

Huy Philip Dao Trong

Dr. med.

## **Die Bedeutung von Sauerstoff und reaktiven Sauerstoffspezies für Glioblastomstammzellen**

Promotionsfach: Neurochirurgie

Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. Christel Herold-Mende

Die Tumorstammzellforschung gehört derzeit zu den viel versprechenden Forschungsgebieten der Krebsforschung. Vor allem im hochmalignen Glioblastom wird angenommen, dass Tumorstammzellen maßgeblich zur Ausbildung von Resistenzen gegen adjuvante Therapien beitragen. Die Erkenntnis, dass Hypoxie, d.h. niedrige Sauerstoffkonzentration, wie sie typischerweise in schnell wachsenden Tumoren entsteht, einen wesentlichen Beitrag zur Ausbildung des Tumorstammzellphänotyps leistet, unterstützt die Notwendigkeit mehr über die dafür verantwortlichen Mechanismen zu lernen. Auch die mit dem Sauerstoffmetabolismus eng verknüpfte Verstoffwechslung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sollte näher betrachtet werden. Als unmittelbare Stoffwechselnebenprodukte des Sauerstoffs scheinen auch diese Moleküle einen Beitrag zu der Ausbildung des Tumorstammzellphänotyps zu leisten. Mit dem Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen und über die Wirkung von Sauerstoff, könnten sich bessere Therapien zur Behandlung des Glioblastoms entwickeln lassen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte dieses Themengebietes erarbeitet. Schwerpunkte lagen einerseits auf dem Stellenwert hypoxischer Bedingungen für die Unreife von Glioblastomzellen und andererseits auf der Rolle von ROS in der Tumorstammzellbiologie. Dazu sollte eingangs geklärt werden wie und warum Glioblastomstammzellen (GSZ) auf Hypoxie reagieren und wie Hypoxie die Differenzierbarkeit von GSZ beeinflusst. Da das Sauerstoffangebot unmittelbar mit der ROS Stoffwechsellage zusammenhängt, stellte sich die Frage welche Funktion ROS in GSZ haben könnte und wie sie auf Differenzierung reagieren würden. Um diese Fragen

beantworten zu können wurden in der Arbeitsgruppe etablierte und gut charakterisierte Glioblastomstammzelllinien als Modelle verwendet. Unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen und differenzierenden Reizen wurden Änderungen der Expression von Tumorstammzellmarkern und Mitochondrienparametern mithilfe von durchflusszytometrischen Messungen quantifiziert. Für Messungen auf mRNA Ebene verwendeten wir semiquantitative qPCR Messungen und mithilfe von bereits zu unseren Zellmodellen publizierten Expressionsdaten konnten wir Änderungen von Enzymexpressionsmustern des ROS Stoffwechsels auf Genomebene analysieren.

Unter hypoxischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Proteinen, die mit der Unreife von Tumorzellen einhergehen wie, z.B. die Tumorstammzellmarker CD133 und Nestin, hochreguliert werden, während der Differenzierungsmarker GFAP eine abnehmende Expression zeigt. Insbesondere die selektive Expression von CD133 gab Grund zur Annahme, dass sich GSZ in ihrem Verhalten gegenüber Sauerstoff grundlegend von ihren reiferen Tochterzellen unterscheiden. Um den ursächlichen Mechanismus besser zu verstehen wurden die mRNA Konzentrationen von HIF1- $\alpha$ , einem sauerstoffregulierten Transkriptionsfaktor, mittels semiquantitativer PCR in 17 Glioblastomgeweben den Stammzellmarkern Nestin und CD133 gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass Nestin und HIF1- $\alpha$  eine positive Korrelation aufwiesen, was auf einen Zusammenhang zwischen der Unreife der Tumorzelle und deren Reaktion auf Sauerstoff hinweist. Weiterhin wurde untersucht, wie sich Hypoxie auf die Differenzierbarkeit von GSZ auswirkt. Dazu behandelten wir diese mit dem differenzierenden Agens All-trans Retinolsäure (ATRA) unter hypoxischen Bedingungen und beobachteten, dass deren Differenzierung schwächer ausfiel als unter normaler Sauerstoffkonzentration. Interessanterweise gab es keine Korrelation zwischen der CD133 Expression und der ROS Konzentration. Auch eine Regulation der CD133 Expression durch exogen zugeführte ROS (Wasserstoffperoxid) konnte ausgeschlossen werden. Einzig allein die Differenzierung mit ATRA erhöhte die ROS Spiegel. Weitergehende Analysen zur ROS Metabolisierung beinhalteten genombasierte Expressionsanalysen ROS-metabolisierender Enzyme sowie der Mitochondrien, Hauptproduzenten von ROS. Auf mitochondrialer Ebene konnte gezeigt werden, dass GSZ ein signifikant höheres Mitochondrienmembranpotential aufweisen, als

Nichttumorstammzellen. In weitergehenden Untersuchungen konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen CD133 Expression und Mitochondrienmembranpotential bzw. -menge gefunden werden. Abschließende Untersuchungen zur Mitochondrienfunktion vor und nach Differenzierung zeigten entgegen unserer Eingangshypothese eine paradoxe Abnahme der Mitochondrienfunktion nach Differenzierung.

Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen, dass niedrige Sauerstoffkonzentrationen einen stammzellfördernden Effekt haben und dass die Differenzierungsfähigkeit von GSZ unter hypoxischen Bedingungen wesentlich beeinträchtigt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass reaktive Sauerstoffspezies und Mitochondrien zwar durch Differenzierung reguliert werden, jedoch keine aktive Rolle in der Ausbildung des Stammzellphänotyps spielen. Somit untermauern diese Ergebnisse den Stellenwert von hypoxischen Bedingungen in der Tumorstammzellbiologie und deren Einfluss auf die Differenzierung von Tumorzellen.