

Aus dem Medizinischen Zentrum für allgemeine Kinderheilkunde
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Seyberth

Molekulargenetische Untersuchungen und klinische Bedeutung der Apoptose beim Neuroblastom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von
Christine Koller, geb. Hüsken
aus Herborn
Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 21. November 2002

gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. R. Arnold

Referent: PD Dr. med. H. Christiansen

Korreferent: Prof. Dr. med. Sommer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1. Das Neuroblastom	5
1.1.1. Definition	5
1.1.2. Inzidenz	5
1.1.3. Genetik	5
1.1.4. zelluläre und molekulare Pathogenese	6
1.1.4.1. Embryologie	6
1.1.4.2. neuronale Differenzierung und Neurotrophinrezeptoren	6
1.1.4.3. DNA-Index	7
1.1.4.4. N-Myc Amplifikation	7
1.1.4.5. Chromosomenverlust	8
1.1.5. Histopathologie	8
1.1.6. Stadieneinteilung	8
1.1.7. Diagnostik	9
1.1.8. Prognose	10
1.1.9. Therapie	11
1.2. Apoptose	12
1.2.1. Allgemeine Einleitung	12
1.2.2. Rezeptorvermittelte Induktion der Apoptose	12
1.2.2.1. Das TNF- und CD95/Fas/APO-1- Rezeptor System	12
1.2.2.2. Die p75NGFR Signalkaskade	13
1.2.3. Induktion von Apoptose über Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53	14
1.2.4. Das c-Myc Protein und seine Funktion	15
1.2.5. Regulation von Apoptose: bcl-2 Familie	16
1.3 Fragestellung	17
2.1. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)	18
2.1.1. Paraffin-Einbettung	18
2.1.2. Vorbereitung der Objektträger	18
2.1.3. Paraffinschnitte	18
2.1.4. Deparaffinisierung der Schnitte	18
2.1.5. TUNEL-Färbung	18
2.1.6. Dapi-Färbung	18
2.1.7. Auswertung der Schnitte	18
2.2. RT-PCR	19
2.2.1. Primersuche	19
2.2.2. RNA-Isolierung	19
2.2.3. Reverse-Transkription	19
2.2.4. Polymerase Kettenreaktion	19
2.2.5. Gelelektrophorese	20
2.3. Western Blot Analyse	20
2.3.1. Herstellung von Zellysaten	20
2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford	21
2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.3.4. Reagenzien für Western-Blot	22
2.4. Tumormaterial	23
3.1. TUNEL Methode	24
3.1.1. Einbettung des Tumorgewebes in Paraffin	24

3.1.2. Anfertigung der Paraffinschnitte	25
3.1.3. TUNEL Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)	25
3.1.4. Auswertung	26
3.2. RT-PCR	26
3.2.1. RNA-Isolierung mit RNazolB	26
3.2.2. Reverse Transkription	27
3.2.3. RT-PCR	27
3.2.3.1. Primerdesign	27
3.2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.2.4. Gelelektrophorese	28
3.2.5. Auswertung	28
3.3. Western-Blot	29
3.3.1. Herstellung von Proteinlysaten aus primärem Tumorgewebe	29
3.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford	29
3.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
3.3.4. Western-Blot	30
3.4. Statistik	31
4. Ergebnisse	32
4.1. Die Bedeutung von Apoptose für das Neuroblastom und ihre prognostische Relevanz	32
4.1.1. Häufigkeit von Apoptose im Neuroblastom	32
4.1.2. Die prognostische Relevanz von Apoptose für das Neuroblastom	32
4.2. Möglicher Zusammenhang zwischen Amplifikation des N-Myc Gens, Apoptose und Prognose im Neuroblastom	36
4.3. Expression des Antiapoptoseprotein bcl-2 im Zusammenhang mit Apoptose, Amplifikation des N-Myc Gens und Prognose im Neuroblastom	37
4.4. Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Apoptose und Prognose im Neuroblastom	39
4.5. Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Amplifikation des N-Myc Gens, Apoptose und Prognose im Neuroblastom	41
4.6. Zusammenhang zwischen Stadium 4s und Apoptose	44
4.7. Ein möglicher Einfluß einer begonnenen Chemotherapie vor Probenentnahme	44
5.1. Die Bedeutung von Apoptose für das Neuroblastom	45
5.2 Zusammenhang zwischen N-Myc Genamplifikation, Apoptose, dem Antiapoptoseprotein bcl-2 und Prognose im Neuroblastom	45
5.3. Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Apoptose und Prognose im Neuroblastom	48
5.4. Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Amplifikation den N-Myc Gens, Apoptose und Prognose im Neuroblastom	49
5.5. Zusammenhang zwischen Stadium 4s und Apoptose	50
6. Zusammenfassung	52
7. Literaturverzeichnis	54
Abkürzungsverzeichnis	61
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	63
Verzeichnis der akademischen Lehrer	65
Danksagung	66

1. Einleitung

1.1. Das Neuroblastom

1.1.1. Definition

Erstmals wurde das Neuroblastom 1865 von Virchow beschrieben, die Genese aus sympathischen Nervenzellen der Neuralleiste konnte 1891 von Marchard nachgewiesen werden. Der Begriff „Neuroblastom“ wurde erst 1910 von Wright geprägt. Die Charakterisierung des Neuroblastoms beruht auf histologischen Befunden. Bei einem Neuroblastom handelt es sich um einen embryonalen Tumor, der sich während der Embryonal- und Fetalperiode aus sympathoadrenergen Neuronen der Neuralleiste entwickelt. In Abhängigkeit von ihrer histologischen Differenzierung kann man drei neuroblastomartige Tumore unterscheiden: das Neuroblastom, das Ganglioneuroblastom, sowie das Ganglioneurom als benigne differenzierte Form dieses Tumors (Principels and Practice of Pediatric Oncology, 3. Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven). Klinisch sind vor allem drei Entwicklungsstadien zu beobachten: die lebensbedrohliche Progression, Differenzierung und Reifung zu einem Ganglioneuroblastom oder Ganglioneurom sowie die spontane Regression (Berthold F. et al., 2000). Die Häufigkeit spontaner Regression ist beim Neuroblastom um ein Vielfaches höher als in anderen Tumorsystemen (Pritchard J. and Hickman J.A., 1994). 90-95% aller Neuroblastome sind katecholaminproduzierende Tumore, was vor allem über eine erhöhte Ausscheidung von Katecholaminmetaboliten über den Urin nachgewiesen werden kann (Principels and Practice of Pediatric Oncology, 3. Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven).

1.1.2. Inzidenz

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle maligne Tumor des Kindesalters (8-10% aller kindlichen Neoplasien). Besonders häufig tritt der Tumor bei Säuglingen und Kleinkindern auf 6,1 Fälle / 100000 Säuglinge pro Jahr (Kaletsch U. et al., 1996). 90% aller Erkrankungen werden innerhalb der ersten fünf Lebensjahre diagnostiziert. In der gesamten Bundesrepublik Deutschland treten jährlich ca. 180 Neuerkrankungen auf.

1.1.3. Genetik

Einige Patienten zeigen eine Prädisposition, ein Neuroblastom zu entwickeln. Diese Prädisposition folgt einer autosomal dominanten Vererbung (Knudson A .G. J. et al., 1976). Ein prädisponierender Genlocus für die Entstehung eines Neuroblastoms konnte allerdings bislang nicht nachgewiesen werden. Eine vermutete Assoziation zwischen genetischer Prädisposition für ein Neuroblastom und dem Verlust des Chromosoms 1p36, welcher häufiger in Neuroblastomzellen beobachtet wird, ließ sich nach Untersuchungen an drei betroffenen Familien nicht bestätigen (Maris J. M. et al., 1996).

1.1.4. zelluläre und molekulare Pathogenese

1.1.4.1. Embryologie

Während der Embryonal- und Fetalperiode wird das sympathische Nervensystem vom sogenannten Zuckerkandelschen Organ, bestehend aus sympathischen Paraganglien, gebildet. Es liegt hauptsächlich am Abgang der Arteria mesenterica inferior, kann aber auch im Mediastinum, Retroperitoneum oder paratestikulär lokalisiert sein. Postnatal kommt es zu einer raschen Involution dieses Organs. 1963 berichteten Beckwith und Perrin, daß mikroskopisch häufiger neuroblastische Knoten, die als Neuroblastoma in situ bezeichnet wurden, bei Kindern unter drei Monaten nachweisbar waren, die aus unklaren Gründen (nicht am Neuroblastom) starben (Beckwith J. and Perrin E., 1963). Weiterhin ergab das in einigen Ländern durchgeführten Massenscreening auf Homovanilin- und Vanilinmandelsäure im Urin von Säuglingen Hinweise darauf, daß Neuroblastome sehr viel häufiger vorkommen als sie diagnostiziert oder klinisch auffällig werden (Principels and Practice of Pediatric Oncology, 3. Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven).

1.1.4.2. neuronale Differenzierung und Neurotrophinrezeptoren

Neuroblastome entwickeln sich aus unreifen sympathischen Neuroblasten. Dabei werden wesentliche zelluläre Prozesse wie Überleben/Apoptose und Differenzierung gesteuert von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, sogenannten Neurotrophinen. Zur Familie der Neurotrophine gehören der „nerve growth factor“ (NGF), sowie der „brain derived nerve growth factor“ (BDNF), das Neurotrophin 3 (NT-3) und das Neurotrophin 4/5 (NT-4/5). Für die Liganden-Rezeptor Interaktion spielt die Assoziation der beiden Komponenten des „high-affinity nerve growth factor receptor“ Komplexes eine wesentliche Rolle. Er besteht aus TrkA, einem 140 kDa großen Protein mit Tyrosinkinaseaktivität, welches NGF spezifisch bindet und dem 75 kDa großen Protein p75NGFR oder „low affinity nerve growth factor receptor“ (LNGFR), der keine Kinaseaktivität aufweist (Canossa M. et al., 1996). p75NGFR bindet alle Neurotrophine, jedoch mit unterschiedlicher Kinetik. Abhängig von der Coexpression beider Rezeptoren bzw. der Bindung von NGF alleine an p75NGFR kommt es zur Transduktion unterschiedlicher Signale (siehe 1.2.2.2.).

