

Jochen Kammermeier

Dr. med.

## **Strahleninduzierter Zelltod beim Neuroblastom und die Bedeutung von Apoptose**

Geboren am 25.03.1974 in Villingen

Reifeprüfung am 11.05.1993 in Villingen

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995 bis zum WS 2002

Physikum am 08.09.1997 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Monterrey, Mexiko (DAAD Stipendium) und Heidelberg

Staatsexamen am 20.11.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pädiatrische Onkologie

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. K.-J. Weber

Für Patienten mit fortgeschrittenem und unresezierbarem NB ist die Radiotherapie zur lokalen Kontrolle des Tumors essentiell. Zur Beurteilung der Radiosensitivität von NB-Zellen wurde in sechs Zelllinien (IMR-32, VI-856, LA-N-5, KELLY, GI-M-EN und SH-EP), die sich phänotypisch wie auch genotypisch unterschieden, Apoptose gemessen und mit klonogenen Standard-Assays verglichen. Des Weiteren wurde die Rolle des bei chemotherapie-induzierter Apoptose wichtigen CD-95 (Fas/Apo-1)-Rezeptors und die Aktivierung der Kaspasenkaskade untersucht.

Erste Experimente mit Bestrahlung von NB-Zelllinien ergaben bereits in der Mikroskopie deutliche morphologische Veränderungen der Zellen als Hinweis auf Apoptose. Durch den Annexin-V-Assay konnte bei zwei Zelllinien (IMR-32 und LA-N-5) Zeichen früher Apoptose nachgewiesen werden. Im Nicoletti-Assay wurde Zeitabhängigkeit (bei 24h, 48h, 72h und 96h) und Dosisabhängigkeit (bei 2Gy, 4Gy, 10Gy und 30Gy) von strahleninduzierter Apoptose untersucht. Es fanden sich in den sechs Zelllinien große Unterschiede hinsichtlich der Strahlensensitivität: IMR-32 und Vi-856 Zellen verhielten sich schon gegenüber niedriger Strahlendosen sensitiv. In LAN-5 und KELLY Zellen konnte Apoptose nur zeitverzögert und in höheren Strahlendosen ausgelöst werden. GI-M-EN und SH-EP verhielten sich

strahlenresistent. Im Gegensatz dazu ergaben sich im Klonogenen Assay zwei Gruppen: IMR-32 und VI-856, mit stärker reduzierter Klonogenität im Vergleich zu LA-N-5, KELLY, GI-MEN und SH-EP. Im Nicoletti-Assay sowie auch im Klonogenen Assay spielte die Strahlendosis bei der Induktion von Apoptose die entscheidende Rolle. In fünf von sechs Zelllinien korrelierten die Ergebnisse des Klonogenen Assays mit denen des Apoptose-Assays. In der insgesamt strahlenresistenten Zelllinie LAN-5 lässt sich in höheren Dosen eine langsame Apoptose auslösen, die jedoch nicht zum Untergang der Zellpopulation führt. Durch Versuche mit Kaspasehemmstoffen konnte die Beteiligung der Kaspasen an der strahleninduzierten Apoptose in unseren NB-Zelllinien nachgewiesen werden. Ebenso wurde der CD-95-Rezeptorstatus aller sechs NB-Zelllinien untersucht. Es ergab sich ein variables Expressionsmuster innerhalb der Zelllinien, das nicht mit dem Profil der Strahlensensibilität vereinbar ist. Nach Bestrahlung wurde eine Hochregulation des Rezeptors in strahlenresistenten Zellen (besonders deutlich bei SH-EP) beobachtet. Die klinische Bedeutung einer strahlentherapieinduzierten Hochregulation des CD-95-Rezeptors für die Chemotherapiesensitivität von NB-Zellen sollte in einem Folgeprojekt untersucht werden.

#### Schlussfolgerung:

Neuroblastomzelllinien zeigen unterschiedliche Suszeptibilität für Apoptose nach Bestrahlung. Klonogene Radiosensitivität korreliert in den untersuchten NB-Zelllinien mit strahleninduzierter Apoptose, wenn diese bei niedrigen Dosen und zu frühen Zeiten beobachtet wird. Die Kaspasenkaskade ist bei strahleninduzierter Apoptose in NB-Zellen von Bedeutung, die CD-95-Rezeptor Expression hingegen ist kein Indikator für Radiosensitivität, weder hinsichtlich Apoptose noch für das klonogene Überleben. Unterschiedliche Pfade von Radiotherapie und Chemotherapie induzierter Apoptose weisen auf einen potentiellen Nutzen kombinierter Therapiemodalitäten hin.