioblastomzellen**

Da eine Ephrin-B2-Regulation durch den HIF-1 $\alpha$ -induzierten Repressor ZEB2 gezeigt werden konnte, sollte anschließend die Auswirkung eines ZEB2-knock-downs hinsichtlich der Ephrin-B2-Regulation in humanen Glioblastomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurden mit dem Trans-Lentiviral™ shRNA Bulk Packaging System von Open Biosystems (Thermo Fisher) shRNA-GIPZ-Lentiviren für stabile ZEB2-knock-down-Glioblastomzellen generiert. Das pGIPZ-Vektor-System verwendet spezifische *short hairpin RNA* (shRNA)-Sequenzen zur Abschaltung des Transkripts. Die Zielzellen LN-229 und G55TL wurden mit einer Gesamt-MOI von 100

mit den Lentiviren transduziert und über die Selektion mit Puromycin wurden stabile polyklonale shZEB2-Zellpools hergestellt (siehe Methoden 4.2.4.8.2).

Die *knock-down*-Effizienz in den Zielzellen wurde über *Western-Blot*-Analysen ermittelt. Hierfür wurden die Zellen unter Normoxie und für 18h unter Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) kultiviert und anschließend die Proteine isoliert. Die Kontrollen zeigten in beiden Zelllinien jeweils in dem entsprechenden Immunoblot für ZEB2 die Induktion der Proteinexpression unter Hypoxie (Abbildung 5.26). In den shZEB2 transduzierten G55TL-Zellen und LN-229-Zellen war die ZEB2-Proteinexpression verglichen mit den Kontrollen sowohl unter Normoxie (siehe Immunoblot links und rechts) als auch unter Hypoxie deutlich vermindert.

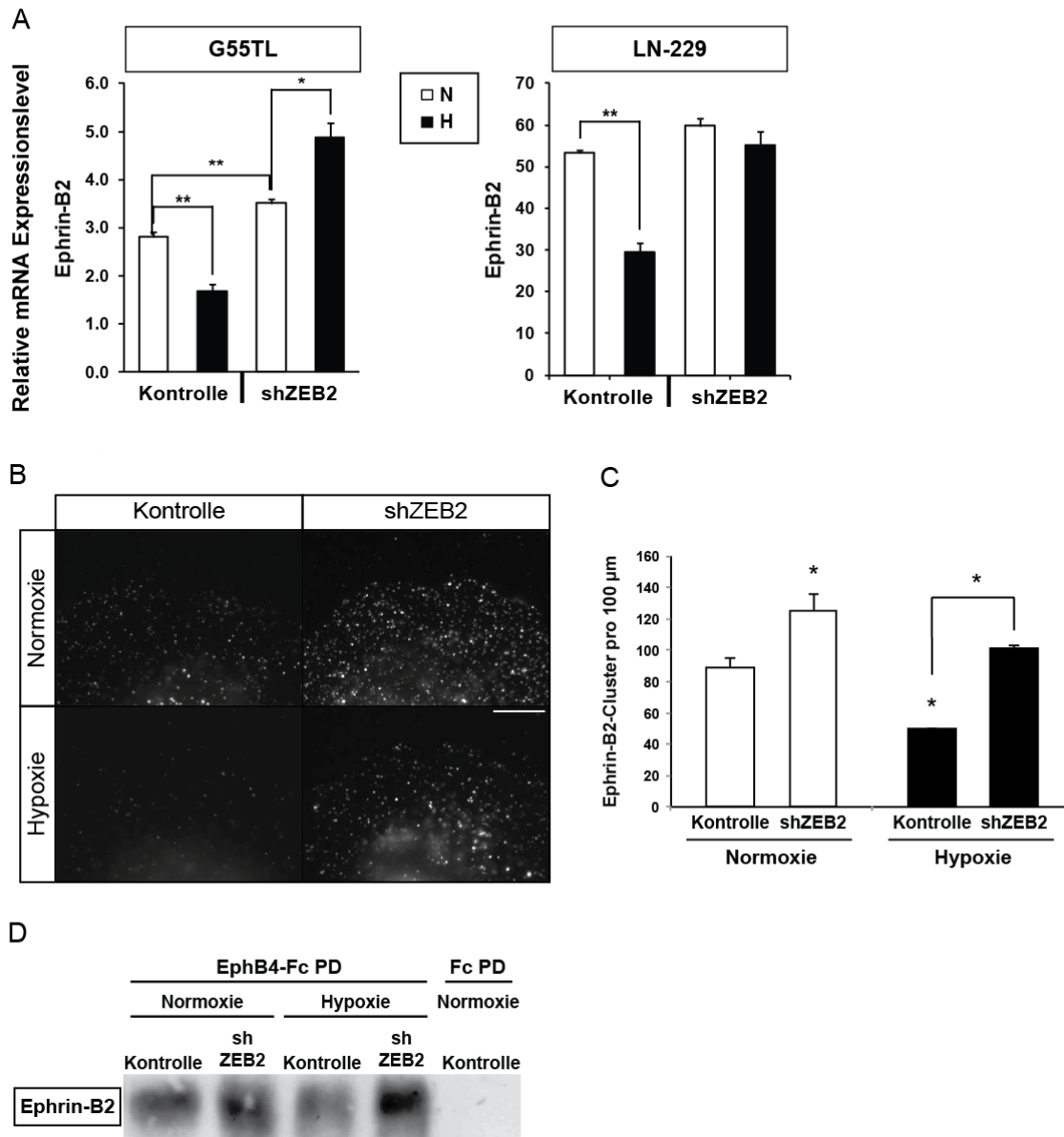


**Abbildung 5.26: Überprüfung der stabilen polyklonalen ZEB2-*knock-down*-Glioblastomzellen.** Humane LN-229- und G55TL-Glioblastomzellen wurden zur Herstellung stabiler *knock-down*-Zellen mit shRNA-Expressionsvektoren gegen ZEB2 und einer shRNA-Kontrolle stabil transduziert und selektioniert. Anschließend wurden die Zellen unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (18h, 1% O<sub>2</sub>) kultiviert und die Proteine in *Western-Blots* analysiert. Die Immunoblots zeigten für ZEB2 (157 kDa) eine deutliche Inhibition der Proteinexpression in den jeweiligen *knock-down*-Zellen sowohl unter Normoxie (Immunoblot Rechts und Links) als auch unter Hypoxie im Vergleich zu den Kontrollen. Tubulin (57 kDa) diente als interne Ladekontrolle für die auf dem *Blot* befindliche Proteinmenge.

### 5.2.5.2 Die Repression von Ephrin-B2 und EphB4 wird in den ZEB2-*knock-down*-Zellen aufgehoben

In den polyklonalen ZEB2-*knock-down*-Zellen konnte nun die Ephrin-B2-mRNA-Expression überprüft werden. Hierzu wurden die Zellen normoxischen und hypoxischen Bedingungen von 1% O<sub>2</sub> für 18h ausgesetzt und die mRNA Expression via qRT-PCR analysiert. In beiden Zelllinien konnte in den Kontrollen die signifikante Herunterregulation von Ephrin-B2 unter Hypoxie nachgewiesen werden (Abbildung 5.27 [A]). Dieser Effekt konnte durch einen ZEB2-Funktionsverlust in den G55TL- und den

LN-229-Zellen aufgehoben werden. Die Ephrin-B2-Expression zeigte in den G55TL-shZEB2-Zellen unter Hypoxie sogar eine signifikante Erhöhung.



**Abbildung 5.27: Die stabile Repression von ZEB2 verhindert die Hypoxie-abhängige Herunterregulation von Ephrin-B2 in humanen Glioblastomzellen.** Stabile ZEB2-knock-down G55TL- und LN-229-Glioblastomzellen wurden unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (18h, 1% O<sub>2</sub>) kultiviert und anschließend die mRNA und die Proteine isoliert. **(A)** Die qRT-PCR zeigte unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Verminderung der Ephrin-B2-Expression in beiden Kontrollzelllinien, die durch Repression von ZEB2 unter Normoxie wie auch unter Hypoxie wieder aufgehoben wurde. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgens *HPRT* verwendet und als x-fache Induktion visualisiert. (s.e.m., n=3, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test). **(B)** Repräsentative Bilder der Ephrin-B2-Cluster in den stabil transduzierten G55TL-Zellen, die auf Deckgläsern kultiviert wurden. Die Ephrin-B2-Cluster wurden mit EphB4 visualisiert, das mit anti-humanen Fc-Cy3 gekoppelt war. Die hypoxischen Zellen zeigten jeweils weniger Ephrin-B2-Cluster. (Skalierungsbalken = 5 μm). **(C)** Quantifizierung der in **(B)** gezeigten Ephrin-B2-Cluster (s.e.m., n=6, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0,001 im zwei-seitigen Student-t-Test). **(D)** Immunoblot von Ephrin-B2, das durch pull-down mit EphB4-Fc in den stabil-transduzierten LN-229-Zellen isoliert wurde. Die Zellen wurden unter Sphären-bildenden Bedingungen kultiviert. Humanes Fc diente als Negativkontrolle. Verglichen mit der normoxischen Kontrolle war die Ephrin-B2-Expression unter Hypoxie reduziert. In den ZEB2-knock-down-Zellen hingegen war die Expression unter Hypoxie stark erhöht.

Für den Nachweis der Ephrin-B2-Regulation auf Proteinebene wurden stabile G55TL ZEB2-*knock-down*-Zellen auf Deckglas kultiviert und die Ephrin-B2-Expression durch EphB4-Fc, gekoppelt mit anti-humanen Fc-Cy3 Antikörper visualisiert. Die Ergebnisse bestätigen die qRT-PCR Ergebnisse (Abbildung 5.27 [B] und [C]). Man konnte die signifikant erhöhte Expression von Ephrin-B2 in den shZEB2-Zellen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie und die signifikant verminderte Expression in der hypoxischen Kontrolle erkennen. Da die Ergebnisse der Immunfluoreszenz in den stabilen LN-229 ZEB2-*knock-down*-Zellen nicht eindeutig waren, wurde in diesen Zellen ein EphB4-Fc-*pull-down* (PD) und ein anschließender Immunoblot durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit rekombinanten EphB4-Fc stimuliert und anschließend die Protein-G-Sepharose-Microbeads isoliert und mit Hilfe eines Immunoblot visualisiert (Abbildung 5.27 [D]). Auch hier konnten die qRT-PCR Ergebnisse bestätigt werden. So war eine verringerte Ephrin-B2-Expression in der hypoxischen Kontrolle verglichen mit der normoxischen Kontrolle erkennbar. Die Expression erhöhte sich entsprechend in den ZEB2-*knock-downs* gegenüber den Kontrollen und auch gegenüber normoxisch und hypoxisch kultivierten Zellen.

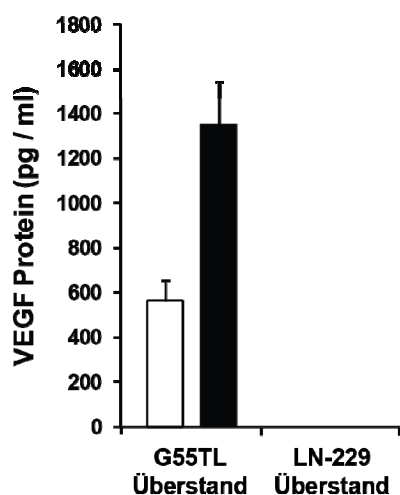
Zusammenfassend bestätigten diese Experimente, dass ZEB2 die Hypoxie-induzierte Repression von Ephrin-B2 auf transkriptioneller sowie auf postrationaler Ebene steuert.

### **5.2.6 Die Rolle von ZEB2 in anti-angiogen-behandelten Tumoren *in vivo***

Als Nächstes sollte die *in vivo*-Relevanz der erhöhten Ephrin-B2-Expression in den stabil hergestellten ZEB2-*knock-down*-Zellen untersucht werden. Hinsichtlich des erhöhten Tumorwachstums und der Tumordinvasion der Ephrin-B2-Gliomazellen (Abbildung 5.10) waren wir daran interessiert herauszufinden, ob die Repression von ZEB2 entsprechend mit einem verringerten Tumorwachstum sowie einem verringerten Invasionsverhalten der Glioblastomzellen einhergeht.

Neben den Aspekten des Ephrin-B2-abhängigen Invasions- und Wachstumsverhaltens der Tumoren, sollte auch der therapeutische Hintergrund der Gliominvasion analysiert werden. Insbesondere, da die Ausschaltung von Ephrin-B2 ein ähnlich erhöhtes Invasionsverhalten zum Vorschein brachte, wie es nach der anti-angiogenen Therapie für gewöhnlich der Fall ist. Wie in der Einleitung erwähnt, entwickeln Glioblastome nach der anti-angiogenen Therapie gegen VEGF einen stark erhöhten invasiven Phänotyp. Zur Untersuchung der therapeutischen Relevanz der

Ephrin-B2-induzierten Invasion sollten die Mäuse mit dem Anti-VEGF-Antikörper Avastin behandelt werden. Zunächst wurden anhand eines *Enzyme Linked Immunosorbent-Assays* (ELISA) die VEGF-Level in den Zellkulturüberständen der G55TL- und LN-229-Glioblastomzellen überprüft. Interessanterweise konnte im Gegensatz zu den G55TL-Zellen in den LN-229-Zellen keine Sezernierung von VEGF im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Abbildung 5.28). In den G55TL-Zellen war eine Hypoxie-induzierte erhöhte VEGF-Expression erkennbar.



**Abbildung 5.28: LN-229-Zellen sezernieren kein VEGF.** Die humanen Glioblastomzellen wurden unter normoxischen und hypoxischen (24h, 1% O<sub>2</sub>) Bedingungen kultiviert und humanes VEGF anschließend mittels eines enzymatischen Immuno-Assays (ELISA) im Kulturüberstand analysiert. Die Quantifizierung zeigte für G55TL-Zellen einen durchschnittlichen VEGF-Level von 563 ± 90 pg VEGF/ ml in den normoxisch-kultivierten und 1353 ± 192 pg VEGF/ ml in den hypoxisch-kultivierten Zellen. In dem LN-229-Kulturüberstand konnte kein VEGF detektiert werden. Die Ansätze wurden als Duplett durchgeführt (n= 2).

#### 5.2.6.1 Der Verlust von ZEB2 führt zu einem verringerten Tumolvolumen und verhindert den invasiven Phänotypen nach anti-angiogener Behandlung von humanen Glioblastomen *in vivo*

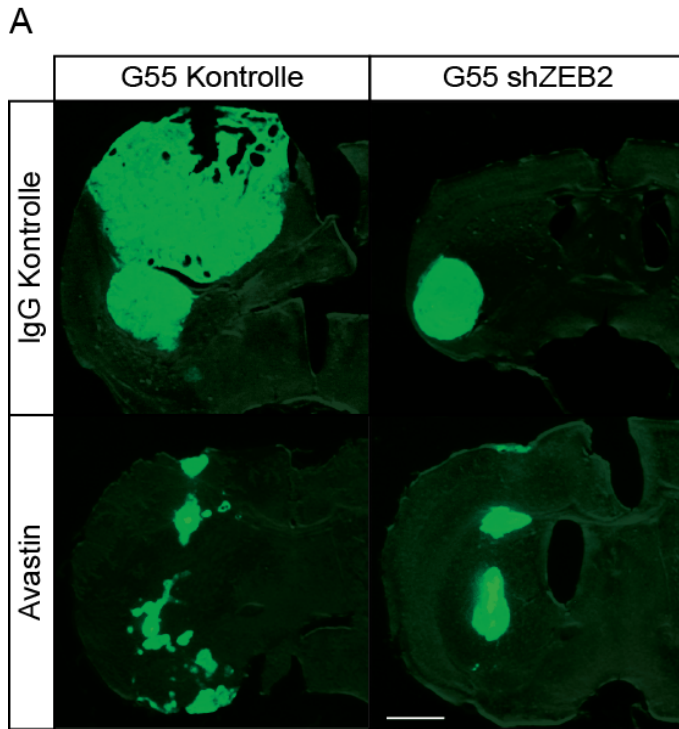
Für die *in vivo* Versuche wurden die stabil transduzierten G55TL und LN-229 ZEB2-*knock-down*-Zellen wie in Abschnitt 5.10 intrakraniell in einem orthotopen Xenograft-Modell transplantiert. Hierfür wurden je 5x 10<sup>3</sup> stabil transduzierte G55TL-Zellen und je 1x 10<sup>5</sup> stabil transduzierte LN-229-Zellen in zwei Mikroliter CO<sub>2</sub>-unabhängigem Medium pro Maus in das linke Striatum transplantiert. Die G55TL-Tumoren zeigten eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit wie die Ephrin-B2-Gliomazellen, was zu einer Versuchsdauer von 13 Tagen führte. Dagegen war das Wachstum der LN-229-Tumoren mit knapp sieben Wochen (54 Tage) deutlich langsamer. Für die anti-angiogene Behandlung wurden die G55TL-transplantierten Mäuse jeden zweiten Tag mit 20 mg/kg Avastin oder humanen IgG zur Kontrolle intraperitoneal behandelt.

Da eine Avastin-Behandlung durch die fehlende VEGF-Produktion der LN-229-Zellen keine Auswirkungen auf die Tumorangio-genese hatte, konnten diese Zellen als Modellsystem von anti-angiogen-resistenten Tumoren genutzt werden. Um die

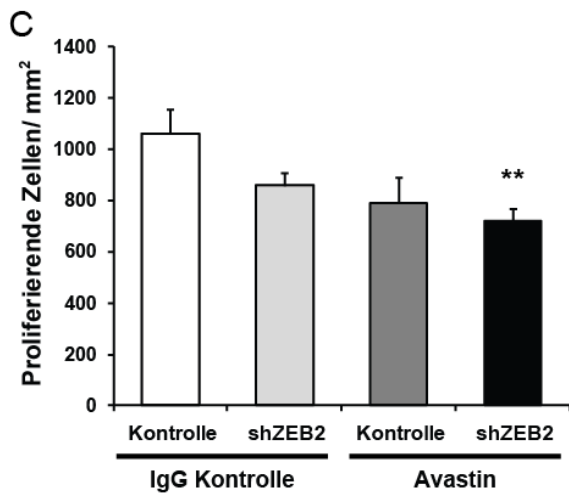
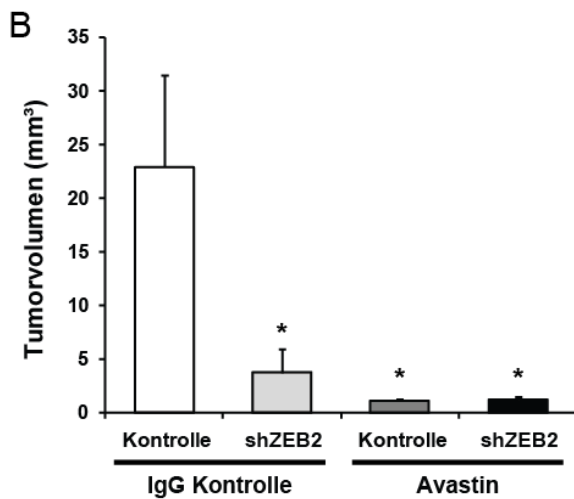
---

Auswirkungen der ZEB2-Repression auf diese resistenten Tumoren zu untersuchen, wurden die stabil transduzierten shZEB2- und WT-LN-229-Zellen ebenfalls mit Avastin behandelt. Aufgrund des langsamen Wachstums der LN-229-Tumoren fand eine Behandlung der transplantierten Mäuse nur dreimal die Woche mit 10 mg/kg Avastin beziehungsweise humanem IgG statt. Nach den ersten Symptomen wurden die Mäuse derselben transplantierten Zelllinie zusammen perfundiert und von den Gehirnen nach der Präparation serielle Dickschnitte (40µm) angefertigt. Durch die GFP-Markierung der transduzierten Glioblastomzellen konnte das Tumolvolumen anhand der fluoreszierenden Tumorzellen mit einem Fluoreszenzmikroskop ermittelt werden.

Die IgG-behandelten Tumoren der stabil-transduzierten humanen G55TL-shZEB2-Glioblastomzellen zeigten verglichen mit den IgG-behandelten Kontrollen ein signifikant verlangsamtes Wachstum (Abbildung 5.29 [A] und [B]). Wie erwartet verhinderte eine Avastin-Behandlung das Tumorstadium signifikant. Eine signifikante Verringerung des Tumorstadiums in den Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren gegenüber den Avastin-behandelten Kontrolltumoren konnte nicht beobachtet werden. Allerdings resultierte die Avastin-Behandlung in den Kontrolltumoren in einer verstärkten Invasion, die durch Tumorsatelliten gekennzeichnet war und im Unterschied zu den kompakt gewachsenen IgG-behandelten Tumoren weit über die linke Hemisphäre streuten. Im Gegensatz hierzu wuchsen die shZEB2-Tumoren sowohl nach der IgG-Behandlung als auch nach der Avastin-Behandlung abgekapselt und nicht invasiv. Um den zu Grunde liegenden Mechanismus für das geringe Tumorstadium zu analysieren, wurde in den Tumoren mit Hilfe des Histon-H3 Antikörpers die Proliferation der Tumorzellen überprüft. Die Proliferation der Avastin-behandelten Tumoren sowie der IgG-behandelten shZEB2-Tumore war verglichen mit den IgG-behandelten Kontrolltumoren tendenziell verringert (Abbildung 5.29 [C]). Die Anzahl der proliferierenden Zellen pro mm<sup>2</sup> ergab in den Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren einen signifikanten Unterschied zu den IgG-behandelten Kontrolltumoren. Hiermit konnte gezeigt werden, dass ein ZEB2-Verlust das Tumorstadium inhibiert.