Frühere Studien haben gezeigt, daß es unterschiedliche Defekte in Expression und Funktion des p75NGFR gibt (Principels and Practice of Pediatric Oncology, 3. Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven), dennoch ist die Rolle der p75NGFR Signalkaskade in der Pathogenese des Neuroblastoms nicht vollständig geklärt. Die Coexpression der mRNAs von TrkA und p75NGFR mRNA ist assoziiert mit einer guten Prognose (Kogner P. et al., 1993). Neben TrkA werden auch in einigen Fällen TrkB und TrkC aus der Trk-Superfamilie exprimiert. Diese beiden Rezeptoren können in ihrer vollen Form oder als sogenannte „truncated“ Rezeptoren, d.h. ohne Tyrosinkinaseaktivität, exprimiert werden. Die Expression des kompletten TrkB ist häufig assoziiert mit N-Myc Amplifikation (Tanaka T. et al., 1995). In solchen Tumoren wird eine gleichzeitige BDNF Expression beobachtet.

BDNF ist der spezifische Ligand für TrkB und schafft so möglicherweise über einen auto- oder parakrinen Weg Wachstumsvorteile für den Tumor (Acheson A. et al., 1995). Demgegenüber wurde bei differenzierten Tumoren eher die Expression der „truncated“ Form des Rezeptors beobachtet.

1.1.4.3. DNA-Index

Der DNA Gehalt von Tumorzellen bei Neuroblastompatienten kann sowohl prognostisch genutzt werden, wie auch therapeutische Hinweise bieten, ob der Patient auf ein bestimmtes Chemotherapieregime anspricht. Säuglinge mit Tumoren, die einen aneuploiden DNA Gehalt aufweisen, zeigen häufiger niedrigere Tumorstadien, wohingegen diploider DNA Gehalt eher mit einer fortgeschrittenen Erkrankung verbunden ist (Look A. T. et al., 1984). Aneuploide Tumore bei älteren Kindern zeigen jedoch eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von strukturellen Veränderungen, wie z.B. Deletionen oder Genamplifikationen. Dies kann ein Grund dafür sein, daß diese Patienten trotz Aneuploidie keine günstige Prognose haben (Look A.T. et al., 1991). Ein Zusammenhang zwischen Tumorzellploidie und der Integrität des Chromosoms 1 wurde ebenfalls von Ambros et al. (1996) gefunden.

In den von ihnen untersuchten Tumoren fanden sie weder Diploidie noch einen Verlust im Bereich des Chromosoms 1 in Zellen von spontan differenzierenden Neuroblastomen.

1.1.4.4. N-Myc Amplifikation

Ungefähr 25% der Neuroblastome zeigen eine N-Myc Genamplifikation, gegenüber einer normalerweise einfachen (single-copy) Konfiguration (prohaploides Genom). Eine solche Amplifikation fällt in der Regel zusammen mit einer fortgeschrittenen Erkrankung, rascher Tumorprogression und schlechter Prognose (Brodeur G.M. et al., 1984). Brodeur et al. konnten zeigen, daß N-Myc Genamplifikation eine biologische Eigenheit in einer Untergruppe aggressiver Neuroblastome ist. Tumore ohne N-Myc Genamplifikation zum Diagnosezeitpunkt entwickeln diese in der Regel auch später nicht (Brodeur G.M. et al., 1987; Brodeur G.M. et al., 1997). Mit dem Ziel die prognostische Signifikanz einer N-Myc Expression in Abwesenheit von einer N-Myc Amplifikation zu determinieren, konnten Cohn et al. (2000) überraschenderweise zeigen, daß hohe Spiegel an exprimierter N-Myc RNA, bei fehlender N-Myc Amplifikation, nicht prognostisch sind für einen ungünstigen Krankheitsverlauf bei Patienten mit Neuroblastomen in fortgeschrittenem Stadium. Selten wird eine N-Myc Amplifikation in lokalisierten Tumoren gefunden. In diesen Tumoren ist eine N-Myc Genamplifikation jedoch nicht notwendigerweise mit ungünstiger Prognose verbunden. Die Biologie lokalisierter Neuroblastome mit N-Myc Genamplifikation scheint sich zu unterscheiden von der fortgeschrittener Tumore mit amplifiziertem N-Myc Gen. In lokalisierten Neuroblastomen mit amplifiziertem N-Myc Gen konnte

eine günstige Histologie, keine DNA-Diploidie oder ein Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 nachgewiesen werden (Cohen P. S. et al., 1988; Cohn S. L. et al., 1995).

1.1.4.5. Chromosomenverlust

Der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 ist eine charakteristische zytogenetische Abnormalität und findet sich in 30-50% der primären Neuroblastome (Brodeur G.M. et al., 1977). Betroffen ist die Region 1p36.2 - 1p36.3 (White P. S. et al., 1995). Diese Deletion ist die häufigste strukturelle Aberration im Neuroblastom und häufig verbunden mit schlechter Prognose. Die meisten Tumore mit Verlust des Chromosoms 1p tragen eine Amplifikation des N-Myc Gens und weisen diploiden DNA Gehalt auf. Betroffene Patienten befinden sich häufig in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium und einem Alter über 1 Jahr (Takeda O. et al., 1996). Es wird vermutet, daß der Verlust oder die Inaktivierung eines bislang unbekanntes Genes an diesem Locus eine kritische Rolle für die Progression eines Neuroblastoms spielen, bzw. daß hier ein oder mehrere Tumorsuppressorgene liegen könnten (Maris J. M. et al. 1995, Brodeur G. M. et al., 1997).

1.1.5. Histopathologie

Unterschiedliche histopathologische Klassifikationen werden als prognostische Kriterien für das Neuroblastom herangezogen. Am häufigsten wird die Klassifikation nach Shimada verwendet (Shimada H. et al., 1984). Sie basiert auf dem Alter des Patienten und den folgenden histologischen Merkmalen: An- oder Abwesenheit von Schwanzzell-Stroma, Grad der Differenzierung und Mitose-Karyorrhexis Index (Anzahl der Mitosen und Karyorrhexis / 5000 Zellen).

Das typische Neuroblastom besteht aus kleinen uniformen Zellen mit hyperchromatischem Kern und wenig Zytoplasma. Das ausdifferenzierte Ganglioneurom besteht aus reifen Ganglienzellen und Schwanzzellen. Das Ganglioneuroblastom enthält histopathologische Merkmale, die sowohl das typische Neuroblastom als auch das reife Ganglioneurom widerspiegeln. Das Neuroblastom zählt, wie auch einige andere Tumore im Kindesalter (Ewing Sarkom, Non-Hodgkin Lymphom, Primitiv Neuroektodermale Tumore, Rhabdomyosarkom) zu den klein-blau-rundzelligen Tumoren. Die Immunhistologische Charakterisierung greift unter anderem auf das Vorkommen von Neuronspezifischer Enolase (NSE), Neurofilament und Synaptophysin zurück (Principels and Practice of Pediatric Oncology, 3.Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven).

1.1.6. Stadieneinteilung

Ein wichtiges klinisches Prognosekriterium ist die Ausbreitung der Erkrankung (Evans A. E. et al., 1971). Die aktuell in Deutschland verwendete Stadieneinteilung basiert auf dem International Neuroblastoma Staging System (INSS), das auf der Evans Klassifikation beruhend fünf klinische Stadien definiert (Brodeur G. M. et al., 1993). Das Stadium 1 umfaßt lokalisierte, d.h. auf ihr Ursprungsorgan oder -gewebe begrenzte Tumore, die ma-

roskopisch komplett entfernbar sind. Tumore des Stadium 2 sind unilateral, d.h. sie haben die Mittellinie, repräsentiert durch die Wirbelsäule, noch nicht überschritten. Eine weitere Unterteilung in die Stadien 2a und 2b bezieht sich auf den Lymphknotenbefall durch Tumorzellen. Man unterscheidet folgende Fälle: Im Stadium 2a sind ipsi- und kontralaterale nicht am Tumor adhärenente Lymphknoten histologisch tumorfrei. Im Stadium 2b zeigen dagegen regionale, ipsilaterale nichtadhärenente Lymphknoten einen Tumorbefall, wohingegen die kontralateralen Lymphknoten noch tumorfrei sind. Stadium 3 ist charakterisiert durch einen nicht resektablen Tumor, der die Mittellinie überschreitet und Lymphknotenbefall zeigt. Das Stadium 4 beschreibt eine disseminierte Erkrankung mit Befall von Knochenmark, Knochen, entfernten Lymphknoten, Haut und / oder anderen Organen. Eine Sonderstellung nimmt das Stadium 4S ein. Es betrifft nur Säuglinge und ist gekennzeichnet durch einen lokalisierten Primärtumor bei gleichzeitiger Metastasierung in Leber, Haut und / oder Knochenmark (Neuroblastomstudie NB 97, Fassung vom 30.04.1997).

