

Sebastian Luger

Dr. med.

## **Durch Hypoxie induziertes *N-myc downstream regulated gene 1* in Glioblastomen**

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Wolfgang Wick

Gliome stellen die am häufigsten vorkommenden primären malignen Hirntumore dar. Sie machen ca. ein Drittel aller Neoplasien im zentralen Nervensystem aus. Maligne Gliome sind zumeist aggressiv wachsende Neoplasien, welche dazu tendieren, das umliegende Hirngewebe zu infiltrieren. Die Therapiemöglichkeiten umfassen Operationen, strahlentherapeutische Interventionen und die Applikation von Chemotherapeutika. Trotz dieser multimodalen Behandlungsoptionen ist die Prognose vor allem für PatientInnen mit höhergradigen Gliomen nach wie vor infaust. Die Therapie wird meist unter palliativen und symptomlindernden Gesichtspunkten durchgeführt.

Eine Vielzahl molekulargenetischer Pfade verhilft malignen Gliomen zu *Escape-Mechanismen*, die zur Therapieresistenz führen. Es ist daher konsequent, Anstrengungen auf die Erforschung der Biologie maligner Gliome zu verwenden, um deren Wachstumsverhalten besser zu verstehen, vor allem im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapeutika für das klinische Umfeld.

Eine typische Eigenschaft maligner Gliome, vor allem der Glioblastome, ist deren schnelles Wachstumsverhalten. Die Vaskularisierung des Tumors verläuft häufig langsamer als die rasche Tumorzellproliferation. Die hierdurch vergrößerte Diffusionsstrecke vom Gefäß zum Gewebe resultiert in Nährstoff- und vor allem Sauerstoffknappheit im Tumor und führt zu Tumornekrosen und reaktiv zu ungeordneten mikrovaskulären Proliferaten. Die Hypoxie im Tumormikromilieu resultiert in der Induktion von transkriptionellen Programmen, die als zelluläre Stressreaktion in Adaptionsmechanismen münden. *N-myc downstream regulated gene 1* (NDRG1) ist ein intrazelluläres Protein und wird in unterschiedlichen Tumorentitäten Hypoxie abhängig induziert. Die Expression von NDRG1 ist vergesellschaftet mit der Regulation zellulären Wachstums und Differenzierung und hat Effekte auf die Metastasierung von Tumoren.

Die vorliegende experimentelle Arbeit untersucht die durch Hypoxie induzierte NDRG1 Genexpression in verschiedenen malignen Gliomzelllinien auf Proteinebene. Des Weiteren wird die hypoxisch vermittelte NDRG1 Expression in den primären malignen Gliomzellen, in Glioblastom-initiierenden Zellen und nicht-neoplastischen Astrozyten studiert. Die Western Blot Analysen ergaben eine gesteigerte NDRG1 Expression nach 24h, 48h und 72h Hypoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrolle in allen untersuchten malignen Gliomzelllinien. In der nicht-neoplastischen Astrozytenzelllinie SV-FHAS wird NDRG1 auf Proteinebene unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls vermehrt exprimiert, jedoch in geringfügigerem Ausmaß als in den neoplastischen Zelllinien. Auch in den primären Gliomzellen zeigte sich nach 72h hypoxischer Inkubation eine deutliche NDRG1 Expressionssteigerung im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch war die NDRG1 Expression in primären Glioblastom-initiierenden Zellen, die in Neuralstammzellmedium kultiviert wurden, unter normoxischer Inkubation zwar detektierbar, jedoch durch Hypoxie nicht verstärkt induzierbar. Darüber hinaus zeigte sich in p53 Knock-Down Gliomtransfektanten die Hypoxie vermittelte NDRG1 Induktion potentiell abhängig von HIF-1, jedoch unabhängig von p53. Um ein Werkzeug für weiterführende funktionelle Analysen zu generieren, wurden stabile shRNS vermittelte NDRG1 Knock-Down Sublinien hergestellt und deren Knock-Down Effizienz sowohl auf RNS- als auch auf Proteinebene überprüft. Mit den NDRG1 Knock-Down Zellen wurden Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt, die eine zytoplasmatische Lokalisation von NDRG1 zeigten und unter hypoxischen Bedingungen eine Assoziation mit der Zellmembran nahe legen. Klonogenitätsassays dienten zur weiteren funktionellen Analyse und zeigten eine signifikante Steigerung des klonogenen Überlebens in den NDRG1 Knock-Down transgenen Linien unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen im Vergleich zu den Kontrollzellen. In der Zusammenschau spricht die stabile Induktion von NDRG1 in der Vielzahl von Gliomzelllinien und primären Gliomzellen für einen stark konservierten Effekt mit wahrscheinlich hoher Relevanz auch *in vivo*. Die Assoziation von NDRG1 mit der Zellmembran, im Besonderen unter hypoxischen Bedingungen legt eine Beteiligung an Interaktionen mit Zelladhäsionskomplexen nahe. Darüber hinaus scheint NDRG1 das klonogene Überleben maligner Gliomzellen unter hypoxischen Wachstumsbedingungen zu inhibieren. Und schließlich lässt das Fehlen der hypoxischen NDRG1 Induktion in undifferenzierten primären Glioblastom-initiierenden Zellen an Effekte in der Zelldifferenzierung denken.