

Imke Gunzenhäuser
Gian Klaus Jürgen Kayser
Dr. med

Expression und Bindungsfähigkeit von Galektin-1 und Galektin-3 bei Neuroblastom und kleinzelligem Bronchialkarzinom in Relation zu Proliferation und Prognose

Imke Gunzenhäuser

geboren am 16. Dezember 1967 in Esslingen a.N.
1986 Abitur Georgii-Gymnasium in Esslingen a.N.
1987 – 1995 Studiengang Humanmedizin
1990 Physikum
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Bruderholz, Schweiz /
Heidelberg
1995 Staatsexamen

Gian Klaus Jürgen Kayser

geboren am 26. Juli 1974 in Heidelberg
Reifeprüfung am 24. Mai 1993 in Heidelberg
Studiengang Humanmedizin vom WS 1993/
1994 bis WS 1999/2000
Physikum am 25. August 1995 an der
Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Indianapolis, USA /
Heidelberg
Staatsexamen am 24. November 1999

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Kayser

Die vorliegende Arbeit befaßt sich vorwiegend mit der Frage nach der prognostischen Aussage von spezifischen Markern für das Neuroblastom und das kleinzellige-anaplastische Bronchialkarzinom. Es sollte geklärt werden, in wieweit die Bindung der Galektine 1 und 3, sowie andere Marker, wie Calcyclin und Histoblutgruppenantigene, das proliferative Verhalten der Tumore aus der Gruppe der neuroepithelialen und neuroendokrinen Reihe beeinflussen und ob – bezogen auf das kleinzellige Bronchialkarzinom – eine Korrelation zu der Überlebenszeit gefunden werden kann.

Ferner sollte mit Hilfe des molekularen Modellings ein Konformationsvorschlag für den in diesem Zusammenhang von Kopitz et al. als maßgeblich beteiligt postulierten Komplex aus humanem Galektin-1 und dem Gangliosid GM1 erarbeitet werden.

Mit Hilfe von Feulgen-gefärbten histologischen Präparaten von insgesamt 48 Patienten mit einem Neuroblastom und 46 Patienten mit einem kleinzelligen-anaplastischen Bronchialkarzinom wurden DNA-zytometrische Messungen bezüglich spezifischer IOD-Parameter durchgeführt. Das proliferative Verhalten wurde mit MIB-1 gefärbten Schnitten derselben Patienten vorgenommen. Die Bindungskapazitäten der Tumore für die verwendeten Proben wurden mit Hilfe der Ligando/Immunohistochemie vollzogen. Bei der statistischen Auswertung wurden die durch die histomorphologische Analyse gewonnen Ergebnisse mit klinischen Daten in Korrelation gesetzt und statistisch ausgewertet.

Für die Erarbeitung des GM1-Galektin-1 Komplexes wurden Monte-Carlo Dockingstudien des Galektin-1 mit Fragmenten des GM1 Gangliosids durchgeführt, die durch eine anschließende Dynamik- und Energieminimierungsberechnungen optimiert wurden. Nach einer visuellen Einteilung in einzelnen Orientierungsgruppen wurden diese einer Konformationsanalyse unterzogen. Nach Selektion der wahrscheinlichen Orientierungen wurden diese mit dem gesamten Gangliosid überlagert und von Hand optimiert. Die hierdurch selektionierte Orientierung wurde dann einer MD-Simulation in Wasser mit anschließender Konformationsanalyse zur weiteren Charakterisierung des Komplexes unterzogen.

Die in diese Arbeit eingeschlossenen Neuroblastome zeigten eine der Literatur entsprechende Alters- und Geschlechtsverteilung mit Erkrankungsalter in den ersten 10 Lebensjahren und

einem in etwa ausgeglichenen Verhältnis zwischen Patientinnen und Patienten. Gleiches gilt für die in dieser Studie eingeschlossenen Fälle des kleinzelligen-anaplastischen Bronchialkarzinoms.

Auch die Analyse der klinischen Daten entsprach sowohl bei den Neuroblastomen als auch bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen denen der Literatur.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, daß vor allem die verwandten Galektine 1 und 3 aussagekräftig für das Proliferationsverhalten, sowohl der Neuroblastome, wie auch der kleinzelligen-anaplastischen Bronchialkarzinome sind. Jeweils stieg die Proliferationsrate der Tumore bei Bindung des Galektin-1 statistisch signifikant an, die Lungenkarzinome zeigten auch bei Bindung des Galektin-3 eine signifikant höhere Proliferationsrate. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Kopitz et al. zu erwähnen, die eine Inhibition des Zellwachstums in vitro bei Neuroblastomzellen der Zellreihe SK-N-MC zeigen konnten, wenn diese mit Galektin-1 beziehungsweise GM1 in Verbindung traten. Die in vivo Ergebnisse dieser Studie lassen sich nun wie ein Feed-Back Mechanismus interpretieren, bei dem es aufgrund der fehlenden Liganden zu einer bei den aggressiven Tumoren vermehrten Expression der Rezeptoren, in diesem Fall des Galektin-1 kommt. Dies wird vor allem durch den Vergleich der Galektin-1 bindenden und zugleich exprimierenden Tumoren mit denen, die diese beiden Eigenschaften nicht besitzen, deutlich: Hier zeigten sich die Galektin-1 bindenden und exprimierenden Tumore statistisch deutlich proliferativ aktiver. Um diese Feed-back-Theorie weiter zu untersuchen, müßte eine Quantifizierung der einzelnen Rezeptoren für Galektin-1, beziehungsweise der Expression von Galektin-1 an den Tumorzellen durchgeführt werden.

Bezüglich der Überlebensraten der kleinzelligen Bronchialkarzinome konnte kein direkter statistisch signifikanter Zusammenhang in der Ligandohistochemie ermittelt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, daß die Prognose mit steigender Proliferationsrate abnimmt. Da ebenfalls ein statistisch signifikanter Anstieg der Proliferationsrate mit der Bindung des Galektin-1 und des Galektin-3 gefunden wurde, läßt sich hier ein eventueller Zusammenhang vermuten, der sich in dieser Studie nicht nachweisen ließ.

Bei den Modellierungsberechnungen konnten durch die Dockingstudien an den GM1-Fragment-Galektin-1 Komplexen drei wahrscheinliche Orientierungen des GM1 in der Bindetasche des menschlichen Galektin-1 erarbeitet werden. Nach Überlagerung der einzelnen Orientierungen mit dem gesamten GM1 konnte jedoch gezeigt werden, daß – nach den Dockingstudien – nur eine Komplexkonformation als wahrscheinlich angesehen werden kann. Diese zeigte nach der Solvents-MD-Simulation auch eine zu Vorberechnungen und zu der Literatur analoge Konformationsanalyse. Jedoch zeigt ein Einpassen der im GM1 endständigen Galaktose in der Orientierung, wie sie aus der Röntgenstruktur des bovinen Galektin-1 bekannt ist, nach einer manuellen Optimierung, daß ein solcher Komplex ebenfalls, wenngleich mit erheblichen konformationellen Einschränkungen des GM1 möglich erscheint. Es bleibt nun abzuwarten, ob NMR-spektroskopische und/oder röntgenstrukturanalytische Daten das Ergebnis der Dockingstudie bestätigen, oder ob sie zeigen, daß es mehrere Möglichkeiten eines Komplexes aus menschlichem Galektin-1 und dem Gangliosid GM1 gibt.