

Prof. Dr. Katrin Lamszus
Kurzbericht zum Abschluss des Projekts

Identifikation von Genen, die für die Tumorinitiierung von Glioblastomzellen in vivo relevant sind

Glioblastome sind die häufigsten bösartigen Hirntumore. Sie sind derzeit nicht heilbar und die Patienten überleben meist trotz Operation, Strahlen- und Chemotherapie nur etwa ein Jahr nach Diagnosestellung. Man nimmt an, dass sogenannte Tumorstammzellen, die besonders therapieresistent sind und die nur eine kleine Subpopulation aller Tumorzellen darstellen, für die Bildung von Tumorrezidiven verantwortlich sind. Zudem sind vermutlich nur die Tumorstammzellen in der Lage, neue Tumorabsiedelungen zu bilden, wie z.B. neue Glioblastomherde an anderen Stellen im Hirn oder auch Metastasen.

Ziel des Projekts war die Identifikation von Genen und Genexpressionsmustern in Glioblastomzellen, die für die Tumorinitiierungsfähigkeit von Bedeutung sind. Hierzu hatten wir in Vorarbeiten ein stabiles Fluoreszenzfarbstoff-basiertes klonales Zellmarkierungssystem, Optical Barcoding (OBC) entwickelt, durch das sich das Wachstum einzelner Klone in vivo nachverfolgen lässt (Mohme et al. *Molecular Therapy* 2017, 25(3):621-633). Mit der OBC-Methode wurden in verschiedenen Gliomzelllinien jeweils 21 Klone verschiedenfarbig markiert. Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der Klone in vivo zeigten, dass verschiedene Subklone einer Zelllinie bei Einzelinjektion in Mäuse ausnahmslos tumorigen waren. Wenn jedoch die Klone zu gleichen Teilen gemischt wurden, trugen nur wenige der Klone maßgeblich zur Tumorbildung bei und dominierten den entstandenen Tumor. Die Tumorinitiierungsfähigkeit unterschiedlicher Klone der Mischpopulationen korrelierte dabei nicht mit der Proliferationsrate der Subklone in vitro oder deren klonaler Expansionsfähigkeit in Mischkulturen. Hieraus ist zu schließen, dass die Adaptationsfähigkeit der Zellen in vivo und/oder das Mikromilieu als solches einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorinitiierungsfähigkeit der Klone haben. Wiederholungsexperimente zeigten, dass stets dieselben Klone in den Tumoren in vivo dominierten, so dass offenbar Klon-inhärente Eigenschaften für diese Prädominanz verantwortlich sind.

Aus den Xenografttumoren konnten wir mittels FACS die prädominante Klone heraussortieren und hieraus RNA für Sequenzierungsanalysen (RNAseq) isolieren. Dabei mussten die individuellen Klone jeweils aus mehreren verschiedenen Mäusstumoren isoliert und gepoolt werden, um eine ausreichende Menge an RNA zu erhalten. Zudem wurden "bulk-Tumore", deren Zellen lediglich mit GFP markiert waren und die keiner klonalen Separation unterzogen wurden, mit untersucht. Ferner wurden "reine" Tumore der dominanten Klone sowie die in vitro kultivierten Zellen in die Analyse einbezogen und mit Klonen verglichen, die in vivo nicht oder kaum zur Tumormorphierung beitrugen und entweder schnell oder langsam in vitro proliferierten.

Die RNAseq Analyse zeigte, dass Klone, die sich in vivo auf Kosten anderer durchsetzten, bereits in vitro eine verwandte Genexpressionssignatur aufwiesen. Darüber hinaus unterschieden sich die Expressionsprofile von "bulk-Tumoren" erheblich von denen der Tumore, die aus klonalen Kulturen hervorgegangen waren. Zudem wiesen Triplikate von "bulk-Tumoren" heterogenere Expressionssignaturen auf als Triplikate klonaler Tumore. Dabei waren wiederum Triplikate individuell injizierter klonaler Tumore ähnlicher als Triplikate der Klone, die aus gemischten Tumoren heraussortiert worden waren. Clusteranalysen und bioinformatische Pathway Analysen zeigten schließlich, dass die drei in vivo dominanten Klone vor allem Gene des Notch Signalwegs überexprimieren sowie Gene, die während der neuralen Entwicklung und insbesondere Hirnentwicklung heraufreguliert sind. Der Notch-Signalweg ist bekanntermaßen in neuralen Progenitorzellen des zentralen Nervensystems aktiviert und gilt als essentiell für den Erhalt dieser undifferenzierten Zellpopulation. Anzunehmen ist daher, dass dieser Signalweg in Glioblastomen für den Erhalt der Stammzeleigenschaften von Bedeutung ist. Zudem wird dieser Signalweg offenbar umso wichtiger, wenn das komplexe Zusammenwirken aus vielfältigen Wachstums- und Überlebensfaktoren, die von einem heterogenen "bulk-Tumor" produziert werden, durch klonale Selektion reduziert wird.

Zusammenfassend konnten durch die Genexpressionsanalysen unterschiedlicher Tumorzellklone Gene und Signaltransduktionswege identifiziert werden, die für die Prädominanz tumorinitiierender Glioblastomzellklone relevant sind.