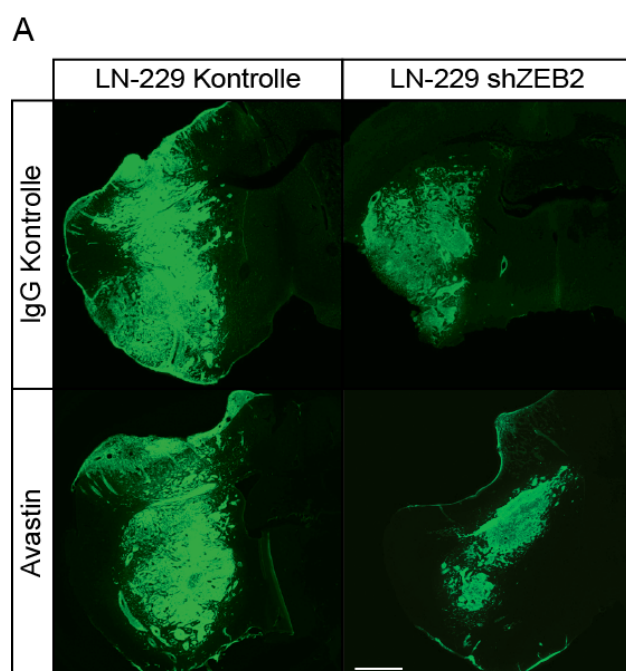


**Abbildung 5.29: Die Repression von ZEB2 verringert das Tumorumfangen von G55TL-Glioblastomzellen.** Die stabil transduzierten GFP-positiven G55TL-shZEB2-Glioblastomzellen und deren Kontrollen wurden in einem intrakraniellen Xenograft-Modell transplantiert. Die Mäuse wurden intraperitoneal alle zwei Tage mit 20 mg/kg Avastin beziehungsweise humanem IgG zur Kontrolle behandelt. Die Gehirne wurden 13 Tage nach der Transplantation präpariert. **(A)** Repräsentative Abbildungen der G55TL-Tumoren zeigen ein geringeres Tumorumfangen des shZEB2-Tumors und der beiden Avastin-behandelten Tumoren im Vergleich zu dem IgG-behandelten Kontrolltumor. **(B)** Die stereologische Quantifizierung der G55TL-Tumorumfänge von je 8 Mäusen pro Gruppe ergab ein durchschnittlich geringeres Tumorumfangen von  $19 \pm 2,2 \text{ mm}^3$  in den IgG-behandelten shZEB2-Tumoren,  $21,8 \pm 0,16 \text{ mm}^3$  in Avastin behandelten Kontrolltumoren und  $21,6 \pm 0,2 \text{ mm}^3$  in Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren im Vergleich zu den IgG-behandelten Kontrolltumoren. **(C)** Die Quantifizierung der Histon-H3-positiven Zellen zeigte eine durchschnittliche Reduktion von  $201 \pm 49$  proliferierenden Zellen pro  $\text{mm}^2$  in IgG-behandelten shZEB2-Tumoren,  $268 \pm 101$  Zellen in Avastin-behandelten Kontrolltumoren und  $340 \pm 51$  Zellen in Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren im Vergleich zu den IgG-behandelten Kontrolltumoren. (n = 8, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 im zweiseitigen Student-t-Test, Skalierungsbalken = 1mm).

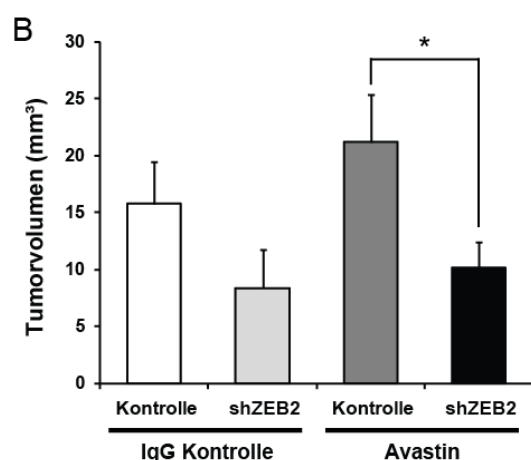




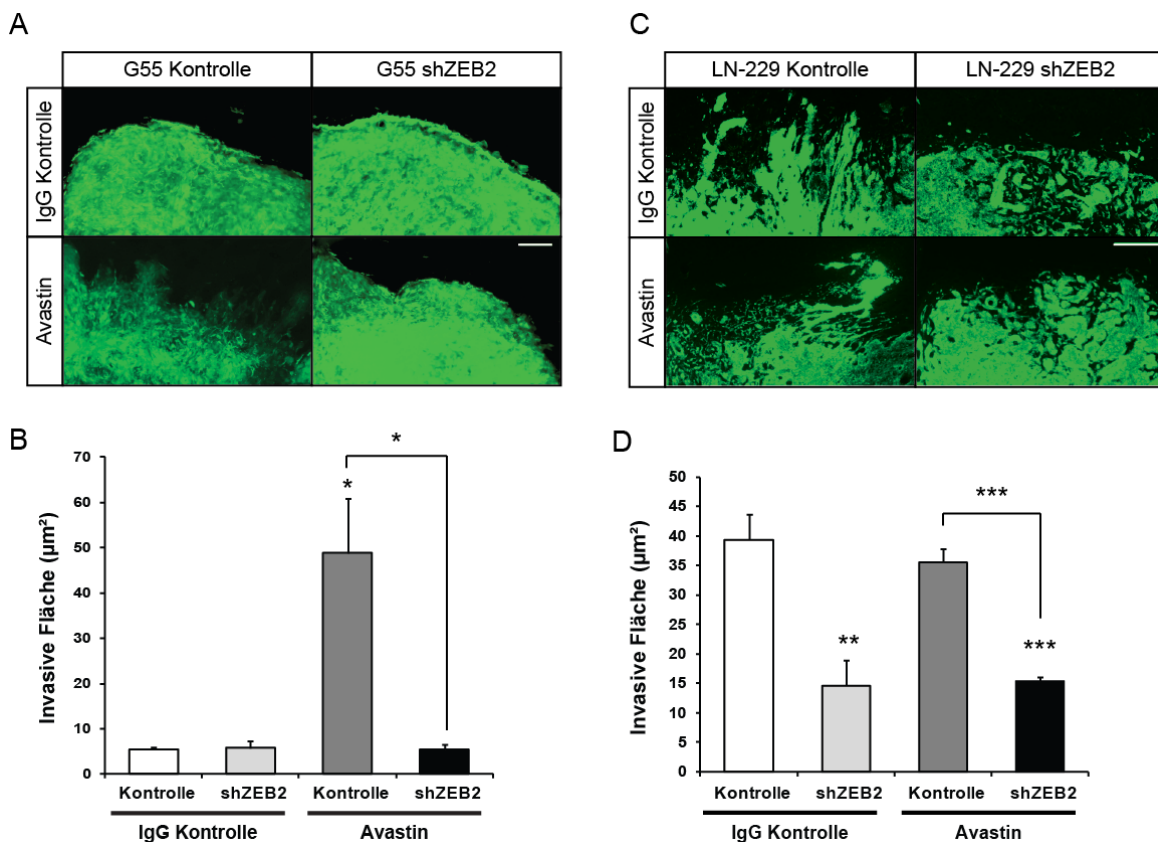
Die LN-229-Tumoren waren sehr groß gewachsen und nahmen teilweise die ganze linke Hemisphäre ein, was durch das langsame Wachstum der LN-229-Glioblastomzellen hervorgerufen wurde und die Mäuse dadurch erst sehr spät erste Symptome gezeigt hatten. Dennoch waren auch hier in den IgG-behandelten Mäusen die shZEB2-Tumoren deutlich kleiner verglichen mit den Kontrolltumoren (Abbildung 5.30). Im Einklang mit dem ELISA-Ergebnis zeigte die Avastin-Behandlung keinen Effekt auf das Wachstum der LN-229-Tumoren. Sowohl die IgG- als auch die Avastin-behandelte Gruppe zeigten vergleichbare Wachstumsmuster. Es konnte jedoch auch hier eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens in den Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren verglichen mit den Avastin-behandelten Kontrollen quantifiziert werden.



**Abbildung: 5.30: Die Repression von ZEB2 verringert das Tumolvolumen von LN-229-Glioblastomzellen.** Die stabil transduzierten GFP-positiven LN-229 shZEB2-Glioblastomzellen und deren Kontrollen wurden in einem intrakraniellen Xenograft-Modell transplantiert. Die Mäuse wurden intraperitoneal dreimal in der Woche mit 10 mg/kg Avastin beziehungsweise humanen IgG zur Kontrolle behandelt. Die Gehirne wurden 54 Tage nach der Transplantation präpariert. **(A)** Repräsentative Abbildungen der LN-229-Tumoren zeigen ein geringeres Tumolvolumen des shZEB2-Tumors und der Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren im Vergleich zu den Kontrolltumoren. **(B)** Die stereologische Quantifizierung der LN-229 ergab ein durchschnittlich geringeres Tumolvolumen von  $7,4 \pm 3,3 \text{ mm}^3$  in den IgG-behandelten shZEB2-Tumoren und  $5,6 \pm 2,3 \text{ mm}^3$  in Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren im Vergleich zu der IgG-behandelten Kontrolltumoren. Das Tumolvolumen in den Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren war signifikant um  $11 \pm 2,3 \text{ mm}^3$  verglichen mit den Avastin-Kontrolltumoren verringert. Die Avastin-Behandlung *per se* hatte keine Auswirkung auf das Tumorwachstum. ( $n = 5 - 8$ , \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  im zwei-seitigen Student-t-Test, Skalierungsbalken = 1mm).



Um die Invasion der Tumorzellen zu quantifizieren, wurden von allen Tumoren zufällig gewählte Bildausschnitte vergrößert und die Invasion der Zellen vom Tumorrand aus gemessen. In den G55TL-Tumoren war die verstärkte Invasion der Avastin-behandelten Kontrolltumorzellen klar erkennbar (Abbildung 5.31 [A] und [B]). Diese signifikant erhöhte Invasion war in den Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren wieder signifikant verringert. Die LN-229-Tumoren zeigten zwar in allen Tumoren eine eher diffuse Invasion, jedoch waren auch in den vergrößerten Bildabschnitten keine Unterschiede in der Tumorzellinvasion zwischen den Avastin- und IgG-behandelten Gruppen erkennbar (Abbildung 5.31 [C] und [D]).

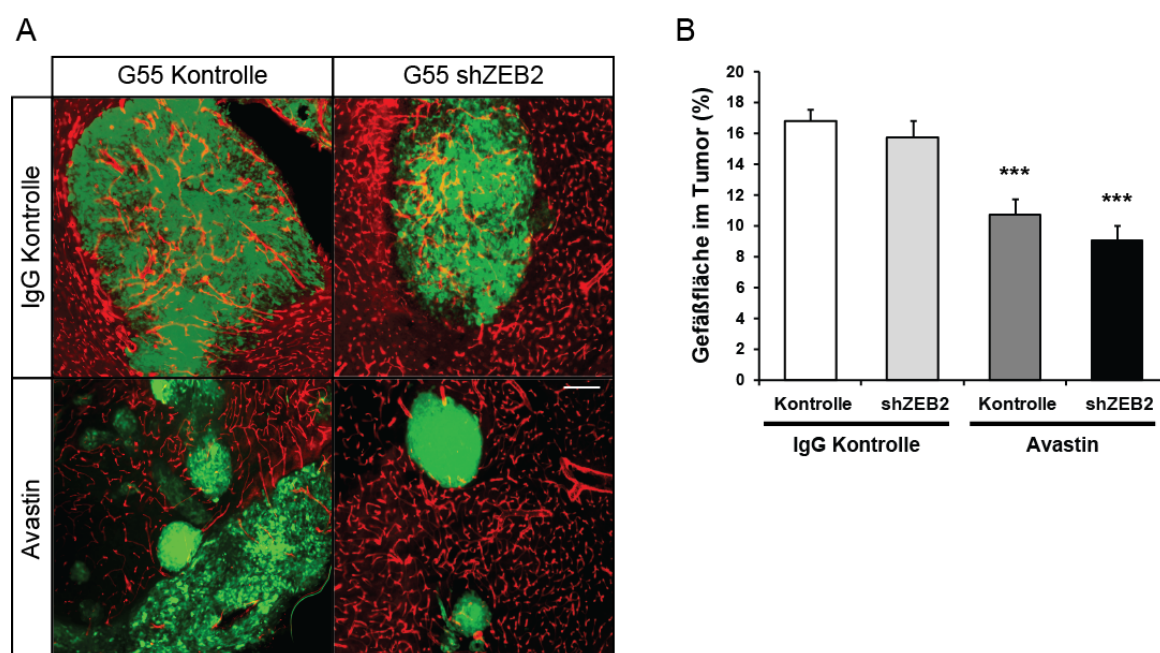


**Abbildung 5.31: Der invasive Phänotyp, der bei anti-angiogener Behandlung entsteht, wird durch die Ausschaltung von ZEB2 verhindert.** Die invasive Fläche der Tumoren wurde auf zufällig gewählten Bildausschnitten quantifiziert und zu der gemessenen Länge des Tumorrandes in dem Bild normalisiert. **(A)** Repräsentative Abbildungen der GFP-positiven G55TL-Tumoren zeigen eine erhöhte Invasion der Tumorzellen in den Avastin-behandelten Kontrolltumoren im Vergleich zu den restlichen Tumoren, die einen kompakten Tumorrand besaßen (Skalierungsbalken = 100  $\mu\text{m}$ ). **(B)** Die Quantifizierung der Invasion in den G55TL-Tumoren ergab eine durchschnittlich mehr als 8-fach erhöhte invasive Fläche in den Avastin-behandelten Tumoren. **(C)** Repräsentative Abbildungen der GFP-positiven LN-229-Tumoren zeigen generell eine diffuse Invasion. Die Kontrolltumoren wiesen stark invasive Stränge auf, die von dem zerklüfteten Tumorrand aus weit ins Parenchym reichten, bei den shZEB2-Tumoren jedoch nicht vorhanden waren (Skalierungsbalken = 200  $\mu\text{m}$ ). **(D)** Die Quantifizierung der LN-229-Tumorinvasion zeigte eine durchschnittlich 0,5-fach signifikant verringerte Invasion in den shZEB2-Tumoren verglichen mit den Kontrolltumoren. ((B) n = 6, (D) n = 8, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 im zwei-seitigen Student-t-Test).

Die in den G55TL-Tumoren quantifizierte Reduktion der Invasion bei einem ZEB2-Funktionsverlust konnte auch in den LN-229-Tumoren unabhängig von der Behandlung der Mäuse bestätigt werden. Die Kontrolltumoren wiesen in beiden Gruppen stark invasive Stränge auf, die vom zerklüfteten Tumorrand aus weit in das Parenchym reichten. Diese invasiven Stränge konnten in den shZEB2-Tumoren nicht nachgewiesen werden. Die Invasion der LN-229 shZEB2-Tumoren war verglichen mit den Kontrollen hochsignifikant verringert.

Die *in vivo* Ergebnisse implizierten durch das verringerte Tumolvolumen sowie der verringerten Invasion der Avastin-behandelten G55TL- und LN-229-shZEB2-Glioblastomzellen die Relevanz, die ZEB2 in der Behandlung von anti-angiogen resistenten Tumoren spielen könnte.

### 5.2.6.2 Die anti-angiogen-behandelten humanen Glioblastomen entwickeln hypoxische Bereiche am Tumorrand

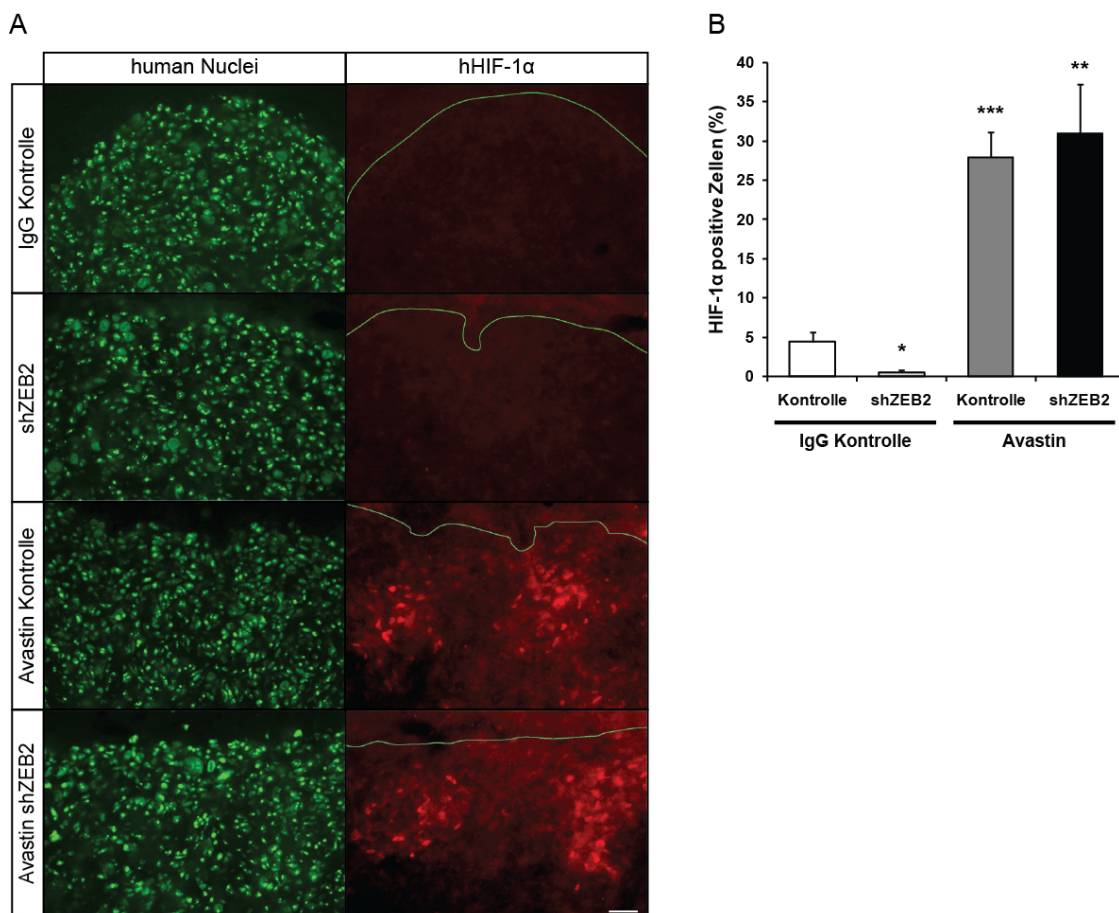


**Abbildung 5.32: Die Behandlung mit Avastin verringert die Gefäßfläche in Tumoren.** (A) Repräsentative Abbildungen von Immunfluoreszenz-gefärbten (anti-Podocalyxin (rot), GFP-positive Tumorzellen (grün)) G55TL-Tumoren weisen in den Avastin-behandelten Tumoren weniger Blutgefäße im Tumor auf (Skalierungsbalken = 200  $\mu$ m). (B) Die Quantifizierung der Blutgefäße ergab eine signifikant geringere Gefäßfläche in den Avastin-behandelten Tumoren verglichen mit den IgG-behandelten Kontrolltumoren. (n = 8, (D) n = 8, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 im zwei-seitigen Student-t-Test)

Der mechanistische Hintergrund der Wachstums- und Invasion-inhibierenden Eigenschaften der G55TL-shZEB2-Tumoren sollte weiter aufgeklärt werden. Daher wurde die Gefäßfläche in den Tumorzellen untersucht um herauszufinden, ob ein ZEB2-

Verlust *per se* mit unterschiedlicher Gefäßdichte einhergeht und welche Auswirkungen eine Gefäßreduktion nach der Avastin-Behandlung auf die Tumorphoxie hat.

Hierfür wurden die Blutgefäße mit dem Anti-Podocalyxin-Antikörper visualisiert und ausgewertet. Die Gefäßdichte der IgG-behandelten Mäuse zeigte in den ZEB2-KO-Tumoren, ähnlich den Ephrin-B2-KO-Tumoren, keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 5.32). Jedoch war in den IgG-behandelten Tumoren eine vergrößerte Anzahl von Gefäßen am Tumorrand gegenüber den Avastin-behandelten Tumoren erkennbar. Dagegen war die Gefäßfläche in den Avastin-behandelten Tumoren verglichen mit den IgG-behandelten Kontrolltumoren hochsignifikant verringert.



**Abbildung 5.33: Die Behandlung mit Avastin erhöht die Hypoxie am Tumorrand.** (A) Repräsentative Abbildungen der Immunfluoreszenz gefärbten G55TL-Tumoren (anti-HIF-1α (rot)) zeigen in den Avastin-behandelten G55TL-Tumoren HIF-1α-positive Bereiche am Tumorrand (Skalierungsbalken = 20 μm). (B) Die Quantifizierung der HIF-1α-positiven Bereiche (je 80 μm/ Bild) ergaben 25% mehr hypoxische Bereiche am Tumorrand verglichen mit den Kontrolltumoren die zu weniger als 5% hypoxisch waren. (n = 8, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 im zwei-seitigen Student-t-Test)

Die Auswertung der Hypoxie wurde mit Hilfe des anti-HIF-1α-Antikörpers durchgeführt. In den IgG-behandelten shZEB2-Tumoren war die HIF-1α-Induktion entsprechend der verkleinerten Tumorumfänge am Tumorrand signifikant verringert

---

(Abbildung 5.33). Dagegen konnte in den Avastin-behandelten Tumoren eine hochsignifikant verstärkte HIF-1 $\alpha$ -Expression am Tumorrand nachgewiesen werden, was auf eine anti-angiogen-induzierte Hypoxie schließen lässt.

Die Avastin-Behandlung ergab eine verminderte Gefäßfläche in den Tumoren, induzierte jedoch parallel dazu auch durch die entstandenen hypoxischen Bereiche am Tumorrand HIF-1 $\alpha$ , was letztlich in der hier erwiesenen Ephrin-B2-abhängigen erhöhten Invasion resultieren kann.

### **5.3 Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse**

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Ephrin-B2 eine Tumorsuppressorrolle in der Glioblastomentwicklung einnimmt und der Verlust der repulsiven Signale von Ephrin-B2 zu einer Veränderung des invasiven Phänotyps beiträgt. In den durchgeführten Versuchen korrelierte die Verminderung der Ephrin-B2-Expression mit einer erhöhten Invasionskapazität und einem verstärkten Tumorwachstum. Diese Ephrin-B2-Herunterregulation erwies sich als Hypoxie-abhängig und konnte durch die Bindung des HIF-1 $\alpha$ -induzierten Repressors ZEB2 an den Ephrin-B2-Promotor begründet werden. Weiterhin konnte sowohl für IgG- als auch Avastin-behandelte ZEB2-*knock-down*-Tumoren ein verringertes Tumolvolumen und eine verringerte Tumorinvasion nachgewiesen werden, was erneut die Ephrin-B2-Tumorsuppressorrolle unterstreicht. Somit konnten mit dem hier aufgezeigten Signalweg potentielle neue Therapieansätze aufgezeigt werden, um der anti-angiogenen-Therapie-Resistenz in Form einer erhöhten Invasion entgegen zu wirken.

