

Sonja Kramer
Dr. med.

Einfluß des TrkA-Rezeptors auf chemotherapeutisch induzierte Apoptose in Neuroblastomzellen

Geboren am 24.06.1975 in Darmstadt
Staatsexamen am 09.12.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. D. Rating

Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste maligne solide Tumor des Kindesalters und ist durch eine enorme Heterogenität bezüglich Pathologie, Molekulargenetik und Klinik gekennzeichnet. So werden einerseits Spontanregressionen, andererseits progrediente Krankheitsverläufe mit früher Metastasierung und extrem schlechter Prognose beobachtet. Neben etablierten prognostischen Parametern wie Alter, Stadium und Grad der Erkrankung haben sich vor allem N-myc-Amplifikation, 1p36-Deletion und TrkA-Expression als molekulare Prognoseparameter herauskristallisiert. Während die beiden erstgenannten beim Neuroblastom mit schlechter Prognose einhergehen, ist die hohe Expression des Neurotrophinrezeptors TrkA mit ausgezeichneter Prognose assoziiert.

Um einen möglichen Zusammenhang der TrkA-Expression mit dem Ansprechen eines Neuroblastoms auf Chemotherapie zu untersuchen, wurde die Neuroblastomzell-Linie SH-SY5Y mit der TrkA-cDNA und vier verschiedenen TrkA-Rezeptor-Mutanten stabil transfiziert. Resultierende Einzelzellklone wurden durch TrkA mRNA und Proteinexpression sowie durch Autophosphorylierung des TrkA-Rezeptors charakterisiert. Die Überexpression des TrkA-Rezeptors führte zu keiner verstärkten Spontanapoptoserate im Vergleich mit der Elternzell-Linie SY5Y. Behandlung der Zellen mit den Zytostatika Doxorubicin und Etoposid, in therapeutischer Dosierung führte indes zu verstärkter Apoptoseinduktion in TrkA-transfizierten Zellen im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle SY5Yvec und der Elternzell-Linie. Bei gleichem Zeitverlauf der Apoptoseinduktion für SY5Y-TrkA und SY5Yvec Zellen war nach 72h Zytostatika-Inkubation in SY5Y-TrkA Zellen die erforderliche Dosis für die Induktion von 50%-spezifischer Apoptoserate der Zellen jeweils 10fach reduziert für Doxorubicin und Etoposid. Es liess sich allerdings kein sensitivierender Effekt von TrkA gegenüber Cisplatin-induzierter Apoptose nachweisen. Mutationen in unterschiedlichen Proteinbindungsstellen des TrkA-Rezeptors resultierten in partieller bis totaler Aufhebung des Apoptose-sensitivierenden Effektes.

Die Analyse des CD95-Rezeptors als Schlüsselmolekül Rezeptor-induzierter Apoptose ergab keine signifikanten Unterschiede in der CD95 mRNA oder Proteinexpression zwischen SY5Y-TrkA und SY5Yvec Zellen. Weitere Analysen mit dem Breitspektrum-Caspase Inhibitor Z-VAD-fmk belegten allerdings die Caspase-Abhängigkeit der Apoptose in beiden Zellen. Inkubation mit dem spezifischen Caspase-8-Inhibitor ZIEDT-fmk schützte interessanterweise SY5Y-TrkA Zellen vor Zytostatika-induzierter Apoptose, während die Apoptoserate in Caspase-8 negativen SY5Y-Zellen wie erwartet nicht blockiert werden konnte. Die daraufhin erfolgte Analyse der Caspase-8 mRNA- und Proteinexpression zeigte eine Rekonstitution der Caspase-8-Expression in SY5Y-TrkA-WT Zellen unabhängig von einer Zytostatika-Exposition. Im Gegensatz dazu waren alle verwendeten TrkA-Rezeptormutanten wie die maternale Zell-Linie SY5Y in An- und Abwesenheit von Zytostatika Caspase-8 negativ. Die Expression des Caspase-8-Inhibitorproteins FLIP war

umgekehrt korreliert zu dem Expressionsprofil von Caspase-8 und demnach in SY5Y-TrkA-WT Zellen supprimiert, während es in SY5Y und den TrkA-Rezeptormutanten exprimiert wurde.

Diese Arbeit führt zu dem neuen Erkenntnis, dass die Expression von TrkA in SY5Y Neuroblastomzellen vermutlich durch Re-Expression von Caspase-8 für Doxorubicin- und Etoposid-induzierte Apoptose sensibilisiert. Dieser Effekt könnte zur Erklärung der ausgezeichneten Prognose TrkA-exprimierender Neuroblastome beitragen.