

Silke Elsesser-Glaab
Dr. med.

Todesrezeptoren in Zusammenhang mit Apoptoseindex beim primären Neuroblastom anhand von 20 Tumorproben nach Aufstellung geeigneter Methodik

Geboren am 09.06.1976 in Aschaffenburg
Reifeprüfung am 30.06.1995 in Aschaffenburg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995 bis SS 2002
Physikum am 26.09.97 an der Universität Würzburg
Klinisches Studium in Würzburg und Heidelberg
Praktisches Jahr in Heilbronn
Staatsexamen am 21.06.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. F. Otto

Vorherige Untersuchungen konnten an Neuroblastomzelllinien Apoptose mit ihren Schlüsselproteinen als Effektormechanismus der Zytostatikatherapie hervorheben. Zu den bedeutenden Schlüsselproteinen gehören die Todesrezeptoren. In diesem Projekt wurde nun die Bedeutung von Apoptose und der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R1-4 an Tumorproben des primären Neuroblastoms untersucht. Das Neuroblastom ist der häufigste extracranielle, solide Tumor des Kindesalters.

Zur Bearbeitung des Projektes wurde eine Tumorbank aufgebaut. Das Tumormaterial wurde sofort im OP verarbeitet. Neben den Hauptanteilen für den Pathologen zur Diagnosestellung wurde ein repräsentativer Anteil direkt im OP in Flüssigstickstoff schockgefroren. Ein dritter Anteil wurde zerkleinert und in 10% DMSO vital eingefroren. So konnten sieben Tumorproben vom Stadium 1, fünf Proben vom Stadium 2, drei Proben im Stadium 4, zwei im Stadium 4s und zwei Ganglioneurome untersucht werden.

Zur Ermittlung der Apoptoserate wurden von den schockgefrorenen Tumorproben Gefrierschnitte angefertigt. Mit der Methode TUNEL wurden die Doppelstrangbrüche, die spezifisch für Apoptose sind, gefärbt. Hier wurde eine modifizierte Art von TUNEL verwendet, die es erlaubt durch Bindung von Digoxigenin und Streptavidin mit folgendem Farbumschlag die Färbung in der Lichtmikroskopie zu begutachten. Es wurden korrespondierende Schnitte HE und TUNEL gefärbt und nur Schnitte verwendet, die mindestens 90% Tumorzellen enthielten. Bei der Auswertung von TUNEL-positiven und gleichsam morphologisch apoptotischen Zellen wurde so der Apoptoseindex erhoben.

Die vital gefrorenen Tumorproben wurden mit einer Enzymmischung aus DNase, Collagenase und Hyaluronidase in eine Einzellzellsuspension umgewandelt. Durch einen Dreierschritt mit spezifischen Antikörper, Ziege-gegen-Maus-Antikörper und Streptavidin wurden die Todesrezeptoren gefärbt. Es wurde eine Zweifachfärbung mit gleichzeitiger Färbung von Gangliosid D₂, das 90-95% der Neuroblastomzellen an ihrer Oberfläche tragen, zur Erkennung dieser durchgeführt. Durchflußzytometrisch wurden die Tumoren untersucht. Der Dreierschritt zur Färbung der Todesrezeptoren war zur Amplifikation der Fluoreszenz bei der geringen Expressionsdichte der Todesrezeptoren nötig.

Die Todesrezeptorexpression wurde zusätzlich auf RNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Hierbei wurde der schockgefrorene Tumor mechanisch verkleinert und die DNA extrahiert. Neben der Zielsequenz wurde auch ein Housekeeping-gene amplifiziert. Somit war eine semiquantitative Auswertung des Zielgens möglich.

Die Auswertung des Apoptoseindexes ergab weit gestreute Ergebnisse. Vergleichsweise etwas höhere Apoptoseindices konnten im Stadium 1 erhoben werden; Stadium 2 und 3 zeigten Werte auf gleich niedrigem Niveau, der niedrigste Index fand sich im Stadium 4. Auffällig war jedoch die besonders hohen Apoptoseindices der Tumorproben im Stadium 4s. Die Ergebnisse zeigten insgesamt eine große Streubreite.

Die Todesrezeptoren wurden unterschiedlich exprimiert. CD95 wurde in den Stadien 1 und 2 höher exprimiert als in den fortgeschrittenen Stadien, wobei der Mittelwert von Stadium 2 jenen von Stadium 1 überschritt. Die beiden Tumorproben im Stadium 4s wiesen keine CD95-Expression auf.

Bei den TRAIL-Rezeptoren konnte eine Expression der Rezeptoren 1-3 nachgewiesen werden, TRAIL-R4 wurde nicht exprimiert. TRAIL-R1 wies eine höhere Expression in den Stadien 1 und 2 auf. Auch hier war die höhere Expressionsrate im Stadium 2 zu finden. Stadium 3 und 4 wiesen keine TRAIL-R1-Expression auf. TRAIL-R2 wurde durchgehend exprimiert. TRAIL-R3 wurde ebenfalls in den gut-prognostischen Stadien höher exprimiert.

Daraus kann man nachfolgende Schlußfolgerungen ziehen:

Die Apoptoseindices beim primären Neuroblastom liegen insgesamt niedrig. Stadium 1 zeigt etwas höhere Apoptoseindices, im Gegensatz dazu findet sich in Stadium 4 einen sehr niedriger Index. Durch die große Streubreite der Ergebnisse ist eine Differenzierung der Stadien 1-4 nicht möglich. Hervorzuheben sind jedoch die besonders hohen Apoptoseindices im Stadium 4s. Sollte sich dieser Unterschied im Apoptoseindex bei einer größeren Probenzahl bestätigen, könnte hiermit eine Differenzierung zwischen Stadium 4 und 4s erfolgen.

Die Todesrezeptoren werden insgesamt in sehr geringer Dichte exprimiert. Insbesondere bei CD95 liegt diese Dichte deutlich unter der von Lymphozyten oder der Zelllinie SH-EP.

Als Hinweis für die Funktionalität der Todesrezeptoren wurde die Expression derer mit dem Apoptoseindex in Verbindung gesetzt. CD95 und TRAIL-R1 werden bei mittleren bis hohen Indices exprimiert. Bei TRAIL-R2 ist kein eindeutiger Zusammenhang zu erkennen.

Durch die geringe Dichte der Todesrezeptoren und der insgesamt seltenen Expressionshäufigkeit sind die an Zelllinien erhobenen Ergebnisse nicht unmittelbar auf Tumormaterial übertragbar.