

Zusammenfassung

Die Dissertationsschrift beschäftigt sich mit dem Einfluss eines Extrazellulär-Matrix-Proteins Versican und seine Splice-Varianten (V0, V1, V2 und V3) auf das Verhalten von humanen Glioblastomzellen in vitro.

Bei einem Glioblastom (Glioblastoma multiforme) handelt es sich um einen Tumor glialen Ursprungs im zentralen Nervensystems. Gliome können anhand ihrer Malignitätskriterien und Proliferationsverhalten in verschiedenen Grade eingeteilt werden (WHO°I- IV). Das Glioblastoma multiforme, der aggressivste Subtyp entspricht dem WHO ° IV. Glioblastome machen etwa 50% aller glialen Tumorarten aus. Es kann sich *de novo* oder durch Progression von niedriggradigen Astrozytomen (WHO°II) oder anaplastischen Astrozytomen (WHO°III) entwickeln.ⁱ Das Glioblastom hat die schlechteste Prognosen mit einer medianen Überlebensrate von 14,6 Monaten nach Diagnosestellung unter bester verfügbarer Therapie.ⁱⁱ Neue Therapiestrategien bei der Behandlung von Glioblastomen sind daher Gegenstand einer Vielzahl von Studien.

Die Aggressivität und Invasivität, das mangelnde Verständnis der molekularen Mechanismen und die genetische Heterogenität der Glioblastome sind eine Ursache für die langfristige Wirkungslosigkeit der derzeitigen Behandlungsmethoden.ⁱⁱⁱ

Die Literatur beschreibt die extrazellulären Matrix der Zellen als einen entscheidenden Faktor der malignen Eigenschaften der Glioblastome. Die extrazellulären Matrix hat einen tiefen Effekt auf die Zellform, Funktionen sowie Zell-Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung. Wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix bei Hirntumoren sind vor allem Proteoglykane, Glykosaminoglykane und Glykoproteine.^{iv}

Neben einer Vielzahl anderer Proteine konnte in verschiedenen Tumorgeweben eine erhöhte Expression von Versican identifiziert werden. Bei Versican handelt es sich um ein großes Chondroitin-Sulphat Proteoglykan, welches in verschiedenen Tumorzellarten exprimiert wird. Versican besteht aus einer N-terminalen G1-Domäne (G1-domain), einer Glycosaminoglykan- Domäne (GAG-domain) und einer C-terminalen G3-Domäne (G3-domain). Durch alternatives Splicing in den Exonen der GAG-Domäne entstehen vier Isoforme von Versican: V0, V1, V2 und V3.^v

Versican reguliert über die negativ geladenen Chondroitin/Dermatan-Sulfat Seitenketten und durch die Interaktion von G1- und G3-Domäne mit anderen Proteinen die Adhäsion, Proliferation, Apoptose, Migration und Invasion.^{vi, vii} Die Expression von Versican ist in vielen Krebszellen erhöht, wobei V0 und V1 die vorherrschenden Isoenzyme in Gliomen darstellen.^{viii} In jüngerer Vergangenheit konnte TGF-beta2 (Transforming growth factor-b2) als ein wichtiger Modulator der Invasivität von Gliomen identifiziert werden. Auch konnte gezeigt werden, dass TGF-beta2 die Expression von Versican induziert.^{ix} Hieraus ergab sich die Fragestellung, welche Funktion den einzelnen Isoformen von Versican in Gliomzellen zu Teil wird.

Methodisch erfolgte die Etablierung der Transfektion der humanen Gliomzelllinien HTZ349, HTZ417, U87 und A172 mit spezifischer siRNA (small interfering RNA) für V1, V2 und V3. Die funktionellen Fähigkeiten der Gliomzellen wurden im Migrationsassays, Proliferationsassay und Adhäsionsassay untersucht. Neben der siRNA erfolgt das Design einer shRNA (short hairpin RNA) für V1 für weitere Langzeitexperimente.

Sowohl auf PCR-Ebene als auch auf Proteinebene ist eine eindeutige Regulation von V1 zu sehen. In den funktionellen Assays führte die Regulation von V1 zu einer signifikant verminderten Migrationsrate und Proliferationsrate, wohingegen keine signifikante Hemmung der Migration durch die Regulierung von V2 und V3 erzielt werden konnte. Darüber hinaus ist die Proliferation in V1 supprimierte Gliomzellen signifikant reduziert. Daher postulieren wir, dass Isoform V1, aber nicht V2 oder V3, ein wesentlicher Modulator der Gliomzell-Migration und Proliferation ist.

Mit dem short-hairpin-Vektor-System für V1 gelang eine stabile Transfektion der Gliomzellen. Das Vektorsystem führte zu einer dauerhafte Regulation von V1, die wir auf Protein- und PCR-Ebene beweisen konnten. Mit der shRNA-Transfektion sollen die *in vivo* Daten in *in vitro* Modelle übertragen werden.

