

Kristina Maria Gassel
Dr. med.

Untersuchung der Regulationsmechanismen therapieresistenter Schläferzellen in Glioblastomen

Fach: Neurochirurgie
Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Christel Herold-Mende

In den letzten Jahre konnten sog. Tumorstammzellen (TSZ) in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden. TSZ entsprechen einer kleinen Population langsam wachsender Tumorzellen, die schneller wachsende Tochterzellen erzeugen können. Diese wiederum bilden die Haupttumormasse. TSZ in Gliomen, sog. Hirntumorstammzellen (HTSZ), konnten in Kultur als eine hoch tumorigene und therapieresistente Tumorsubpopulation charakterisiert werden. Der TSZ-Theorie zufolge bestimmen z.B. CD133-positive HTSZ in Gliomen den Krankheitsverlauf und beeinflussen somit substantiell das Gesamtüberleben. In Vorarbeiten zeigte sich, dass einige Tumorzellen im Zellverband bereits nach wenigen Zellteilungen in einen Ruhezustand übergehen können, und dass dieses Teilungsmuster im Sinne einer charakteristischen Zellhierarchie über die Zeit konstant ist. Ein genaueres Verständnis dieses Ruhezustandes einerseits und andererseits die Vermittlung des asymmetrischen Teilungsmusters sowie dessen klinische Relevanz waren Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die erwähnten ruhenden Zellen waren von besonderem Interesse, da sie in Vorarbeiten eine Therapieresistenz zeigten und somit für die hohe Rezidivrate in Glioblastomen verantwortlich sein könnten. Zur Charakterisierung und Isolierung der ruhenden Zellpopulation wurde in der vorliegenden Arbeit die sog. Label-Retention-Methode verwendet. Diese Methode erlaubt eine direkte Identifizierung der ruhenden bzw. langsam proliferierenden Stammzellen anhand ihrer Farbstoffretention. Anhand von Kokultivierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass ruhende label-retaining Zellen in ihrem Wachstum signifikant gehemmt wurden, wenn sie mit der proliferierenden Zellfraktion in Kultur gebracht wurden. Diese Hemmung war am stärksten ausgeprägt bei direktem Zell-Zell-Kontakt der beiden Zellpopulationen, aber auch in abgeschwächter Form durch parakrine Moleküle möglich. Um die zwei verschiedenen Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Differenzierung zu charakterisieren, wurden Färbungen mit Antikörpern gegen GFAP und NESTIN durchgeführt. NESTIN war dabei in den proliferationsaktiven Zellen stärker als in den ruhenden Zellen exprimiert. Um mögliche Faktoren zu identifizieren, die an der Vermittlung des Ruhezustandes und der damit einhergehenden asymmetrischen Teilung beteiligt sind, wurden weiter verschiedene Proteine untersucht, die an der Regulation des Zellzyklus und der Selbsterneuerung beteiligt sind. Hierbei konnte in den proliferierenden Zellen im Vergleich mit den ruhenden/ label-retaining Zellen eine höhere Expression von NOTCH1 und SMAD3 sowie von HES6 nachgewiesen werden. Damit konnte erstmals auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass in label-retaining ruhenden Tumorzellen im Vergleich mit der proliferierenden Stammzellfraktion zellzyklusaktivierende Proteine herunterreguliert sind. Desweiteren wurde eine Überexpression von p53 in den proliferierenden TSZ gefunden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass p53 als bekanntes und auch in soliden Tumoren häufig mutiertes Tumorsuppressorgen auch an der Regulation von Gliom-TSZ beteiligt ist. Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine Analyse zur klinischen Relevanz der untersuchten Signalwege angeschlossen. Bei der Überlebensanalyse von 419 Patienten der TCGA-Datenbank und von 85 Patienten eines

eigenen Validierungskollektivs zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen einer hohen Expression von TP53BP2 mit einem verbesserten Überleben. Die übrigen untersuchten Moleküle NOTCH1, GFAP, SMAD3, p53 zeigten keine signifikante Überlebenskorrelation. Diese Daten stellen eine Verbindung her zwischen p53 in den label-retaining Zellen und dem klinischen Verlauf von Gliomen.

In der vorliegenden Arbeit konnten label-retaining Tumorstammzellen isoliert und auf funktioneller sowie Protein-Ebene charakterisiert werden. Ein Bezug zu klinischen Krankheitsverläufen konnte hergestellt werden. Eine weitere molekulare Charakterisierung von Label-Retention erscheint hinsichtlich der klinischen Relevanz somit sinnvoll.