

Zwischenbericht zu dem Projekt "Tumormetabolismus - Interaktion zwischen Tumorzellen und Hirngewebe" (Stand: November 2016)

Das Forschungsprojekt verfolgt drei Hauptziele, deren Arbeitsfortschritte im Einzelnen dargestellt werden. Erstes Projektziel ist die Untersuchung der Kausalität der Assoziation von Glykolyse und Glioblastomzellmigration. Hypothese hierbei ist, dass das Glykolyseenzym Glucose-6-phosphat-Isomerase (GPI) bei der Migration und Invasion von Glioblastomzellen eine wichtige Rolle spielt. Denn GPI ist nicht nur ein Glykolyseenzym, sondern ist auch unter dem Namen Autocrine Motility Factor (AMF) bekannt als ein von Zellen sezernierter Faktor, der an den Zelloberflächenrezeptor AMFR binden und die Motilität z.B. von Melanomzellen steigern kann. Unsere bisherigen Arbeitsergebnisse zeigen, dass sowohl GPI/AMF als auch AMFR in Glioblastomen vorwiegend in hochgradig hypoxischen Regionen heraufreguliert sind. Ein Gewebsmicroarray zeigte darüberhinaus, dass eine hohe Expression von GPI/AMF mit einem kürzeren Überleben von Glioblastompatienten assoziiert ist. Untersuchungen an verschiedenen Glioblastomzelllinien ergaben, dass sowohl GPI/AMF also auch AMFR durch Hypoxie heraufreguliert werden und dass insbesondere die Sekretion von GPI/AMF in das Zellmedium durch Hypoxie erhöht wird. Funktionelle Experimente ergaben, dass GPI/AMF die chemotaktische Migration von Glioblastomzellen erheblich steigert, wohingegen die Proliferation insbesondere bei höheren Konzentrationen inhibiert wird. Der GPI/AMF-Inhibitor Erythrose-4-Phosphat inhibierte die Motilität der Zellen und durch Immundepletion von GPI/AMF aus dem Zellkulturüberstand ließ sich eine autokrine Stimulation der Zellmigration belegen. Eine Herunterregulation der Expression von GPI/AMF mittels shRNA führte zu verringerter Migration, wohingegen die Proliferation kaum verändert war. Derzeit stehen noch in vivo Versuche aus, bei denen die Zellen, in denen die Expression von GPI/AMF herunterreguliert wurde, als Xenografttumore implantiert werden, um deren Wachstum und Invasionsverhalten im Hirn von Mäusen zu beurteilen. Die bisherigen Untersuchungen zeigen also zusammenfassend, dass GPI/AMF ein außerordentlich potenter pro-migratorischer Faktor ist, wodurch die Assoziation zwischen Glykolyse und Zellmigration - zumindest teilweise - erklärt werden kann. Demzufolge ist GPI/AMF ein potenziell vielversprechendes Target für die Inhibierung der Invasion von Glioblastomzellen im Hirn.

Zweites Projektziel ist die Analyse der Relevanz intra- und intertumoraler Heterogenität für den Glioblastomzellmetabolismus. Intratumorale metabolische Heterogenität kommt in Glioblastomen unter anderem darin zum Ausdruck, dass in hochgradig hypoxischen Arealen Enzyme der Glycolyse hoch exprimiert sind, wohingegen Enzyme des Pentosephosphatwegs hier vergleichsweise gering exprimiert sind, wobei sich in hochproliferativen Arealen ein umgekehrtes Bild ergibt. Um die Ursachen und Mechanismen metabolischer Heterogenität auf klonaler Ebene analysieren zu können, entwickelten wir ein klonales Farbmarkierungssystem (Optical Barcoding). Hiermit lässt sich das Schicksal individueller Zellen in heterogenen Kulturen in vitro sowie in Xenografttumoren in vivo verfolgen und es lassen sich aus den Tumoren individuelle Zellklone herausortieren für differenzielle Analysen zur Adaptation an metabolischen Stress wie Hypoxie und Glucosemangel. Um intertumorale Unterschiede des Metabolismus bei Gliomen mit unterschiedlichem genetischen Entstehungshintergrund zu identifizieren, werden in Kooperation mit Prof. Glass transgene Mausgliomzellen untersucht, die Veränderungen der Gene TP53, PDGF-B, CDKN2a und EGFR aufweisen. Derzeit werden die Genexpressionsprofile dieser Zelllinien mittels RNAseq analysiert.