Metastasierungswege im Neuroblastom sind lymphogen und hämatogen. Hämatogene Metastasen finden sich vor allem in Knochenmark, Knochen, Leber und Haut, selten in Lunge oder Gehirn. Letztere werden gewöhnlich als Manifestation eines Rezidivs oder als Endstadium der Erkrankung betrachtet (Principels and Practice of Pediatric Oncology, 3.Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven). Es ist aufgrund des Ursprungs am Abgang der Arteria mesenterica inferior (Zuckermandelsches Organ) mit räumlicher Nähe zur Wirbelsäule durchaus möglich, daß sich der Tumor durch neurale Foramina in den Spinalkanal ausbreitet und zur Rückenmarkskompression mit entsprechenden neurologischen Ausfällen führt.

1.1.7. Diagnostik

Die Diagnose Neuroblastom wird durch histologische Untersuchung von Tumorgewebe oder durch den Nachweis typischer Tumorzellnester im Knochenmark in Verbindung mit erhöhten Katecholaminmetaboliten (Homovanilin- und Vanilinmandelsäure) im Serum oder Urin gestellt. Dabei muß eines der beiden INSS-Diagnosekriterien für das Neuroblastom erfüllt sein (Brodeur G. M. et al., 1993). Im Rahmen der Neuroblastomstudie NB97 (Fassung vom 30.04.1997) wird neben der Bereitstellung von Tumorgewebe für die Histologie auch ausreichend Gewebe für weitere Untersuchungen gefordert. Zu diesen zusätzlichen Untersuchungen gehören unter anderem Analysen auf N-Myc Amplifikation, 1p-Deletion und Telomeraseaktivität. Eine rein klinische Diagnose ist lediglich für Säuglinge mit Stadium 4S zugelassen, um diese oft schwerkranken Kinder nicht übermäßig durch eine Biopsie zu belasten.

Um die Tumorausdehnung festzustellen, wird ein Minimum an zusätzlicher Diagnostik empfohlen. Wichtig ist dabei vor allem für weitere Verlaufsuntersuchungen eine Bestimmung des Tumolvolumens, um eine Therapiekontrolle durchführen zu können. Diese sollte

möglichst immer mit der gleichen Methode erfolgen. Als bildgebende Verfahren für die Bestimmung des Tumolvolumens werden Sonographie, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie eingesetzt. Ein besonderes Verfahren stellt die mIBG Szintigraphie dar. ^{123}I -Jod-Metajodbenzylguanidin reichert sich, vermittelt über Katecholaminrezeptoren, in katecholaminproduzierenden Geweben und somit besonders in den Neuroblastomzellen im Tumorgewebe an. Mit dieser Methode können sowohl Primärtumor als auch Metastasen spezifisch dargestellt werden (Neuroblastomstudie, NB97, Fassung vom 30.04.1997).

Als Tumormarker werden die Bestimmung von Homovanilin- und Vanilinmandelsäure zur Diagnose und Verlaufskontrolle, neuronspezifische Enolase (NSE) als Verlaufparameter sowie Laktatdehydrogenase (LDH) und Ferritin als prognostische Kriterien genutzt (Evans A.E. et al., 1987).

1.1.8. Prognose

In Abhängigkeit von klinischen Parametern zeigt sich deutlich, daß Patienten mit den lokalisierten Stadien 1 bis 3, aber auch das disseminierte Stadium 4S deutlich bessere Überlebenswahrscheinlichkeiten als Patienten mit Stadium 4 haben. Bessere Überlebenswahrscheinlichkeiten im Säuglingsalter zeigen Patienten mit lokalisierter (Stadium 1-3) als auch metastasierender Erkrankung (Stadium 4) (Neuroblastomstudie, NB97, Fassung vom 30.04.1997). In Bezug auf die Histologie ist für Patienten mit einem Malignitätsgrad 1 die Prognose deutlich besser als für die Grade 2 und 3. Sind im Tumor differenzierte Zellen nachweisbar, verbessert sich die Prognose (Shimada H. et al., 1984).

Unter den molekulargenetischen Parametern ist der Karyotyp geeignet, um prognostische Aussagen zu machen. Allgemein haben aneuploide Tumore mit einem DNA Index >1 eine bessere Prognose als solche mit einem DNA Index $=1$ (Look A. T. et al., 1984). Als bester molekularer Parameter zur Risikodiskriminierung hat sich der Nachweis einer N-Myc Genamplifikation herausgestellt. So charakterisierte Tumore gehen sehr viel häufiger mit disseminierter Erkrankung und schlechter Prognose einher (Brodeur G. M. et al., 1984; Brodeur G. M. et al., 1997). Daneben konnte eine Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1 ebenfalls eindeutig mit schlechter Prognose und Assoziation mit zusätzlichen ungünstigen Faktoren wie einer N-Myc Genamplifikation in Verbindung gebracht werden (Maris J. M. et al., 1995; Ambros I. M. et al., 1996; Brodeur G. M. et al., 1997). Hohe Serum Ferritin Werte und eine hohe neuronspezifische Enolase sind prognostisch ungünstig bzw. werden häufiger bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung beobachtet (Evans A. E. et al., 1987). Ein hoher LDH Wert spiegelt schnellen Zellumsatz wider und ist assoziiert mit einer großen Tumormasse. Somit ergänzt der LDH Wert die klinischen Parameter Alter und Stadium (Principels and Practice of Pediatric Oncology, 3. Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven).

1.1.9. Therapie

Im Rahmen der aktuellen Neuroblastomstudie (NB97, Fassung vom 30.04.1997) erfolgt die Therapie für die Stadien 1-3 risikoadaptiert. Dies minimiert die Nebenwirkungen im Rahmen der Therapie. Als Risikofaktoren gelten N-Myc Genamplifikation und Alter über ein Jahr zum Zeitpunkt der Diagnose. Hieraus läßt sich eine Standardrisikogruppe mit einem oder keinem Risikofaktor bzw. eine Hochrisikogruppe mit beiden Faktoren ableiten. Diese Risikogruppeneinteilung hat im Stadium 4 lediglich Relevanz, um die individuelle Prognose abzuschätzen, behandelt werden alle Patienten im Stadium 4 nach dem gleichen Therapieschema.

Die Initialtherapie des Neuroblastoms basiert auf Chirurgie, Chemotherapie und Bestrahlung

a) Chirurgie: Abhängig vom Zeitpunkt nach der Diagnose kann die Operation sowohl diagnostische als auch therapeutische Funktion haben. Zu den Zielen einer primären Operation gehören: Diagnosesicherung, Gewinnung von Tumormaterial für histologische und biologische Untersuchungen, intraoperative Festlegung der Tumorausdehnung und Versuch der Tumorentfernung (Neuroblastomstudie, NB 97, Fassung vom 30.04.1997; *Principals and Practice of Pediatric Oncology*, 3. Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven).

b) Chemotherapie: Die Chemotherapie dominiert eindeutig die Therapie des Neuroblastoms. Sie basiert auf einer risikoadaptierten Multichemotherapie, d.h. vorteilhafte Ergänzung von Wirksynergismen sowie Minimierung der Zytotoxizität und unerwünschter Nebenwirkungen. Im Rahmen der Chemotherapie gibt es für Patienten der Hochrisikogruppe noch die Möglichkeit einer sogenannten Megatherapie. Nach vorheriger ausreichender Sammlung von Stammzellen aus dem peripheren Blut erhalten die Patienten eine Hochdosischemotherapie, bei der im Hinblick auf die nachfolgende autologe Stammzelltransplantation auf die Knochenmarkstoxizität keine Rücksicht genommen werden muß (Neuroblastomstudie NB 97, Fassung vom 30.04.1997; *Principals and Practice of Pediatric Oncology*, 3. Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven, Berthold F. et al., 2000).

c) Bestrahlung: Eine lokale Radiotherapie ist lediglich vorgesehen für Primärtumore von Hochrisikopatienten, sofern nach 6 Chemotherapieblöcken und einer Zweitoperation noch kontrastmittel- oder mIBG-speichernde Tumorresiduen vorhanden sind (Neuroblastomstudie NB97, Fassung vom 30.04.1997; *Principals and Practice of Pediatric Oncology*, 3. Edition, Chapter 29, Lippincott-Raven).

1.2. Apoptose

1.2.1. Allgemeine Einleitung

Apoptose ist ein deskriptiver Name, mit dem man den Prozeß des programmierten Zelltodes bezeichnet (Fraser A. et al., 1996). Durch diesen Vorgang kontrolliert ein Organismus die Zahl der Zellen. Während der Apoptose aktiviert die Zelle einen Mechanismus, der sie systematisch zerstört. In der Zellmembran entstehen Membranschäden, auf der Oberfläche erscheinen pro-phagozytotische Signale, die Zelle wird kompakter, das Chromatin kondensiert und die DNA zerfällt. Dieser Vorgang geschieht aktiv und erstreckt sich über einen Zeitraum von wenigen Minuten bis wenige Stunden (Molekularbiologie der Gene, Kapitel 36.10, B.Lewis, Spektrum Verlag; Williams G.T.,1991). Die Reste einer apoptotischen Zelle werden als „apoptotic bodies“ bezeichnet und rasch von umgebenden Zellen phagozytiert. Ausgelöst werden kann Apoptose auf sehr unterschiedliche Weise: durch Entzug von Wachstumsfaktoren, Glucocorticoidtherapie, Gamma-Strahlung, durch Induktion bestimmter Signalkaskaden über Zelloberflächenrezeptoren oder über einen Angriff von zytotoxischen T-Helfer Zellen. Viele der Erkenntnisse über den basalen Mechanismus des programmierten Zelltodes stammen aus Untersuchungen von Horvitz (1999) über den entwicklungsabhängigen Zelltod in *Caenorhabditis elegans*. In diesem Wurm durchlaufen 131 der 1090 somatischen Zellen, die im Laufe der Entwicklung zu einem adulten Nematoden gebildet werden, den programmierten Zelltod (Fraser A. et al., 1996). Ein entsprechendes Phänomen tritt bei Vertebraten auf. Am deutlichsten wird dies bei der Entwicklung des Nervensystems oder während klonaler Selektion des Immunsystems. Darüber hinaus spielt Apoptose aber auch eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr und der Limitierung von unkontrolliertem Zellwachstum (Molekularbiologie der Gene, Kapitel 36.10, B.Lewis, Spektrum Verlag; Williams G.T.,1991). Im Folgenden soll auf die wichtigsten Mechanismen der Apoptosinduktion eingegangen werden.