## 6 Diskussion

Trotz neuer Erkenntnisse zur Therapie des aggressiven Glioblastoms beträgt die mediane Überlebenszeit der Betroffenen lediglich ein Jahr. Ein wesentliches Hindernis für eine erfolgreiche Behandlung stellen die starke Invasion der Glioblastomzellen in das Parenchym und die damit einhergehende Rezidivbildung dar. In diesem Zusammenhang hat sich zudem gezeigt, dass anti-angiogene Wirkstoffe, die zu Beginn dieser Therapieentwicklung als vielversprechend zur Behandlung von Glioblastomen gehandelt wurden, evasive Resistenzen induzieren, indem die Zellen unter anderem in einen invasiven Phänotyp übergehen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein wichtiger Pathomechanismus identifiziert werden, der die Invasion von Glioblastomen reguliert. So konnte in Glioblastomzellen anhand von *in vitro* und *in vivo* Versuchen für Ephrin-B2 eine Tumorsuppressorrolle nachgewiesen werden. Der Verlust von Ephrin-B2 wurde auf genetischer, epigenetischer und auf molekularer Ebene nachgewiesen und resultierte in einer erhöhten Tumorinvasion und –progression. Die Untersuchungen zur Regulation von Ephrin-B2 identifizierten den EMT-Regulator ZEB2 als transkriptionellen Repressor von Ephrin-B2, der Hypoxie-abhängig durch HIF-1 $\alpha$  induziert wird und somit eine pro-onkogene sowie eine pro-invasive Funktion in der Glioblastomprogression einnimmt. Letztlich konnte mit der Inaktivierung von ZEB2 eine neue potentielle therapeutische Zielstruktur aufgezeigt werden, die der anti-angiogen-induzierten Invasion der Glioblastomzellen entgegenwirkt und gleichzeitig die TumorgroÙe verringert.

### 6.1 Ephrin-B2 agiert als Tumorsuppressor in Gliomen

Glioblastome sind durch zentrale Nekrosen, hypoxische Bereiche und periphere Tumorzellinvasion in das umliegende Hirngewebe charakterisiert. Auch wenn die initialen Auslöser der neoplastischen Transformation von Glioblastomen meist genetische Mutationen sind, entstehen aufgrund des schnellen Wachstums der Glioblastome häufig hypoxische Bereiche, die zu der Aktivierung der regulatorischen Transkriptionsfaktoren HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*)-1 $\alpha$  und -2 $\alpha$  führen. Die Aktivierung von HIF gehört zu den entscheidenden Parametern, die die Pathophysiologie des Glioblastoms charakterisieren, indem durch die Regulation von über 100 Zielgenen unterschiedliche zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Zelltod, Zellmetabolismus, pH-Regulation, Stammzellerneuerung, Angiogenese und auch die Invasion/ Metastasierung eingeleitet werden (102, 121, 122, 125). Glioblastome zeigen in nekrotischen Bereichen, die durch einen niedrigen Sauerstoffgehalt in den angrenzenden zeldichten Pseudopalisaden der



perinekrotischen Region charakterisiert sind, sowie an der invasiven Front eine Erhöhung von HIF-1 $\alpha$ - und auch HIF-2 $\alpha$ -Proteinen. Die vermehrte HIF-1 $\alpha$ -Expression korreliert mit einer erhöhten Malignität der Gliome und weist auf die Relevanz von HIF-1 $\alpha$  in der Tumorinvasion hin (142-144). Bisher ist wenig über die HIF-abhängigen Zielgene bekannt, die zur Induktion eines invasiven Tumorphänotyps im Glioblastom führen. Demnach ist die Entschlüsselung von molekularen Mechanismen, die zur Regulation der Tumorinvasion beitragen, für das Verständnis der Pathophysiologie des Glioblastoms und zur Entwicklung neuer Therapieformen essentiell.

Die Eph-Rezeptoren und deren Ephrin-Liganden bilden zusammen hinsichtlich der Zellbeweglichkeit ein wichtiges Zellkommunikationssystem. So konnte gezeigt werden, dass das Eph- und Ephrin-System bei der Angiogenese sowie der Invasion und Progression von Tumoren eine Rolle spielt. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist vor allem das EphB/ Ephrin-B-System, welches aufgrund der bidirektionalen Signalgebung eine wesentliche Funktion in der Zellmotilität und Invasion einnehmen kann. Allerdings handelt es sich bei der Eph/ Ephrin-Signaltransduktion um einen komplexen Prozess, der durch gegensätzliche zelluläre Ereignisse gekennzeichnet ist. So konnten sowohl eine erhöhte als auch eine verminderte Expression von Eph und Ephrinen in Tumorzellen nachgewiesen werden, die zur Tumorphathogenese beitragen. Abhängig von der Eph- und Ephrin-Zusammensetzung in den Zellen und dem umliegenden Gewebe können Eph und Ephrine durch die Vermittlung onkogener Signale sowohl tumorfördernd als auch durch tumorsuppressive Signale tumorinhibierend wirken (198, 240-242).

Zur Entschlüsselung der Funktion von Eph-Rezeptoren und deren Ephrin-Liganden in der Glioblastominvasion und -progression, wurden im ersten Teil dieser Arbeit genetische und epigenetische Untersuchungen der EphB/Ephrin-B-Familie in einer Kohorte von Gliompatienten unterschiedlicher Malignitätsgrade durchgeführt. Da bisher keine Untersuchungen zur Regulation der Eph und Ephrine durch Hypoxie im Glioblastom vorliegen, wurde zudem die Expression verschiedener Eph und Ephrine in Glioblastomzellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen analysiert. Dabei konnte Ephrin-B2 als Tumorsuppressorgen identifiziert werden, das auf genetischer Ebene sowie HIF-1 $\alpha$ -vermittelt durch das hypoxische Mikromilieu inaktiviert wird.

Um den Einfluss der Hypoxie auf die Eph- und Ephrin-Expression im Glioblastom zu ermitteln, wurde zunächst die relative Expressionsverteilung der Eph- und Ephrin-Familie in einer Reihe von humanen Glioblastomzelllinien analysiert. In der quantitativen *real-time* PCR zeigten die Eph und Ephrine in den untersuchten Glioblastomzelllinien unterschiedliche Expressionslevel (siehe Abbildung 5.2). Da es sich um etablierte

Zelllinien aus Patientenmaterial handelt, ist die ungleiche Expression wohl auf genotypische Unterschiede zurück zu führen.

Die Untersuchung der Eph- und Ephrin-Expression unter Hypoxie ergab mehrheitlich eine signifikante Herunterregulation nach 18h Hypoxie, sowohl in den Glioblastomzelllinien SNB19, LN-229 und G55TL, als auch in der im Labor etablierten primären Glioblastomzelllinie pGBM (siehe Abbildung 5.3). Nach 96h glichen sich die Werte wieder den normoxischen Kontrollen an. Interessanterweise korrelierte diese Regulation der Eph und Ephrine unter Hypoxie mit einem erhöhten Proteinlevel von HIF-1 $\alpha$  nach 18h, der nach 96h wieder entsprechend verringert war. Da diese Regulation bei HIF-2 $\alpha$  nicht vorhanden war, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die Eph und Ephrine HIF-1 $\alpha$ -abhängig reprimiert wurden. Auffällig war auch, dass die vorhandene Aktivität von HIF-2 $\alpha$  bei der längerfristigen Hypoxie die Eph und Ephrine, verglichen mit der normoxischen Kontrolle, hochregulierte. Eine Hochregulation durch HIF-2 $\alpha$  konnte bisher nur für Ephrin-A1 in Endothelzellen nachgewiesen werden (300). Die unterschiedliche Expression der HIF-Isomere wurde auch von Holmquist-Mengelbier *et al.* 2006 nachgewiesen. In den untersuchten Neuroblastomazellen war HIF-1 $\alpha$  nur bei einer akuten Hypoxie von vier Stunden und bei 1% O<sub>2</sub> aktiv, wogegen HIF-2 $\alpha$  auch nach 24h und bei milder Hypoxie von 5% noch aktiv war. Die Ergebnisse bestätigten, dass HIF-1 $\alpha$  vorrangig bei einer akuten und HIF-2 $\alpha$  bei einer chronischen Hypoxie vorhanden sind und demnach auch unterschiedliche zelluläre Ereignisse und Gene aktivieren (139).

Um nun die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Repression der Eph und Ephrine nachzuweisen, wurden HIF-siRNAs zur Inaktivierung verwendet und Versuche unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Die erfolgreiche Ausschaltung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in den Zellen wurde anhand von HIF-spezifischen Primern und dem HIF-1 $\alpha$ -Zielgen CA-IX überprüft (siehe Abbildung 5.4). Da die Ausschaltung von HIF-1 $\alpha$ , nicht jedoch von HIF-2 $\alpha$ , die Repression der Eph und Ephrine aufhob, konnten die transienten *knock-down*-Versuche die Hypothese weiter unterstützen, dass die Expression der untersuchten Eph und Ephrine durch HIF-1 $\alpha$  inhibiert wurde.

Als nächstes sollte die Rolle der EphB- und Ephrin-B-Familie hinsichtlich der Gliomprogression näher überprüft werden. Hierfür wurde eine komparative genomische Hybridisierung (*Comparative Genomic Hybridization* [CGH]) mit einer Reihe von Grad II – IV Gliombiopsien durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten verstärkt Deletionen der EphB- und Ephrin-B-Familie in Gliomen, die sich vor allem bei Ephrin-B2 manifestierten (siehe Abbildung 5.5 [A]). Die Deletionen korrelierten mit der erhöhten Malignität der Gliome. Eine Ausnahme stellte EphB4 dar, für das eine Genamplifikation in Gliomen nachgewiesen werden konnte.



Neben dem genomischen Verlust von Ephrin-B2 sollte auch untersucht werden, ob während der Progression von einem niedrig-gradigen zu einem höher-gradigen Tumor eine zusätzlich verminderte Ephrin-B2-Expression durch epigenetische Modifikationen des Genoms vorliegt. Bei der epigenetischen Regulation spielen die Histone als Grundbausteine des Heterochromatins eine entscheidende Rolle. Histone können mehrfach verändert werden, durch Modifikationen wie Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung. Die Acetylierung von Lysin in Histonen vereinfacht die Transkription, indem die Bindung zwischen Histon und DNA geschwächt wird und dadurch das Heterochromatin in die offene Konformation des Euchromatins dekondensiert (301). Die Deacetylierung resultiert in einer Blockierung der DNA für Transkriptionsfaktoren, sodass die transkriptionelle Aktivität inhibiert wird. In Tumorzellen kommt es daher häufig zur Überexpression von Histon-Deacetylasen (HDACs). Eine weitere, häufig vorkommende epigenetische Regulierung durch Repression ist die Promotor-Hypermethylierung. In Säugetieren betrifft die DNA-Methylierung meist die CpG (*Cytosine preceding Guanine*)-Inseln in der Promotorregion, deren GC-Gehalt etwa 60% beträgt. Die Cytosin-Hypermethylierung der CpG-Inseln von Promotoren ist ein häufiger Mechanismus der Geninaktivierung in Tumorzellen und ermöglicht die Regulation des Genoms, ohne die primäre Nukleotidsequenz zu verändern, indem eine Methyl (CH<sub>3</sub>-)gruppe auf das Cytosin in Position 5 hinzugefügt wird (290, 302, 303).

Zusätzlich zu der genetischen Aberration von Ephrin-B2, konnte anhand von Natriumbisulfit-Sequenzierungen eine Hypermethylierung des Ephrin-B2-Promotors in den Gliombiopsien nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.5 [B]). Die Tatsache, dass eine epigenetische Inaktivierung von Ephrin-B2 vorrangig in sekundären und nicht in primären Glioblastomen zu finden war, legt die Vermutung nahe, dass ein Verlust der Ephrin-B2-Expression mit der Tumorprogression einhergeht. Entsprechend der CGH- und Methylierungsdaten war auch die Ephrin-B2-Expression in den methylierten Gliombiopsien verringert (siehe Abbildung 5.5 [C]). Methylierungsspezifische qRT-PCR-Ergebnisse von Glioblastomzelllinien ergaben nach einer Behandlung von entsprechenden Inhibitoren gleichermaßen eine Hypermethylierung und eine zusätzliche Deacetylierung des Ephrin-B2 Promotors (siehe Abbildung 5.6). Der Verlust der Ephrin-B2-Funktion scheint somit insgesamt vorteilhaft für eine Gliomprogression zu sein. Aufgrund der hier generierten Daten wäre es interessant zu untersuchen, ob die Methylierung von Ephrin-B2 möglicherweise als prognostischer Marker dienen könnte.

Eine ähnliche Regulation von Rezeptor und Ligand wurde auch von Li *et al.* 2010 in aggressiven, malignen Gliomen beschrieben, wo die Hochregulation von EphA2 und

die gleichzeitige Herunterregulation von EphrinA1 mit einer schlechten Prognose für die Patienten korrelierte (304). Eine Hypermethylierung von EphB3 und EphA1 wurde im Kolonkarzinom beschrieben (305, 306). Die Herunterregulation von Ephrin-B2 konnte in Brustkrebszellen und im Kolonkarzinom nachgewiesen werden (307, 308). Wesentlich mehr Befunde gibt es allerdings zur EphB4-Expression in verschiedenen Karzinomen, wie Brust-, Eierstock-, Magen- und Darmkrebs. In diesen Karzinomen wurden mehrfach hohe EphB4-Expressionslevel beschrieben, die teilweise auch mit der Tumorprogression korrelierten, während der Hauptligand Ephrin-B2 nur auf sehr niedrigem Level exprimiert wurde (240, 256, 309). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Tumorzellen sich verschiedene Mechanismen zu Nutze machen, um die Ephrin-B2-Expression zu senken und so dem tumorsuppressiven Effekt zu entgehen.

Es gibt jedoch zu EphB4 auch gegenteilige Daten, aus denen eine Herunterregulation und mögliche Tumorsuppressorfunktion von EphB4 im Zusammenhang mit der Tumorprogression hervorgeht. So zeigten Battle *et al.* 2005 zwar eine Hochregulation für die Eph-Rezeptoren EphB2, EphB3 und EphB4 im frühen Stadium der Kolonkarzinomprogression, jedoch kam es bei der Weiterentwicklung des Tumors zu einem Verlust der EphB-Expression bei der Adenom-Karzinom-Transition. Dieser Verlust von EphB korrelierte mit dem Grad der Malignität und zeigte eine tumorsuppressive Rolle für EphB4, indem die repulsiven Signale die EphB4 im gesunden intestinalen Gewebe vermittelte, im Laufe der Karzinomprogression aufgehoben wurden (243). Ebenso postulierten Herath *et al.* 2009, dass in den frühen Stadien der malignen Transformation des Kolonkarzinoms die Expression der Eph-Rezeptoren erhöht und im Weiteren bei der Progression des Tumors zu maligneren Stadien durch Promotormethylierung oder Genmutationen wieder reprimiert wird. Dieser Funktionsverlust förderte zudem auch die Tumordinvasion. In den dabei untersuchten Kolonkarzinomen konnte der Verlust der EphA1-Expression durch die Hypermethylierung der EphA1-CpG-Inseln erklärt werden. Die dadurch hervorgerufene verringerte EphA1-Expression korrelierte mit einer schlechten Überlebensrate der Patienten (310). Auch Berclaz *et al.* konnten 2001 einen EphB4-Funktionsverlust in Brustkrebszellen nachweisen (311). Die verringerte EphB4-Expression wurde ebenso von Davalos *et al.* 2006 im fortgeschrittenen kolorektalen Tumorstadium beschrieben, bei dem EphB4 zu Beginn der Tumorbildung hochreguliert wurde, jedoch während der Tumorprogression eine epigenetischen Abschaltung durch eine Promotor-Hypermethylierung folgte. Anhand von PCRs konnte dabei eine reduzierte EphB4-Expression festgestellt werden, die mit einer schlechten Prognose für die Patienten einherging (252). Die Gruppe wies in einer weiteren Studie 2009 die

Tumorsuppressoraktivität von EphB4 im Kolonkarzinom in einem genetischen Tiermodell nach, bei dem die Inaktivierung eines Allels von EphB4 (EphB4+/-) mit einer hohen Proliferationsrate und einer Induktion der Invasion einherging. Darüber hinaus resultierten die EphB4-Mutationen in umfassenden transkriptionellen Reprogrammierungen, die auch die Zellproliferation und die Umgestaltung der EZM umfassten (257).

Im Einklang mit Befunden aus Untersuchungen anderen Tumorspezies, deutet der Ephrin-B2-Verlust in unseren Glioblastomzellen und -biopsien auf eine Tumorsuppressorfunktion in der Glioblastomentwicklung hin, wohingegen die Amplifikation von EphB4 möglicherweise für eine onkogene Rolle von EphB4 spricht.

### **6.1.1 Der Verlust von Ephrin-B2 erhöht das Tumorwachstum und die Tumordinvasion**

Im Anschluss an die genetischen und molekularen Untersuchungen wurden *in vitro* und *in vivo* funktionelle Analysen durchgeführt, die die Rolle von Ephrin-B2 und EphB4 in Bezug auf die Tumordinvasion im Glioblastom weiter aufklären sollten. Die Tumorsuppressorfunktion von Ephrin-B2 beruhte auf der Hypothese, dass Ephrin-B2-medierte, repulsive Signale die Invasion von Tumorzellen in das umliegende Gewebe verhindern. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnten diese Tumorsuppressorfunktion bestätigen, da der Verlust von Ephrin-B2 *in vivo* zu einem erhöhten Tumorwachstum und einer verstärkten Tumordinvasion führte, die auch *in vitro* bestätigt werden konnte. Für EphB4 hingegen ergaben die funktionellen Untersuchungen gegensätzliche Ergebnisse. So war die Invasion nach der Aktivierung der EphB4-Signaltransduktion vergleichbar mit der Aktivierung der Ephrin-B2-reversen Signaltransduktion *in vitro* verringert, obwohl die genetischen Untersuchungen eine onkogene Rolle von EphB4 implizierten. Daher wird im Folgenden diskutiert ob die beobachtete verringerte Invasionskapazität der Glioblastomzellen auf dem Verlust der Ephrin-B2-reversen Signaltransduktion beruht, wodurch auch die EphB4-Signaltransduktion inhibiert wird, oder ob eine Ephrin-B2-unabhängige Aktivierung der EphB4-Signaltransduktion eine mögliche Erklärung wäre.

Um den Ephrin-B2-Verlust in Bezug auf die Tumordinvasion weiter aufzuklären, wurde das Invasionsverhalten der Glioblastomzellen *in vitro* in einem Transwell-Migrationsassay untersucht, indem die Ephrin-B2- und EphB4-Signalwege durch rekombinantes EphB4-Fc beziehungsweise Ephrin-B2-Fc, die im Matrigel eingebettet waren, stimuliert wurden. Die Glioblastomzellen LN-229, G55 und SNB-19 zeigten

sowohl bei einer Aktivierung des reversen Ephrin-B2-Signalweges durch die Verwendung von löslichem EphB4-Fc als auch bei der Aktivierung des EphB4-Signalweges durch Ephrin-B2-Fc eine verminderte Invasion (siehe Abbildung 5.7). In Anbetracht der Tatsache, dass EphB4-Rezeptoren bevorzugt Ephrin-B2-Liganden aktivieren (212), konnten eine Aktivierung der Ephrin-B1- und Ephrin-B3-reversen Signaltransduktion und in diesem Zusammenhang mögliche Effekte auf die Ephrin-B2-Signaltransduktion in den Zellen vernachlässigt werden. Jedoch bleibt zu bedenken, dass *in vivo* die Ephrin-B2-Signaltransduktion auch durch weitere EphB-Rezeptoren die im gesunden Gehirngewebe exprimiert werden, aktiviert werden kann (312).

Die Gruppe von Nakada *et al.* veröffentlichte bereits Studien über die Glioblastominvasion im Zusammenhang mit der Ephrin-B2-Signaltransduktion. 2006 beobachteten Nakada *et al.* in invadierenden Glioblastomzellen eine geringere Ephrin-B2 Expression als in den Kontrollzellen. Dabei förderte Ephrin-B3, nicht jedoch Ephrin-B2, die Glioblastominvasion (313). Erstaunlicherweise veröffentlichte Nakada *et al.* 2010 gegensätzliche Ergebnisse (259). Darin zeigen Microarraydaten von Glioblastombiopsien hohe Ephrin-B2-Expressionslevel. Hierbei wird jedoch nicht zwischen sekundärem oder primärem Glioblastom unterschieden. In unseren Daten war die Ephrin-B2-Expression hauptsächlich im sekundären Glioblastom verringert (Daten nicht gezeigt). Auch unterscheidet diese Art von Studien nicht zwischen einer Expression von Ephrin-B2 in Tumor- oder Stromazellen. Insbesondere angiogene Endothelzellen erhöhen die Expression von Ephrin-B2, sodass ein Ephrin-B2-Verlust auf Tumorseite möglicherweise nicht erkannt werden würde. Die Migrations- und Invasionsversuche wiesen *in vitro* als auch *ex vivo* eine erhöhte Invasion von Glioblastomzellen nach der Aktivierung und Phosphorylierung von Ephrin-B2 auf. Hier muss jedoch beachtet werden, dass in dem Transwell-Assay die Zellen mit Medium behandelt wurden, das lösliches EphB2-Fc beinhaltete, um so Ephrin-B2 in den Tumorzellen zu aktivieren. Wenn man nun davon ausgeht, dass es sich bei Ephrin-B2 im Glioblastom um repulsive Signale handelt, ist die verstärkte Invasion der Zellen durch die repulsiven Signale des EphB2-Fc im Medium zu erklären, da die Zellen so durch die poröse Membran in die Richtung des EphB2-Fc-freien Mediums migrierten. Dies resultierte entsprechend in der gemessenen erhöhten Invasion. In der Versuchsanordnung der vorliegenden Arbeit hingegen war das EphB4-Fc beziehungsweise Ephrin-B2-Fc zur Aktivierung der jeweiligen Ephrin-B2- und EphB4-Signalwege im Matrigel eingebettet, das die Zellen durchdringen mussten. Dabei verhinderten die repulsiven Signale die Invasion durch das Matrigel und die Membran, was zu der verringerten Invasion führte. Die kontroversen Ergebnisse in den beiden Veröffentlichungen 2006 und 2010 von Nakada *et al.* können zudem auch durch

unterschiedliche Mengen von verwendetem Ephrin-Fc erklärt werden, die je nach Konzentration unterschiedliche Signale hervorrufen können (314).