Drittes Projektziel ist die Charakterisierung der Hypoxie-Regulation weiterer Stoffwechselwege, die direkt oder indirekt mit der Glykolyse verknüpft sind. Hierzu erfolgten quantitative PCR Analysen und Western Blot Analysen von Enzymen des Serin-Synthesewegs, des Folsäure (C1)-Stoffwechsels, des Methioninzyklus sowie der Purin- und Pyrimidinbiosynthese. Hierbei zeigte sich, dass Enzyme des Folsäure-Zyklus überwiegend durch Hypoxie herunterreguliert werden, wohingegen Enzyme des Serinsynthesewegs heraufreguliert werden. Analysen an Tumormaterial ergaben, dass die Phosphoglycerate Dehydrogenase, das erste Enzym der Serinbiosynthese besonders hoch in IDH1-mutierten Gliomen exprimiert ist. Diese Analysen müssen ergänzt und an weiteren Zelllinien validiert werden, um ein komplexes Bild zu erhalten. Darüberhinaus stehen funktionelle Analysen zur Bedeutung ausgewählter Enzyme aus.

Progress report for the project "Tumor metabolism - interaction between glioblastoma cells and brain" (November 2016)

The research project focuses on three main aims and work packages. The first aim addresses the question whether glycolysis and glioblastoma cell migration are mechanistically linked. We hypothesize that the glycolysis enzyme glucose-6-phosphate-isomerase (GPI) plays an important role in glioblastoma cell migration and invasion. GPI functions not only as a glycolysis enzyme but is also known as autocrine motility factor (AMF), a factor that can be secreted from cells and can bind to the cell surface receptor AMFR, thereby stimulating the motility of for example melanoma cells in an autocrine fashion. Our data obtained so far show that both GPI/AMF as well as its receptor AMFR are most strongly expressed in the most severely hypoxic regions in glioblastoma tissue. Furthermore, immunostaining of a tissue microarray revealed that high expression of GPI/AMF is associated with a shorter survival of glioblastoma patients. Analyses on a panel of different glioblastoma cell lines showed that the expression of both GPI/AMF as well as AMFR is strongly enhanced by hypoxia and that in particular the secretion of GPI/AMF into the culture medium is increased under hypoxic conditions. Functional experiments demonstrated that GPI/AMF strongly enhances the chemotactic migration of glioblastoma cells, whereas proliferation tends to be decreased, especially at higher concentrations. The GPI/AMF-Inhibitor erythrose-4-phosphate (E4P) inhibited the migration of glioblastoma cells, and by immunodepleting of GPI/AMF from the culture supernatant we demonstrated that glioblastoma cells stimulate their motility in an autocrine fashion. Downregulation of GPI/AMF expression by shRNA transduction resulted in reduced migration whereas proliferation was largely unchanged. Currently, in vivo experiments are outstanding, in which cells with downregulated GPI/AMF expression will be implanted into the brains of immunocompromized mice as xenograft tumors in order to study their growth and invasion. In summary, the results obtained thus far demonstrate that GPI/AMF is a potent pro-migratory factor for glioblastoma cells, which can in part explain the association between glycolysis and migration. Consequently, GPI/AMF is potentially promising target for the inhibition of glioblastoma cell invasion in brain.

The second aim is to analyze the relevance of intra- and intertumoral heterogeneity for glioblastoma cell metabolism. Intratumoral metabolic heterogeneity is for example obvious in glioblastoma tissue, in which the most severely hypoxic regions display very high expression of glycolysis enzymes but comparatively low expression of pentose phosphate pathway enzymes, whereas the inverse expression pattern is observed in highly proliferative tissue areas. To facilitate analyses of the causes and mechanisms of metabolic heterogeneity at the clonal level, we developed a clonal colour tracing system (optical barcoding). The technique allows to track the fate of individual cells in heterogeneous cultures as well as in xenograft tumors in vivo. Moreover, individual cell clones can be re-sorted from tumors after growth in vivo and can then be used for differential analyses of adaptation to metabolic stress, such as hypoxia and glucose starvation. In order to identify intertumoral differences in metabolic regulation in gliomas with different genetic background, transgenic mouse glioma cell lines with alterations of the TP53, PDGF-B, CDKN2a and EGFR genes will be studied in collaboration with Prof. Glass. Currently, the gene expression profiles of these cell lines are being analyzed by RNAseq.

The third aim is to characterize the hypoxic regulation of additional pathways that directly or indirectly branch off glycolysis. For this purpose, quantitative PCR analyses and Western blot analyses of enzymes of the serine synthesis pathway, the folate cycle, the methionine cycle and the purine and pyrimidine synthesis pathways have been performed. Preliminary findings demonstrate that enzymes of the folate cycle are mostly downregulated by hypoxia, whereas enzymes of the serine synthesis pathway are upregulated. Analyses on tumor material revealed that phosphoglycerate dehydrogenase, the first enzyme of the serine synthesis pathway is particularly highly expression in IDH1-mutated gliomas. These analyses now have to be extended and to be validated on additional cell lines to generate a more complete picture. In addition, functional analyses on selected enzymes need to be performed.