

Sarah Christina Weisang

Dr. med.

Untersuchung der molekularen Grundlagen der Retinolsäureresistenz bei Glioblastomen

Fach/Einrichtung: Neurochirurgie

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

Glioblastome als entdifferenzierte und aggressive Gehirntumoren haben trotz therapeutischer Fortschritte der letzten Jahre weiterhin eine ausgesprochen schlechte Prognose. Retinolsäure als differenzierend wirkende Substanz ist insbesondere in der Therapie bestimmter hämatologischer Erkrankungen bereits seit geraumer Zeit erfolgreich etabliert. Jedoch erbrachte sie bislang in der Behandlung von Glioblastomen wie auch anderen soliden Tumorerkrankungen nicht die erhofften klinischen Erfolge, sodass ihr therapeutischer Einsatz weiterhin limitiert ist. In den letzten Jahren konnten sowohl Störungen des Retinolsäure-Stoffwechsels als auch in deren Wirkungen in einigen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Diese Veränderungen stellen potentielle Resistenzmechanismen gegenüber Retinolsäure und somit Erklärungsansätze für ein fehlendes klinisches Ansprechen dar. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe an einem Glioblastomgewebe-Kollektiv wiesen eine stark reduzierte Konzentration an all-trans Retinolsäure (ATRA) in der Mehrheit der Gewebe, die demzufolge in ATRA^{high}- und ATRA^{low}-Gewebe eingeteilt wurden, nach und brachten dies mit Veränderungen des Retinolsäurestoffwechsels in Verbindung. Aus diesen Erkenntnissen wurde die Hypothese abgeleitet, dass eine Verminderung der intrazellulären Retinolsäurekonzentration zu dauerhaften Veränderungen innerhalb von Glioblastomzellen führt und in der Folge das Ansprechen auf ATRA substanziiell vermindert wird. Eine genauere Untersuchung der Sensitivität von Glioblastomzellen gegenüber ATRA einerseits und andererseits die Identifizierung der molekularen Grundlagen einer bestehenden Resistenz sowie deren medikamentöse Beeinflussbarkeit waren Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Zunächst ließ sich im Vergleich von drei Glioblastom- mit einer humanen Astrozytenzellkultur eine Induktion der mRNA-Expression der Retinolsäurerezeptoren RARA und RARB sowie eine Abnahme der Zellproliferation durch die Behandlung mit 1 µl ATRA nur bei den Astrozyten erzielen. Im Gegenteil wiesen zwei der drei Tumorzelllinien sogar einen signifikanten Anstieg des Zellwachstums durch ATRA-Gabe auf. Diese Ergebnisse sprachen für eine Resistenz gegenüber den differenzierenden Effekten von ATRA aller drei Glioblastomzelllinien unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zu ATRA^{high} beziehungsweise ATRA^{low} verglichen mit Astrozyten. Um die möglichen Grundlagen einer ATRA-Resistenz in Glioblastomen umfassend zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig Veränderungen genomischer und nichtgenomischer Wirkungen von ATRA mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) sowie Sandwichimmunoassay sowohl an Geweben als auch an daraus etablierten Zellkulturen erhoben. Da ein ungünstiges Verhältnis der beiden Transportproteine CRABP2 und FABP5 mit einer konsekutiven Überaktivierung von PPAR δ bereits als Resistenzmechanismus beschrieben ist, wurde zusätzlich eine Überexpression von FABP5 mittels qRT-PCR sowie eine Beteiligung von PPAR δ mittels eines spezifischen Agonisten als auch Antagonisten ausgeschlossen. Darüber hinaus ist beschrieben, dass epigenetische Veränderungen des RARB-Promotors an der Regulation der ATRA-Sensitivität beteiligt sind. Daher

wurden in dieser Arbeit insgesamt sechs Gewebe auf das Vorhandensein der inaktivierenden H3K27-Dimethylierung und der aktivierenden H3K4-Trimethylierung im Bereich des RARB-Promotors mittels CHIP untersucht. Zwar wiesen ATRA^{low}-Gewebe verglichen mit ATRA^{high}-Geweben eine geringere Aktivierung, jedoch entgegen der eigenen Hypothese keine verstärkte Inaktivierung des RARB-Promotors auf. Dieses Ergebnis legte nahe, dass Glioblastomgewebe in Hinblick auf die RARB-Promotorkonfiguration prinzipiell für ATRA empfänglich sind und sich die Unterschiede in der Promotoraktivierung durch das unterschiedliche ATRA-Angebot erklären. Im letzten Teil dieser Arbeit wurden erstmals in drei Glioblastomzelllinien ATRA-abhängige Aktivitätsveränderungen in verschiedenen Signalwegen simultan getestet und mit Astrozyten verglichen. Hierbei führte eine Behandlung mit ATRA bei Astrozyten im Gegensatz zu den drei Glioblastomzelllinien zu einer signifikanten Abnahme in der Phosphorylierung der drei Enzyme AKT, BAD und GSK3B und legte somit eine gegenläufige Regulation des PI3K/AKT-Signalwegs in maligne veränderten glialen Zellen nahe. Dieser Befund unterstützte die Ergebnisse aus Studien an anderen Tumoren, die eine ATRA-Resistenz mit einer verstärkten Aktivierung dieses Signalwegs in Verbindung bringen konnten. Im Gegensatz zu einigen dieser Untersuchungen gelang in der vorliegenden Arbeit durch die zusätzliche Gabe des PI3K-Inhibitors BKM120 eine Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber ATRA nicht. Zwar wurde durch BKM120 eine Reduktion des Zellwachstums erreicht, jedoch konnte durch die kombinierte Behandlung mit BKM120 und ATRA weder ein zusätzlicher Proliferationsrückgang noch eine Zunahme in der Expression der Rezeptoren RARA und RARB herbeigeführt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Resistenz bei Glioblastomzellen gegenüber einer Behandlung mit ATRA verglichen mit Astrozyten nachgewiesen werden. Hierfür scheinen weder eine Überaktivierung des CRABP2/FABP5-Signalwegs noch epigenetische Veränderungen des RARB-Promotors maßgeblich zu sein, sondern vielmehr nicht-genomische Wirkungen von ATRA eine Rolle zu spielen. Hierbei kommt insbesondere eine verstärkte ATRA-abhängige Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in Betracht.