1.2.2. Rezeptorvermittelte Induktion der Apoptose

1.2.2.1. Das TNF- und CD95/Fas/APO-1- Rezeptor System

Der „Tumor Necrosis Factor Receptor 1“ (TNFR1) und CD95/Fas/APO-1 gehören zur „Tumor Necrosis Factor Receptor“- Familie (Fraser A. et al., 1996). Sie sind beide in der Lage, über ihre Liganden den Tumornekrosefaktor (TNF) und den Liganden des Oberflächenantigens CD95 (CD95L), Apoptose zu induzieren. Während TNF ein weitverbreitetes Zytokin ist, findet man den CD95 Liganden hauptsächlich an der Oberfläche von zytotoxischen T-Helfer Zellen. Charakteristisch für beide Rezeptoren ist eine intrazelluläre „death domain“, aus ungefähr 70 Aminosäuren, die evolutionär hoch konserviert ist. Diese „death domains“ sind wesentlich an der Signaltransduktion beteiligt. So rekrutieren sie nach Ligandenbindung weitere Proteine, die eine „death domain“ enthalten. Für CD95 ist dies das Protein FADD. Demgegenüber benötigt TNFR1 zunächst TRADD als Adapterprotein, um schließlich auch FADD zu binden. Die so entstandenen Komplexe

sind notwendig, um eine Signalkaskade auszulösen. Ferner sind für eine Induktion von Apoptose spezielle Proteasen notwendig, deren Prototyp das „Interleukin-1 β -converting enzyme“ (ICE) darstellt (Fraser A. and Evan G., 1996).

ICE-verwandte Proteasen enthalten alle die Aminosäure Cystein in ihrem aktiven Zentrum, spalten ihr Zielprotein c-terminal an einer spezifischen Asparaginsäure und werden daher auch Caspasen genannt. In der Zelle werden sie als inaktive Vorläufer synthetisiert, sogenannte Procaspasen, die selbst wieder an einer spezifischen Asparaginsäure durch eine andere Caspase prozessiert werden. So setzen sie eine proteolytische Kaskade in Gang (Raff M., 1998).

Im Anschluß an die Bildung des CD95-FADD bzw. TNFR1-TRADD-FADD Komplexes wird von beiden die Caspase-8 rekrutiert, was in einer Aktivierung der Caspase-3 und letztendlich in der Auslösung der Apoptose mündet. Für den CD95/Fas Rezeptor gibt es abhängig vom Zelltyp noch eine weitere Möglichkeit, Apoptose zu induzieren. Im Anschluß an die Rekrutierung von Caspase-8 kommt es über Bid, ein proapoptotisches Mitglied der bcl-2 Familie, zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Anschließend wird über einen Komplex aus Cytochrom c und dem Protein Apaf-1 Caspase-9 rekrutiert und schließlich Caspase-3 gespalten (Prendergast G.C., 1999)

1.2.2.2. Die p75NGFR Signalkaskade

In der extrazellulären Domäne des NGFR gibt es eine evolutionär konservierte Struktur, bei der es sich wahrscheinlich um die Ligandenbindungsstelle handelt (Johnson D. et al., 1986). An diese bindet NGF, ein neurotropher Faktor, der verantwortlich für Differenzierung und Überleben sympathischer und sensorischer Neurone ist. Bei dem Rezeptor handelt es sich um den „low affinity nerve growth factor receptor“ (p75NGFR), ein mehrfach glycosyliertes Transmembranprotein ohne Tyrosinkinaseaktivität. Daneben wurde ein „high affinity nerve growth factor receptor“ (Tyrosinkinase A, TrkA) beschrieben, dessen Tyrosin-Phosphorylierung und Tyrosinkinaseaktivität durch NGF induziert wird (Kaplan D.R. et al., 1991). Er ist Mitglied der Tyrosinkinase (trk)-Superfamilie, die bevorzugt in neuronalen Geweben exprimiert werden. Als Dimer mit p75NGFR bilden sie den „high affinity nerve growth factor receptor“ Komplex.

Die Aussagen, welche Teile des Komplexes für eine hoch affine Bindung von NGF verantwortlich sind, widersprechen sich. Klein et al. (1991) sind der Ansicht, daß eine solche Bindung die Anwesenheit des p75NGFR nicht benötigt. Hempstead et al. (1991) favorisieren, daß eine Coexpression von TrkA und p75NGFR für eine hoch affine Bindung von NGF notwendig ist, wobei der p75NGFR hier die Affinität von NGF an den TrkA erhöht. Eine Aktivierung des TrkA alleine scheint verantwortlich für die Zelldifferenzierung zu sein. Die Aktivierung des p75NGFR alleine resultiert in einer p75NGFR induzierten Apoptose (Rabizadeh S. et al., 1993; Frade J. M. et al., 1996; Kuner P. and Hertel C., 1998). P75NGFR zeigt strukturelle Ähnlichkeit zur TNFR- und Fas- (APO-1/CD95) Fa-

milie (Rabizadeh S. et al., 1993; Frade J.M. et al., 1996) und ist über die Bindung von Neurotrophinen in der Lage, über eine Sphingomyelinlipase Apoptose zu induzieren. Nach der Hydrolyse des Phospholipids Sphingomyelin in der Zellmembran wird ein „second messenger“, Ceramid, gebildet. Durch die Ceramidproduktion wird eine Aktivierung der „stress-activated protein kinase2 (SAPK) induziert (Verheij M. et al., 1996), ebenso wie eine Aktivierung von NFkB. Beides führt letztendlich zur Induktion von Apoptose. Diese Signalkaskade wird auch von einer Reihe Zytokinrezeptoren wie z.B. TNFR1 aktiviert, welcher nach TNF-Bindung direkt an der Induktion von Zelltod beteiligt ist (Carter B.D. et al., 1996).

1.2.3. Induktion von Apoptose über Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53

Das p53 Protein ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor (Farmer G., et al., 1992). Die Domäne zur Transkriptionsaktivierung liegt im Aminoterminus des Proteins (Fields S. et al., 1990), die notwendige Domäne zur Stabilisierung der spezifischen Bindung an die DNA findet sich auf dem Carboxyterminus (Stürzbecher H-W. et al., 1992). Die Region für sequenzspezifische DNA-Bindung ist in einer Vielzahl von Tumoren mutiert (Rouach E.Y., et al., 1996).

P53 hat im wesentlichen die Funktion, die zelluläre Reparatur von DNA-Schäden in Gang zu setzen. Als Tumorsuppressor dient p53 somit zur Bewahrung genetischer Stabilität. Verschiedene Streßfaktoren wie UV-Strahlung oder Gamma-Strahlung induzieren einen raschen Anstieg der p53 Spiegel, hauptsächlich über die Stabilisierung des normal sehr kurzlebigen Proteins. Das Protein p19^{ARF} verhindert den Abbau und die Inaktivierung von p53 dadurch, daß es in Streßsituationen an Mdm2 bindet, welches die p53 Aktivität über diverse Mechanismen antagonisieren kann (Jacobs J.J.L. et al., 1999; Weber J.D. et al., 1999; Pomerantz J. et al., 1998). Die Aktivierung von p53 führt zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase und zur Induktion von Apoptose. Als Transkriptionsfaktor kann p53 auf zwei Wegen in die Induktion der Apoptose eingreifen. Zum einen führt eine erhöhte p53 Konzentration in der Zelle zu einer vermehrten Expression von Bax. Dieses Protein ist ein proapoptotisches Mitglied der bcl-2 Familie, welches in den Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom c und über Caspase-9 zur Aktivierung von Caspase-3 führt. Eine zweite Möglichkeit ist eine Interaktion in der CD95/Fas/APO-1 Signalkaskade. P53 ist in der Lage die Fas/APO-1 Expression zu induzieren (Raff M., 1998; Rouach E.Y. et al., 1996). Dies führt zur direkten Stimulierung der CD95/Fas/APO-1-Signalkaskade.

1.2.4. Das c-Myc Protein und seine Funktion

C-Myc wurde als zelluläres Gegenstück des transformierenden Onkogens v-Myc beschrieben (Roussele M. et al., 1979). Weitere Protoonkogene aus der Myc-Familie sind N-Myc, L-Myc und B-Myc. Der Carboxyterminus von c-myc ist gekennzeichnet durch die Abfolge einer basischen Domäne, einem Helix-loop-Helix und einem Leuzin Zipper (b/HLH/Z) (Murre C. et al., 1989; Landschulz W.H. et al., 1988). Diese Strukturelemente vermitteln hauptsächlich die spezifische Erkennung eines DNA Motifs, das in allen Zielgenen enthalten ist. Für eine physiologische DNA-Bindung und biologische Aktivität ist die Bildung eines Heterodimers mit Max notwendig (Prendergast G.C. et al., 1999).

Am Aminoterminus von c-Myc befindet sich die Transaktivierungsdomäne (Kato G.J. et al., 1990) und zwei, bei allen Myc Familienmitgliedern enthaltene, hochkonservierte Segmente, die sogenannten Myc Boxen 1 und 2 (Sarid J et al., 1987). Die strukturellen Eigenschaften weisen auf eine Aktivität von Myc als Transkriptionsfaktor hin (Amati B. et al., 1992).

