

Aline Baader

Dr. med.

Charakterisierung einer Zellhierarchie in Glioblastomen mit Hilfe eines Kollagenmatrix-basierten Klonogenitätsassays

Promotionsfach: Neurochirurgie

Doktormutter: Prof. Dr. rer.nat. C. Herold-Mende

Die Tumorstammzellhypothese hat wesentlich zum Verständnis maligner Krebserkrankungen beigetragen. Sie postuliert, dass Krebszellen im Sinne einer Hierarchie miteinander vernetzt sind und eine unreife Population von sogenannten Tumorstammzellen durch erhöhte Selbsterneuerungsfähigkeit und Bildung von reiferen Tochterzellen zur Aufrechterhaltung des Tumors in der Lage ist. Die vorliegende Arbeit ist mit der Hoffnung verknüpft Tumorzellen mit erhöhter Selbsterneuerungsfähigkeit mittels eines Marker-unabhängigen Verfahrens nachzuweisen und zu charakterisieren. Hierfür wurde eine kürzlich beschriebene Methode zur Kultivierung und Beobachtung neuraler Stammzellen auf Glioblastomzelllinien angewendet: Der Neural Colony Forming Cell Assay (NCFCA) ermöglichte es, in eine Kollagenmatrix eingebettete Glioblastomzellen über längere Zeiträume zu beobachten und funktionelle Untersuchungen durchzuführen.

Insgesamt wurden für diese Arbeit 21 verschiedene Glioblastomstammzellkulturen im NCFCA auf ihre Selbsterneuerungsfähigkeit (Klonogenität) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese unter Standardbedingungen ähnlich wachsenden Zelllinien sich in Bezug auf ihre Klonogenität im NCFCA deutlich unterschieden. So konnte ein 324-facher Unterschied in der Klonogenitätsrate zwischen der Zelllinie mit der niedrigsten und der mit der höchsten Selbsterneuerungsfähigkeit nachgewiesen werden. Diese Heterogenität war jedoch unabhängig von Zelltod - mittels PI-Inkorporation ermittelt - oder Proliferationsgeschwindigkeit. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass einige Glioblastomzelllinien eine Klonogenität von bis zu 16% aufwiesen, im Gegensatz zu neuralen Stammzellen mit durchschnittlich 2-3%. Weiterhin wurde eine signifikante Assoziation zwischen erhöhter Klonogenität und dem Gesamtüberleben von Glioblastompatienten ermittelt. Durch den Vergleich der Überlebensdaten von Patienten mit den Klonogenitätswerten der zugehörigen

Glioblastomzelllinien konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher Klonogenität und schlechtem Gesamtüberleben nachgewiesen werden ($p=0.017$). So lag der Anteil der Patienten, die nach Diagnosestellung lediglich 10 Monate überlebten, in der Gruppe der hoch klonogenen Zelllinien bei 80% im Vergleich zu 18,6% in der Gruppe der niedrig klonogenen Zelllinien.

Im Rahmen von Replattierungsexperimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die erhöhte Selbsterneuerungsfähigkeit nicht auf einzelne Zellen innerhalb einer Zelllinie zurückzuführen ist. Vielmehr zeigten Glioblastomzellen eine robuste, zelllinienspezifische Hierarchie in Bezug auf ihre Selbsterneuerungsfähigkeit auf und schienen im Vergleich zu normalen neuronalen Stammzellen eine erhöhte Frequenz an Zellteilungen aufzuweisen, bei denen die Selbsterneuerungsfähigkeit gleichermaßen auf beide Tochterzellen übertragen wird. Diese Hypothese konnte im zweiten Teil der Arbeit untermauert werden. Anhand von Färbungsexperimenten mit dem un-toxischen, stabilen Membranfarbstoff Dil, konnte das Wachstums- und Teilungsverhalten zuvor identifizierter, aggressiver Glioblastomzelllinien über längere Zeiträume beobachtet werden. Es zeigte sich, dass einige Tumorzellen im Zellverband bereits nach wenigen Zellteilungen in einen Ruhezustand übergehen und dass dieses Teilungsmuster im Sinne einer Zellhierarchie konstant bleibt.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse beschreiben den NCFCA als ein sensitives und Marker-unabhängiges Verfahren zur Identifizierung von aggressiven Glioblastomzelllinien mit erhöhtem Selbsterneuerungspotential. Die Erkenntnisse dieser Arbeit liefern somit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Tumorstammzelltheorie in Glioblastomen.