

Elena Ana Schnabel
Dr. med.

Einfluss der Expression der microRNA-Familien miR-17-92 und miR-221/222 auf das Überleben von Patienten mit primärem Glioblastom nach Resektion und Radiochemotherapie

Fach/Einrichtung: Radiologie, DKFZ

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Debus

Das Glioblastom ist der häufigste und aggressivste primäre Hirntumor bei Erwachsenen. Trotz multimodaler Therapiestrategien mit Operation, Strahlen- und Chemotherapie liegt das mediane Überleben bei nur 14 Monaten. Positive prognostische Faktoren sind dabei junges Alter, eine hoher Karnofsky-Index, eine MGMT-Promotormethylierung, der Erhalt einer Radiochemotherapie mit Temozolomid sowie eine IDH1-Mutation. Unabhängig davon überlebt ein kleiner Teil der Patienten länger als zwei Jahre. Die Entwicklung von Radioresistenz sowie die hohe Invasivität der Tumorzellen sind kritische Faktoren für die Lokalrezidivrate als vorherrschende Form des Therapieversagens, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen Gegenstand aktueller Forschung sind.

MicroRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden, die auf post-transkriptioneller Ebene die Proteinbiosynthese modulieren. Sie spielen eine pleiotropische Rolle in zellulären Prozessen und können fast jeden genetischen Pathway beeinflussen, so auch die maligne Entartung von Zellen. Auch in Glioblastom-Zellen regulieren microRNAs biologische Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Migration, Invasion und Reaktion auf Bestrahlung und Chemotherapie.

Der Arbeit zugrunde liegt die Hypothese, dass inhärente Expressionsunterschiede von microRNAs das Therapieansprechen und somit das Überleben von Patienten beeinflussen. Um dies zu untersuchen wurden Daten von zwei verschiedenen Patientenkollektiven genutzt. Als Trainingskohorte dienten die microRNA-Expressionsdaten von The Cancer Genome Atlas (TCGA), der momentan größten Quelle für integrative molekulare und klinische Daten. In die Validierungskohorte wurden Glioblastom-Patienten eingeschlossen, die alle an der Universitätsklinik Heidelberg behandelt wurden.

Die microRNA-Expressionsdaten von The Cancer Genome Atlas (TCGA) enthielten Microarray-Daten von 534 microRNAs von 482 Glioblastom-Patienten. Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen erbrachten 48 microRNAs, deren differentielle Expression (Quartil-Vergleich) signifikant mit dem Überleben korrelierte. Unter den bestplatzierten microRNAs befanden sich Mitglieder der miR-221/222 und miR-17-92-Familie ($p\text{-LRT} \leq 0,05$). Eine hohe Expression von miR-221 und miR-222 korrelierte dabei mit einem kürzeren Überleben. Die Differenz des medianen Überlebens zwischen den Gruppen mit niedriger und hoher microRNA-Expression lag für miR-221 bei 3,7 und für miR-222 bei 4,7 Monaten. Im Gegensatz dazu korrelierte eine hohe Expression von miR-17-92 mit verlängertem Überleben. Die Differenz des medianen Überlebens lag zwischen 3,9 und 5,1 Monaten. Auch uni- und multivariate Analysen bestätigten miR-221 und miR-222 als negative ($HR > 1$; $p < 0,05$) sowie die miR-17-92-Mitglieder als positive Prognosefaktoren ($HR < 1$; $p < 0,05$) für Überleben.

Zur Validierung wurden aus der jeweiligen microRNA-Familie miR-221 und miR-222 sowie miR-17-5p, miR-18a und miR-19b ausgewählt und in den Proben von 113 Heidelberger Glioblastom-Patienten per qRT-PCR quantifiziert. Für miR-221 und miR-222 bestätigten die

Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen dabei die Korrelation von hoher Expression mit verkürzten Gesamtüberleben ($p\text{-LRT}\leq 0,05$). Die Differenz des medianen Überlebens lag bei 9 bzw. 13 Monaten. Auch in uni- und multivariaten Analysen konnten miR-221 und miR-222 als unabhängige negative Prognosefaktoren für Überleben validiert werden ($HR>1$; $p<0,05$).

Für die untersuchten Mitglieder der miR-17-92-Familie zeigten die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen der Validierungskohorte zwar auch eine signifikante Korrelation zwischen microRNA-Expression und Überleben, diese stand jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der Trainingskohorte. So korrelierte eine hohe Expression von miR-17-5p, miR-18a und miR-19b mit einem verkürzten Gesamtüberleben ($p\text{-LRT}\leq 0,05$). Die Differenz des medianen Überlebens lag dabei zwischen 3 und 13 Monaten. Univariate Analysen bestätigten miR-17-5p, miR-18a und miR-19b als negative Prognosefaktoren für Überleben ($HR>1$; $p<0,05$), während die multivariaten Analysen keine signifikanten Ergebnisse für diese drei microRNAs erbrachten.