Das Myc Protein ist in der Lage, zwei gegensätzliche Prozesse zu induzieren. Es kann sowohl Proliferation vorantreiben als auch Apoptose induzieren. Eine kontinuierliche Expression des c-Myc Gens bietet die Möglichkeit, unabhängig vom Zellzyklus, also auch jenseits des R-Kontrollpunktes, Zellproliferation exponentiell voranzutreiben (Waters C.M. et al., 1991).

Über eine Aktivierung des Myc Gens ist es möglich, in ruhenden Zellen den Zellzyklus wieder in Gang zu setzen und eine Zellzyklusprogression voranzutreiben (Eilers M. et al., 1991; Lutz W. et al., 1996). In normalen Zellen geschieht eine Kontrolle der Myc Funktion unter anderem über die An- oder Abwesenheit von Mitogenen, die an Myc binden und seine Funktion inhibieren (Waters C.M. et al., 1991). Zu einer wachstumsfaktor-unabhängigen Expression des Myc Gens kommt es in Tumoren als Ergebnis entweder von Veränderungen des Myc Gens selbst oder durch Mutationen von Proteinen aus den Signalkaskaden, die die Expression des Myc Gens regulieren. So kann es zu Myc induzierter Proliferation auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren kommen (Fanidi A. et al., 1992; Bouchard C. et al., 1998). Unter diesen Bedingungen ist eine Proliferation nur noch zu limitieren durch eine gleichzeitige Induktion von Apoptose über das Myc Gen (Bouchard C. et al., 1998). Evan et al. (1992) konnten in Fibroblasten eine c-Myc induzierte Apoptose nachweisen, deren Ausmaß abhängig von der c-Myc Expression war. Harrington et al. (1994) versuchen mit ihrem „Dualen-Modell“ die Doppelrolle von c-Myc zu erklären. Dabei scheint c-Myc induzierte Apoptose ein physiologischer Aspekt der Funktion des c-Myc Gens zu sein, welcher durch das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren reguliert wird. Serumdeprivierte Zellen sterben aufgrund des Mangels an Überlebensfaktoren, es kommt zu c-Myc induzierter Apoptose. Der genaue Mechanismus einer Myc induzierten Apoptose ist bislang noch nicht eindeutig aufgeklärt. Unumstritten scheint die komplexe Interaktion des Myc Gens mit Mechanismen der Apoptoseinduktion zu sein. Ein Zusam-

menhang zwischen aktivem Myc Gen und einer Akkumulation von stabilisiertem p53 wurde nachgewiesen (Hermeking H. et al., 1994). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß für eine effiziente Apoptoseinduktion über c-Myc eine Oberflächeninteraktion zwischen CD95-Ligand und seinem Rezeptor benötigt wird (Hueber A-O. et al., 1997). Andererseits wurden auch Faktoren beschrieben, die an einer Hemmung c-Myc induzierter Apoptose beteiligt sind. c-Myc induzierte Apoptose kann supprimiert werden über Zytokine wie IGF1 (Harrington E.A. et al., 1994; Hueber A-O. et al., 1997) oder Antiapoptoseproteine wie z.B. bcl-2 (Bissonnette R.P. et al., 1992; Fanidi A. et al., 1992; Hueber A-O. et al., 1997).

1.2.5. Regulation von Apoptose: bcl-2 Familie

Die bcl-2 Familie reguliert den Tod der Zelle über Kontrolle der Permeabilität der Mitochondrienmembran während der Apoptose. Der Export von Cytochrom c durch die Mitochondrienmembran geschieht durch einen Polyprotein Kanal. Ein spannungsabhängiger Ionenkanal, VDAC („voltage dependent anion channel“), dient als eigentliche Pore für den Transport von Cytochrom c. Während die proapoptotischen Proteine Bax und Bad eine Öffnung des VDAC-Kanals beschleunigen, schließen antiapoptotische Proteine wie bcl-2 und bcl-xl den Kanal durch direkte Bindung (Shimizu S. et al., 1999; Martinou J.C., 1999).

1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von Apoptose für das Neuroblastom näher untersucht werden. Dazu mußten Apoptosehäufigkeit, bcl-2 Expression und die Expression des p75NGFR in Schnitten von Tumorgewebe, RNA-Isolaten oder Proteinlysaten gemessen werden. In einem ersten Fragenkomplex sollte die prognostische Relevanz von Apoptose für die Charakterisierung des Neuroblastoms geklärt und die Zusammenhänge zwischen Apoptosehäufigkeit und klinischen Parametern (letaler Krankheitsverlauf, Zeitraum eines ereignisfreien Überlebens, Alter zum Diagnosezeitpunkt und Krankheitsstadium), sowie dem wichtigsten molekularbiologischen Prognosekriterium, N-Myc Amplifikation, beschrieben werden. Vor dem Hintergrund der dualen Funktion von c-Myc sowohl Apoptose zu induzieren als auch Zellproliferation vorantreiben zu können, soll in einem zweiten Fragenkomplex untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Antiapoptoseprotein bcl-2, der N-Myc Amplifikation und der Apoptose sichtbar gemacht werden und dieser für die Prognose beim Neuroblastom herangezogen werden kann. Im Rahmen der neuronalen Entwicklung spielen der „nerve growth factor“ (NGF) und seine Rezeptoren für Entwicklung und Differenzierung dieser Zellen eine wesentliche Rolle. Aus Neuroblastom-Zelllinien ist bekannt, daß der „low affinity nerve growth factor receptor“ (p75NGFR) eine Signalkaskade in Gang setzen kann, die in Apoptose mündet. So soll in einem dritten Fragenkomplex untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression des p75NGFR, der Amplifikation des N-Myc Gens, sowie der Apoptosehäufigkeit gibt und dieser als prognostischer Faktor für die Entwicklung des Neuroblastoms gewertet werden kann.

2.1. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

2.1.1. Paraffin-Einbettung

Paraformaldehyd 8% (Sigma, Deisenhofen), 1:1 verdünnt mit PBS (Sigma, Deisenhofen), Paraffin schüttelfähig 56 - 58 °C (Merck, Frankfurt), Paraffin schüttelfähig 51 - 53 °C (Merck, Frankfurt), Paraffin schüttelfähig 42 - 44 °C (Merck, Frankfurt), Ethanol 70, 80 und 96% (Riedel-de-Haen, Seelze), Isopropanol (Riedel-de-Haen, Seelze), Aqua dest., 50 - 60 mg Tumorgewebe, Wässerungssiebe aus Plastik

2.1.2. Vorbereitung der Objektträger

Extran alkalisch 15% (Merck, Frankfurt) in Aqua dest., TESP 2% (Merck, Frankfurt) in Aqua dest., Aceton (Riedel-de-Haen, Seelze), Aqua dest., Objektträger 26X76 mm

2.1.3. Paraffinschnitte

Microtom (Leica RM 2135 und CM 1900, Wetzlar), Wasserbad (Leica, Wetzlar), Messer (Leica, Disposable Microtome Blades 819, Wetzlar), Gewebekleber (Tissue tek, Sakura),

2.1.4. Deparaffinisierung der Schnitte

Xylol (Merck, Frankfurt), Ethanol 100, 85, 50% (Riedel-de-Haen, Seelze) in Aqua dest., NaCl 0,85% (Roth, Karlsruhe), PBS (Sigma, Deisenhofen), Proteinase K 20µg/ml (Qiagen, Hilden), Formaldehyd 4% (Merck, Frankfurt) in Aqua dest.

2.1.5. TUNEL-Färbung

In situ cell death detection kit (Boehringer, Mannheim), PBS (Sigma, Deisenhofen), H₂O₂ 0,3% (Merck, Frankfurt) in Methanol (J.T.Baker, Deventer, NL), Triton-X 0,1% (Serva, Heidelberg) in Sodium Citrat 0,1% (Sigma, Deisenhofen), Dnase I 1mg/ml (Promega, Madison, WI, USA), Parafilm „M“ (Laboratory Film, American National Can™, Greenwich, CT, USA)

Sonstiges

Fluorescent mounting medium (Dako, Hamburg), Deckgläser 22X22mm, Petrischalen, 10 cm, Wärmeschrank, 37 °C

2.1.6. Dapi-Färbung

NP 40 0,1% (Calbiochem, La Jolla, CA USA), in PBS (Sigma, Deisenhofen), Dapi (4,6-Damidino-2-Phenylindol, 5µg/ml) (Sigma, Deisenhofen), 1:50 in NP40/PBS

2.1.7. Auswertung der Schnitte

Microscop (Leica DM RB, Wetzlar), Kamera (Kappa CF 15/4 MCC), Software (LeicaQWin)

2.2. RT-PCR

2.2.1. Primersuche

Sequenzsuche mit „Pub-med Nucleotid Query“, Primersuche mit Software „Oligo“, Prüfung der Primer auf homologe Sequenzen mit „BLAST sequence similarity search“ (Basic Blast version 2.0), NGFR Primer1: 5`Ctg CAA CCT ggg CgA ggg TgT 3` (Roth, Karlsruhe), NGFR Primer2: 5`Ctg ggg gTg Tgg ACC gTg TAA 3` (Roth, Karlsruhe), β -Actin Primer1: 5`ATC Tgg CAC CAC ACC TTC TAC AAT gAg Ctg Cg 3` (Roth, Karlsruhe), β -Actin Primer2: 5`CgT CAT ACT CCT gCT Tgc TgA TCC ACA TCT gC 3` (Roth, Karlsruhe)

2.2.2. RNA-Isolierung

Eppendorfgefäß 1,5 ml, 30 mg Tumorgewebe, 800 μ l RNAzolB (WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden), 80 μ l Chloroform (Riedel-de-Haen, Seelze), Isopropanol (Riedel-de-Haen, Seelze), Ethanol 75% (Riedel-de-Haen, Seelze) in Aqua dest., Aqua dest.