Zur weiteren Analyse der Ephrin-B2-Signaltransduktion im Zusammenhang mit der Tumorprogression und Invasion, wurde ein Ephrin-B2-*knock-out* (KO)-Mausgliommodell entwickelt (siehe Abbildung 5.8). Die erfolgreiche Herstellung hochgradiger Gliomazellen durch die Immortalisierung von Astrozyten aus konditionellen Ephrin-B2<sup>loxP/loxP</sup>-*knock-in*-Mäusen (R. Adams, MPI für molekulare Biomedizin, Münster) mit Hilfe des large-T-Antigens und dem H-Ras-V12-Retrovirus, wurde bereits mehrfach nachgewiesen. So konnten Blouw *et al.*, 2003 HIF-1 $\alpha$ - und VEGF-defiziente, transformierte Astrozyten herstellen und untersuchten die Zellen intrakraniell in einem orthotopen Xenograft-Modell. Während die VEGF-KO-Tumoren verglichen mit den Kontrollen kleiner waren, rief die Inaktivierung von HIF-1 $\alpha$  ein vergrößertes Tumorwachstum wie auch eine erhöhte Invasion hervor (86). Bei der Herstellung der Zellen resultierte die Bindung von large-T in einer Inhibierung der p53- und RB-Funktion, was wiederum den auftretenden genetischen Mutationen in der humanen Gliomaprogression gleicht (siehe Abbildung 3.1). Das H-Ras-Onkogen aktivierte den p21-Ras-Signalweg. Neben dem Verlust der p53- und RB-Funktion, zeigten die generierten Gliomazellen weitere ähnliche genetische Aberrationen wie für das humane Glioblastom beschrieben, so zum Beispiel eine verringerte Expression von p16, p19 und PTEN, sowie eine Überexpression von EGFR, MDM2 und CDK4 (315, 316). Dadurch, dass Ephrin-B2 erst nach der Immortalisierung und Transformation in den Zellen durch die Verwendung der Cre-Rekombinase ausgeschaltet wurde, konnte der gleiche genetische Hintergrund sowohl in den Wildtypzellen als auch in den Ephrin-KO-Zellen sichergestellt werden. Die Zellen bieten ein optimales murines Gliommodell, um das Glioblastomverhalten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen.

Mit Hilfe der Ephrin-B2-KO-Gliomazellen, die eine erhöhte Invasivität in einem 3D-Kollagenmatrix-Invasionsassay zeigten, konnte die tumorsuppressive Aktivität von Ephrin-B2 bestätigt werden (siehe Abbildung 5.9). Im orthotopen Xenograft-Mausmodell zeigten diese Ephrin-B2-KO-Gliomazellen entsprechend der *in vitro* Daten auch *in vivo* intrakraniell eine erhöhte Invasivität (siehe Abbildung 5.10). Darüber hinaus waren die Tumoren der Ephrin-B2-KO-Gliomazellen verglichen mit den Wildtyp-Zellen durchschnittlich um das zweifache größer (siehe Abbildung 5.10). Um den zu Grunde liegenden Mechanismus des gesteigerten Tumorwachstums der Ephrin-B2-KO-Gliomazellen zu klären, wurde die Zellproliferation überprüft, die keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltumoren ergab (siehe Abbildung 5.11). Ähnlich der hier gezeigten Daten, konnten in weiteren Xenograft-Mausmodellen zur Untersuchung von

Gliomen und Kolonkarzinomen die erhöhten Tumolvolumina nicht immer durch eine vermehrte Proliferation der Zellen begründet werden (251, 259). Die Ermittlung der Blutgefäßdichte zeigte außerdem, dass die Blutgefäßflächen in den Tumoren nicht signifikant variierten (siehe Abbildung 5.11). Der Wachstumsvorteil der Ephrin-B2-defizienten Tumoren konnte hier nicht durch eine verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung aufgrund der angiogen-induzierten, verbesserten vaskulären Infrastruktur oder durch eine verstärkte Proliferation erklärt werden. Allerdings könnten zusätzliche funktionelle Untersuchungen der Tumorgefäße zur Aufklärung des vergrößerten Tumolvolumens beitragen. Vor allem bezüglich der Rolle von Ephrin-B2 in der Tumorangiogenese, wären weitere Analysen der Blutgefäße notwendig (198, 317). So wird Ephrin-B2 neben Endothelzellen auch in Perizyten exprimiert. 2004 zeigten Noren *et al.*, dass Ephrin-B2 auch in Tumorzellen die vaskuläre Umgestaltung vermittelt, indem die EphB4-exprimierenden Brustkrebszellen die Ephrin-B2-exprimierenden Endothelzellen während der Angiogenese leiten und Ephrin-B2 die neu geformten Blutgefäße zusätzlich stabilisiert (318). Dieser positive Effekt von EphB4 auf die Tumorangiogenese könnte eine Erklärung für die Überexpression in unseren untersuchten Glioblastombiopsien sein, da dies einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen darstellen würde.

Eph-Rezeptoren und ihre Ephrin-Liganden sind dafür bekannt, die repulsiven Effekte bei der Axonlenkung und der Vaskulogenese zu vermitteln (319-321). In Tumoren können diese repulsiven Signale tumorsuppressiv wirken, indem die Tumorzellen vom umgebenden Gewebe eingeschlossen (kompartimentalisiert) werden. Cortina *et al.* zeigten in einer Studie von 2007, dass die EphB-exprimierenden Kolonkarzinomzellen durch die repulsiven Signale nicht in die Ephrin-B-exprimierenden Bereiche vordringen. So konnten die EphB-Ephrin-B-Interaktionen die Kolonkarzinomzellen daran hindern in gesundes Gewebe zu invadieren. Dabei waren die Tumorzellen durch die EphB-vermittelte, E-Cadherin-abhängige Adhäsion sowie das Parenchym in unterschiedliche Kompartimente aufgeteilt. Die EphB-Signaltransduktion veränderte nach einer Ephrin-B1-Stimulation die cytoplasmatische Menge an E-Cadherin in den Tumorzellen, indem E-Cadherin zur Zellmembran transloziert wurde und die Tumorzellen dadurch mit Adhäsionsverbindungen fest aneinander hafteten (251). Auch Clevers *et al.* schlugen 2006 vor, dass die Interaktionen zwischen Eph-Rezeptor-positiven Tumorzellen und den umgebenden Ephrin-positiven, gesunden, epithelialen Zellen die Gewebe im Kolonkarzinom kompartimentalisierten (308). Zusätzlich zu Untersuchungen im Kolonkarzinom, konnte eine Tumorsuppression und Inhibition der Tumordinvasion durch eine Kompartimentalisierung von EphB-positiven Tumorzellen auch

---

bei Brustkrebs gezeigt werden (243, 322). Tumorsuppressive Eigenschaften konnten für Ephrin-B2 auch im Kolonkarzinom in einem Xenograft-Modell nachgewiesen werden (323).

Abgesehen von den repulsiven Effekten der Ephrin-B2-reversen Signaltransduktion, die von Eph-Rezeptoren aus dem Hirnparenchym in den Tumorzellen aktiviert werden, kann Ephrin-B2 auch von Eph-Rezeptoren aktiviert werden, die die Tumorzellen selber exprimieren. So war die Invasion der Ephrin-B2-KO-Gliomazellen in unserem 3D-Kollagenmatrix-Invasionsassay erhöht, obwohl kein umliegendes Gewebe die Ephrin-B2-KO-Gliomasphäroide umgab (siehe Abbildung 5.9). Die dreidimensionale Struktur der Tumorsphäroide in dem Versuch stellte jedoch sicher, dass die Gliomazellen von allen Seiten Zell-Zell-Kontakt hatten. Dadurch konnten die Eph- und Ephrin-Signalwege zwischen den Tumorzellen aktiviert werden. Dieser Mechanismus konnte auch von Noren *et al.* 2006 in Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Interessanterweise war hier in den Tumorzellen trotz der erhöhten Expression, EphB4 durch eine verminderte Tyrosinphosphorylierung weniger aktiv als in den Kontrollzellen, sodass EphB4 tumorsuppressive Eigenschaften zeigte. Ephrin-B2 war hingegen nur sehr gering exprimiert (256).

Diese Vorgänge könnten auch eine Erklärung für unsere Befunde sein. Demnach könnten repulsive Effekte zwischen den im Tumor exprimierenden Ephrin-B2-Liganden und den im Parenchym exprimierenden Eph-Rezeptoren induziert werden, wodurch die Tumorzellen von dem umgebenden Gewebe eingeschlossen bleiben würden und sich nicht ausbreiten könnten. Wir gehen davon aus, dass unsere Zellen diese repulsiven Signale überwinden müssen, um in das Parenchym invadieren zu können. Dies unterstreicht die Relevanz, die die repulsive Ephrin-B2-Signalgebung auf die Tumordinvasion und den Tumorstadium hat.

Generell werden die repulsiven Effekte der EphB-Ephrin-B-Signaltransduktion hinsichtlich der Migration und Invasion von Zellen meist durch die Umgestaltung des Zytoskeletts vermittelt, wie Studien über die Regulation der Ras- und Rho-Familie der kleinen GTPasen durch Eph und Ephrine gezeigt haben (218). In Bezug auf die reverse Signaltransduktion konnte der repulsive Effekt bei Riedl *et al.* 2005 durch die Kontraktion des Zytoskeletts nach einer Ephrin-B1-Aktivierung erklärt werden. In den untersuchten Kolonkarzinomzellen aktivierte Ephrin-B1 die kleinen GTPasen Rho und Ras und inaktivierte gleichzeitig Rap1, was zu einem Integrinverlust in den Zellen und somit zur Zellretraktion führte (324). In Prostatakarzinomzellen konnte Ephrin-B2 darüber hinaus die Migration der Tumorzellen über aktiviertes EphB3/ EphB4 und der nachgeschalteten Rho-GTPase Cdc42 fördern (258). Im Zusammenhang der Invasion von Gliomzellen

konnte auch die Aktivierung der GTPase Rac1 durch EphB2-Ephrin-B1 nachgewiesen werden. Dabei konnten die Tyrosin-phosphorylierten Motive der Ephrin-B1-Liganden zusammen mit dem SH2/ SH3 Adapterprotein Grb4 an Rac1 assoziieren und so die Reorganisation des Aktinzytoskeletts steuern (313). Abgesehen von der Umgestaltung des Aktinzytoskeletts, gibt es auch Hinweise darauf, dass die Ephrin-B-reverse Signaltransduktion die migratorischen und invasiven Effekte in Krebszellen inhibiert, die durch den Chemokin-Rezeptor CXCR4 induziert werden (210, 228), indem die Interaktion von CXCR4 mit dem Chemokin-Liganden SDF-1 verhindert wird. Dies konnte durch eine Ephrin-B-abhängige Reduktion der SDF-1-Aktivität nachgewiesen werden, wobei das GTPase-aktivierende Protein PDZ-RGS3 durch die Bindung an Ephrin-B als negativer Regulator der G-Protein-Signalkaskade agiert und die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-CXCR4-Attraktion an das Chemokin SDF-1 und deren Interaktion neutralisiert (233). Interessant ist dies vor allem, da erhöhte CXCR4-Level mit der erhöhten HIF-1 $\alpha$ -Expression im Glioblastom korrelieren (325).

Hinsichtlich der vorwärtsgerichteten Signaltransduktion wiesen Marston *et al.* 2003 in Fibroblasten und Endothelzellen repulsive Signale nach der Aktivierung von EphB4 durch eine Rac-abhängige Trans-Endocytose nach, was zunächst in der Phagozytose der Zellplasmamembran und schließlich in der Zellrepulsion resultierte (326). In einer Studie von Noren *et al.* aktivierte EphB4, stimuliert durch Ephrin-B2-Fc, in einem Maus-Xenograft-Modell den anti-onkogenen Signalweg der Abl-Arg-Tyrosinkinase, was zur Phosphorylierung des Adapterproteins Crk führte. Dies resultierte in einer verminderten Tumorzellproliferation und einem verminderten Tumorwachstum, sowie auch einer verminderten Invasion. Jedoch konnten hier, ebenso wie bei unseren Ergebnissen, keine Unterschiede der Gefäßdichte gemessen werden. Zusätzlich verminderte die Aktivierung von EphB4 durch Ephrin-B2 auch die Expression der pro-invasiven Matrix-Metalloprotease MMP-2 (256). Die Abl-Familie der nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen und die Crk-Familie der SH2/ SH3-Adapterproteine sind für die Regulation des Aktinzytoskeletts und der fokalen Adhäsion im Zusammenhang mit zellulärer Migration bekannt. So führt die Phosphorylierung des Crk-Adapterproteins zu einer intramolekularen Bindung mit der eigenen SH2-Domäne, die die Funktion des Crk-Adapterproteins inaktiviert (327). Die Funktion von Crk besteht zum einen in der Förderung der Migration durch die Bindung des Gerüstproteins Cas an Integrine (328), zum anderen kann CrkI auch die Zellmobilität durch die Aktivierung von PI3K und Rac über seine SH2-Domäne fördern. In Glioblastomen wird CrkI stark exprimiert (294). In unserem Mausgliommodell würde dies bedeuten, dass EphB4 durch die fehlenden Ephrin-B2-Liganden nicht aktiviert sein könnte und dadurch Crk nicht phosphoryliert und

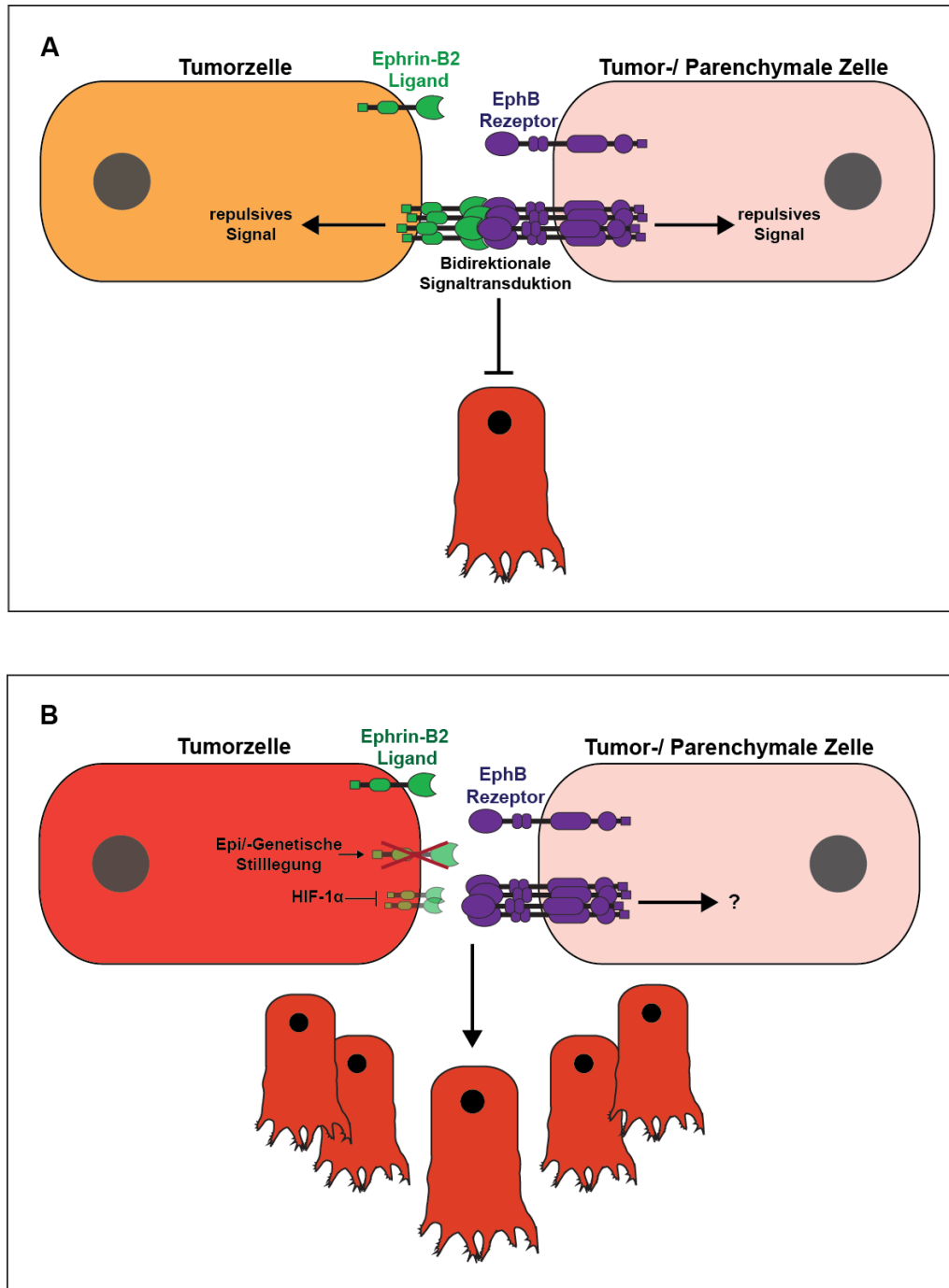


nicht inaktiviert werden würde. Dies würde zu einer erhöhten Motilität der Zellen führen. Somit förderte der Ephrin-B2-Verlust durch die fehlende EphB4-Aktivierung die Tumorprogression und Invasion. Zusätzlich könnte durch die fehlende EphB4-Ephrin-B2-Aktivierung die vorhandene Aktivität von MMP-2 zur EZM-Degradation beitragen und so die Invasion der Tumorzellen weiter fördern.

Zusätzlich zu den tumorsuppressiven Effekten der EphB4-Signaltransduktion, gibt es auch kontroverse Veröffentlichungen, die über tumorfördernde Eigenschaften berichten. Demnach war EphB4 in den Studien von Kumar *et al.* 2007 im Ovarialkarzinom überexprimiert, was auch mit einer erhöhten Malignität korrelierte. Die Inaktivierung von EphB4 mit Hilfe von siRNAs führte entsprechend zu einer erhöhten Apoptose und verminderten Migration sowie Invasion in den Ovarialkarzinomzellen. Interessant dabei ist allerdings, dass Ephrin-B2 in den untersuchten Zellen nicht exprimiert war, was einen Liganden-unabhängigen Mechanismus der EphB4-Signaltransduktion vermuten lässt (249). In einer weiteren Studie beschrieben Kumar *et al.* 2009 eine erhöhte Expression von EphB4 gegenüber EphB2 im Kolonkarzinom. Dies konnte mit dem Wechsel des  $\beta$ -Catenin Co-Aktivators p300, der EphB2 induziert, zu dem CREB Bindeprotein (CBP), welches EphB4 induziert, erklärt werden. Die Karzinomzellen hatten dadurch einen Überlebensvorteil, der jedoch auch Ephrin-B2-unabhängig war (329). Die onkogene Funktion von EphB4 konnte zudem in weiteren Tumorarten wie Blasen- und Kopf-Hals-Karzinomen nachgewiesen werden (330, 331). Neben der onkogenen Funktion von EphB4 in Prostatakrebs zeigten Xia *et al.* 2005 außerdem, dass die erhöhte EphB4-Expression die Tumorangiogenese fördert (332). In den genannten Studien wurde die EphB4-Signaltransduktion jedoch nie durch Ephrin-B2 aktiviert. Die Ephrin-unabhängige Signalgebung von EphB4 wurde auch von Noren *et al.* 2009 in Brustkrebszellen nachgewiesen, in denen EphB4-unabhängig von Ephrin-B2 die Integrin-vermittelte Adhäsion der Tumorzellen inhibierte (255). Ebenfalls in Brustkrebszellen konnten Kumar *et al.* 2006 eine onkogene Wirkung von EphB4 nachweisen. In den untersuchten Zellen resultierte der *knock-down* von EphB4 in einer verminderten Funktion von MMP-2 und MMP-9, sodass geschlossen werden konnte, dass EphB4 einen positiven Effekt auf die Tumordinvasion haben müsste (331). Im Gegensatz dazu zeigten Noren *et al.* 2006, dass in Brustkrebszellen die Aktivierung von EphB4 durch Ephrin-B2 einen tumorsuppressiven Effekt hat und dabei die MMP-2 Level reduziert werden (256). Dies könnte darauf hinweisen, dass die EphB4-Signaltransduktion, solange sie von Ephrin-B2 aktiviert wird, die Tumorprogression und Invasion inhibiert, es jedoch während der Tumorprogression zum Verlust von Ephrin-B2 kommt und EphB4 dadurch alternative Signalwege aktiviert, die die Tumorprogression

und Invasion unabhängig von Ephrin-B2 fördern. Zur Erklärung der verminderten Invasion kann schließlich auch eine tumorsuppressive Funktion von EphB4 in Betracht gezogen werden, die durch die fehlende Aktivierung von Ephrin-B2 in den Ephrin-B2-Ko-Zellen ausgeschaltet wurde.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse auf eine Tumorsuppressorfunktion der Ephrin-B2-abhängigen Signalwege hin (Abbildung 6.1). Wir gehen davon aus, dass die beobachtete funktionelle Herunterregulation der Ephrin-B2-Expression durch die HIF-1 $\alpha$ -vermittelte hypoxische Mikroumgebung, sowie der genetische und epigenetische Verlust von Ephrin-B2 einen synergistischen Prozess in der Tumorprogression darstellen. Die erhöhte Tumorfläche sowie –invasion der Ephrin-B2-KO-Glioblastomzellen deuten darauf hin, dass die aktive Ephrin-B2-Signaltransduktion repulsive Signale gegenüber dem Parenchym vermittelt und dadurch die Tumorzellen vom umgebenden Parenchym eingeschlossen und kompartmentalisiert werden. Die fehlenden Ephrin-B2-Signale im hochgradigen Gliom und in unseren Ephrin-B2-KO-Zellen heben diese repulsiven Signale auf, was zu der Überwindung der begrenzenden Migrationssignale führt und in einem erhöhten Tumorwachstum sowie einer erhöhten Invasion resultiert. Demnach ist eine Tumorprogression und Invasion erst möglich, nachdem die Expression von Ephrin-B2 vermindert wurde. Die HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Repression von Ephrin-B2 repräsentiert somit einen neuen molekularen Link in der Invasion und Progression von Glioblastomen. Dabei ist noch unklar, ob die beobachtete tumorsuppressive Funktion von Ephrin-B2 durch den invasionsblockierenden Mechanismus der Ephrin-B2/EphB4-Interaktion, EphB4-abhängig (*forward signaling*), zwischen benachbarten Tumorzellen oder dem umgebenden Parenchym hervorgerufen wird, oder allein über die intrazelluläre Domäne von Ephrin-B2 durch die reverse Signaltransduktion (*reverse signaling*) mediiert wird. Die Rolle von EphB4 konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, da EphB4 genetisch amplifiziert vorliegt, funktionell jedoch HIF-1 $\alpha$ -abhängig in hypoxischen Bereichen reprimiert wird. Demnach könnte EphB4 sowohl eine onkogene Funktion im Glioblastom einnehmen, die Ephrin-B2-unabhängig aktiviert werden könnte, oder aber eine tumorsuppressive Funktion, die trotz Amplifikation durch beispielsweise Phagozytose oder fehlender Tyrosinaktivierung durch den Ephrin-B2-Verlust hinfällig wäre.



