

Georg Gdynia

Dr. med.

## **Charakterisierung neuer alternativer Funktionen der Caspasen und des HMGB1-Proteins: Invasivität und nicht-apoptotischer Zelltod**

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. W. Roth

Glioblastome sind hochmaligne Hirntumore, die sich durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber apoptotischem Zelltod sowie durch eine hohe zelluläre Invasivität auszeichnen. Diese Eigenschaften tragen ursächlich zum schlechten Ansprechen von Glioblastomen auf eine Radiochemotherapie oder eine neurochirurgische Resektion bei. Die molekularen Mechanismen, die der gesteigerten Motilität und der Zelltod-Resistenz von Glioblastomzellen zugrunde liegen, sind jedoch nur teilweise verstanden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird gezeigt, dass in Glioblastomzellen – auch in Abwesenheit von zellulärem Stress oder apoptotischen Stimuli – *in vivo* und *in vitro* Caspasen konstitutiv aktiviert vorliegen. Die Inhibierung von Caspasen führt zur verminderten Motilität von Glioblastomzellen in Migrations- und Invasionsversuchen. Analog bewirkt auch eine Suppression der Expression von Caspase-3 oder Caspase-8 durch spezifische siRNA oder Antisense DNA Moleküle eine Hemmung der Glioblastomzellmigration. Die durch konstitutive Caspaseaktivität vermittelte Motilität von Glioblastomzellen ist nicht abhängig von einer Aktivierung des CD95 Rezeptors oder der ERK1/2 bzw. JNK Kinasen. Die basale proteolytische Caspasenaktivität führt zu einer konstanten Spaltung des zellmotilitätsassoziierten Proteins Gelsolin in ein N-terminales Spaltprodukt, das zur Caspasen vermittelten Steigerung der Migration und Invasion von Glioblastomzellen beitragen könnte. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit eröffnet sich die Möglichkeit, durch die experimentell-therapeutische Applikation von niedrig dosierten Caspase Inhibitoren die Invasivität von Glioblastomzellen zu hemmen. Das therapeutische Fenster müßte dabei so gewählt werden, dass es bei effizienter Motilitätshemmung noch nicht zu einer Blockierung des apoptotischen Zelltodprogrammes kommt. Abhängig von den Ergebnissen zukünftiger Studien könnte der hier beschriebene Mechanismus zu einer neuen Strategie für die verbesserte Behandlung von Glioblastomen beitragen.

Neben den Caspasen können auch andere Zelltod-regulierende Proteine die Motilität von Tumorzellen beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welchen Einfluß das Nekrose-assoziierte Protein *High-mobility group box 1* (HMGB1) auf Migration und Invasivität von Glioblastomzellen hat. Überraschenderweise konnte bereits in initialen Versuchen festgestellt werden, dass humanes rekombinantes HMGB1 stark zytotoxisch auf Glioblastomzellen wirkt, und dass der hierbei eintretende Zelltod ungewöhnliche Charakteristika besitzt. Daher wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit diese neue, bislang noch nicht beschriebene Art des HMGB1-induzierten Zelltodes charakterisiert. Die durch humanes rekombinantes (rh) HMGB1 vermittelte Zytotoxizität ist Mitochondrien abhängig und führt zu starker Schädigung der mitochondrialen DNA und des mitochondrialen Proteoms durch toxische Malondialdehyd und Hydroxynonenal Addukte. Der beobachtete Zelltod ist phänotypisch durch das Auftreten von Riesenmitochondrien gekennzeichnet. Die Bildung dieser Riesenmitochondrien ist unabhängig von nukleären Signalen, da

Riesenmitochondrien nach Behandlung mit rhHMGB1 auch in kernlosen Zytoplasten beobachtet werden können. Die Entstehung von freien Sauerstoffradikalen und die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) sind wichtig für den rhHMGB1 vermittelten Zelltod, da sowohl Antagonisten von reaktiven Sauerstoffspezies, wie N-Acetylcystein, zytosolische Catalase oder mitochondriale Mangan-Superoxiddismutase, als auch die Inhibierung der JNK den rhHMGB1 verursachten Zelltod hemmen. Im Gegensatz zu Glioblastomzellen waren nicht-neoplastische Astrozyten resistent gegenüber den zytotoxischen Wirkungen von rhHMGB1, was eine tumorspezifische Wirkung von HMGB1 als möglich erscheinen lässt. Die systemische Behandlung von CD1 Nacktmäusen, denen Gliom Xenografts implantiert worden waren, bewirkte eine signifikante Verminderung des Tumorwachstums. Zusammengefasst stellt der HMGB1 vermittelte Zelltod eine neue, bisher nicht beschriebene Zelltodart dar, die sich von den bisher bekannten Typen des Zelltodes, wie Apoptose, Autophagie, Seneszenz, klassischer Nekrose und Nekroptose unterscheidet. Möglicherweise stellt der HMGB1 induzierte Zelltod eine neue spezielle Art der Nekrose dar, die auch physiologisch in der Tumorzellbiologie eine Rolle spielt, da Riesenmitochondrien auch in einer Reihe humaner maligner Tumoren wie z.B. in Glioblastomen nachweisbar waren. Zusammengefasst eröffnen die in dieser Arbeit erhobenen Daten – nicht zuletzt aufgrund einer mutmasslichen tumorspezifischen Wirkung von HMGB1 – die Möglichkeit, daß rekombinantes HMGB1-Protein auch therapeutisch für Glioblastome eingesetzt werden könnte. Eventuelle toxische Nebenwirkungen von rhHMGB1 müssen jedoch sehr gründlich untersucht werden, da HMGB1 deutliche Effekte auf Entzündungsprozesse haben kann. Zukünftige Studien werden im Detail untersuchen, welche Möglichkeiten und Limitierungen mit einer experimentellen Therapie von Glioblastomen mit rhHMGB1 verbunden wären.