

Mario Idzko

Dr. med.

Expression des Na⁺-abhängigen Glukose-Cotransporters (SGLT-1) in normalen und präneoplastischen Schleimhäuten sowie Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereiches

Geboren am 12.11.1974 in Heidelberg

Staatsexamen am 16.06.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Christoph Reisser

Die Ergebnisse mehrerer neuer Untersuchungen zum biologischen Verhalten von Tumoren lassen vermuten, dass eine Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen und der SGLT-1-Expression besteht.

Aufbauend auf dieser Hypothese wurde in vorliegender Arbeit mithilfe von immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden die Expression des aktiven Glucosetransporters (SGLT-1) in normalen, dysplastischen und malignen Gewebeproben von Schleimhäuten und Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs und die Veränderungen der SGLT-1-Expression im Verlauf der Entstehung der malignen Tumoren untersucht.

Dafür wurden intraoperativ entnommene Gewebeproben aus normaler und dysplastischer Schleimhaut sowie aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf/Hals-Bereichs nach Schockgefrierung in einem Kryostaten 6µm dick geschnitten und immunhistochemisch untersucht. Das Glucosetransportprotein SGLT-1 wurde unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers durch die Avidin–Biotin-Methode dargestellt. Dieser Antikörper wurde speziell für diese Untersuchung hergestellt und durch eine Westernblot-Untersuchung mit dem Proteinlysat einer Darmzelllinie, deren SGLT1-Gehalt bereits beschrieben ist, in Hinblick auf seine Spezifität überprüft.

Ein Teil intraoperativ gewonnener Biopsien wurde für Zellkulturversuche angezüchtet und durch gegen bestimmte Cytokeratine gerichtete Antikörper auf ihren epithelialen Ursprung untersucht. Eine endotheliale Verunreinigung der Zellkulturen wurde durch Einsatz endothelspezifischer Antikörper ausgeschlossen. Für die vorliegenden Untersuchungen

wurden nur Zellkulturen verwendet, die eine homogene Färbung der Cytokeratinmarker und einen fehlenden Nachweis von Endothelzellen zeigten.

Aus den kultivierten Zellen wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits die gesamte RNA gewonnen und photometrisch die Konzentration und Qualität der Proben überprüft. Die RT-PCR erfolgte mit einem Kit, wobei die sense- und antisense Primer nach einer aus der Genbank (Swissprot) gewählten Sequenz synthetisiert wurden.

Alle Oligonucleotidprimerpaare umfassten Intron- und Exonstellen um auszuschließen, dass die PCR-Produkte von eventuellen DNA-Kontaminationen stammten. Zur Qualitätskontrolle der RNA-Aufarbeitung wurde zusätzlich eine RT-PCR mit Glyceraldehyde-3-phosphatase-dehydrogenase Primern durchgeführt.

Im Ergebnis war bei 17 von 28 Tumorkulturen SGLT-1-mRNA durch die RT-PCR nachweisbar. Die meisten der SGLT-1 positiven Tumorzellkulturen entstammten Geweben, die eine fortgeschrittenere Differenzierung aufwiesen: zwei von zwei G1-Tumoren, acht von acht G2-Tumoren sowie sieben von 18 G3-Tumoren waren SGLT-1-positiv.

Die immunhistochemische Untersuchung mit dem speziell entwickelten Antikörper zeigte eine heterogene Färbung des Tumorgewebes in 29 der 34 untersuchten Tumorgewebeproben. Der SGLT-1 Nachweis gelang dabei nur in differenzierteren Tumorarealen. Tumorgewebe, bei denen nur einzelne oder keine Zellen SGLT-1-positiv waren, zeigten bei der Untersuchung auf SGLT-1-mRNA keinen positiven Befund.

Normale oder dysplastische Schleimhautproben zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster für SGLT-1. Dabei konnten gezeigt werden, dass in Biopsien von normaler Schleimhaut nur die apikalen Schleimhautschichten im oberen Drittel des Stratum spinosum - im Stratum lucidum und im Stratum granulosum - SGLT1 exprimierten, während im Stratum basale – dem Ort der Zellproliferation - kein SGLT-1-Protein nachweisbar war. In dysplastisch veränderten Schleimhautarealen hingegen war das SGLT-1-Protein nicht nachweisbar

Das beobachtete SGLT-1-Verteilungsmuster in den untersuchten Geweben, sowie die SGLT-1-mRNA-Expression, die bevorzugt in Zellkulturen von differenzierteren Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches beobachtet wurde, stützen die Hypothese, dass SGLT1 bei normaler und bei dysplastisch veränderter Schleimhaut sowie bei malignen Kopf-Hals-Tumoren in differenzierungsabhängiger Weise exprimiert wird.

Diese Hypothese konnte durch Untersuchungen der Glykogenspeicherung bestätigt werden, da Glykogen als Speicherform der Glucose nur in differenzierten Schleimhautzellen nachweisbar ist. Genauso wie Glykogen war auch SGLT-1 nur in den differenzierten Tumorbereichen nachweisbar.

Die Beobachtungen zur Expression und Verteilung von SGLT-1 in normaler und in dysplastisch veränderter Schleimhaut des Kopf-Hals-Bereiches erweitern das Wissen und das Verständnis über die Expression von Glucosetransportproteinen in diesem Bereich. Dies könnte zum einen für die Planung neuer Therapien von Bedeutung sein, die sich gegen den für die Tumorzelle lebensnotwendigen Glucosetransport richten könnten, als auch für die Nutzung des SGLT-1-Proteins als diagnostischen Differenzierungsmarker im Kopf-Hals-Bereich.