Im nächsten Schritt sollte über funktionelle Charakterisierung der untersuchten microRNA-Familien ein besseres Verständnis über ihre Rolle als Onco-miR bzw. Tumorsuppressor-miR geschaffen werden. Stabile Überexpression und Knockdown der microRNAs erfolgten mittels lentiviraler Vektoren in der Glioblastom-Zelllinie U251. Zur Überexpression wurden die pre-miR-Vektoren pre-miR-222 und pre-miR-17-92, zum Knockdown die miRZip-Vektoren miRZip-222 und miRZip-19b genutzt. Der Knockdown durch miRZip-19b konnte per qRT-PCR nicht validiert, weshalb diese Zellen von weiteren Experimenten ausgeschlossen wurden.

Die Auswirkung von Überexpression und Knockdown der microRNAs auf Migration und Invasion wurden mittels Scratch-Assay mit Hilfe von Time-lapse-basierter Mikroskopie untersucht. Für miR-222 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Migrationsfähigkeit, während die Invasivität der Glioblastom-Zellen durch miR-222-Überexpression erhöht wurde ($p<0,05$). Zudem erhöhte Bestrahlung mit 2 Gy die Invasivität von pre-miR-222 exprimierenden Zellen signifikant ($p<0,05$), während die Migrationsfähigkeit der Zellen durch Bestrahlung nicht signifikant beeinflusst wurde.

Die Überexpression von Mitgliedern der miR-17-92-Familie erhöhte Migration und Invasion signifikant ($p<0,05$). Bestrahlung mit 2 Gy erhöhte die Migrationsfähigkeit der pre-miR-17-92 exprimierenden Zellen signifikant ($p<0,05$), eine leichte Erhöhung der Invasivität konnte ebenfalls beobachtet werden, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau. Zur Untersuchung der Radioresistenz wurde für pre-miR-17-92 exprimierende Zellen ein standardisierter zweidimensionaler klonogener Überlebensassay durchgeführt, wobei kein signifikanter Einfluss der Überexpression auf die Radiosensitivität beobachtet wurde. Hingegen zeigten im dreidimensionalen klonogenen Überlebensassay pre-miR-17-92 exprimierende Zellen bereits ab einer Dosis von 2 Gy eine deutlich erhöhte Radioresistenz im Vergleich zu den Kontrollzellen ($p<0,05$).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit zusammenfassend gezeigt werden, dass die Expression von miR-221/222 und von miR-17-92 mit dem Gesamtüberleben von Glioblastom-Patienten korreliert. Die Rolle der miR-221/222 als negative Prognosefaktoren des Gesamtüberlebens konnte dabei in beiden Kohorten nachgewiesen werden, während die Ergebnisse für miR-17-92 heterogen ausfielen. Die Ergebnisse der darauf folgenden Experimente zur funktionellen Charakterisierung deuten darauf hin, dass die untersuchten microRNAs die Aggressivität von Glioblastom-Zellen steigern.

Bisher publizierte Studien postulieren sowohl onkogene als auch tumorsupprimierende Funktionen für die beiden hier untersuchten microRNA-Familien im Glioblastom. Dies scheint unter anderem durch Beeinflussung von Proliferation, Zellüberleben, Migration und Invasion zustande zu kommen. Die Korrelation von erhöhtem Expressionslevel mit verkürztem Überleben in der Heidelberger Kohorte sowie die anschließenden funktionellen Untersuchungen unterstützen eine Onco-miR Hypothese für beide microRNA-Familien. Diese Arbeit bietet eine solide Grundlage für weitere Untersuchungen zu komplexen heterotypischen Tumor-Stroma-Interaktionen, insbesondere zu Tumorangiogenese und Immunantwort, deren Durchführung notwendig ist, um einen besseren Einblick in die Funktion dieser microRNA-Familie im Glioblastom auch im Hinblick auf Modulation von Therapiesensitivität zu erhalten. Trotz des sicherlich noch weiten Weges bis zu einer klinischen Anwendung stellen diese microRNAs vielversprechende mögliche Biomarker und Targets für neue zielgerichtete Therapien dar, die gerade für das Glioblastom aufgrund seiner bisher so fatalen Prognose dringend notwendig wären.