ⁱ Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 114(2): 97–109

ⁱⁱ Grossman SA, Ye X, Piantadosi S, Desideri S, Nabors LB, Rosenfeld M, Fisher J (2010) Survival of Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Treated with Radiation and Temozolomide on Research Studies in the United States. *Clin Cancer Res.* 15; 16(8): 2443–2449

ⁱⁱⁱ Bellail AC, Hunter SB, Bart DJ, Tan C, Van Meir EG (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36: 1046-1069

ⁱⁱⁱ Rao JS (2003) Molecular mechanism of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature Review*, 3: 489-501

Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S et al. (2008) MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Molecular and cellular Biology*, 28(17): 5369-5380

ⁱⁱⁱ Louis DN (2006) Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual Review Pathology*, 1: 97-117

^{iv} Bellail AC, Hunter SB, Bart DJ, Tan C, Van Meir EG (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36: 1046- 1069

^v Hirose J, Kawashima H, Yoshie O, Tashiro K, Miyasaka M (2001) Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses. *Journal of Biological Chemistry*, 276(7): 5228–5234

^{vi} LeBaron RG, Zimmermann DR, Ruoslahti E (1992) Hyaluronate binding properties of versican. *Journal of Biological Chemistry*, 267(14): 10003–10010

^{vii} Wight TN (2002) Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Current Opinions in Cell Biology*, 14(5): 617–623

^{viii} Sheng W, Wang G, Wang Y, et al. (2005) The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 16:1330-40

^{ix} Arslan F, Bosserhoff AK, Nickl- Jockschat T (2007) The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor- β 2. *Cancer Research (UK)*, 96: 1559-1565

Lebenslauf

Name	Julia Sophie Onken
Geburtsdatum	20.03.1984
Nationalität	Deutsch
Wohnhaft	Genter Strasse 54, 13353 Berlin
Vater	Dr. med. Ulrich Onken, Allgemeinmediziner
Mutter	Andrea Onken, Physiotherapeutin
Geschwister	Dr. med. Anna Theresa Onken Moritz Theodor Onken Marie Luise Onken
Schulzeit	1990-1994 Grundschule in Burgebrach 1994-2003 Gymnasium Kaiser-Heinrich in Bamberg Juni 2003 Abitur
Auslandsaufenthalte	1999 Schüleraustausch nach Kanada 2000 Schüleraustausch nach Frankreich 2002 Sprachkurs in New York/ USA 2003 Sprachkurs in Malaga/ Spanien
Praktika	06/2003-11/2003 Krankenpflegepraktikum in der Steigerwaldklinik Burgebrach 01/2004-03/2004 Praktikum auf der chirurgischen Station am Klinikum Bamberg
Studium	SS 2004 Immatrikulation an der Universität Köln im Fach Mineralogie WS 2004/2005 Immatrikulation an der Universität Heidelberg im Fach Medizin WS 2006/2007 Immatrikulation an der Universität Regensburg für den klinischen Abschnitt des Medizinstudiums

Staatsexamen	09/2006 erfolgreiche Ablegung des ersten Staatsexamens 11/2010 erfolgreiche Ablegung des zweiten Staatsexamens
Famulaturen	02/2007-03/2007 Abteilung für Herzchirurgie am Deutschen Herzzentrum München 03/2008-04/2008 Gastroenterologie und Kardiologie am Klinikum Bamberg 08/2008 Neurologische Poliklinik des BKH in Regensburg 08/2008-09/2008 Respiratory Department des Airedale General Hospital in Steeton, GB
Praktisches Jahr	08/2009-12/2009 Allgemein Chirurgie im Hospital Cardio Infantil, Bogotá, Kolumbien 12/2009-04/2010 Abteilung für Neurochirurgie am Kantonsspital Sankt Gallen, Schweiz 04/2010-08/2010 Abteilung für Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg
Berufliche Tätigkeit	Seit 03/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Neurochirurgie der Charité, Berlin

Julia Sophie Onken

Berlin, den 07.07.2012

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Bogdahn und Herrn Prof. Dr. Peter Hau für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas dieser Arbeit und die Möglichkeit es zu bearbeiten.

Ganz besonders herzlich danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Peter Hau, dafür, dass er während der Fertigstellung dieser Arbeit immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Petra Leukel für das freundschaftliche Arbeitsverhältnis, die vielseitige Unterstützung und allzeit moralische und technische Unterstützung. Sie hat einen großen Beitrag zum Gelingen der Experimente geleistet. Vor allem bedanke ich mich für die viele Arbeit, die wir in das Sequenzieren der siRNA gesteckt haben.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Forschungslabors H3, besonders natürlich meiner Arbeitsgruppe für die gute Zeit. Vielen Dank liebe Anett, Lomie, Xiu, ihr habt mich in der Anwendung vieler Methoden unterstützt.

Ich danke meiner Familie sowie meinen engsten Vertrauten: Clemens, Zissi, Charlotte, Annika, Corinna, Thomas und Jürgen. Auf Ihre guten Zureden konnte ich jederzeit zählen.

Erklärung

„Ich erkläre hiermit, dass die Dissertation durch Prof. Dr. med. Ullrich Bogdan und Prof. Dr. med. Peter Hau angeregt und ihre Ausarbeitung durch sie überwacht wurde.“

„Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt“.

Julia Sophie Onken

Berlin, den 07.07.2012