**Abbildung 6.1: Modell der Ephrin-B2-abhängigen Invasion in Glioblastomen.** (A) Zu Beginn der Tumorentwicklung hemmen die repulsiven Signale von Ephrin-B2 und EphB4 die Invasion der Tumorzellen in das Parenchym. (B) Im hochgradigen Glioblastom ist die Invasion durch den Verlust der repulsiven Signale aufgrund der genetischen, epigenetischen oder der Mikroumgebung-abhängigen Inaktivierung von Ephrin-B2 stark erhöht.

## 6.2 Ephrin-B2 wird HIF-1 $\alpha$ -abhängig durch ZEB2 reprimiert

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Fokus zunächst auf die Entschlüsselung der Ephrin-B2-Regulation durch HIF-1 $\alpha$  in den untersuchten Glioblastomzellen gelegt. Zwar gibt es Studien zur HIF-1 $\alpha$ -vermittelten Herunterregulation durch die direkte Bindung an die HRE des Zielgens (333) oder durch die kompetitive Hemmung anderer Transkriptionsfaktoren wie Myc (138), dennoch fungiert HIF-1 $\alpha$  hauptsächlich als aktivierender Transkriptionsfaktor. Daher gingen wir bei der beobachteten HIF-1 $\alpha$ -induzierten Repression von Ephrin-B2 von einem indirekten Mechanismus aus. Wie bereits beschrieben reguliert HIF-1 $\alpha$  in der hypoxischen Mikroumgebung adaptive Prozesse wie die Angiogenese, den Zellmetabolismus und die Invasion. HIF-1 $\alpha$  ist in Tumoren für gewöhnlich hochreguliert und gilt als Indikator für verstärkte Invasion und Metastasierung sowie Rezidivbildung und wird begleitet von erhöhter Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie (182). Die Hypoxie-induzierte Invasion konnte in dieser Arbeit in den SNB19-Glioblastomzellen anhand eines 3D-Kollagenmatrix-Invasionsassays bestätigt werden (siehe Abbildung 5.1). Die Tumorprogression und Invasion ist generell mit einer erhöhten Kapazität der Zellen assoziiert, die EZM zu beeinflussen. In epithelialen Zellen ist die Aktivierung der Epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) ausschlaggebend für eine erhöhte Invasion und Metastasierung von Tumoren. Dabei fördern EMT-Repressoren die Veränderung epithelialer Tumorzellen zu einem migratorischen, invasiven mesenchymalen Phänotypen, indem Adhäsionsproteine wie E-Cadherin transkriptionell reprimiert und stattdessen mesenchymale Moleküle wie Vimentin und N-Cadherin exprimiert werden. Dies resultiert in einer Auflösung der Zell-Zell-Verbindungen und folglich in einer erhöhten Motilität der Zellen (161, 164, 165). Im Glioblastom wird E-Cadherin kaum exprimiert (294). Der funktionelle Verlust von E-Cadherin korreliert in epithelialen Tumoren mit einer erhöhten Tumorprogression und Metastasierung (166, 167). Die Expression der EMT-Faktoren ist auch mit der Invasivität und Metastasierung sowie schlechter Prognosen einiger Karzinome assoziiert (164). Die EMT-Repressoren können neben TGF- $\beta$  auch durch HIF-1 $\alpha$  induziert werden. Mit der EMT reguliert HIF-1  $\alpha$  einen zusätzlichen Mechanismus, der für das Wachstum und das Überleben von Tumoren von Vorteil ist. (334, 335). Folglich wurden in der vorliegenden Arbeit potentielle HIF-1 $\alpha$ -regulierte Repressoren untersucht, die für die Ephrin-B2-Herunterregulation verantwortlich sein könnten. In den Untersuchungen konnte ZEB2 (*zinc finger E-box binding homeobox 2*) als HIF-1 $\alpha$ -induzierbarer Repressor von Ephrin-B2 identifiziert werden. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die bekannten mesenchymalen Marker Vimentin und N-Cadherin in unseren Glioblastomzellen, wie in

der Literatur beschrieben, hochreguliert und zudem durch die untersuchten EMT-Repressoren Hypoxie-abhängig reguliert werden (102, 335, 336).

Zunächst wurde die Hypoxie-abhängige Regulation der EMT-Repressoren in humanen LN-229 Glioblastomzellen überprüft. Dabei war nur für ZEB2 und SNAI2 sowohl auf der mRNA- als auch auf Proteinebene eine Hochregulation unter Hypoxie erkennbar (siehe Abbildung 5.12). Die erhöhte Proteinmenge von SNAI1, die im *Western-Blot* detektiert wurde, konnte nicht auf mRNA-Ebene bestätigt werden, was auf eine posttranskriptionelle Regulation schließen lässt. Eine posttranskriptionelle Regulation von SNAI1 wurde auch von Yang *et al.* in Brust-, Lungen-, und Zungenkrebs beschrieben. In dieser Studie wurde HIF-1 $\alpha$  auch als Transkriptionsfaktor von TWIST beschrieben. Diese Regulation war in unseren Glioblastomzellen nicht erkennbar, was demnach für eine gewebespezifische Regulation spricht (192). Neben TWIST ist auch LOX als direktes HIF-Zielgen im Zusammenhang mit der Metastasierung identifiziert worden (189).

Für die Überprüfung der Regulation der mesenchymalen Marker und von Ephrin-B2 durch die EMT-Repressoren wurden eine Behandlung der Zellen mit siRNAs der EMT-Repressoren und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von SNAI1 die Hypoxie-abhängige Hochregulation von Vimentin und N-Cadherin wieder aufhob (siehe Abbildung 5.15). Im Einklang mit unseren Resultaten konnte eine aktuelle Studie von Han *et al.* (2011) ebenfalls eine SNAI-abhängige Regulierung von Vimentin in Glioblastomzellen zeigen (337). Da diese Faktoren bereits in Gliomen im Zusammenhang mit einer erhöhten Malignität und Invasion beschrieben wurden (338, 339) und die Regulation durch SNAI sowohl mit dem mesenchymalen Phänotyp als auch mit Stammzeleigenschaften assoziiert ist, könnte die Snail-Familie einen molekularen und funktionellen Link zwischen Hypoxie, EMT-Funktion und Tumorprogression sowie Invasion darstellen. Diese Untersuchungen gingen jedoch über die Interessen dieser Arbeit hinaus und werden in einem neuen Projekt bearbeitet.

Die Behandlung der Zellen mit EMT-spezifischen siRNAs zeigte in der qRT-PCR-Analyse zur Ephrin-B2-Expression, dass die Blockierung von TWIST1, TWIST2 und ZEB2 die Hypoxie-vermittelte Herunterregulation von Ephrin-B2 aufhob (siehe Abbildung 5.14). Da jedoch nur ZEB2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durch Hypoxie hochreguliert wurde, kam nur dieser Faktor als putativer transkriptioneller Repressor von Ephrin-B2 für weitere Untersuchungen in Frage.

ZEB2 kann durch TGF- $\beta$  induziert werden und wird während der Entwicklung im zentralen Nervensystem, im Herzen, in der Skelettmuskulatur und in hämatopoetischen

Zellen exprimiert. ZEB2 ist zudem für entwicklungsbiologische Prozesse wie der Bildung von Mesoderm und neuronalem Gewebe von Bedeutung. Obwohl die Inaktivierung von ZEB2 in manchen Geweben durch ZEB1 kompensiert werden kann, ist die Inaktivierung in Mausembryonen durch Defekte in der Neuralleiste letal. Interessanterweise kann ZEB2 die Invasion in verschiedenen Karzinomen auch durch die Regulation von MMP-2 induzieren (164, 340, 341). Eine erhöhte ZEB2-Expression konnte in mehreren Karzinomen wie Brust-, Leber-, Eierstock-, Pankreas-, Nieren- und Kolonkarzinom nachgewiesen werden (342, 343). In epithelialen Karzinomen induziert ZEB2 neben den weiteren EMT-Repressoren die Invasion über die Repression von E-Cadherin. Außerdem korreliert eine erhöhte ZEB2-Expression mit der zunehmenden Malignität verschiedener Karzinome (164, 171). Auch in Glioblastomzellen kann ZEB2 die Invasion und Migration fördern (344).

Als nächstes wurde die Regulation von ZEB2 durch HIF näher betrachtet. Da die ZEB2-Hochregulation in verschiedenen Glioblastomzellen unter Hypoxie mit der HIF-1 $\alpha$ -Regulation auf Proteinebene übereinstimmte (siehe Abbildung 5.16), lag die Vermutung nahe, dass ZEB2 direkt durch HIF-1 $\alpha$ -reguliert wird. Mithilfe von lentiviralen Konstrukten konnten erfolgreich stabil transfizierte HIF-1 $\alpha$ -Überexpression- und *knock-down*-Zellen der humanen Glioblastomzelllinien SNB19 und LN-229 hergestellt werden.

In den stabil transfizierten HIF-1 $\alpha$ -Überexpression-LN-229-Glioblastomzellen korrelierte die ZEB2-Expression positiv mit der Hochregulation von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie als auch in der HIF-1 $\alpha$ -Überexpression. Ebenso war die ZEB2-Expression in den hypoxischen HIF-1 $\alpha$ -*knock-down*-Zellen verringert (siehe Abbildung 5.20). Für die direkte Regulation durch HIF-1 $\alpha$  spricht auch die vorhandene konservierte HIF-1 $\alpha$ -Bindestelle (*hypoxia responsive element*) im humanen ZEB2-Promotor, die in der -876 Position der TSS gefunden wurde (342). Eine Regulation von ZEB2 durch HIF-1 $\alpha$  konnte auch in Nierenkarzinomzellen gezeigt werden (293, 334).

HIF-1 $\alpha$  reguliert neben ZEB2 noch eine Reihe weiterer Proteine die in der Migration und Invasion beteiligt sind. Darunter fallen Proteine, die bei der Gestaltung der extrazellulären Matrix (EZM) und der Basalmembran beteiligt sind wie MMP-1, -2, -7 und -9 und wichtige Moleküle wie den Urokinase Plasminogenaktivator Rezeptor (uPAR), Fibonektin 1, und TGF (*Transforming growth factor*)  $\alpha$  und  $\beta$  (102, 132, 133). In humanen Gliomazellen induziert die HIF-Aktivierung auch TGF- $\beta$ , welches wiederum MMPs hochreguliert und die MMP-Inhibitoren reprimiert und letztlich auch die EMT kontrolliert (345). Shyu *et al.* zeigten 2007 in Lungenkarzinomzellen die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Hochregulation von uPAR, MMP-1 und MMP-2 (346). Neben MMPs werden auch MT-MMPs (*Membrane-type 4 matrix metalloproteinase*) durch HIF reguliert. MT4-

MMP wurde in einer Studie von Huang *et al.*, ähnlich wie Ephrin-B2, HIF-1 $\alpha$ -abhängig durch SNAI2 reguliert und förderte die Metastasierung des untersuchten Plattenepithelkarzinoms (347). MT-MMPs wiederum aktivierten in invadierenden Glioblastomen MMP-2 und MMP-9 (294). Auch Brustkrebszellen zeigten eine erhöhte Invasivität unter hypoxischen Bedingungen, die mit erhöhten MMP-2 Leveln korrelierten (348). Dies weist auf die essentielle Rolle von HIF-1 $\alpha$  in der Tumorbilogie hin. Die Folgen eines Eingriffs in dieses komplexe HIF-Signalnetzwerk sind entsprechend unvorhersehbar, da dadurch eine Reihe unterschiedlicher Signalwege manipuliert werden können. Zudem zeigten bereits Blouw *et al.*, dass HIF-1 $\alpha$  differentielle Rollen in der Tumorprogression besitzt, die sehr von der Mikroumgebung des Tumors abhängen (86).

Um die direkte Bindung des repressiven Transkriptionsfaktors ZEB2 an Ephrin-B2 zu überprüfen, wurden als nächstes Promotoranalysen durchgeführt. ZEB2 Transkriptionsfaktoren sind durch zwei separate Cluster von Bindedomänen charakterisiert, vier N-terminale (drei CCHH und eine CCHC) und drei C-terminale (CCHH) Zinkfingerdomänen. Die Bindung der beiden Zinkfingerdomänen findet simultan mit einer hohen Affinität zur E-Box Konsensussequenz (CANNTG) statt. Außerdem besitzt ZEB2 auch eine p300-, eine SMAD- und eine CtBP-Bindedomäne. So kann ZEB2 neben der transkriptionellen Repression durch die Rekrutierung des CtBP-Co-Repressors, durch die Bindung des Co-Aktivatoren p300 und der Interaktion des SMAD Komplexes auch transkriptionsaktivierend wirken (349).

Eine Charakterisierung des Ephrin-B2-Promotors erfolgte 2009 durch die Gruppe von Sohl *et al.* (298). Dabei wurden neben einer Transkriptionsstartseite (TSS) auch fünf Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert, die unter anderem für die direkte Bindung der Myc-assoziierten Zinkfingertranskriptionsfaktoren (MAZ) vorhanden waren. MAZ und SP1 wiederum können in Endothelzellen Ephrin-B2 regulieren (350). Hinsichtlich der ZEB2-Bindestellen, konnten drei konservierte E-box Elemente im Ephrin-B2-Promotor identifiziert werden (siehe Abbildung 5.22). Eine davon befindet sich in der 5'UTR-Region und die anderen beiden 350 Bp aufwärts (*upstream*) der TSS. Diese beiden Bindestellen liegen in einer Anordnung vor, die für eine hochaffine Bindung von ZEB2 notwendig ist (342). Um die Hypoxie-abhängige Repression des Ephrin-B2-Promotors durch ZEB2 zu verifizieren, wurde die murine Ephrin-B2-Promotorregion in ein Luciferase-Reporter-Konstrukt kloniert und für den Luciferase-Assay die Zellen mit einem ZEB2-Vektor transient transfiziert. Die Ephrin-B2-Promotoraktivität war unter Hypoxie signifikant vermindert (Abbildung 5.23 [A]). Die Überexpression von ZEB2 minderte die Ephrin-B2-Aktivität noch weiter (Abbildung 5.23 [B]). Auch auf

transkriptioneller Ebene zeigte die Überexpression oder die Inaktivierung von ZEB2 eine Herunterregulation oder entsprechend eine Hochregulation von Ephrin-B2, was die biologische Relevanz des beobachteten Effekts bestätigte (siehe Abbildung 5.21). Um die funktionelle Regulierung von Ephrin-B2 durch ZEB2 zu untersuchen, wurden die ZEB2-Bindestellen im Ephrin-B2-Promotor-Luciferase-Konstrukt mutiert und erneut der zuvor erwähnte Luciferase-Assay durchgeführt. In den mutierten Konstrukten war keine Regulation durch Hypoxie oder ZEB2 mehr erkennbar (siehe Abbildung 5.24). Vielmehr war die Promotoraktivität in allen untersuchten Bedingungen im Vergleich zu der wildtypischen Kontrollsequenz erhöht. Dies zeigt nicht nur, dass ZEB2 wahrscheinlich direkt an Ephrin-B2 bindet, sondern auch, dass es vermutlich bereits unter normalen physiologischen Bedingungen zu einer latenten Repression durch ZEB2 kommt. Die direkte Bindung von ZEB2 an den endogenen Ephrin-B2-Promotor konnte dann schließlich anhand einer ChIP-Analyse in hypoxischen oder ZEB2-überexprimierenden Glioblastomzellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.25).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Herunterregulation von Ephrin-B2 durch die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Aktivierung des transkriptionellen EMT-Repressors ZEB2 hervorgerufen wird und so die Malignität und Invasivität von Glioblastomen fördert.

### **6.3 ZEB2 als Schlüsselfaktor der evasiven Resistenz nach anti-angiogener Behandlung**

Die Behandlung des Glioblastoms ist trotz fortlaufender neuer Erkenntnisse und Entwicklung neuer Medikamente komplex. Bisher erzielte auch die anti-angiogene Therapie nicht den erhofften Therapieerfolg. Die Angiogenese ist ein wichtiger Schritt in der Tumorprogression, da durch die neu geformten Blutgefäße die Versorgung des Tumors sichergestellt wird und diese Blutgefäße auch als Invasionsschienen von Glioblastomzellen genutzt werden können (*vessel co-option*). Ziel der anti-angiogenen Therapie ist es, mit Hilfe von Angiogenese-Inhibitoren die Gefäßneubildung lokal im Tumorgewebe zu verlangsamen oder sogar ganz zu verhindern. Zu Beginn der anti-angiogenen Therapie kann eine anti-tumorigene Wirkung mit einer Erhöhung der progressionsfreien Phase beobachtet werden, in der sich der Tumor verkleinert und auch die Tumorgefäße reduziert werden. Jedoch entwickeln sich nach der Fortsetzung der Therapie für einige Wochen adaptive und evasive Mechanismen, die zu einer anti-angiogenen Resistenz führen und so der Wirksamkeit der Behandlung entgegenstehen. Experimentell konnte gezeigt werden, dass diese Resistenzen entweder durch eine Revaskularisierung in Folge einer Induktion von alternativen pro-angiogenen



Signalwegen, einer Stabilisierung der Tumorgefäße durch eine erhöhte Perizyten-Bedeckung, oder durch die Induktion eines invasiven und Blutgefäß-assoziierten Phänotyps entstehen (62, 70, 351). Dies konnte in Mausmodellen gezeigt werden, wie zum Beispiel in dem Pankreaskarzinom (PNET) in RIP1-Tag2-Mäusen oder in Glioblastom-Xenograft-Mausmodellen (75, 83, 352). Darüber hinaus resultierte in klinische Studien die Behandlung von Glioblastompatienten mit Avastin zwar in einer verlängerten progressionsfreien Zeit, jedoch konnte die Gesamtüberlebenszeit wegen der pro-invasiven Fähigkeit der Tumorzellen und der daraus resultierenden Rezidive nicht erhöht werden (64, 353, 354). Auch in dem Ratten-Glioblastommodell von Rubenstein *et al.* (2000) war die Tumorgefäßdichte nach einer anti-VEGF-Therapie reduziert und die Apoptoserate erhöht. Es konnte jedoch auch eine erhöhte Invasion durch die Wanderung der Tumorzellen entlang der vorhandenen Blutgefäße festgestellt werden. Demnach konnte die notwendige Angiogenese durch die Migration der Zellen umgangen werden, was letztlich in der Bildung zahlreicher Tumorsatelliten resultierte (81). Vergleichbare Ergebnisse ergaben auch die Studien von Kunkel *et al.* (2001) in einem intrakraniellen Mausglioblastommodell (82). Zudem konnte im Zusammenhang mit der erhöhten Invasion nach anti-angiogener Therapie in mehreren Mausmodellen das HIF-System als entscheidender Faktor identifiziert werden (75, 78, 83, 90). Die hier generierten Daten identifizierten ZEB2 als Regulator der Glioblastominvasion sowie der evasiven Resistenz nach anti-angiogener Behandlung, was zur Optimierung der therapeutischen anti-angiogenen Behandlung im Glioblastom beitragen kann.

Da in der vorliegenden Arbeit der Verlust von Ephrin-B2 als wichtiger Schritt in der Kontrolle der Tumorprogression und Invasion identifiziert werden konnte und ZEB2 die Ephrin-B2-Expression unter Hypoxie regulierte, wurde als nächstes untersucht, ob die Inaktivierung von ZEB2 das Tumorwachstum und die Tumordinvasion verhindern würde. Nach der erfolgreichen Herstellung der stabilen ZEB2-*knock-down*-Zellen durch eine lentivirale Transduktion in G55TL und auch LN-229-Glioblastomzellen (siehe Abbildung 5.26), wurde zunächst die Ephrin-B2-Regulation *in vitro* untersucht. Die Kontrollzellen zeigten unter hypoxischen Bedingungen sowohl in den G55TL als auch in LN-229-Zellen eine verringerte Ephrin-B2-Expression, auf transkriptioneller und auch auf Proteinebene. Diese Repression der Ephrin-B2-Expression wurde in den ZEB2-*knock-down*-Zellen durch den ZEB2-Verlust aufgehoben und führte somit zu einem Anstieg der Ephrin-B2-Expression (siehe Abbildung 5.27).

In dem orthotopen Xenograft-Mausmodell zeigten beide Zelllinien in den ZEB2-*knock-downs* (shZEB2), die entsprechend erhöhte Ephrin-B2-Level besaßen, verglichen mit den Kontrollen eine verringerte Tumorgroße *in vivo* (Abbildung 5.29 und Abbildung

5.30). Die Phänotypen der G55TL- und LN-229-Tumoren unterschieden sich jedoch sehr stark. Die LN-229 Tumoren waren *per se* hoch invasiv und weit gestreut. Dies kann durch die fehlende VEGF-Expression der Zellen erklärt werden, die in einem VEGF-spezifischen ELISA ermittelt wurde (siehe Abbildung 5.28). Da die VEGF-Signaltransduktion wesentlich für eine tumorinduzierte Angiogenese ist, wandern Tumorzellen in denen kein VEGF vorhanden ist zu den vorhandenen Blutgefäßen und zeigen dadurch ein angiozentrisches Wachstum und eine erhöhte Invasion (87).

