

Henriette Mandelbaum
Dr.med.

In vitro-Modellierung und Einzelzell-Analytik der Netzwerk-Konnektivität von Glioblastomzellen

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

Kaum eine Tumorerkrankung geht mit einer schlechteren Prognose einher als das Glioblastom. 2015 wurden sogenannte tumor microtubes (TMs) entdeckt und damit eine Schlüsselkomponente maligner Gliome identifiziert: ein ausgeprägtes Tumorzellnetzwerk, das durch interzelluläre TMs gebildet wird. TMs sind zelluläre Ausläufer, die von Glioblastom-Zellen gebildet werden und damit auf unterschiedliche Weise zur Tumorprogression beitragen. Die zelluläre Verbundenheit (Konnektivität) innerhalb des Glioblastoms durch das dichte TM-vermittelte Tumorzellnetzwerk ermöglicht Kommunikation und molekularen Transport zwischen Tumorzellen, die Teil des Netzwerkes sind. In humanen wie murinen Tumoren sind aber bis zu 50% der Tumorzellen unverbunden und deren Bedeutung ist bisher weniger gut verstanden. Auch Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung werden über TM vermittelte Netzwerke unterhalten: diese zytotoxischen Therapien wirken vor allem gegen unverbundene Tumorzellen, während konnektierte Zellen im Netzwerk größtenteils geschützt sind. Tumor microtubes und die daraus resultierende, potente zelluläre Vernetzung tragen also nicht nur zur interzellulären Kommunikation, sondern auch zur fortschreitenden Tumorprogression in das gesunde Gehirn und zur Resistenzentwicklung gegenüber etablierten Therapieregimen bei.

Die Methode der RNA-Einzelzellsequenzierung hat in den letzten Jahren intensiv zum tieferen Verständnis von malignen Hirntumoren und speziell Glioblastomen und TMs beigetragen: Durch die Anfärbung über TMs verbundener Tumorzellen konnte ein differentielles Genexpressionsprofil verbundener vs. unverbundener Tumorzellen unter dem Begriff "Connectivity Signature" etabliert werden. Weiterhin konnten 2019 durch die Sequenzierung einer großen Anzahl von Tumorzellen aus Patientenproben sogenannte maligne cell states definiert werden, in denen sich maligne Zellen innerhalb eines jeden Glioblastoms präsentieren. Es zeigte sich, dass Zellen vom astrozytären und mesenchymalen Typ 1 (AC-LIKE, MES1-LIKE) besonders hohe Connectivity Scores aufweisen, also besonders stark zum Tumorzellnetzwerk beitragen. Bisher ist wenig über konnektierte bzw. unkonnektierte Tumorzellen im Glioblastom bekannt. Zudem gibt es bis heute kein gutes in vitro Modell, das dazu dienen könnte, diese beiden höchstwahrscheinlich sehr relevanten morphologischen Zellgruppen vor allem auf Einzelzellebene besser verstehen und untersuchen zu können. Hauptzielsetzung dieser Promotionsarbeit war daher die Etablierung eines solchen in vitro Modells und die detaillierte Betrachtung morphologischer und transkriptomischer Entwicklungen innerhalb der respektiven Zellgruppen, um neue Entstehungsmechanismen der Netzwerkbildung innerhalb maligner Gliome zu entschlüsseln. Unter Verwendung zweier unterschiedlicher Wachstumsbedingungen konnte für vier Glioblastom-Zelllinien ein in vitro Modell für "mehr vernetzte" und "weniger vernetzte" Zellen etabliert werden. Während der in vitro Kultivierung zeigte sich unter dem Lichtmikroskop eine ausgeprägt vermehrte Verbundenheit und Zellausläufer zwischen Tumorzellen, die unter adhärennten Wachstumsbedingungen kultiviert worden waren; unter Suspensionsbedingungen kultivierte Glioblastom-Zellen zeigten diesen Phänotyp kaum.

Unter dem Konfokalmikroskop konnte gezeigt werden, dass es sich bei den zellulären Verbindungen tatsächlich um Strukturen mit typischen morphologischen Eigenschaften von tumor microtubes handelt und diese in diesem in vitro Assay signifikant vermehrt unter adhärennten Bedingungen gebildet werden. Diese Beobachtungen zeigten sich kongruent in allen 4 untersuchten Glioblastom-Zelllinien. Mittels Einzelzellanalyse konnte nach dem SmartSeq2 Protokoll erstmals eine qualitativ hochwertige Charakterisierung des transkriptomischen Profils von vier Glioblastom-Zelllinien unter diesen beiden Wachstumsbedingungen erstellt werden und dieses mit etablierten in-vivo Genexpressionsprofilen des Glioblastoms assoziiert werden. Hierbei wurden wichtige Markergene von adhärennten bzw. Suspensionszellen definiert und analysiert und in adhärennten Zellen zeigten sich biologische Prozesse wie "Tube Morphogenesis" und "Tube Development" besonders aktiv, passend zu deren hoher TM-Ausbildung. In Suspensionszellen überwogen Zellzyklusprogramme. Bei der Anwendung des "Connectivity Score" zeigte sich dieser in drei von vier Zelllinien unter adhärennten Bedingungen signifikant erhöht. Erstmals konnte zudem eine Assoziation zwischen Transkriptionsprofilen in vitro und der bisher bekannten zellulären Grundarchitektur des Glioblastoms hergestellt werden: Zellen in adhärennten Wachstumsbedingungen polarisieren vermehrt in Richtung zweier verwandter cell states (MES-LIKE und AC-LIKE), was ihren erhöhten Connectivity Score erklären könnte. Die Entwicklung definierter transkriptomischer Identitäten aus dem in vitro Modell konnte anschließend auch im Mausmodell demonstriert werden. Zusätzlich dazu konnte mittels qPCR in allen 4 Zelllinien unter adhärennten Wachstumsbedingungen eine erhöhte Expression von GAP43 und APOE gezeigt werden, die beide als relevante Treiber der tumor microtube Entstehung gelten. CHI3L1 konnte als Parameter für Zellverbundenheit in vitro identifiziert werden und war ebenfalls unter adhärennten Bedingungen erhöht messbar.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit durch ein robustes in-vitro Modell für zelluläre Vernetzung und maligne Zelltypverteilung des Glioblastoms erstmals transkriptomische Einzelzell-Profile von adhärennten Zellen vs. Suspensionszellen gewonnen werden. Für die Identifikation von Zielstrukturen und für zukünftige Screeningmethoden zur Hemmung der tumor microtube Bildung können diese Ergebnisse nützlich sein.