Dr. med.

Wnt-Aktivierung in Glioblastomen

Geboren am 19.02.1975 in Schwäbisch Hall Staats-Examen am 02.06.2003

Promotionsfach: Neurochirurgie

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

Glioblastome stellen gleichzeitig die häufigsten wie auch die bösartigsten hirneigenen Tumore des Menschen dar. Sie sind durch eine hohe Invasivität sowie eine hohe Proliferationsfähigkeit gekennzeichnet. Zum Erwerb dieser Eigenschaften ist eine Aktivierung Invasions- und Proliferations-regulierender Gene notwendig.

Durch den wnt-Signalweg wird eine Vielzahl solcher Gene kontrolliert. Wnt-Aktivierung im adulten Gewebe führt zu gesteigerter Proliferation, epithelial-mesenchymaler Transformation und letztendlich zur onkogenen Transformation. Hauptüberträger des wnt-Signals von der Zellmembran in den Zellkern ist β-Catenin, dessen subzelluläre Lokalisation und Degradation straff kontrolliert ist. In Abwesenheit des wnt-Signals liegt β-Catenin an der Membran im Komplex mit Cadherinen vor, während cytoplasmatisches β-Catenin durch einen Degradationskomplex, der unter anderem die Phosphokinase GSK3β, den Tumorsuppressor APC sowie das Scaffold-Protein Axin enthält, zum Abbau durch das Ubiquitin-Proteasomensystem markiert wird. Wnt-Aktivierung führt zu cytoplasmatischer Stabilisierung Zellkern und nukleärer Translokation **β**-Catenins. Im wird durch einen Transaktivatorkomplex aus β-Catenin und Transkriptionfaktoren der LEF/TCF-Familie die Transkription wnt-abhängiger Gene beeinflusst.

An Kurzzeitkulturen maligner Glioblastome (n=15) wiesen wir eine cytoplasmatische Stabilisierung β-Catenins in einem hohen Prozentsatz der Kulturen (87%) durch Westernblot subzellulärer Fraktionen nach. Abgesehen von wenigen immunhistochemischen Arbeiten zu diesem Thema (Reis-Filho, Simpson 2003, Utsuki, Sato 2002, Yokoya, Imamoto 1999) gelang hierdurch der erste Hinweis auf eine mögliche Aktivierung des wnt-Pathways in diesem hochmalignen Tumor.

Cytoplasmatische Stabilisierung β-Catenins ist notwendige Voraussetzung für eine Aktivierung wnt-abhängiger Gene. Allerdings müssen weitere Voraussetzungen, wie

1

beispielsweise nukleäre Translokation β-Catenins und Expression transkriptioneller Kofaktoren der LEF/TCF-Familie hinzukommen, um eine Transkription β-Cateninabhängiger Gene zu ermöglichen. Wir untersuchten daher direkt die transkriptionelle Aktivität β-Catenins in Glioblastom-Kurzzeitkulturen durch einen Luciferase-Reportergenassay. Die Aktivität des Luciferase-Reporters spiegelt hierbei die transkriptionelle Aktivität des TCF/β-Catenin-Komplexes in der untersuchten Kultur wider. In fünf von 13 Glioblastomkulturen wurde eine mehr als zweifache Induktion des Luciferase-Reporters beobachtet, das wnt-Signal wird also in diesen Kulturen β-Catenin/TCF-abhängig erfolgreich in den Nukleus transferiert. Auffällig ist, daß das Reporterplasmid in den übrigen acht Kulturen, die ausnahmslos ebenfalls eine cytoplasmatische Stabilisierung β-Catenins im Westernblot zeigen, nicht oder allenfalls gering induziert wird. Hier liegt also eine cytoplasmatische Stabilisierung β-Catenins ohne assoziierte Transduktion des wnt-Signals in den Nukleus vor. Cytoplasmatische Retentionsfaktoren wie APC oder Axin sowie das Expressionsniveau transkriptioneller Co-Aktivatoren und Co-Repressoren mögen diese Diskrepanz begründen. Eine Aktivierung des wnt-Signals ist auf unterschiedlichen Ebenen möglich. Der von Tumoren am häufigsten genutzte Mechanismus ist die Mutation von Komponenten des wnt-Signalweges. Besonders häufig sind loss-of-function Mutationen im Tumorsuppressor APC, der für die Degradation \(\beta\)-Catenins unentbehrlich ist. Solche Mutationen werden in der Mehrzahl familiärer und sporadischer Colon-Karzinome (>80%) gefunden und führen in über 95% der Fälle zur Expression eines verkürzten APC-Proteins, welches nicht mehr in der Lage ist, den β-Catenin-Spiegel zu kontrollieren. Durch einen kombinierten Zugang aus Sequenzierung der "Mutation Cluster Region" (n=13), die etwa 60% der beschriebenen APC-Mutation enthält, sowie Durchführung eines Protein Truncation Test (n=13), welcher durch in vitro Transkription und Translation die Bildung eines verkürzten APC-Proteins nachweisen kann, konnten wir APC-Mutationen mit hoher Sicherheit als ursächlich für die beobachtete β-Catenin-Stabilisierung ausschließen. Zum Zweiten werden stabilisierende Mutationen im β-Catenin-Gen (CTNNB1) selbst häufig beobachtet, so beispielsweise in APC-negativen Colon-Karzinomen oder hepatozellulären Karzinomen. Diese Mutationen betreffen fast ausnahmslos die sogenannte Regulatordomäne des Proteins, in der die Serin- und Threoninreste für die GSK3\beta-abhängige Phosphorilierung lokalisiert sind. Wir schlossen Mutation in dieser Regulatordomäne in allen Glioblastom-Kulturen (n=13) aus.

Zusammenfassend gelang es durch die vorliegende Arbeit erstmals, eine Aktivierung des embryonalen wnt-Signalweges in einer Untergruppe (5/15) von Glioblastomen zu demonstrieren. Diese Aktivierung wird nicht, wie aus anderen Tumorsystemen bekannt, durch

häufige Mutationen in APC oder CTNNB1 verursacht. Unseres Erachtens kommen als mögliche Mechanismen der β -Catenin-Stabilisierung neben unbekannten Mutationen in weiteren Komponenten des wnt-Signalweges insbesondere regulatorische Einflüsse weiterer Signalwege in Betracht. So könnte beispielsweise Tyrosin-Phosphorylierung β -Catenins durch Rezeptortyrosinkinasen, die häufig in Glioblastomen überexprimiert werden, zu einer Redistribution β -Catenins von der Membran ins Cytoplasma führen.

Die Identifizierung der Mechanismen, die eine wnt-Aktivierung in Glioblastomen bedingen, und ihre mögliche therapeutische Beeinflussung könnten unseres Erachtens einen wichtigen Schritt in der Kontrolle des aggressiven Proliferationsverhaltens dieses Tumors darstellen.