Da ZEB2 durch die Repression von Ephrin-B2 den invasiven Phänotyp förderte, sollte überprüft werden, ob ZEB2 auch eine Rolle bei der ausweichenden Resistenz nach anti-angiogener Therapie spielt. Die Ergebnisse die in den klinischen Studien beobachtet wurden, konnten in unseren Xenograft-Modellen bestätigt werden. Obwohl die G55TL-Kontrollzellen reduzierte Tumorumfänge nach der anti-angiogenen Therapie mit Avastin zeigten, war in den G55TL-Tumoren dennoch eine stark erhöhte Invasion vorhanden (Abbildung 5.29 und Abbildung 5.31 [A] und [B]). Die Proliferation der Avastin-behandelten Tumoren sowie der IgG-behandelten shZEB2-Tumore war tendenziell gegenüber den IgG-behandelten Kontrolltumoren geringer, allerdings konnte nur in den Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren eine signifikant verminderte Proliferation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.29 [C]). Dennoch war keine signifikante Reduktion des Tumorumfanges in den Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren gegenüber den Avastin-behandelten Kontrolltumoren erkennbar. Zudem konnte auch keine verminderte Invasion der shZEB2-Tumoren gegenüber den IgG-behandelten Kontrolltumoren nachgewiesen werden. Dies könnte an der sehr geringen Größe der G55TL-shZEB2-Tumoren gelegen haben. Dadurch, dass die IgG-behandelten Kontrolltumoren vergleichsweise schnell gewachsen sind und der Versuch für die vergleichende Auswertung mit allen Mäusen zum selben Zeitpunkt abgebrochen wurde, waren bis auf die IgG-behandelten Kontrolltumoren, die Tumore aller anderen Gruppen sehr klein. Es bleibt zu vermuten, dass etwaige Unterschiede in der Invasivität und auch im Tumorwachstum zu einem späteren Zeitpunkt deutlicher zum Ausdruck gekommen wären. Umso bemerkenswerter ist in diesem Zusammenhang, dass zu diesem frühen Zeitpunkt in den Avastin-behandelten G55TL-Kontrolltumoren die Invasion mit Tumorsatelliten bereits klar erkennbar war. Der Effekt einer Avastin-Behandlung konnte in den G55TL-Tumoren besonders eindrucksvoll beobachtet werden, da die Tumoren nicht invasiv sondern sehr kompakt wachsen, was sich in der glatten Tumorfrente widerspiegelte. Dass die Avastin-Behandlung in einer Auflösung der kompakten Wachstumsfront resultierte, bestätigte die Invasions-fördernde Wirkung von Avastin im Glioblastom. Interessanterweise reichte die Inaktivierung von ZEB2 für eine mit der anti-

angiogenen Therapie vergleichbare Verringerung des Tumolvolumens aus. Zusätzlich dazu verhinderte die ZEB2-Inaktivierung den Wechsel zu dem invasiven Phänotyp nach der Avastin-Behandlung.

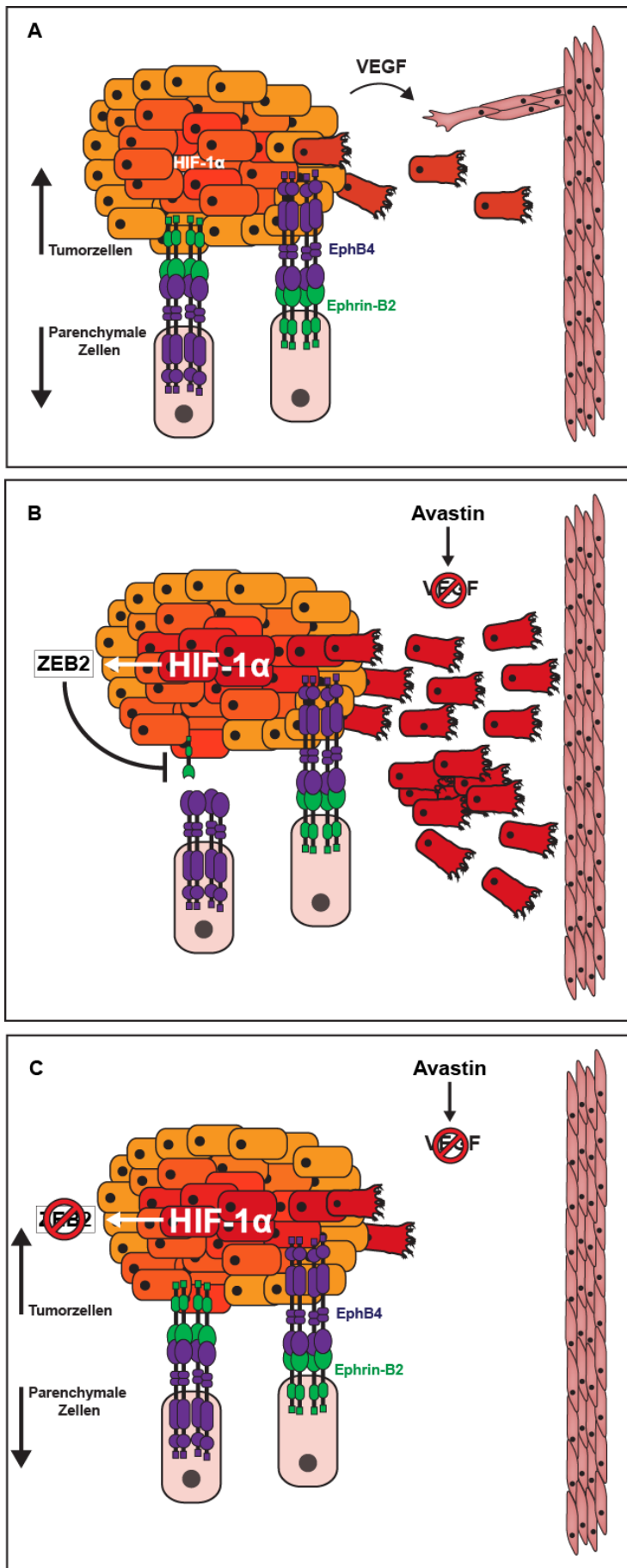
Die Avastin-Behandlung resultierte wie erwartet in einer verminderten Blutgefäßfläche in den Tumoren (siehe Abbildung 5.32). Ähnlich der Ephrin-B2-KO-Tumoren war auch in den IgG-behandelten shZEB2-Tumoren keine Veränderung der Gefäßdichte im Vergleich zu den IgG-behandelten Kontrolltumoren erkennbar. Außer der verminderten Tumorgefäßfläche der Avastin-behandelten Tumoren, war auch eine Reduktion der Blutgefäße am Tumorrand erkennbar, was auf die Induktion der Angiogenese in den IgG-behandelten Tumoren hindeutet. Damit einhergehend entstanden am Tumorrand der Avastin-behandelten Tumoren hypoxische Bereiche (siehe Abbildung 5.33). Obwohl die Avastin-Behandlung zu einer deutlichen Tumorreduktion führte, entstanden Therapie-bedingt durch die stark verringerten Blutgefäße HIF-1 $\alpha$ -positive Bereiche, die wiederum die Invasion förderten und somit auch eine Erklärung der evasiven Resistenz lieferten. Die shZEB2-Tumoren, die mit Avastin behandelt wurden, zeigten zwar vergleichbar hohe HIF-1 $\alpha$ -Level am Tumorrand wie die Avastin-behandelten Kontrolltumoren, jedoch waren die shZEB2-Tumoren kompakt und streuten nicht. Die Invasivität der Tumorzellen am Tumorrand kann somit durch erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Level und dadurch reduzierte ZEB2-Level begründet werden, was auf die entscheidende Rolle von ZEB2 und der Repression von Ephrin-B2 in der Tumordinvasion hinweist. Die verminderte HIF-1 $\alpha$ -Expression in den IgG-behandelten shZEB2-Tumoren kann hingegen durch die stark verminderte Tumorgroße und der daraus resultierenden besseren Blutversorgung erklärt werden.

Die Behandlung der LN-229-Tumoren mit Avastin diente als Modell anti-angiogen-resistenter Tumoren, da diese Zellen kein VEGF produzierten (siehe Abbildung 5.28) und somit die Avastin-Behandlung keine Auswirkungen auf das Tumorstadium oder die Tumordinvasion hatte (siehe Abbildung 5.30). Die LN-229 Tumoren wuchsen langsamer und invasiver als die G55TL-Tumoren. Da der LN-229-Tumorversuch knapp 6 Wochen später als der G55TL-Tumorversuch abgebrochen wurde, waren die LN-229-Tumoren großflächiger gewachsen, wodurch die Wirkung der ZEB2-Inaktivierung besser zur Geltung kam. Sowohl in den IgG-behandelten als auch in den Avastin-behandelten shZEB2-Tumoren war ein vermindertes Tumorstadium als auch eine verringerte Tumordinvasion signifikant erkennbar (siehe Abbildung 5.31 [C] und [D]). Zusätzlich konnte in den LN-229-Tumoren die ZEB2-vermittelte Herunterregulation von Ephrin-B2 bei der Tumordinvasion bestätigt werden, da die Ephrin-B2-Expression in den invadierenden Zellen am Tumorrand stark verringert war (Daten nicht gezeigt).

Letztlich belegten die *in vivo* Versuche, dass ein ZEB2-Funktionsverlust zum einen dem Tumorwachstum und zum anderen der induzierten Invasion nach anti-angiogener-Behandlung entgegen wirkt.

#### **6.4 Abschließende Bemerkung**

Zusammenfassend konnte anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse gezeigt werden, dass der Verlust der reversen Ephrin-B2-Signaltransduktion einen entscheidenden Schritt bei der Tumorinvasion und –progression darstellt. Der Funktionsverlust von Ephrin-B2 konnte sowohl durch einen genetischen, einen epigenetischen als auch einen molekularen Mechanismus durch die HIF-1 $\alpha$ -vermittelte, ZEB2-abhängige Repression nachgewiesen werden. Dabei gehen wir davon aus, dass zu Beginn der Tumorentwicklung, wenn der Tumor ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird, Ephrin-B2 aktiv ist und die bidirektionale Signaltransduktion von Ephrin-B2 und der EphB-Rezeptoren den Tumor und das Hirnparenchym durch repulsive Signale in Kompartimente aufteilt, wodurch die Tumorinvasion inhibiert wird (Abbildung 6.2 [A]). Als Folge der Tumorprogression wird der Tumor nicht ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, wodurch hypoxische Bereiche entstehen. Hypoxie wiederum induziert invasive Programme, die dem Tumor erlauben aus der hypoxischen Nische in die angiogene Nische zu wandern und zu überleben. Dabei resultieren die erhöhten VEGF-Level während der Angiogenese in der Entstehung neuer Blutgefäße, an denen die Tumorzellen entlang wandern können und so die Bildung von Tumorsatelliten fördern. Unsere Daten zeigten, dass die Glioblastomzellen durch die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Aktivierung des transkriptionellen Repressors ZEB2 der feindlichen Umgebung entkommen, indem die repulsiven Signale des Ephrin-B2-Systems reprimiert werden und die Zellen so diffus in das Parenchym und zu den Blutgefäßen migrieren können (Abbildung 6.2 [B]). Durch die anti-angiogene Behandlung mit Avastin wurde die Tumorangiogenese drastisch inhibiert, was einerseits das Tumolvolumen verminderte aber auch vermehrt hypoxische Bereiche am Tumorrand hervorbrachte. Die erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Expression an der Tumordinvasionsfront reprimierte daraufhin ZEB2-abhängig die repulsiven Signale von Ephrin-B2 und könnte zudem weitere invasionsfördernde Mechanismen induzieren, wie etwa die Aktivierung von den Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9. Dies resultierte in einer stark erhöhten Invasion. Durch die Inaktivierung von ZEB2 und der darauffolgenden Reaktivierung der Ephrin-B2-Funktion, konnte schließlich die Tumorprogression und Invasion, auch im Zusammenhang mit der Avastin-Behandlung, deutlich reduziert werden (Abbildung 6.2 [C]).



**Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der molekularen Regulation von ZEB2 und Ephrin-B2 in der Glioblastom-invasion.**

**(A)** Kompartimentalisierung der Tumorzellen durch die repulsiven Signale von Ephrin-B2 und EphB4. Migrierende Zellen wandern zudem an vorhandenen Blutgefäßen entlang. **(B)** Im hochgradigen Glioblastom wird durch die entstandenen hypoxischen Bereiche HIF-1 $\alpha$ -induziert. Dieser hypoxische Effekt wird durch antiangiogene Reagenzien intensiviert, was zu der Induktion von ZEB2 führt und in der Repression von Ephrin-B2 resultiert. Durch die fehlenden repulsiven Signale sind die Tumorerosion sowie die Tumorerprogression deutlich erhöht. **(C)** Durch die Inaktivierung von ZEB2 und der darauffolgenden Reaktivierung der Ephrin-B2-Funktion, wird die Tumorerprogression und Invasion, auch im Zusammenhang mit einer antiangiogenen Behandlung, verhindert.

Unsere Beobachtungen der verminderten Tumorinvasion durch die Inaktivierung von ZEB2 weisen auf einen generellen Mechanismus der ZEB2-Funktion in der Tumorinvasion hin, der auch bei der evasiven Resistenz nach anti-angiogener Behandlung aktiviert wird.

Die nächste Herausforderung wird nun sein, die regulatorischen Mechanismen der Ephrin-B2-Signaltransduktion hinsichtlich der Gliominvasion und -progression zu entschlüsseln. Zunächst wäre die Herstellung eines Doppelknockouts von ZEB2 und Ephrin-B2 von Vorteil, um den hier aufgezeigten Mechanismus zu bestätigen. Ebenso ist nicht klar, ob die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse durch die bidirektionale Wirkung von Ephrin-B2 und EphB4, oder durch die einseitige reverse Signaltransduktion durch Ephrin-B2 hervorgerufen wurden. Eine genauere Untersuchung der Funktion von EphB4 in den Tumorzellen wäre notwendig um herauszufinden, ob es sich bei der Hochregulation von EphB4 in den Glioblastomen um onkogene Eigenschaften handelt und die Signaltransduktion möglicherweise Ephrin-B2-unabhängig aktiviert wird, oder ob EphB4 keine zusätzliche Rolle in der Tumorprogression spielt, da es beispielsweise zu einer verminderten Tyrosinkinasefunktion oder einer Inaktivierung der Signaltransduktion kommt.

Weiterhin wäre die Untersuchung der Ephrin-B2- und Eph-B4-abhängigen migratorischen Signale durch beispielsweise der Rho-Familie der kleinen GTPasen oder MMPs in Bezug auf die EZM-Regulation interessant. Ebenso wie die Aufschlüsselung einer möglichen Regulation des Abl-Crk Signalweges durch EphB4 oder auch der Nachweis der Kompartimentalisierung durch Endozytose. Einen wichtigen Aspekt hinsichtlich der Funktion der bidirektionalen Signalgebung stellt auch die Tumormikroumgebung dar. Abgesehen von Untersuchungen in Endothelzellen, ist wenig über die Expression von EphB und Ephrin-B in Fibroblasten, infiltrierenden Immunzellen oder inflammatorischen Zellen bekannt.

In Endothelzellen vermittelt Ephrin-B2 die Umgestaltung von unreifen Tumorgefäße und stabilisiert die Gefäße (264, 265). Die vor allem durch VEGF induzierten neuen Blutgefäße nach der Angiogenese sind unreif, stark gewunden und undicht (51) und zudem ungenügend mit Perizyten assoziiert. Die Blut-Hirn-Schranke, die eine physiologische Schutzbarriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Gehirn darstellt und aus Perizyten, Astrozyten und Endothelzellen aufgebaut ist (355), ist in Glioblastomen defekt (53). Interessanterweise kann VEGF über den Notch-Signalweg Ephrin-B2 hochregulieren, sodass Ephrin-B2 zusammen mit VEGF und vielen weiteren angiogenen Faktoren die Angiogenese fördert. Dabei zeigten Studien, dass Ephrin-B2 auch die Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten fördert und so die

---

Tumorgefäße nach Anti-VEGF-Therapie stabilisieren kann (261, 318, 356). Hypothetisch würde dies bedeuten, dass durch eine fortführende Behandlung mit ZEB2-Inhibitoren, nach der anti-angiogenen Therapie, Ephrin-B2 aktiv werden könnte und so der Patient durch die Stabilisierung der Endothelzellen eher genesen könnte, sofern die Regulation von Ephrin-B2 auf Endothelzellen vergleichbar wie in den hier untersuchten Tumorzellen ist.

Letztlich ist noch wenig über die molekularen Mechanismen des Eph-Ephrin-Systems in seiner Rolle der Tumorangiogenese bekannt. Auch die in der Diskussion aufgeführten, teilweise kontroversen Studien zeigen die Fülle an regulatorischen Möglichkeiten, die das Eph- und Ephrin-System bietet und die auch Zelltyp- und Gewebespezifisch zu sein scheinen. Die Entschlüsselung des Ephrin-B2-Signalweges wäre für eventuelle therapeutische Maßnahmen notwendig, da das bisherige Verständnis nicht ausreicht und sowohl aus der vorgelegten Arbeit als auch den diskutierten Daten hervorgeht, dass eine Hemmung oder Überexpression von Eph und Ephrinen nicht nur positive Ergebnisse erzielen könnte.

In dieser Arbeit konnte schließlich ZEB2 als potentieller Kandidat zur Entwicklung therapeutischer Strategien identifiziert werden. Um die Rolle von ZEB2 in der EMT genauer zu charakterisieren, wären Analysen zur Metastasierung von Tumoren nach anti-angiogener Therapie notwendig. Die Fähigkeit von Tumoren Metastasen zu bilden, verschlechtern die Heilungschancen der Patienten erheblich. Die durchgeführten Therapien haben meist eine palliative und keine kurative Zielsetzung (27). Neben den malignen Hirntumoren stellen zerebrale Metastasen die häufigste Ursache von intrakraniellen Neoplasien dar. Dazu zählen Malignome, Lungen-, Mamma-, Nierenzell-, Prostata, und gastrointestinale Karzinome, wie auch maligne Melanome (357). Interessante ZEB2-regulierende Faktoren wären beispielsweise Mitglieder der micro-RNA-200-Familie (miR-200), die nachweislich die Expression von ZEB2 in Tumorzellen kontrollieren (177) und selber wiederum durch HIF reguliert werden können (358, 359).

Eine genauere Aufklärung der hier beschriebenen Faktoren ist demnach unerlässlich für die erfolgreiche Entwicklung spezifischer Wirkstoffe, um letztlich die therapeutische Wirksamkeit der Glioblastombehandlung und die Behandlung von Metastasen im Speziellen zu verbessern.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Pietsch T & Wiestler OD. Molecular neuropathology of astrocytic brain tumors. *J Neurooncol* **1997**; 35(3):211-222.
2. Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* **2001**; 2(2):120-129.
3. Ohgaki H & Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* **2005**; 109(1):93-108.
4. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, *et al.* The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **2002**; 61(3):215-225; discussion 226-219.
5. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **2007**; 114(2):97-109.
6. Riemenschneider MJ & Reifenberger G. Molecular neuropathology of gliomas. *Int J Mol Sci* **2009**; 10(1):184-212.
7. Burger PC, Vogel FS, Green SB, & Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* **1985**; 56(5):1106-1111.
8. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, *et al.* Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* **2004**; 64(19):6892-6899.
9. Ohgaki H & Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **2007**; 170(5):1445-1453.
10. Simpson JR, Horton J, Scott C, *et al.* Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1993**; 26(2):239-244.
11. Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, & Collins VP. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* **1998**; 22(1):9-15.
12. Kanu OO, Hughes B, Di C, *et al.* Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol* **2009**; 3:39-52.
13. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, *et al.* p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* **2001**; 11(2):159-168.
14. Kraus JA, Lamszus K, Glesmann N, *et al.* Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol* **2001**; 101(4):311-320.
15. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* **2000**; 80(1):65-72.
16. Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, *et al.* Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* **1995**; 10(11):2243-2246.
17. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**; 352(10):997-1003.
18. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **2004**; 4(4):296-307.
19. Reifenberger G & Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med* **2004**; 82(10):656-670.
20. Claes A, Idema AJ, & Wesseling P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* **2007**; 114(5):443-458.
21. Giese A & Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* **1996**; 39(2):235-250; discussion 250-232.
22. Black KL. The Cure for Cancer: Not If but When. *Oncologist* **1997**; 2(5):IX-X.



23. Subramanian A, Harris A, Piggott K, Shieff C, & Bradford R. Metastasis to and from the central nervous system--the 'relatively protected site'. *Lancet Oncol* **2002**; 3(8):498-507.
24. Nakada M, Nakada S, Demuth T, *et al.* Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci* **2007**; 64(4):458-478.
25. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, *et al.* Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* **2004**; 64(3):920-927.
26. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **2000**; 6(4):389-395.
27. Hanahan D & Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**; 144(5):646-674.
28. Hanahan D & Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **1996**; 86(3):353-364.
29. Urbich C & Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* **2004**; 14(8):318-322.
30. Adams RH & Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**; 8(6):464-478.
31. Lyden D, Hattori K, Dias S, *et al.* Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* **2001**; 7(11):1194-1201.
32. Plate KH, Breier G, Weich HA, & Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **1992**; 359(6398):845-848.
33. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, *et al.* Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest* **2002**; 109(6):777-785.
34. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* **2000**; 5 Suppl 1:3-10.
35. Bergers G & Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **2003**; 3(6):401-410.
36. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, *et al.* VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* **2003**; 161(6):1163-1177.
37. Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, *et al.* Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* **2010**; 465(7297):487-491.
38. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, *et al.* Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* **2010**; 465(7297):483-486.
39. Goldbrunner RH, Bendszus M, Sasaki M, *et al.* Vascular endothelial growth factor-driven glioma growth and vascularization in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* **2000**; 47(4):921-929; discussion 929-930.
40. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* **2004**; 25(4):581-611.
41. Ferrara N, Gerber HP, & LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **2003**; 9(6):669-676.
42. Robinson CJ & Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* **2001**; 114(Pt 5):853-865.
43. Harper SJ & Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* **2008**; 8(11):880-887.
44. Schmidt NO, Westphal M, Hagel C, *et al.* Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *Int J Cancer* **1999**; 84(1):10-18.

45. Suri C, Jones PF, Patan S, *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **1996**; 87(7):1171-1180.
46. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res* **1986**; 46(2):467-473.
47. Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, & Liotta LA. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science* **1983**; 221(4607):281-283.
48. Carmeliet P & Collen D. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* **2000**; 902:249-262; discussion 262-244.
49. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, *et al.* Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* **2002**; 160(3):985-1000.
50. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, & Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* **2005**; 15(4):297-310.
51. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **2000**; 407(6801):242-248.
52. Liebner S, Fischmann A, Rascher G, *et al.* Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* **2000**; 100(3):323-331.
53. Tozer GM, Kanthou C, & Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* **2005**; 5(6):423-435.
54. Plate KH & Mennel HD. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Exp Toxicol Pathol* **1995**; 47(2-3):89-94.
55. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, *et al.* AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* **2007**; 11(1):83-95.
56. Gagner JP, Law M, Fischer I, Newcomb EW, & Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: imaging and experimental therapeutics. *Brain Pathol* **2005**; 15(4):342-363.
57. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **1971**; 285(21):1182-1186.
58. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* **1972**; 175(3):409-416.
59. Kim KJ, Li B, Winer J, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **1993**; 362(6423):841-844.
60. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, *et al.* Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* **1997**; 57(20):4593-4599.
61. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, & Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2004**; 3(5):391-400.
62. Norden AD, Drappatz J, & Wen PY. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat Rev Neurol* **2009**; 5(11):610-620.
63. Buie LW & Valgus J. Bevacizumab: a treatment option for recurrent glioblastoma multiforme. *Ann Pharmacother* **2008**; 42(10):1486-1490.
64. Norden AD, Young GS, Setayesh K, *et al.* Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* **2008**; 70(10):779-787.
65. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* **2001**; 7(9):987-989.
66. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **2005**; 307(5706):58-62.