Sonstiges

Vortex Genie 2™ (Bender u. Hobein AG, Zürich), Eppendorf Centrifuge 5402, Speed-Vac (Keutz Labor Geräte, Reiskirchen), Heizblock Techne Dri-Block DB.3D, Pipettenspitzen: ART (Aerosolresistent Tips, Molecular Bio Products, San Diego, Californien), Gilson Pipette (Keutz Labor Geräte, Reiskirchen)

2.2.3. Reverse-Transkription

5 μ l First Strand Buffer (GiBCO, Karlsruhe), 1 μ l RNAsin (40 Units/ μ l) (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 μ l Primer p(dT)₁₅ for cDNA synthesis, (Boehringer, Mannheim), je 1 μ l dNTP (10mM) (Perkin Elmer, Weiterstadt), 5 μ l Dithiothreitol, DTT (0,1M) (GiBCO, Karlsruhe), 3 μ l BSA, bovin Serum Albumin (0,1mg/ml) (Serva, Heidelberg), 3 μ g RNA-Isolat, 1 μ l (200 Units) Reverse Transcriptase (SuperscriptII, GiBCO, Karlsruhe), Aqua dest.

Sonstiges

RNA/DNA Calculator, Gene QuantII (Pharmacia Biotech, Cambridge, GB), Cycler: Gene Amp PCR-System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt), Pipette und Pipettenspitzen (siehe 2.2.2.)

2.2.4. Polymerase Kettenreaktion

3 μ l cDNA, 1 μ l NGFR Primer 1 bzw. β -Actin Primer 1, 1 μ l NGFR Primer 2 bzw. β -Actin Primer 2, 5 μ l 10X Mobitaq Reactionbuffer (Mo Bi Tec, Göttingen), 0,1 μ l Taq Polymerase, 1000 U MoBiTaqK (Mo Bi Tec, Göttingen), 0,9 μ l 10X Mobitaq Dilutionbuffer (Mo Bi Tec, Göttingen), je 1 μ l dNTP (Perkin Elmer, Weiterstadt), 1 μ l Formamid (Sigma, Deisenhofen), 3 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck, Frankfurt), Aqua dest.

Sonstiges

Cycler: Gene Amp PCR-System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt), Pipette und Pipettenspitzen (siehe 2.2.2.)

2.2.5. Gelelektrophorese

Agarosegel

50 ml Tris-Borate EDTA Buffer (1:5 in H₂O verdünnt) (Sigma, Deisenhofen), 1 g NuSieve 3:1 Agarose (Rockland, Maine, USA)

Ladepuffer 5X

0,0625 g Bromphenolblau (Merck, Frankfurt), 28,7 ml Glycerol 87% (Merck, Frankfurt), 0,25 g SDS (Dodecylsulfat-Natrium-Salz) (Serva, Heidelberg), 16,3 ml Aqua dest., Waage

Gellauf

10 µl Probe, 10 µl Ladepuffer in 1 Kontrollspur pro Gel 100bp DNA Ladder (GiBCO, Karlsruhe), Gelkammer (Pharmacia, Cambridge, GB), Power Supply GPS 200/400

Sonstiges

Pipetten und Pipettenspitzen (siehe 2.2.2.), Meßzylinder, Bechergläser, Metallspatel, Heizplattenrührer IKAMAGRET (50-300°C, 100 bis 1100 Umdrehungen/min), Image Master VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, GB), Software (Image Master VDS Version 3.0)

2.3. Western Blot Analyse

2.3.1. Herstellung von Zellysaten

Lysepuffer

7,5 ml 150 mM NaCl (Roth, Karlsruhe), 2,5 ml NP40 1% (Sigma, Deisenhofen), 12,5 ml 50mM Tris-Puffer pH 8 (Roth, Karlsruhe), 227,5 ml Aqua dest., Lagerung bei 4 °C

Proteaseinhibitoren

5 µl Aprotinin (Roth, Karlsruhe) 1 mg/ml in Aqua dest., 5 µl Leupeptin (Boehringer, Mannheim) 1 mg/ml in Aqua dest., 5 µl Pepstatin (Boehringer Mannheim) 1 mg/ml in Ethanol (Riedel-de-Haen, Seelze), 25 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Roth, Karlsruhe)

Sonstiges

pH-Meter 761 Calimatic, Knick, Eppendorf Centrifuge 5402, Eppendorfgefäß 1,5 ml, Plastikmörser, Wasserbad, flüssiger Stickstoff, Pipette und Pipettenspitzen siehe 2.2.2.

2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Lösung

50 mg Coomassie Brilliant Blau G250 (Roth, Karlsruhe), 23,75 ml Ethanol (Riedel-de-Haen, Seelze), 50 ml ortho-Phosphorsäure 85% (Merck, Frankfurt), ad 500 ml H₂O, die Lösung filtrieren und lichtgeschützt aufbewahren

Referenz-Stocklösung

BSA (bovines Serum Albumin) (Serva, Heidelberg) 1 mg/ml in Lysepuffer

Sonstiges

0,15 M NaCl (Roth, Karlsruhe), Bechergläser, Meßzylinder, Cuvetten, 10X10X48 mm (Sarstedt), Photometer (Spectrophotometer U-2001, Hitachi), Pipetten und Pipettenspitzen (siehe 2.2.2.)

2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgel

2,5 ml Anodenpuffer, 1,66 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, 5,8 ml Aqua dest., 8 µl Bromphenolblau (Merck, Frankfurt), 8 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) (Roth, Karlsruhe), 100 µl APS 10% (Ammoniumpersulfat) (Aldrich, Steinheim) in Aqua dest.

Trenngel 15%

16,87 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, 8,45 ml Kathodenpuffer, 2,83 ml Aqua dest., 5,4 ml lineares Polyacrylamid 2% (Sigma, Deisenhofen), 27 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) (Roth, Karlsruhe), 270 µl APS 10% (Ammoniumpersulfat) (Aldrich, Steinheim) in Aqua dest.

Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung

375 ml Acrylamid 40% (AppliChem, Darmstadt), 4 g Bisacrylamid (Sigma, Deisenhofen), ad 500 ml Aqua dest., bei 4 °C abgedunkelt aufbewahren

4X Anodenpuffer

30,3 g Tris-Base (Roth, Karlsruhe), 20 ml SDS 10% (AppliChem, Darmstadt) in Aqua dest., auf pH 6,8 mit Salzsäure rauchend 37% (Merck, Frankfurt), ad 500 ml Aqua dest.

4X Kathodenpuffer

20 ml SDS 10% (AppliChem, Darmstadt), 8 ml EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,5M (Sigma, Deisenhofen), 18,75g Trizma Hydrochloride (Sigma, Deisenhofen), 76,45 g Tris Base (Roth, Karlsruhe)

Laufpuffer pH 8,3

151 g Tris Base (Roth, Karlsruhe), 940 g Glycin (Roth, Karlsruhe), 250 ml SDS 20% (AppliChem, Darmstadt) in Aqua dest., 4000 ml Aqua dest.; 1:10 verdünnen

3X SDS Probenpuffer

4,8 ml Anodenpuffer, 0,6 g SDS (AppliChem, Darmstadt), 0,462 g DTT (Dithiothreitol) (Sigma, Deisenhofen), 1 Spatelspitze Bromphenolblau (Merck, Frankfurt), 3,5 ml Glycerin (Merck, Frankfurt), ad 10 ml Aqua dest. bei 4 °C aufbewahren

2.3.4. Reagenzien für Western-Blot

Blocklösung

12,5 g Magermilchpulver für Mikrobiologie (Merck, Frankfurt), 500 µl Tween20 0,2% (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) in Aqua dest., 12,5 ml 20X TBS, ad 250 ml Aqua dest., filtern und bei 4 °C aufbewahren

20X TBS

60,5 g Tris Base (Roth, Karlsruhe), 87,66 g NaCl (Roth, Karlsruhe), ad 500 ml Aqua dest.,

Blotpuffer

200 ml Methanol 20% (J.T.Baker, Deventer, NL) in Aqua dest., 2,42 g Tris Base 20 mM (Roth, Karlsruhe), 11,62 g Glycin 15 mM (Roth, Karlsruhe), ad 1000 ml Aqua dest.

Sonstiges

Methanol 100% (zur Behandlung der PVDF-Membran), PVDF-Membran Immobilon-P Transfermembran (Millipore, Bedford, WA USA), Blotting Papier Gel-blotting-Papier (Schleicher und Schuell, Düsseldorf), Entwicklerlösungen ECL Plus Western blotting Detektions-Reagenzien A und B (Amersham, Freiburg), Film ECL Hyperfilm (Amersham, Freiburg)

Antikörper

α-bcl-2 AB

Anti-bcl-2 Antikörper (Maus), monoklonal, 100 µg IgG/ml. (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), im Wester-Blot 1:2000 in Aqua dest. verdünnt eingesetzt

α-CDK2 AB

Anti-human CDK2 Antikörper (Kaninchen), polyklonal, 200 µg IgG/ml (Biotech, Santa Cruz), im Western-Blot 1:1000 in Aqua dest. verdünnt eingesetzt

α -Kaninchen AB

Anti-Kaninchen Antikörper (Esel) (Amersham, Freiburg), im Western-Blot 1.3000 in Aqua dest. verdünnt eingesetzt

α -Maus AB

Anti-Maus Antikörper (Schaaf) (Amersham, Freiburg), im Western-Blot: 1:3000 in Aqua dest. verdünnt eingesetzt

Waschlösung

50 ml 20XTBS , 2 ml Tween20 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), ad 1000 ml H₂O

Sonstiges

Blottkammer, Power Supply (Hoefler, San Francisco, USA), full range rainbow marker (Amersham, Freiburg)

2.4. Tumormaterial

Primäre humane Neuroblastome wurden freundlicherweise von Herrn PD. Dr. med. Holger Christiansen, Universitäts-Kinderklinik, Marburg, zur Verfügung gestellt.

