

Tilman Georg Rudolph Schneider  
Dr. med.

## **In-vitro-Charakterisierung von Glioblastomstammzellen anhand von funktionellen und molekularen Kriterien**

Fach/Einrichtung: Neurochirurgie

Doktormutter: Prof. Dr. Christel Herold-Mende

Glioblastome gehören zu den aggressivsten Tumoren. Der aktuelle Therapiestandard besteht aus der chirurgischen Resektion in Kombination mit einer postoperativen Radio-Chemotherapie. Trotz dieser aufwendigen Therapie kommt es in nahezu 100% der Fälle zum Rezidiv, welches innerhalb weniger Monate zum Tod des Patienten führt. Aggressives Wachstum und hohe Rezidivraten konnten in den letzten Jahren mit dem Vorhandensein einer Subpopulation unreifer und therapieresistenter Tumorzellen, sogenannter Tumorstammzellen (TSZ), in Zusammenhang gebracht werden.

Genau wie somatische Stammzellen zeichnen sich TSZ durch bestimmte Eigenschaften aus: Sie gelten als langsam proliferierende, z. T. ruhende Zellen mit der Fähigkeit, je nach Umgebungsreiz neues Wachstum anzustoßen und weiter differenzierte, schnell wachsende Tochterzellen zu bilden.

Bisher wurden mehrere TSZ-Marker gefunden, welche unterschiedliche Subpopulationen innerhalb der heterogenen Tumorzellmasse zu kennzeichnen scheinen, ohne eine einheitliche Identifikation aller TSZ zu ermöglichen. Es besteht also die Notwendigkeit, TSZ in Glioblastomen anhand neuer, markerunabhängiger Verfahren zu identifizieren.

Eine Methode, die bereits erfolgreich eingesetzt werden konnte, um Stammzellen in somatischem Gewebe aufgrund ihres langsamen Wachstums zu identifizieren, ist die Label-Retention-Methode.

Mithilfe lipophiler Farbstoffe, die Zellen gleichmäßig färben und bei Zellteilung auf die neu entstehenden Tochterzellen verteilt werden, können ruhende bzw. langsam proliferierende Zellen von sich schnell teilenden Zellen unterschieden werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Glioblastomzellen mit lipophilen Farbstoffen wie z.B. PKH-26<sup>®</sup> anfärben lassen und dass das Teilungsverhalten anhand des Verlustes von Farbstoff im Sinne der Label-Retention-Methode nachvollzogen werden kann. Langsam wachsende bzw. ruhende Zellen verbleiben als intensiv gefärbte Label-Retaining-Zellen (LRZ), während schnell wachsende Zellen durch die höhere Zellteilungsrate ungefärbt, als nicht-LRZ, abgrenzbar werden.

Dieser Nachweis verschiedener Raten von LRZ gelang in Zelllinien mit unterschiedlichem Wachstumsverhalten. So konnten in dieser Arbeit der Vergleich des Wachstumsverhaltens verschiedener Zelllinien und Raten von LRZ in diesen Zelllinien zeigen, dass die Rate der LRZ invers mit der Wachstumsrate korreliert.

Durch Immunfluoreszenz-Färbung von Tumorzellsphäroiden (klonalen Tumorzellpopulationen) konnte ein hierarchischer Aufbau der Zellpopulation bestätigt werden. Die klonal entstandenen Sphäroide, Zellpopulationen gleichen Ursprungs, zeigten ein zelllinienspezifisches Wachstumsmuster.

In unterschiedlichen Zelllinien konnte ein Nebeneinander an differenzierten, undifferenzierten, sterbenden und proliferierenden Zellen gezeigt werden. Die Untersuchung der Häufigkeitsverteilung dieser Zellen zeigte, dass im Sinne einer Hierarchie in einer Zelllinie feste, über verschiedene Wachstumsstadien gleichbleibende Häufigkeitsverteilungen nachgewiesen werden konnten.

Große Sphäroide, ältere Zellpopulationen bestehend aus mehreren tausend Zellen, zeigten im Sinne einer Hierarchie das gleiche Verteilungsmuster wie kleine Sphäroide, jüngere Sphäroide also, bestehend aus wenigen hundert Zellen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass sich die beschriebene Hierarchie bereits sehr früh etabliert.

Neben der Darstellung des Teilungsverhaltens und der Wachstumsrate bestätigten die Untersuchungen der LRZ ein zelllinienspezifisches hierarchisches Wachstum der Zellen. So konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass in verschiedenen Zelllinien eine reproduzierbare, spezifische Rate an LRZ auftritt. Diese Rate war unabhängig vom verwendeten Farbstoff.

Um zu zeigen, dass es sich bei den LRZ um eine vitale Subpopulation handelt, wurde der Anteil sterbender Zellen in LRZ im Vergleich zu nicht-LRZ bestimmt. Mithilfe des TUNEL<sup>®</sup>-Protokolls wurden apoptotische Zellen markiert, um deren Anteil an der gesamten Population zu bestimmen. Es zeigte sich, dass der Großteil der LRZ eine vitale, nicht apoptotische Zellpopulation darstellt.

In aufwendigen Reaktivierungsversuchen konnte durch die Eliminierung umgebender Zellen eine entscheidende Fähigkeit der LRZ aufgedeckt werden. Die LRZ waren in der Lage, erneut zu proliferieren und eine völlig neue heterogene Zellpopulation im Sinne eines Rezidivs aufzubauen.

Daraus wurde geschlussfolgert, dass die LRZ höchstwahrscheinlich durch die umgebenden Zellen in ihrem Ruhezustand gehalten werden.

In der Hoffnung, die molekularen Grundlagen für den Ruhezustand von LRZ zu identifizieren, wurden LRZ und korrespondierende nicht-LRZ isoliert und einer genomweiten mRNA-Expressionsanalyse mittels Microarray unterzogen.

Dieser Vergleich lieferte 63 signifikant differentiell exprimierte Gene, von welchen mehrere mit der Zellzykluskontrolle assoziiert werden konnten. Die Gene RN7SK, TP53BP2, die mit Zellzyklusarrest assoziiert sind, wurden in ruhenden LRZ stärker exprimiert. CDCA8, MYB, SF3B2 und E2F3, die mit Proliferation assoziiert sind, wurden hingegen in LRZ schwächer exprimiert.

Die vorliegende Arbeit legt nahe, dass LRCs eine wesentliche Rolle bei der Therapieresistenz von Glioblastomen sowie bei der Entstehung von Rezidivtumoren spielen und bietet einen Ausgangspunkt für weiterführende mechanistische Untersuchungen.