67. Yuan F, Chen Y, Dellian M, *et al.* Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93(25):14765-14770.
68. Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, *et al.* Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* **2004**; 64(11):3731-3736.
69. Claes A, Wesseling P, Jeuken J, *et al.* Antiangiogenic compounds interfere with chemotherapy of brain tumors due to vessel normalization. *Mol Cancer Ther* **2008**; 7(1):71-78.
70. Norden AD, Drappatz J, Muzikansky A, *et al.* An exploratory survival analysis of anti-angiogenic therapy for recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* **2009**; 92(2):149-155.
71. Smith JK, Mamoon NM, & Duhe RJ. Emerging roles of targeted small molecule protein-tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Oncol Res* **2004**; 14(4-5):175-225.
72. Bergers G & Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* **2008**; 8(8):592-603.
73. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* **2008**; 26(1):127-132.
74. Zhou Q, Guo P, & Gallo JM. Impact of angiogenesis inhibition by sunitinib on tumor distribution of temozolomide. *Clin Cancer Res* **2008**; 14(5):1540-1549.
75. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, *et al.* Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **2009**; 15(3):232-239.
76. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, *et al.* Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J* **2004**; 18(2):338-340.
77. Kerbel RS. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* **1997**; 390(6658):335-336.
78. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, & Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* **2005**; 8(4):299-309.
79. Guo P, Hu B, Gu W, *et al.* Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol* **2003**; 162(4):1083-1093.
80. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, & Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* **2003**; 111(9):1287-1295.
81. Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T, *et al.* Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia* **2000**; 2(4):306-314.
82. Kunkel P, Ulbricht U, Bohlen P, *et al.* Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res* **2001**; 61(18):6624-6628.
83. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, *et al.* Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* **2009**; 15(3):220-231.
84. Lamszus K, Kunkel P, & Westphal M. Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir Suppl* **2003**; 88:169-177.

85. Lucio-Eterovic AK, Piao Y, & de Groot JF. Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin Cancer Res* **2009**; 15(14):4589-4599.
86. Blouw B, Song H, Tihan T, *et al.* The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* **2003**; 4(2):133-146.
87. Du R, Lu KV, Petritsch C, *et al.* HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* **2008**; 13(3):206-220.
88. Iwamoto FM, Abrey LE, Beal K, *et al.* Patterns of relapse and prognosis after bevacizumab failure in recurrent glioblastoma. *Neurology* **2009**; 73(15):1200-1206.
89. Narayana A, Kelly P, Golfinos J, *et al.* Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival. *J Neurosurg* **2009**; 110(1):173-180.
90. de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, *et al.* Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro Oncol* **2010**; 12(3):233-242.
91. Preusser M, Haberler C, & Hainfellner JA. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr* **2006**; 156(11-12):332-337.
92. Acker T & Acker H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *J Exp Biol* **2004**; 207(Pt 18):3171-3188.
93. Silver I & Erecinska M. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv Exp Med Biol* **1998**; 454:7-16.
94. Leniger-Follert E, Lubbers DW, & Wrabetz W. Regulation of local tissue PO<sub>2</sub> of the brain cortex at different arterial O<sub>2</sub> pressures. *Pflugers Arch* **1975**; 359(1-2):81-95.
95. Semenza GL & Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **1992**; 12(12):5447-5454.
96. Wang GL & Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **1995**; 270(3):1230-1237.
97. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, & Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**; 92(12):5510-5514.
98. Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hankinson O, & Ratcliffe PJ. The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells. *J Biol Chem* **1996**; 271(25):15117-15123.
99. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, & Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* **1998**; 7(3):205-213.
100. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, & Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* **2001**; 20(18):5197-5206.
101. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, & Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* **1997**; 272(31):19253-19260.
102. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2003**; 3(10):721-732.
103. Huang LE, Gu J, Schau M, & Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**; 95(14):7987-7992.

104. Salceda S & Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* **1997**; 272(36):22642-22647.
105. Berra E, Richard DE, Gothie E, & Pouyssegur J. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation. *FEBS Lett* **2001**; 491(1-2):85-90.
106. Bruick RK & McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **2001**; 294(5545):1337-1340.
107. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, *et al.* C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **2001**; 107(1):43-54.
108. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, & Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* **1997**; 272(17):11205-11214.
109. Yu F, White SB, Zhao Q, & Lee FS. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**; 98(17):9630-9635.
110. Ivan M, Kondo K, Yang H, *et al.* HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* **2001**; 292(5516):464-468.
111. Ohh M, Park CW, Ivan M, *et al.* Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* **2000**; 2(7):423-427.
112. Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, & Kaelin WG, Jr. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* **1995**; 269(5229):1444-1446.
113. Berra E, Benizri E, Ginouves A, *et al.* HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* **2003**; 22(16):4082-4090.
114. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* **2004**; 19:176-182.
115. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, *et al.* FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* **2002**; 16(12):1466-1471.
116. Li YM, Zhou BP, Deng J, *et al.* A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells. *Cancer Res* **2005**; 65(8):3257-3263.
117. Chen S, Sanford CA, Sun J, *et al.* VHL and PTEN loss coordinate to promote mouse liver vascular lesions. *Angiogenesis* **2010**; 13(1):59-69.
118. Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Semenza GL, & Van Obberghen E. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* **2002**; 277(31):27975-27981.
119. Minet E, Arnould T, Michel G, *et al.* ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* **2000**; 468(1):53-58.
120. Kim WY & Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* **2004**; 22(24):4991-5004.
121. Acker T & Plate KH. A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol Med* **2002**; 80(9):562-575.
122. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* **2002**; 16(10):1151-1162.

123. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, & Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* **2000**; 275(28):21048-21054.
124. Ebert BL, Firth JD, & Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem* **1995**; 270(49):29083-29089.
125. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, *et al.* Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **1998**; 394(6692):485-490.
126. Gerber HP, Condorelli F, Park J, & Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **1997**; 272(38):23659-23667.
127. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, *et al.* Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* **2003**; 17(2):271-273.
128. Tian H, McKnight SL, & Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* **1997**; 11(1):72-82.
129. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, & Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem* **2002**; 277(36):32405-32408.
130. Koh MY, Lemos R, Jr., Liu XP, & Powis G. The hypoxia associated factor (HAF) switches cells from HIF-1{alpha} to HIF-2{alpha} dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res* **2011**.
131. Shweiki D, Itin A, Soffer D, & Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **1992**; 359(6398):843-845.
132. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, *et al.* Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* **2003**; 63(5):1138-1143.
133. Petrella BL, Lohi J, & Brinckerhoff CE. Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene* **2005**; 24(6):1043-1052.
134. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, *et al.* Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* **2003**; 3(4):347-361.
135. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, *et al.* Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* **2003**; 425(6955):307-311.
136. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, & Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* **2001**; 61(18):6669-6673.
137. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, & Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* **2007**; 11(4):335-347.
138. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, *et al.* HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* **2004**; 23(9):1949-1956.
139. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, *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**; 10(5):413-423.
140. Acker T, Diez-Juan A, Aragones J, *et al.* Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha. *Cancer Cell* **2005**; 8(2):131-141.

141. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **1999**; 284(5422):1994-1998.
142. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* **2000**; 88(11):2606-2618.
143. Evans SM, Judy KD, Dunphy I, *et al.* Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(24):8177-8184.
144. Zhong H, Chiles K, Feldser D, *et al.* Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* **2000**; 60(6):1541-1545.
145. Vordermark D. Significance of hypoxia in malignant glioma. Re: Evans *et al.* Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10:8177-84. *Clin Cancer Res* **2005**; 11(10):3966-3967; author reply 3967-3968.
146. Okamoto I, Kawano Y, Matsumoto M, *et al.* Regulated CD44 cleavage under the control of protein kinase C, calcium influx, and the Rho family of small G proteins. *J Biol Chem* **1999**; 274(36):25525-25534.
147. Nagano O, Murakami D, Hartmann D, *et al.* Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol* **2004**; 165(6):893-902.
148. Sasaki H, Yoshida K, Ikeda E, *et al.* Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors: an inverse correlation with malignancy. *Cancer* **1998**; 82(10):1921-1931.
149. Cavallaro U & Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **2004**; 4(2):118-132.
150. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* **2003**; 15(6):740-746.
151. Perego C, Vanoni C, Massari S, *et al.* Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J Cell Sci* **2002**; 115(Pt 16):3331-3340.
152. Gladson CL. The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J Neuropathol Exp Neurol* **1999**; 58(10):1029-1040.
153. Mahesparan R, Read TA, Lund-Johansen M, *et al.* Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol* **2003**; 105(1):49-57.
154. Wenk MB, Midwood KS, & Schwarzbauer JE. Tenascin-C suppresses Rho activation. *J Cell Biol* **2000**; 150(4):913-920.
155. Hemler ME. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **1998**; 10(5):578-585.
156. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **2002**; 110(6):673-687.
157. Paulus W, Baur I, Beutler AS, & Reeves SA. Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins. *Lab Invest* **1996**; 75(6):819-826.
158. Gotzmann J, Fischer AN, Zojer M, *et al.* A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene* **2006**; 25(22):3170-3185.
159. Lamszus K, Schmidt NO, Jin L, *et al.* Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. *Int J Cancer* **1998**; 75(1):19-28.
160. Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Humphrey PA, *et al.* Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res* **1990**; 50(18):6039-6044.

161. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2002**; 2(6):442-454.
162. Nakada M, Niska JA, Miyamori H, *et al.* The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells. *Cancer Res* **2004**; 64(9):3179-3185.
163. Demuth T & Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* **2004**; 70(2):217-228.
164. Peinado H, Olmeda D, & Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **2007**; 7(6):415-428.
165. Yilmaz M & Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* **2009**; 28(1-2):15-33.
166. Birchmeier W & Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* **1994**; 1198(1):11-26.
167. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, & Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* **1998**; 392(6672):190-193.
168. Battle E, Sancho E, Franci C, *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2000**; 2(2):84-89.
169. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2000**; 2(2):76-83.
170. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, *et al.* The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* **2003**; 116(Pt 3):499-511.
171. Comijn J, Berx G, Vermassen P, *et al.* The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* **2001**; 7(6):1267-1278.
172. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, *et al.* DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* **2005**; 24(14):2375-2385.
173. Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, *et al.* A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **2001**; 276(29):27424-27431.
174. Kang Y & Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **2004**; 118(3):277-279.
175. Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, & Weiss SJ. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem* **2005**; 280(12):11740-11748.
176. Lu Z, Ghosh S, Wang Z, & Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* **2003**; 4(6):499-515.
177. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, & Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **2009**; 139(5):871-890.
178. Janda E, Lehmann K, Killisch I, *et al.* Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* **2002**; 156(2):299-313.
179. Peinado H, Quintanilla M, & Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **2003**; 278(23):21113-21123.



180. Huber MA, Kraut N, & Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* **2005**; 17(5):548-558.
181. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, & Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* **2004**; 24(1):306-319.
182. Pouyssegur J, Dayan F, & Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **2006**; 441(7092):437-443.
183. Imai T, Horiuchi A, Wang C, *et al.* Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* **2003**; 163(4):1437-1447.
184. Kurrey NK, K A, & Bapat SA. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecol Oncol* **2005**; 97(1):155-165.
185. Wanami LS, Chen HY, Peiro S, Garcia de Herreros A, & Bachelder RE. Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: implications for tumor progression. *Exp Cell Res* **2008**; 314(13):2448-2453.
186. Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, *et al.* A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J* **2005**; 24(19):3446-3458.
187. Peinado H, Portillo F, & Cano A. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell Cycle* **2005**; 4(12):1749-1752.
188. Thomassin L, Werneck CC, Broekelmann TJ, *et al.* The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers. *J Biol Chem* **2005**; 280(52):42848-42855.
189. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, *et al.* Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* **2006**; 440(7088):1222-1226.
190. Yang J, Mani SA, Donaher JL, *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **2004**; 117(7):927-939.
191. Yang J & Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* **2008**; 14(6):818-829.
192. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, *et al.* Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* **2008**; 10(3):295-305.
193. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, *et al.* A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* **2006**; 131(3):830-840.
194. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, & Takaku F. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* **1987**; 238(4834):1717-1720.
195. Bartley TD, Hunt RW, Welcher AA, *et al.* B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature* **1994**; 368(6471):558-560.
196. Orioli D & Klein R. The Eph receptor family: axonal guidance by contact repulsion. *Trends Genet* **1997**; 13(9):354-359.
197. Flanagan JG & Vanderhaeghen P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* **1998**; 21:309-345.
198. Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer* **2010**; 10(3):165-180.
199. Palmer A & Klein R. Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev* **2003**; 17(12):1429-1450.
200. Himanen JP, Saha N, & Nikolov DB. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Cell Biol* **2007**; 19(5):534-542.
201. Poliakov A, Cotrina M, & Wilkinson DG. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* **2004**; 7(4):465-480.

202. Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **2008**; 133(1):38-52.
203. Pitulescu ME & Adams RH. Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev* **2010**; 24(22):2480-2492.
204. Kullander K & Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002**; 3(7):475-486.
205. Wybenga-Groot LE, Baskin B, Ong SH, *et al.* Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell* **2001**; 106(6):745-757.
206. Holland SJ, Peles E, Pawson T, & Schlessinger J. Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Curr Opin Neurobiol* **1998**; 8(1):117-127.
207. Gale NW, Flenniken A, Compton DC, *et al.* Elk-L3, a novel transmembrane ligand for the Eph family of receptor tyrosine kinases, expressed in embryonic floor plate, roof plate and hindbrain segments. *Oncogene* **1996**; 13(6):1343-1352.
208. Anonymous. Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell* **1997**; 90(3):403-404.
209. Bruckner K, Pasquale EB, & Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* **1997**; 275(5306):1640-1643.
210. Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**; 6(6):462-475.
211. Himanen JP, Rajashankar KR, Lackmann M, *et al.* Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* **2001**; 414(6866):933-938.
212. Chrencik JE, Brooun A, Recht MI, *et al.* Structure and thermodynamic characterization of the EphB4/Ephrin-B2 antagonist peptide complex reveals the determinants for receptor specificity. *Structure* **2006**; 14(2):321-330.
213. Brambilla R, Bruckner K, Orioli D, *et al.* Similarities and differences in the way transmembrane-type ligands interact with the Elk subclass of Eph receptors. *Mol Cell Neurosci* **1996**; 8(2-3):199-209.
214. Kalo MS & Pasquale EB. Multiple in vivo tyrosine phosphorylation sites in EphB receptors. *Biochemistry* **1999**; 38(43):14396-14408.
215. Zisch AH, Pazzagli C, Freeman AL, *et al.* Replacing two conserved tyrosines of the EphB2 receptor with glutamic acid prevents binding of SH2 domains without abrogating kinase activity and biological responses. *Oncogene* **2000**; 19(2):177-187.
216. Binns KL, Taylor PP, Sicheri F, Pawson T, & Holland SJ. Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Mol Cell Biol* **2000**; 20(13):4791-4805.
217. Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, & Pasquale EB. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* **2003**; 6(2):153-160.
218. Noren NK & Pasquale EB. Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. *Cell Signal* **2004**; 16(6):655-666.
219. Shamah SM, Lin MZ, Goldberg JL, *et al.* EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* **2001**; 105(2):233-244.
220. Tapon N & Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **1997**; 9(1):86-92.
221. Hall A & Nobes CD. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2000**; 355(1399):965-970.

222. Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, *et al.* Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* **2002**; 111(2):251-263.
223. Wahl S, Barth H, Ciossek T, Aktories K, & Mueller BK. Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* **2000**; 149(2):263-270.
224. Irie F & Yamaguchi Y. EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci* **2002**; 5(11):1117-1118.
225. Murai KK & Pasquale EB. New exchanges in eph-dependent growth cone dynamics. *Neuron* **2005**; 46(2):161-163.
226. Penzes P, Beeser A, Chernoff J, *et al.* Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* **2003**; 37(2):263-274.
227. Zou JX, Wang B, Kalo MS, *et al.* An Eph receptor regulates integrin activity through R-Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**; 96(24):13813-13818.
228. Arvanitis D & Davy A. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev* **2008**; 22(4):416-429.
229. Palmer A, Zimmer M, Erdmann KS, *et al.* EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell* **2002**; 9(4):725-737.
230. Cowan CA & Henkemeyer M. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* **2001**; 413(6852):174-179.
231. Torres R, Firestein BL, Dong H, *et al.* PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* **1998**; 21(6):1453-1463.
232. Lee HS, Nishanian TG, Mood K, Bong YS, & Daar IO. EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. *Nat Cell Biol* **2008**; 10(8):979-986.
233. Lu Q, Sun EE, Klein RS, & Flanagan JG. Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* **2001**; 105(1):69-79.
234. Essmann CL, Martinez E, Geiger JC, *et al.* Serine phosphorylation of ephrinB2 regulates trafficking of synaptic AMPA receptors. *Nat Neurosci* **2008**; 11(9):1035-1043.
235. Zimmer M, Palmer A, Kohler J, & Klein R. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* **2003**; 5(10):869-878.
236. Holmberg J, Clarke DL, & Frisen J. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* **2000**; 408(6809):203-206.
237. Hattori M, Osterfield M, & Flanagan JG. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* **2000**; 289(5483):1360-1365.
238. Egea J & Klein R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol* **2007**; 17(5):230-238.
239. Marquardt T, Shirasaki R, Ghosh S, *et al.* Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. *Cell* **2005**; 121(1):127-139.
240. Noren NK & Pasquale EB. Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer. *Cancer Res* **2007**; 67(9):3994-3997.
241. Merlos-Suarez A & Batlle E. Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **2008**; 20(2):194-200.
242. Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, *et al.* Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. *Cancer Res* **2005**; 65(22):10170-10173.
243. Batlle E, Bacani J, Begthel H, *et al.* EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* **2005**; 435(7045):1126-1130.

244. Surawska H, Ma PC, & Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **2004**; 15(6):419-433.
245. Castano J, Davalos V, Schwartz S, Jr., & Arango D. EPH receptors in cancer. *Histol Histopathol* **2008**; 23(8):1011-1023.
246. Greenman C, Stephens P, Smith R, *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **2007**; 446(7132):153-158.
247. Ruhe JE, Streit S, Hart S, *et al.* Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. *Cancer Res* **2007**; 67(23):11368-11376.
248. Zogopoulos G, Jorgensen C, Bacani J, *et al.* Germline EPHB2 receptor variants in familial colorectal cancer. *PLoS One* **2008**; 3(8):e2885.
249. Kumar SR, Masood R, Spannuth WA, *et al.* The receptor tyrosine kinase EphB4 is overexpressed in ovarian cancer, provides survival signals and predicts poor outcome. *Br J Cancer* **2007**; 96(7):1083-1091.
250. Nakada M, Niska JA, Tran NL, McDonough WS, & Berens ME. EphB2/R-Ras signaling regulates glioma cell adhesion, growth, and invasion. *Am J Pathol* **2005**; 167(2):565-576.
251. Cortina C, Palomo-Ponce S, Iglesias M, *et al.* EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells. *Nat Genet* **2007**; 39(11):1376-1383.
252. Davalos V, Dopeso H, Castano J, *et al.* EPHB4 and survival of colorectal cancer patients. *Cancer Res* **2006**; 66(18):8943-8948.
253. Brantley-Sieders DM & Chen J. Eph receptor tyrosine kinases in angiogenesis: from development to disease. *Angiogenesis* **2004**; 7(1):17-28.
254. Yang NY, Pasquale EB, Owen LB, & Ethell IM. The EphB4 receptor-tyrosine kinase promotes the migration of melanoma cells through Rho-mediated actin cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* **2006**; 281(43):32574-32586.
255. Noren NK, Yang NY, Silldorff M, Mutyala R, & Pasquale EB. Ephrin-independent regulation of cell substrate adhesion by the EphB4 receptor. *Biochem J* **2009**; 422(3):433-442.
256. Noren NK, Foos G, Hauser CA, & Pasquale EB. The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. *Nat Cell Biol* **2006**; 8(8):815-825.
257. Dopeso H, Mateo-Lozano S, Mazzolini R, *et al.* The receptor tyrosine kinase EPHB4 has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* **2009**; 69(18):7430-7438.
258. Astin JW, Batson J, Kadir S, *et al.* Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells. *Nat Cell Biol* **2010**; 12(12):1194-1204.
259. Nakada M, Anderson EM, Demuth T, *et al.* The phosphorylation of ephrin-B2 ligand promotes glioma cell migration and invasion. *Int J Cancer* **2010**; 126(5):1155-1165.
260. Haldimann M, Custer D, Munarini N, *et al.* Deregulated ephrin-B2 expression in the mammary gland interferes with the development of both the glandular epithelium and vasculature and promotes metastasis formation. *Int J Oncol* **2009**; 35(3):525-536.
261. Foo SS, Turner CJ, Adams S, *et al.* Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* **2006**; 124(1):161-173.
262. Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, & Anderson DJ. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* **1999**; 4(3):403-414.
263. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, *et al.* Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* **1999**; 13(3):295-306.

