

Erik Jung
Dr.med.

„Tumor microtubes“ als Resistenz- und Invasionsmechanismus in malignen Gliomen – Molekulare Schlüsselmechanismen und *in vivo* Charakterisierung

Fach/Einrichtung: DKFZ
Doktorvater: Prof. Dr. med. Frank Winkler

Maligne Gliome, allen voran das hochmaligne Glioblastom, sind zwar seltene, aber aktuell aufgrund ihres diffusen Wachstums und ihrer hohen Therapieresistenz trotz der Kombination von Operation, Chemo- und Radiotherapie unheilbare Tumorerkrankungen. Da eine Eskalation der konventionellen Therapie aufgrund einer damit verbundenen Schädigung des Hirnparenchyms kaum noch möglich erscheint, sind spezifischere Therapieansätze vonnöten.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert dünne (<2,5 Mikrometer) und bis zu mindestens mehreren Hundert Mikrometern lange Zellausläufer, die als „tumor microtubes“ bezeichnet wurden, als neuartigen Mechanismus der Hirnkolonisation und Therapieresistenz. Die Untersuchungen erfolgten hauptsächlich mittels longitudinaler intravitale Zweiphotonenmikroskopie von im Mausgehirn wachsenden humanen Gliomzellen, wodurch nicht nur morphologische, sondern auch dynamisch-funktionelle Studien auf Einzelzellebene möglich waren. So konnte gezeigt werden, dass eine Form von tumor microtubes als Leitstruktur bei der Tumorzellinvasion und somit der diffusen Besiedlung des Hirnparenchyms dient, welche eine vollständige operative Entfernung unmöglich macht. Ein anderer Subtyp führt zur Bildung eines synzytialen Netzwerkes, welches, nicht unähnlich der neurogenen Reaktion auf einen Hirnparenchymschaden, die Fähigkeit zur Selbstreparatur nach Tötung einzelner Mitglieder besitzt. Zellen, die Teil dieses Netzwerkes sind, sind außerdem vor den Folgen einer zytotoxischen Radiotherapie geschützt, sodass die Netzwerkintegration als neuartiger Resistenzmechanismus postuliert wird. Innerhalb des Netzwerkes ermöglichen auf Connexin 43 basierende Gap Junctions den Austausch von Informationen in Form von interzellulären Kalziumwellen, welche unter physiologischen Bedingungen diverse zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung regulieren. Eine Runterregulation dieses Connexins senkt hingegen die Strahlenresistenz, wobei die Pufferung von apoptoseinduzierenden Kalziumerhöhungen oder reaktiven Sauerstoffspezies potenzielle Mechanismen darstellen, welche vernetzte Zellen vor den Folgen einer Radiotherapie schützen.

Als strukturelle Komponenten der tumor microtubes wurden die an der Neuro- und Neuritogenese beteiligten Proteine Tweety-homolog 1 und Growth-associated protein 43 identifiziert, was auf die Ausnutzung von an der physiologischen Hirnentwicklung beteiligter Mechanismen hindeutet. Ihre nach aktuellem Wissen begrenzte Bedeutung im adulten Gehirn lässt sie als aussichtsreiche therapeutische Zielstrukturen erscheinen. Knockdown-Studien zeigten, dass Tweety-homolog 1, womöglich aufgrund seiner Eigenschaften als Chloridkanal, für die Funktion invasiver tumor microtubes von Bedeutung ist und die diffuse Hirnkolonisation durch seine Runterregulation gehemmt werden kann. Growth-associated protein 43, welches in tumor microtubes wie in aussprossenden Axonen an den wachstumskegelartigen Spitzen konzentriert vorliegt, ist hingegen sowohl an der Bildung invasiver als auch interkonnektierender tumor microtubes beteiligt, sodass seine Hemmung zusätzlich die durch das Netzwerk vermittelte Therapieresistenz senkt.

Auch Gefäßen sowie der perivaskulären Nische wird eine wichtige Rolle bei der Tumorzellinvasion und, womöglich aufgrund der Beherrschung von Krebsstammzellen, bei der Therapieresistenz zugesprochen. Die *in vivo*-Untersuchungen zeigten, dass Gefäße tumor microtubes als Ansatzpunkte dienen und somit die schnelle sowie im Vergleich zur Invasion

entlang eines Gefäßes effektivere, parenchymale Invasion ermöglichen. Longitudinale Untersuchungen ergaben weiterhin, dass ein Teil der perivaskulären Zellpopulation langfristig ortsständig bleibt, wohingegen andere Zellen invadieren und dabei dynamisch zwischen perivaskulärem und parenchymalem Kompartiment wechseln. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass gefäßassoziierte Zellen, unabhängig von Verbindungen zu anderen Zellen, vor den Folgen einer Strahlentherapie geschützt sind. Eine Runterregulation des Notch1-Signalweges, der unter physiologischen Bedingungen einerseits den Erhalt der neuronalen Stammzellnische und andererseits die Neuritenbildung reguliert, führt zwar zur Depletion dieser resistenten Zellpopulation, bewirkt jedoch gleichzeitig die Erhöhung des interzellulären Vernetzungsgrades und somit der Resistenz der übrigen Zellen, sodass derartige Therapieansätze wenig erfolgversprechend erscheinen.

Die Arbeit präsentiert außerdem neue Erkenntnisse bezüglich der ausgeprägten intratumoralen Heterogenität mit 1) verbundenen und unverbundenen, 2) invadierenden und residenten, 3) perivaskulären und parenchymalen Zellen sowie 4) invasiven und interkonnektierenden tumor microtubes. Sie charakterisiert des Weiteren multiple Parallelen der Gliombiologie zur Neurogenese, sodass eine Rekapitulation neurogener Prozesse und Programme als Ursache der biologischen und klinischen Eigenschaften von Gliomen postuliert wird.

Aufgrund des translationalen Ansatzes werden durch die Charakterisierung von tumor microtubes neue Ansätze zur Therapie von Gliomen vorgeschlagen, die derzeit zum Teil bereits weiter untersucht werden: 1) Hemmung der diffusen Infiltration und Hirnkolonisation durch Hemmung der Bildung und Funktion invasiver tumor microtubes [z. B. durch Hemmung von Tweety-homolog 1]; 2) Hemmung der Bildung interkonnektierender tumor microtubes [z. B. durch Hemmung von Growth-associated protein 43]; 3) Destabilisierung bestehender tumor microtubes [z. B. durch Störung von Zytoskelettelementen oder Adhärenzmolekülen]; 4) Störung der Netzwerkfunktion und des Informationsaustausches [z. B. durch Hemmung von Gap Junctions oder Kalziumwellen]; 5) Ausnutzung des Netzwerkes zur Verteilung wachstumshemmender oder zytotoxischer Therapeutika.