

Adriana Julita Pietrzak

Dr. med.

## **Beurteilbarkeit der apoptosebedingten Chemotherapiesensitivität im Kurzzeitkultursystem primärer Neuroblastomgewebe**

Geboren am 07. 01. 1975 in Oppeln

Reifeprüfung am 08. 08. 1995 in Marburg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis SS 2003

Physikum am 19. 08. 1998 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Klinisches Studium an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg, Monterrey (Mexiko), Luzern (Schweiz)

Staatsexamen am 09. 05. 2003 an der an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Karl-Ludwig Waag

Das Neuroblastom ist mit 8-10% aller kindlichen Neoplasien der häufigste extrakranielle maligne Tumor des Kindesalters. Die breite Palette und der Grad der histopathologischen Differenzierung und die klinischen und biologischen Charakteristika zeichnen sich durch ein sehr heterogenes Verhalten aus, was die Vorhersage des Verlaufes der Erkrankung, die Einschätzung der Prognose und den Erfolg einer Therapie sehr schwer macht. Da die Chemotherapie die tragende Komponente der Therapie des disseminierten Neuroblastoms ist, stellt die Chemotherapieresistenz einen wichtigen, die Heilung limitierenden Faktor in der Therapie der Erkrankung dar. Diese Tatsache wirft immer wieder die Frage auf, wie die Ansprechbarkeit des jeweiligen Neuroblastoms auf ein bestimmtes Chemotherapieregime eingeschätzt werden kann.

Zelllinien dienen zur Zeit als wichtigstes Modell für die Untersuchung molekularer Eigenschaften der Neuroblastome. Da sie aus außerordentlich hochmalignen Neuroblastomen hervorgegangen sind und sich nur in Ausnahmefällen etablieren lassen, repräsentieren sie jedoch in der sehr heterogenen Gruppe nur einen kleinen Aspekt. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf alle Varianten des Neuroblastoms erfordert auch die

Untersuchung der prognostisch günstigeren Formen. Dazu ist die Untersuchung an primären Tumorgewebe erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Kurzzeitkultursystem aus zuvor vital kryokonservierten Tumorzellen aus primärem Neuroblastomgewebe etabliert und seine Untersuchbarkeit in Hinsicht auf die individuelle apoptosebedingte Chemotherapiesensitivität überprüft. Hierfür stand Neuroblastomgewebe in einer lokalen Tumorbank zur Verfügung, die insgesamt 80 Tumoren umfasst. Für die hier dargestellte Untersuchung wurde das Verhalten zwölf primärer, vital kryokonservierter Neuroblastome der Stadien 1, 2, 3, 4, 4s und ein Ganglioneurom ausgesucht und in einem Kurzzeitkultursystem über 96 Stunden untersucht. Zuerst wurde das biologische Verhalten der Tumoren beobachtet, wie Morphologie, Vitalität, Proliferation, Wachstumscharakteristik und Stoffwechselverhalten. Das Proliferationsverhalten und die Vitalität wurden mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt; das Stoffwechselverhalten wurde mit dem Cell-Proliferation Assay MTT überprüft. Einen Aufschluss über die zelluläre Zusammensetzung der Kurzzeitkultur ergab die durchflusszytometrische Analyse der Zelloberflächenmarker GD2, CD45, CD56.

Schließlich wurde nach der Induktion der Apoptose in den Kurzzeitkulturen mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin parallel die apoptosebedingte Chemotherapiesensitivität im MTT-Assay, in der Durchflusszytometrischen Untersuchung nach Inkubation in hypotoner fluorochromer Propidiumjodid-Lösung und dem TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)-Assay untersucht.

Es zeigte sich, dass ein Kurzzeitkultursystem aus vital kryokonserviertem primärem Neuroblastomgewebe grundsätzlich stadiumunabhängig etablierbar ist. Die Zellausbeute pro eingefrorenes Aliquot des Tumorgewebes und die Vitalität der Neuroblastomzellen in der Kultur über 96 Stunden waren wiederholbar repräsentativ. Es ergaben sich jedoch grundsätzliche Unterschiede zu Kurzzeitkulturen etablierter Neuroblastomzelllinien. Tumorzellen aus niedrigmalignen Neuroblastomen, insbesondere niedriger Stadien verhielten sich mit ihrer niedrigen Stoffwechselaktivität, fehlender Proliferation und in ihrer variablen Antwort auf Chemotherapie biologisch deutlich anders als Neuroblastomzellen aus klassischen Zelllinien.

Das primäre Tumorgewebe war analog zu Zelllinien auch mit funktionellen Assays analysierbar. Durch die begrenzt für die Untersuchung zur Verfügung stehende Zellzahl,

die heterogene Zusammensetzung der Zellpopulation und viel Zelldebris, mussten jedoch, abhängig vom angewendeten Testverfahren, eine Reihe von methodischen Problemen gelöst werden.

Während die spontane Apoptoserate der untersuchten Neuroblastome von Anfang an stark erhöht war und dadurch nur bedingte Aussagekraft bot, waren jedoch die Ergebnisse der Bestimmung der spezifischen Apoptoserate in allen drei Testsystemen vergleichbar. Es deuteten sich vor allem auch stadiumabhängige Unterschiede an, was sicherlich noch an größerem Tumorkollektiv überprüft werden muss. Neuroblastomzellen des Stadium 4s zeigten eine deutlichere Antwort auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Doxorubicin, als Neuroblastomzellen lokalisierter Stadien.

Weitere Untersuchungen an größeren Probenzahlen müssen klären, ob die entwickelte Methode der *in vitro* Bestimmung apoptosebedingter Chemotherapiesensitivität prospektiv klinisch relevante Aussagen liefern kann.

Das Kurzzeitkultursystem von vital eingefrorenem primären Neuroblastomgewebe ermöglicht diagnose- und therapierrelevante Aussagen durch funktionelle zell- und molekularbiologische Untersuchungen des Verhaltens der Tumorzellen in der Kultur und gegenüber chemotherapeutischen Agenzien.