Alle Patienten mit Verdacht einer Neuroblastomkrankung werden in der Bundesrepublik Deutschland nach Richtlinien der Neuroblastomstudie (Neuroblastomstudie NB 97, Fassung von 30.04.1997) der Deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) diagnostiziert und behandelt.

Das Untersuchungsmaterial wird von den Mitgliedern der GPOH unmittelbar nach Operation, Biopsie oder Punktion auf dem Postweg (gekühlt) in die Kinderklinik Marburg versandt. Hier wird das Material sofort aufgearbeitet und zunächst bei -80 °C eingefroren. Alle Angaben bezüglich der Stadien und weitere klinische Daten stammen aus den betreffenden Kliniken. Die Amplifikation von N-Myc wird im Neuroblastomlabor der Kinderklinik Marburg bestimmt. Die in dieser Arbeit untersuchten Neuroblastomtumore wurden aus der in der Kinderklinik Marburg etablierten Tumorbank entnommen und stellen hinsichtlich der Stadien- und Altersverteilung, sowie der N-Myc Genamplifikation eine annähernd repräsentative Gruppe der Gesamtneuroblastome der Bundesrepublik Deutschland dar.

3.1. TUNEL Methode

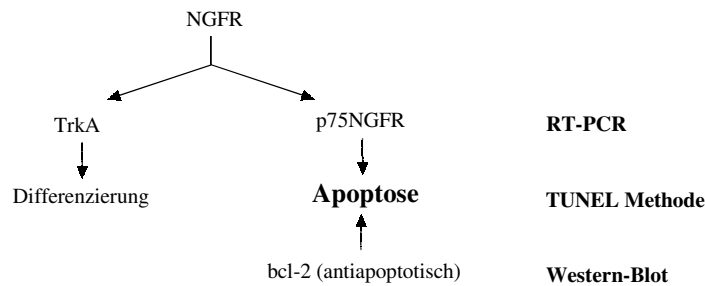


Abb.1: Übersicht über den Versuchsablauf

3.1.1. Einbettung des Tumorgewebes in Paraffin

Vor der eigentlichen Einbettung des Tumorstückes in Paraffin erfolgt zunächst die Fixierung des Gewebes, um die gewünschten Strukturen optimal zu erhalten und eine Färbung zu ermöglichen. Die kleinen Gewebeproben (ca. 60 mg) wurden direkt in Fixierlösung (Paraformaldehyd 8%, 1:1 mit PBS verdünnt) gegeben, in der sie schwammen. Durch kurzes Schwenken überzeugte man sich davon, daß die Präparate nicht an der Wand des Gefäßes klebten. Dieser Fixierschritt erfolgte über mindestens 24 Stunden bei 4 °C. Eine Voraussetzung für die Anfertigung gleichmäßiger dünner Schnitte und die Arretierung der Präparate in einer Schneidevorrichtung, ist die Einbettung der Gewebestücke in ein geeignetes Medium. In der vorliegenden Arbeit wurde Paraffin als Medium für die Einbettung gewählt. Der erste Schritt zur Einbettung besteht im Auswaschen der Fixierlösung und der Entwässerung des Gewebes. Dazu wurden die Tumorproben in beschriftete Wässerungssiebe aus Plastik gelegt und über Nacht unter fließendem Wasser ausgewaschen. Nach dem Auswaschen der Fixierflüssigkeit müssen Präparate, die in nicht mit Wasser mischbare Einbettmedien übertragen werden sollen, zunächst entwässert werden. Die Entwässerung erfolgt stufenweise in einer aufsteigenden Alkoholreihe, um Zerreißen oder Schrumpfungen des Gewebes zu vermeiden. Hier wurde nacheinander jeweils für 2 Stunden in 70%, 80% und 96%igem Alkohol inkubiert.

Nach der Alkoholreihe kommt vor der mit Wasser nicht mehr mischbaren Phase eine Zwischenflüssigkeit. Diese ist sowohl mit Alkohol mischbar als auch noch im Stande, geringe Mengen Wasser aufzunehmen. So erfolgte nun zweimal eine Inkubation für 1,5 Stunden in Isopropanol. Während der Entwässerung blieben die Proben ständig in den Wässerungssieben. Mit Hilfe der Zwischenflüssigkeit wurden so vor der eigentlichen Paraffineinbettung auch noch Alkoholreste entfernt und Restwasser entzogen. Anschließend wird die Probe, die sich immer noch im Wässerungssieb befindet, in Paraffin (Schmelzpunkt 42 - 44°C) über Nacht durchtränkt. Die Proben werden dann für jeweils 3 Stunden in Paraffin mit den Schmelzpunkten 51 - 53°C und 56 - 58°C inkubiert. Zuletzt wird der Paraffinblock gegossen. Paraffin bildet beim Abkühlen Kristalle. Erfolgt das Abkühlen rasch, so ist das Gefüge des erstarrten Paraffins homogen feinkristallin und die Schneidbarkeit gut. Daher wurde das Gewebestück aus dem Wässerungssieb entnommen, in eine Gießform auf Eis gelegt und mit Paraffin (Schmelzpunkt 56 - 58°C) übergossen. Die Bodenplatte des Wässerungssiebes wurde als Halterung für den gegossenen Paraffin-

block angedrückt. Nach ca. 10 - 15 Minuten war der Block ausgehärtet und konnte der Form entnommen werden.

3.1.2. Anfertigung der Paraffinschnitte

Um eine gute Haftung der Schnitte an den Objektträgern zu gewährleisten, wurden diese zunächst gereinigt. Dazu wurden die Objektträger über Nacht vollständig mit Extran alkalisch 15% bedeckt und anschließend für je 2 Stunden mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gewaschen. Abschließen erfolgte die Trocknung der Objektträger für 1,5 Stunden bei 175°C.

Mit dem Mikrotom wurden Gewebeschnitte von 3 µm Dicke angefertigt. Diese wurden mit Hilfe eines Pinsels in ein gleichmäßig temperiertes Wasserbad (39°C) mit der Messerseite nach unten überführt. Im Wasserbad streckten sich die Schnitte auf der Wasseroberfläche sofort und konnten dann mit einem Objektträger, der zu 2/3 in das Wasser getaucht war, durch Hochheben des Glases aufgefischt werden. Anschließend wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 40 °C über Nacht auf den Objektträgern getrocknet.

3.1.3. TUNEL Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)

Während der Apoptose kommt es zur Fragmentierung genomischer DNA, wobei sowohl niedermolekulare Doppelstrang DNA-Fragmente entstehen, als auch hochmolekulare Einzelstrangbrüche („nicks“). Diese DNA-Strangbrüche können in einer enzymatischen Reaktion detektiert werden durch Färbung freier 3'-OH Enden mit modifizierten Nukleotiden. Man nutzt die spezifische Bindung von terminaler Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) an freie 3'-OH DNA-Enden, worauf die Synthese eines Polydeoxynucleotid Polymers erfolgt. So wird mit Hilfe von TdT biotinyliertes Deoxyuridin (dUTP) in DNA-Strangbrüche inkorporiert, welches durch Antifluorescein-Antikörper detektiert werden kann.

Vor der eigentlichen Färbung ist es noch notwendig, endogene Peroxidasen mit Hilfe von H_2O_2 zu inaktivieren. Dazu werden die Gewebeproben mit Blocklösung (0,3% H_2O_2 in Methanol) überschichtet und mit Parafilm abgedeckt 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte werden anschließend in PBS gewaschen, um dann mit der Permeabilisationslösung (0,1% Triton-X in 0,1% Natrium-Citrat) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert zu werden.

Nach 2 erneuten Waschschrritten mit PBS erfolgt nun die eigentliche Färbung. Die Umgebung der Probe wird getrocknet. Anschließend werden 25 µl des TUNEL-Reaktionsmixes (bestehend aus Enzym- und Färbelösung) auf den Schnitt aufgetragen und mit Parafilm bedeckt. Es folgt eine Inkubation für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer (bestehend aus einer Petrischale, die mit feuchten Tüchern ausgelegt wird). Nun schließen sich nochmals 3 Waschschrritte an. Um bei der späteren Auswertung Färbeartefakte von apoptotischen Zellen unterscheiden zu können, wird noch eine Kerngegenfärbung mit DAPI durchgeführt. Mit Hilfe von DAPI ist es möglich, Chromatin im Nucleolus anzufärben. 0,1% NP40 in PBS werden 50:1 mit DAPI (5µg/ml) verdünnt. Von dieser Lösung werden 25 µl auf jeden Schnitt aufgetragen

und für 5 Minuten inkubiert. Zuletzt wird erneut zweimal in PBS gewaschen. Der getrocknete Schnitt wird mit fluorescent mounting medium überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

Pro Schnitt wurde neben einer Doppelbestimmung jeweils eine Negativkontrolle angefertigt, bei der das TUNEL-Reaktionsmix durch reine Färbelösung ohne Enzymlösung ersetzt war. Je Serie von 9 Tumoren wurde eine Positivkontrolle angefertigt. Durch Vorinkubation (30 Minuten bei Raumtemperatur) mit DNase I ist es möglich, DNA-Strangbrüche („nicks“) zu induzieren. Die restliche Behandlung erfolgte wie oben beschrieben.

Die TUNEL-Färbung wurde für 11 Tumore noch einmal an Cryoschnitten wiederholt, um einen Einfluß der Schnitttechnik auf das Färbeergebnis auszuschließen. Es konnten vergleichbare Ergebnisse für die Färbung an Cryo- oder Paraffinschnitten nachgewiesen werden.

