

Zoltán Gál
Dr. med.

In vitro und in vivo Charakterisierung von Gliomstammzellen

Neurochirurgie
Prof. Dr. rer. nat. Christel Herold-Mende

Seit mehr als 10 Jahren wurden in verschiedenen Tumorentitäten, so auch Gliomen, Tumorstammzellen (TSZ) identifiziert. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese und Therapieresistenz. Eine wichtige Gemeinsamkeit verschiedener TSZ ist die Fähigkeit unter serumfreier Kultivierung zu überleben und unendlich neue Sphäroide bilden zu können. Die intra- und intertumorale Heterogenität sowie die Herkunft dieser Zellen wird jedoch aufgrund sehr variabler Eigenschaften wie der Expression von Stammzellmarkern, Selbsterneuerungsfähigkeit, Tumorigenität, Proliferationsrate und Invasivitätspotenzial kontrovers diskutiert.

Sieben in unserer Arbeitsgruppe etablierte humane Glioblastomstammzelllinien (GSZs) wurden *in vitro* mithilfe des neural-colony forming cell assay (NCFCA) markerunabhängig hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung analysiert und *in vivo* hinsichtlich ihrer Tumorigenität, Invasivität, proliferativen Aktivität und Tumor-induzierten Neoangiogenese. Die *in vivo* Untersuchungen erfolgten für alle GSZ i) nach intracranieller Xenotransplantation mit unterschiedlichen Zellzahlen und verschiedenen Beobachtungszeiträumen in NOD/SCID-Mäusen sowie ii) in Nacktmäusen im Schädelkammermodell mittels intravitaler Mikroskopie. Immunhistochemische und Immunfluoreszenz Analysen erfolgten an postmortem entnommenen tumortragenden Mäusehirnen.

Die Klonogenitätsanalyse mittels NCFCA zeigte sehr unterschiedliche Werte von 0,13 – 18,9%. Basierend darauf wurden die GSZ in niedrig- und hoch-klonogene Kulturen eingeteilt. Hierbei zeigten Typ-I (hoch-klonogene) GSZ ein kompaktes *in vitro* Wachstumsverhalten und konnten durchweg Xenograft-Tumore *in vivo* etablieren. Diese zeigten eine solide Tumormasse mit deutlicher Invasionszone und einen häufigen Befall der Leitungsbahnen bis in die kontralaterale Hemisphäre. Außerdem wiesen sie eine erhöhte Proliferationsrate und ausgeprägte CD133-Expression auf. Die erhöhte Klonogenität war nicht nur mit einem signifikant verkürztem Überleben der xenotransplantierten Tiere sondern auch dem der Ursprungspatienten verbunden.

Die niedrig-klonogenen Typ-II Zellen besaßen zwar die Fähigkeit Tumore zu generieren aber erst bei Erhöhung der implantierten Zellzahl (1×10^6 /Tier) oder nach Verlängerung der Beobachtungsperiode (21-35 Wochen). Sie zeigten eine niedrige CD133-Expression und

bildeten im Mausmodell hochinvasive Tumore. Zumeist fehlte eine kompakte Tumormasse und die Tumorzellen verteilten sich diffus über das ganze Gehirn. Interessanterweise zeigten Typ-II Zelllinien bei Erhöhung der implantierten Zellzahl ein Phänotypshift in Richtung von kompakten, weniger invasiven Tumoren.

Die Untersuchung der Neoangiogenese in der Schädelfensterkammer zeigte dichte und tortuose Gefäßnetzwerke sowohl in Typ-I wie auch in Typ-II GSZ. Diese Gefäßpathologie bestätigte sich auch bei den intrakraniell implantierten Tumoren, die eine histologisch abnorme Gefäßarchitektur aufwiesen und in der MRT Bildgebung als Zeichen einer Bluthirnschrankenstörung Kontrastmittel anreicherten.

In der vorliegenden Arbeit konnten GSZs markerunabhängig subgruppiert werden. Die mittels NCFCA bestimmte Klonogenität zeigte nicht nur eine Auswirkung auf biologische Eigenschaften wie Tumorigenität und Invasivität der GSZ, sondern war auch mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Typ-II Zellen (CD133^{niedrig}) waren auch mit niedriger Zellzahl (1×10^4 /Tier) fähig Tumore zu generieren, was eine deutlich höhere Stammzellfrequenz vermuten lässt als bisher angenommen wurde. Die ausgeprägte Invasivität der Xenograft-Tumore bestätigt, dass GSZ die Ursprungstumore deutlich besser widerspiegeln als konventionelle, nicht invasiv wachsende Linien. Mit den von uns verwendeten GSZ-Linien konnte in ein und demselben Xenograft Invasivität und Neoangiogenese beschrieben werden, was in serumkultivierten Gliomkulturen kaum beobachtet wurde. Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Arbeit war der Einfluss des Studiendesigns auf den Tumorphänotyp. Die oben genannten Invasivitätsunterschiede waren weder im neurosphere assay (NSA), noch im Schädelfensterkammermodell zu beobachten. Diese Ergebnisse geben somit Hinweise auf die invasions- und tumormodulierende Rolle der Extrazellulärmatrix, die mithilfe von NCFCA und orthotoper Implantation deutlich gemacht werden konnte.

Die in dieser Arbeit beschriebenen funktionellen Unterschiede der Gliomstammzellsubtypen öffnen den Weg für weitere molekularbiologische Fragestellungen, die die Grundlage für neue Therapieansätze darstellen.