264. Adams RH, Diella F, Hennig S, *et al.* The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell* **2001**; 104(1):57-69.
265. Wang HU, Chen ZF, & Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **1998**; 93(5):741-753.
266. Herbert SP, Huisken J, Kim TN, *et al.* Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science* **2009**; 326(5950):294-298.
267. Kuijper S, Turner CJ, & Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med* **2007**; 17(5):145-151.
268. Hanahan D, Lane D, Lipsich L, Wigler M, & Botchan M. Characteristics of an SV40-plasmid recombinant and its movement into and out of the genome of a murine cell. *Cell* **1980**; 21(1):127-139.
269. Hamel W, Westphal M, & Shepard HM. Loss in expression of the retinoblastoma gene product in human gliomas is associated with advanced disease. *J Neurooncol* **1993**; 16(2):159-165.
270. Westphal M, Hansel M, Hamel W, Kunzmann R, & Holzel F. Karyotype analyses of 20 human glioma cell lines. *Acta Neurochir (Wien)* **1994**; 126(1):17-26.
271. Westphal M, Meima L, Szonyi E, *et al.* Heregulins and the ErbB-2/3/4 receptors in gliomas. *J Neurooncol* **1997**; 35(3):335-346.
272. Beckman G, Beckman L, Ponten J, & Westermarck B. G-6-PD and PGM phenotypes of 16 continuous human tumor cell lines. Evidence against cross-contamination and contamination by HeLa cells. *Hum Hered* **1971**; 21(3):238-241.
273. Fogh J, Fogh JM, & Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **1977**; 59(1):221-226.
274. Westermarck B. The deficient density-dependent growth control of human malignant glioma cells and virus-transformed glia-like cells in culture. *Int J Cancer* **1973**; 12(2):438-451.
275. Westermarck B, Ponten J, & Hugosson R. Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand A* **1973**; 81(6):791-805.
276. Borbe R, Rieger J, & Weller M. Failure of taxol-based combination chemotherapy for malignant glioma cannot be overcome by G2/M checkpoint abrogators or altering the p53 status. *Cancer Chemother Pharmacol* **1999**; 44(3):217-227.
277. Mullis K, Faloona F, Scharf S, *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1986**; 51 Pt 1:263-273.
278. Toedt G, Barbus S, Wolter M, *et al.* Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status. *Int J Cancer* 128(5):1095-1103.
279. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, & Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**; 193(1):265-275.
280. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**; 227(5259):680-685.
281. Nambu JR, Chen W, Hu S, & Crews ST. The *Drosophila melanogaster* similar bHLH-PAS gene encodes a protein related to human hypoxia-inducible factor 1 alpha and *Drosophila* single-minded. *Gene* **1996**; 172(2):249-254.
282. Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H, & Russell DW. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* **1989**; 264(14):8222-8229.

283. Boshart M, Weber F, Jahn G, *et al.* A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **1985**; 41(2):521-530.
284. Marinovic AC, Mitch WE, & Price SR. Tools for evaluating ubiquitin (UbC) gene expression: characterization of the rat UbC promoter and use of an unique 3' mRNA sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**; 274(2):537-541.
285. Shaw LM. Tumor cell invasion assays. *Methods Mol Biol* **2005**; 294:97-105.
286. Potter C & Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle* **2004**; 3(2):164-167.
287. Sulman EP, Tang XX, Allen C, *et al.* ECK, a human EPH-related gene, maps to 1p36.1, a common region of alteration in human cancers. *Genomics* **1997**; 40(2):371-374.
288. Huusko P, Ponciano-Jackson D, Wolf M, *et al.* Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer. *Nat Genet* **2004**; 36(9):979-983.
289. Traylor RN, Fan Z, Hudson B, *et al.* Microdeletion of 6q16.1 encompassing EPHA7 in a child with mild neurological abnormalities and dysmorphic features: case report. *Mol Cytogenet* **2009**; 2:17.
290. Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, & Jones PA. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med* **2008**; 59:267-280.
291. Patra SK & Bettuzzi S. Epigenetic DNA-(cytosine-5-carbon) modifications: 5-aza-2'-deoxycytidine and DNA-demethylation. *Biochemistry (Mosc)* **2009**; 74(6):613-619.
292. Segura I, Essmann CL, Weinges S, & Acker-Palmer A. Grb4 and GIT1 transduce ephrinB reverse signals modulating spine morphogenesis and synapse formation. *Nat Neurosci* **2007**; 10(3):301-310.
293. Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res* **2006**; 66(5):2725-2731.
294. Nakada M, Nakada S, Demuth T, *et al.* Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci* **2007**; 64(4):458-478.
295. Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, & Dubchak I. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **2004**; 32(Web Server issue):W273-279.
296. Gilbert D. Sequence file format conversion with command-line readseq. *Curr Protoc Bioinformatics* **2003**; Appendix 1:Appendix 1E.
297. Thomas-Chollier M, Sand O, Turatsinze JV, *et al.* RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **2008**; 36(Web Server issue):W119-127.
298. Sohl M, Lanner F, & Farnebo F. Characterization of the murine Ephrin-B2 promoter. *Gene* **2009**; 437(1-2):54-59.
299. Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, *et al.* New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J* **1999**; 18(18):5073-5084.
300. Yamashita T, Ohneda K, Nagano M, *et al.* Hypoxia-inducible transcription factor-2alpha in endothelial cells regulates tumor neovascularization through activation of ephrin A1. *J Biol Chem* **2008**; 283(27):18926-18936.
301. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **2007**; 128(4):693-705.
302. Jiang C & Zhao Z. Mutational spectrum in the recent human genome inferred by single nucleotide polymorphisms. *Genomics* **2006**; 88(5):527-534.
303. Bernstein BE, Meissner A, & Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* **2007**; 128(4):669-681.

304. Li X, Wang L, Gu JW, *et al.* Up-regulation of EphA2 and down-regulation of EphrinA1 are associated with the aggressive phenotype and poor prognosis of malignant glioma. *Tumour Biol* **2010**; 31(5):477-488.
305. Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, *et al.* Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. *Cancer Res* **2005**; 65(22):10170-10173.
306. Herath NI, Doecke J, Spanevello MD, Leggett BA, & Boyd AW. Epigenetic silencing of EphA1 expression in colorectal cancer is correlated with poor survival. *Br J Cancer* **2009**; 100(7):1095-1102.
307. Andres AC & Ziemiecki A. Eph and ephrin signaling in mammary gland morphogenesis and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2003**; 8(4):475-485.
308. Clevers H & Batlle E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Res* **2006**; 66(1):2-5.
309. Li M, Zhao ZW, Zhang Y, & Xin Y. Over-expression of Ephb4 is associated with carcinogenesis of gastric cancer. *Dig Dis Sci* **2011**; 56(3):698-706.
310. Herath NI, Doecke J, Spanevello MD, Leggett BA, & Boyd AW. Epigenetic silencing of EphA1 expression in colorectal cancer is correlated with poor survival. *Br J Cancer* **2009**; 100(7):1095-1102.
311. Berclaz G, Flutsch B, Altermatt HJ, *et al.* Loss of EphB4 receptor tyrosine kinase protein expression during carcinogenesis of the human breast. *Oncol Rep* **2002**; 9(5):985-989.
312. Hafner C, Schmitz G, Meyer S, *et al.* Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem* **2004**; 50(3):490-499.
313. Nakada M, Drake KL, Nakada S, Niska JA, & Berens ME. Ephrin-B3 ligand promotes glioma invasion through activation of Rac1. *Cancer Res* **2006**; 66(17):8492-8500.
314. Hansen MJ, Dallal GE, & Flanagan JG. Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron* **2004**; 42(5):717-730.
315. Blouw B, Song H, Tihan T, *et al.* The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* **2003**; 4(2):133-146.
316. Ding H, Roncari L, Shannon P, *et al.* Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res* **2001**; 61(9):3826-3836.
317. Steinle JJ, Meininger CJ, Chowdhury U, Wu G, & Granger HJ. Role of ephrin B2 in human retinal endothelial cell proliferation and migration. *Cell Signal* **2003**; 15(11):1011-1017.
318. Noren NK, Lu M, Freeman AL, Koolpe M, & Pasquale EB. Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**; 101(15):5583-5588.
319. Egea J & Klein R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol* **2007**; 17(5):230-238.
320. Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**; 6(6):462-475.
321. Poliakov A, Cotrina M, & Wilkinson DG. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* **2004**; 7(4):465-480.
322. Bonifaci N, Gorski B, Masojc B, *et al.* Exploring the link between germline and somatic genetic alterations in breast carcinogenesis. *PLoS One* **2010**; 5(11):e14078.
323. Liu W, Jung YD, Ahmad SA, *et al.* Effects of overexpression of ephrin-B2 on tumour growth in human colorectal cancer. *Br J Cancer* **2004**; 90(8):1620-1626.

324. Riedl JA, Brandt DT, Battle E, *et al.* Down-regulation of Rap1 activity is involved in ephrinB1-induced cell contraction. *Biochem J* **2005**; 389(Pt 2):465-469.
325. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* **2006**; 86(12):1221-1232.
326. Marston DJ, Dickinson S, & Nobes CD. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol* **2003**; 5(10):879-888.
327. Feller SM. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* **2001**; 20(44):6348-6371.
328. Chodniewicz D & Klemke RL. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim Biophys Acta* **2004**; 1692(2-3):63-76.
329. Kumar SR, Scehnet JS, Ley EJ, *et al.* Preferential induction of EphB4 over EphB2 and its implication in colorectal cancer progression. *Cancer Res* **2009**; 69(9):3736-3745.
330. Masood R, Kumar SR, Sinha UK, *et al.* EphB4 provides survival advantage to squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* **2006**; 119(6):1236-1248.
331. Kumar SR, Singh J, Xia G, *et al.* Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *Am J Pathol* **2006**; 169(1):279-293.
332. Xia G, Kumar SR, Masood R, *et al.* EphB4 expression and biological significance in prostate cancer. *Cancer Res* **2005**; 65(11):4623-4632.
333. Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, *et al.* Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* **2004**; 24(7):2875-2889.
334. Evans AJ, Russell RC, Roche O, *et al.* VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol Cell Biol* **2007**; 27(1):157-169.
335. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, & Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105(17):6392-6397.
336. Radaelli E, Ceruti R, Patton V, *et al.* Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. *Histol Histopathol* **2009**; 24(7):879-891.
337. Han SP, Kim JH, Han ME, *et al.* SNAI1 is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* **2011**; 31(3):489-496.
338. Yang HW, Menon LG, Black PM, Carroll RS, & Johnson MD. SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer* **2010**; 10:301.
339. Myung J, Cho BK, Kim YS, & Park SH. Snail and Cox-2 expressions are associated with WHO tumor grade and survival rate of patients with gliomas. *Neuropathology* **2010**; 30(3):224-231.
340. Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, *et al.* Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* **2004**; 90(6):1265-1273.
341. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, *et al.* Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* **2005**; 103(8):1631-1643.
342. Katoh M. Integrative genomic analyses of ZEB2: Transcriptional regulation of ZEB2 based on SMADs, ETS1, HIF1alpha, POU/OCT, and NF-kappaB. *Int J Oncol* **2009**; 34(6):1737-1742.



343. Peinado H, Olmeda D, & Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **2007**; 7(6):415-428.
344. Xia M, Hu M, Wang J, *et al.* Identification of the role of Smad interacting protein 1 (SIP1) in glioma. *J Neurooncol* **2010**; 97(2):225-232.
345. Wick W, Platten M, & Weller M. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J Neurooncol* **2001**; 53(2):177-185.
346. Shyu KG, Hsu FL, Wang MJ, Wang BW, & Lin S. Hypoxia-inducible factor 1alpha regulates lung adenocarcinoma cell invasion. *Exp Cell Res* **2007**; 313(6):1181-1191.
347. Huang CH, Yang WH, Chang SY, *et al.* Regulation of membrane-type 4 matrix metalloproteinase by SLUG contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Neoplasia* **2009**; 11(12):1371-1382.
348. Indelicato M, Pucci B, Schito L, *et al.* Role of hypoxia and autophagy in MDA-MB-231 invasiveness. *J Cell Physiol* **2010**; 223(2):359-368.
349. Verschueren K, Remacle JE, Collart C, *et al.* SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* **1999**; 274(29):20489-20498.
350. Sohl M, Lanner F, & Farnebo F. Sp1 mediate hypoxia induced ephrinB2 expression via a hypoxia-inducible factor independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**; 391(1):24-27.
351. Verhoeff JJ, van Tellingen O, Claes A, *et al.* Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. *BMC Cancer* **2009**; 9:444.
352. Keunen O, Johansson M, Oudin A, *et al.* Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**; 108(9):3749-3754.
353. Fischer I, Cunliffe CH, Bollo RJ, *et al.* High-grade glioma before and after treatment with radiation and Avastin: initial observations. *Neuro Oncol* **2008**; 10(5):700-708.
354. Narayana A, Kelly P, Golfinos J, *et al.* Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival. *J Neurosurg* **2009**; 110(1):173-180.
355. Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol* **2005**; 30(1):57-70.
356. Huang J, Soffer SZ, Kim ES, *et al.* Vascular remodeling marks tumors that recur during chronic suppression of angiogenesis. *Mol Cancer Res* **2004**; 2(1):36-42.
357. Kirsch DG & Loeffler JS. Brain metastases in patients with breast cancer: new horizons. *Clin Breast Cancer* **2005**; 6(2):115-124.
358. Chan YC, Khanna S, Roy S, & Sen CK. miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells. *J Biol Chem* **2011**; 286(3):2047-2056.
359. Liu H, Brannon AR, Reddy AR, *et al.* Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma. *BMC Syst Biol* **2010**; 4:51.

weitere Informationen:

URL unter: <http://www.avastin.de/>

URL unter: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-bevacizumab>

URL unter: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/ac/09/briefing/2009-4427b1-01-FDA.pdf>

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

<i>aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
Ang	Angiopoietin
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa/ ungefähr
CA-IX	Carboanhydrase-IX
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary cDNA</i> )
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CGH	komparative genomische Hybridisierung ( <i>Comparative Genomic Hybridization</i> )
CMV	Cytomegalovirus
CpG	<i>Cytosine preceeding Cuanine</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EGF	<i>Epidermal growth Factor</i>
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> )
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
Eph	<i>Erythropoietin-producing human hepatocellular</i>
Ephrin	<i>Eph receptor interacting protein</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	kristallisierbares Fragment ( <i>Fragment crystallizable, constant part of the antibody</i> )
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
g	Gramm
GBM	<i>Glioblastoma multiforme</i>
h	Stunde(n) ( <i>hour</i> )
H	Hypoxie

---

---

HDAC	Histon-Deacetylase
H/E	Hematoxylin/ Eosin
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor ( <i>Hypoxia-Inducible Factor</i> )
HPRT	Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase
HRE	<i>Hypoxia Responsive Element</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>Horse-Radish Peroxidase</i> )
IP	Immunpräzipitation
IHC	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
Kb	Kilo-Basenpaare
KD	<i>knock-down</i>
kDa	Kilo-Dalton
KO	<i>knock-out</i>
L	Liter
LOH	Verlust der Heterozygotie ( <i>Loss of Heterozygosity</i> )
LOX	Lysyl Oxidase
LOXL	Lysyl Oxidase-Like
M	Molar
max	maximal
min	Minute
miRNA	microRNA
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol, mikromolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MT-MMPs	Membran-typ Matrixmetalloproteinase
n	Anzahl
N	Normoxie
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDZ	PSD 95/Disc large/ZO-1-Domäne

qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
RLU	relative Lumineszenzeinheit ( <i>Renilla Luciferase Units</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
sek	Sekunden(n)
s.e.m.,	<i>standard error of mean</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-Derived Factor-1</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIP1	<i>SMAD-Interacting Protein 1</i>
SNAI	<i>snail homolog</i>
SV40	<i>simian-virus 40</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TSS	Transkriptionsstartseite
TU	<i>Transducing Units</i>
TWIST	twist homolog
üN	über Nacht
UbC	<i>Ubiquitin-C</i>
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-A</i>
VEGFR	VEGF-Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
WT	Wildtyp
ZEB	<i>Zinc finger E-box-Binding homeobox</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

### 3 Einleitung

Abbildung 3.1:	Schematische Übersicht der molekularen Pathogenese in der Tumorprogression von Gliomen.....	5
Abbildung 3.2:	Wichtige Signalwege in der Pathogenese von Glioblastomen .....	7
Abbildung 3.3:	Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen eines Glioblastompatienten vor und nach dessen Behandlung....	8
Abbildung 3.4:	Angiogenese durch Gefäßsprossung .....	11
Abbildung 3.5:	Mechanismen der anti-angiogenen Resistenzentwicklung im GBM .....	15
Abbildung 3.6:	Entwicklung eines diffus infiltrierenden GBM-Rezidiv nach einer Avastin-Behandlung .....	16
Abbildung 3.7:	Schematische Darstellung funktioneller Domänen von HIF- $\alpha$ , die für die Regulation durch VHL und die Transkriptionsregulation von Zielgenen relevant sind .....	19
Abbildung 3.8:	Schematische Darstellung der Invasion von Glioblastomzellen.....	21
Abbildung 3.9:	Hypoxie-induzierter E-Cadherin Verlust in der EMT.....	24
Abbildung 3.10:	Schematische Darstellung der Eph-Rezeptor und Ephrin-Liganden Strukturen .....	27
Abbildung 3.11:	Tumorsuppressor-vermittelte Signalwege von EphB und Ephrin-B .....	30

### 5 Ergebnisse

Abbildung 5.1:	Hypoxie-induzierte Invasion von Glioblastomzellen in einem Kollagen-Invasion-Assay .....	90
Abbildung 5.2:	EphB- und Ephrin-B-Regulierung in verschiedenen humanen Glioblastomzelllinien.....	91
Abbildung 5.3:	Unterschiedliche Hypoxie-abhängige Regulation von EphB und Ephrin-B .....	93
Abbildung 5.4:	HIF-1 $\alpha$ -abhängige Verminderung der EphB- und Ephrin-B-Expression unter hypoxischen Bedingungen .....	94

---

Abbildung 5.5:	Der Verlust von Ephrin-B2 ist ein häufiges Ereignis in malignen Gliomen .....	96
Abbildung 5.6:	Methylierungs- und Deacetylierungsstatus von Ephrin-B2 in Glioblastomzellen .....	98
Abbildung 5.7:	Durch die Aktivierung des EphB4- und reversen Ephrin-B2-Signalweges wird die Invasion der humanen Glioblastomzellen reduziert .....	99
Abbildung 5.8:	Nachweis der Immortalisierung, Transformation und Ausschaltung von Ephrin-B2 in Gliomazellen .....	101
Abbildung 5.9:	Der Verlust von Ephrin-B2 erhöht die Invasion der Gliomazellen <i>in vitro</i> .....	101
Abbildung 5.10:	Der Verlust von Ephrin-B2 erhöht das Tumolvolumen und die Tumorinvasion von Gliomazellen .....	103
Abbildung 5.11:	Der Verlust von Ephrin-B2 hat keinen Einfluss auf die Proliferation der Gliomazellen und die Gefäßfläche im Tumor .....	104
Abbildung 5.12:	Untersuchung der Hypoxie induzierten Expression von EMT-Repressoren auf mRNA- und Proteinebene .....	106
Abbildung 5.13:	Überprüfung des siRNA-vermittelten Funktionsverlustes der EMT-Repressoren .....	107
Abbildung 5.14:	Die Inhibition von TWIST1, TWIST2 und ZEB2 hebt die Hypoxie-induzierte Repression von Ephrin-B2 auf .....	108
Abbildung 5.15:	Die Inhibition von SNAI1 hebt die Hypoxie induzierte erhöhte Expression von N-Cadherin und Vimentin auf .....	110
Abbildung 5.16:	Hypoxie-induzierte Erhöhung der ZEB2-Proteinexpression in Glioblastomzellen .....	111
Abbildung 5.17:	Überprüfung der <i>knock-down</i> -Effizienz von HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -miRNA-Sequenzen .....	113
Abbildung 5.18:	Überprüfung der stabilen polyklonalen HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ - <i>knock-down</i> -Glioblastomzellen .....	114
Abbildung 5.19:	Überprüfung der stabilen polyklonalen HIF-1 $\alpha$ - und HIF-2 $\alpha$ -Überexpression .....	116
Abbildung 5.20:	ZEB2 wird in humanen Glioblastomzellen durch HIF-1 $\alpha$ reguliert .....	117
Abbildung 5.21:	Ephrin-B2 wird in Glioblastomzellen unter Hypoxie durch ZEB2 reguliert .....	118

Abbildung 5.22:	Der Ephrin-B2-Promotor enthält konservierte ZEB2-Bindestellen .....	120
Abbildung 5.23:	Die Ephrin-B2-Promotoraktivität wird sowohl durch Hypoxie als auch durch ZEB2 stark vermindert .....	121
Abbildung 5.24:	Mutierte ZEB2-Bindestellen im Ephrin-B2-Promotor verhindern sowohl die Hypoxie- als auch die ZEB2-abhängige verminderte Promotoraktivität. ....	122
Abbildung 5.25:	Nachweis der direkten Bindung von ZEB2 an den Ephrin-B2-Promotor durch eine ChIP-Analyse .....	123
Abbildung 5.26:	Überprüfung der stabilen polyklonalen ZEB2- <i>knock-down</i> -Glioblastomzellen .....	125
Abbildung 5.27:	Die stabile Repression von ZEB2 verhindert die Hypoxie-abhängige Herunterregulation von Ephrin-B2 in humanen Glioblastomzellen .....	126
Abbildung 5.28:	LN-229-Zellen sezernieren kein VEGF .....	128
Abbildung 5.29:	Die Repression von ZEB2 verringert das Tumolvolumen von G55TL-Glioblastomzellen .....	130
Abbildung: 5.30:	Die Repression von ZEB2 verringert das Tumolvolumen von LN-229-Glioblastomzellen .....	131
Abbildung 5.31:	Der invasive Phänotyp, der bei anti-angiogener Behandlung entsteht, wird durch die Ausschaltung von ZEB2 verhindert .....	132
Abbildung 5.32:	Die Behandlung mit Avastin verringert die Gefäßfläche in Tumoren .....	133
Abbildung 5.33:	Die Behandlung mit Avastin erhöht die Hypoxie am Tumorrand .....	134
<b>6 Diskussion</b>		
Abbildung 6.1:	Modell der Ephrin-B2-abhängigen Invasion in Glioblastomen .....	149
Abbildung 6.2:	Schematische Darstellung der molekularen Regulation von ZEB2 und Ephrin-B2 in der Glioblastom-invasion .....	159

## 8.3 Tabellenverzeichnis

### 3 Einleitung

Tabelle 3.1:	Klassifikation und Graduierung der Gliom-Subtypen gemäß der WHO-Klassifikation von 2007 .....	4
Tabelle 3.2:	Auflistung der anti-angiogenen Reagenzien die in klinischen Studien zur Behandlung des Glioblastoms untersucht werden .....	14

### 4 Material und Methoden

Tabelle 4.1:	Liste der Antibiotika zur bakteriellen Selektion .....	37
Tabelle 4.2:	Liste der Antibiotika für die Selektion von transduzierten Zelllinien .....	38
Tabelle 4.3:	Liste der Primärantikörper .....	39
Tabelle 4.4:	Liste der verwendeten Sekundärantikörper .....	40
Tabelle 4.5:	Liste der verwendeten Primer .....	56
Tabelle 4.6:	Liste der verwendeten Zelllinien .....	57
Tabelle 4.7:	Liste der hergestellten stabilen polyklonalen <i>knock-down</i> -Zellen .....	58
Tabelle 4.8:	Liste der hergestellten stabilen polyklonalen Überexpression-Zellen .....	59



## **9 Danksagung**



## **10 Curriculum Vitae**