3.1.4. Auswertung

Die Auswertung der TUNEL-Färbung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. In Doppelbestimmung wurden jeweils 1000 Zellen aus 10 - 20 Gesichtsfeldern bei 400 facher Vergrößerung ausgezählt. Für die Kernfärbung wurde ein Fluoreszenzfilter der Wellenlänge 340 - 380 nm verwendet, während die TUNEL-Färbung bei einer Wellenlänge zwischen 450 und 490 nm ausgezählt wurde. Auf diese Weise wurde ein Apoptoseindex (AI) ermittelt, der die Anzahl apoptotischer Zellen/1000 Zellen angibt. Bei Werten von $AI < 0,5$ wurden die Tumore als negativ gewertet, bei Werten von $0,5 < AI \leq 0,9$ wurden die Tumore als schwach positiv gewertet, Tumore mit Werten von $AI > 0,9$ wurden als stark positiv gewertet.

3.2. RT-PCR

3.2.1. RNA-Isolierung mit RNazolB

RNazolB begünstigt die Formation von Komplexen aus RNA mit Guanidin und Wassermolekülen und verhindert gleichzeitig hydrophile Interaktionen von DNA und Proteinen. Das heißt, DNA und Proteine, wie RNAsen werden so aus der wässrigen Phase entfernt, während die RNA in dieser Phase verbleibt.

In einem Eppendorfgefäß (1,5 ml) werden 30 mg Tumorgewebe mit 800 µl RNazolB versetzt und mit einem Plastikmörser homogenisiert. Im Anschluß wird das Eppendorfgefäß nach Zugabe von 80 µl Chloroform 15 Sekunden gevortext und dann für 5 Minuten auf Eis gestellt. Es folgt eine Zentrifugation bei 14000rpm, 4 °C für 15 Minuten. Im Eppendorfgefäß bilden sich zwei Phasen, eine untere Phenol-Chloroformphase und eine obere wässrige Phase. Mit Hilfe des Chloroform werden alle Phenolspuren aus der wässrigen Phase entfernt. DNA und Proteine befinden sich nun in der Inter- und der organischen Phase, wohingegen sich die RNA in der wässrigen Phase befindet und in ein neues Eppendorfgefäß überführt wird. In dieses Gefäß gibt man das gleiche Volumen RNase freies Isopropanol, mischt die Flüssigkeiten durch aufziehen mit der Pipette und stellt alles 15 Minuten auf Eis. Es folgt eine Zentrifugation bei 14000 rpm, 4 °C für 15 Minuten. Anschließend ist die RNA als gelblich-weißes Pellet zu sehen. Nachdem der

Überstand abgenommen wurde, wird die RNA mit 75% Ethanol gewaschen, in der Speed Vak getrocknet und anschließend mit 20 µl H₂O aufgenommen und 15 Minuten bei 60 °C gelöst.

3.2.2. Reverse Transkription

Um für die Reverse Transkription die notwendige RNA Menge einsetzen zu können, wird zunächst der RNA-Gehalt der einzelnen Proben photometrisch, bei 260 nm, mit dem RNA/DNA Calculator bestimmt, wobei anschließend je Probenansatz 3 µg mRNA eingesetzt wurden. Mittels reverser Transkription wird anschließend die cDNA Vorlage (template) für die nachfolgende RT-PCR synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurde hier die Oligo(dT) Methode gewählt. Oligo(dT)-Oligonukleotide lagern sich an den Poly-A Schwanz der mRNA an, so daß alle mRNA-Moleküle für die cDNA Synthese genutzt werden. Zur Zusammensetzung des Ansatzes siehe im Teil Material Punkt 2.2.3. In einem Thermoheizblock wurde das Eppendorfgefäß mit dem Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der Reaktion bei 70 °C für 15 Minuten.

3.2.3. RT-PCR

3.2.3.1. Primerdesign

Mit Hilfe der Datenbank „Pub-med Nukleotid Query“ wurde die Sequenz der „human nerve growth factor receptor“ mRNA herausgesucht und in das Programm „Oligo“ zum Primerdesign transferiert. So konnten optimale Primer ausgesucht werden. Um die ausgesuchten Primer auf homologe Bindungsstellen in anderen Genen zu überprüfen, erfolgte ein Vergleich der Sequenzen aus der Genbank Datenbank mittels „BLAST sequence similarity search, Basic Blast Version 2.0“ Algorithmus. Die hier verwendeten Primer liegen in den Exons 1 und 2, die Sequenz ist im Teil Material unter dem Punkt 2.2.1. angegeben.

3.2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion beruht auf einer Idee von Kary B. Mullis. Seine Entdeckung war, daß man bestimmte thermostabile DNA-Polymerasen dazu benutzen konnte, in vitro eine beliebige DNA-Sequenz millionenfach zu amplifizieren. Das Funktionsprinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht nun darauf, daß die Taq-Polymerase, eine thermostabile Polymerase aus *Thermus aquaticus*, aus freien Desoxynukleosidtriphosphaten einen DNA-Strang synthetisieren kann. Als Vorlage (template) wird ein DNA-Einzelstrang benötigt, hier die thermisch aufgeschmolzene cDNA, an der in jeweils 5' - 3'Richtung, ausgehend von gebundenen Primern, ein komplementärer Strang synthetisiert wird. Als Primer werden synthetisch hergestellte Oligonucleotide von ca. 20 Basenpaar Länge eingesetzt. Durch Bindung an die komplementäre Basensequenz des Template wurde so das 5'Ende des zu amplifizierenden Bereichs definiert. Gleiches gilt für den zweiten Primer, dessen Sequenz komplementär zum 3'Ende des zu vervielfältigenden Bereichs ist. In sich immer wiederholenden Zyklen wird die doppelsträngige DNA-Probe durch Erhitzen auf 96 °C für 1 Minute aufgeschmolzen. Durch Abkühlen auf 60 °C für 1,15 Minuten erreicht man die optimale Anlagerungstemperatur für die beiden Primer, die schließlich

bei 72 °C für 1,30 Minuten die gewünschte Sequenz amplifizieren, ein 469 Basenpaar langes Fragment für den NGFR. (Die hier angegebenen Bedingungen gelten für die Amplifikation der NGFR-Sequenz, es wurde in 40 Zyklen wiederholt, die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes findet sich im Teil Material unter dem Punkt 2.2.4.) In den vorliegenden Versuchen wurde neben der Vervielfältigung des „human nerve growth factor“ Rezeptors aus derselben cDNA jeweils auch für die quantitativen Bestimmungen das „housekeeping“ Gen β -Actin amplifiziert, das in jeder Zelle enthalten ist. Tumorproben, bei denen ein wiederholter Nachweis von β -Actin sowie der Nachweis von NGFR nicht gelang, wurden von der Wertung ausgeschlossen, mit der Annahme einer nicht mehr intakten RNA. Ferner wurde durch Bildung des Intensitätsverhältnisses zwischen β -Actin und NGFR Bande semiquantitativ die Menge amplifizierten nerve growth factor Rezeptors bestimmt.

3.2.4. Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzutrennen. Die DNA-Proben werden mit Lade-Puffer versetzt, so daß ihre Dichte erhöht und sie in den Geltaschen gehalten werden. Durch Anlegen einer Spannung wandern die Fragmente von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Fragmentgröße. Je kleiner die Fragmente sind, umso schneller wandern sie im elektrischen Feld. Der negativ geladene Farbstoff im Probenpuffer bewegt sich mit den kleinsten DNA-Fragmenten in der Laufmittelfront und zeigt diese an.

Für die Herstellung des Agarosegels wird die Agarose mit Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) bis zur Blasenbildung aufgeköcht und nach Abkühlung blasenfrei in den vorbereiteten Schlitzen gegossen, wobei die Kammbreite je nach Wunsch variabel ist. Das Gel wird ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend zur besseren Auspolymerisierung weitere 30 Minuten im Kühlschrank gekühlt. Anschließend werden Kamm und Abdichtung entfernt, das Gel mit TBE-Puffer überschichtet und die Geltaschen mit Proben befüllt. Dazu werden je 10 μ l PCR-Produkt und Lade-Puffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Um später die Fragmentgröße zuzuordnen zu können, läuft in einer Kontrollspur ein Gemisch aus Fragmenten mit jeweils 100bp Unterschied (100bp Leiter) mit. Je niedriger die angelegte Spannung, umso gleichmäßiger ist die Lauffront und umso klarer die Auftrennung.

Um anschließend die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird das Gel 15 Minuten in einer Wanne mit Ethidiumbromidlösung gefärbt. Dabei lagern sich die Ethidiumbromidmoleküle zwischen die Basenpaare der DNA-Moleküle. Anschließend wird das Gel noch 20 Minuten gewässert, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Unter UV-Licht können die so angefärbten DNA-Fragmente schließlich sichtbar gemacht werden.

3.2.5. Auswertung

Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte durch Bildung des Intensitätsverhältnisses von p75NGFR- und β -Actin-Bande. Für die statistische Auswertung mittels des Chi² Tests nach

Spearman wurden die untersuchten Proben in zwei Gruppen unterteilt, nämlich negativ (Intensitätsverhältnis von -65 bis 0) und positiv (Intensitätsverhältnis >0).

3.3. Western-Blot

3.3.1. Herstellung von Proteinlysaten aus primärem Tumorgewebe

Mit der Methode des schnellen Einfrierens und Auftauens („freeze-thaw“ Methode) wurden Tumorzellen zunächst aufgeschlossen, um bestimmte Proteine untersuchen zu können. In jeder Zelle befinden sich zelleigene Proteasen, die so aufgeschlossenen Proteine abbauen könnten. Daher werden dem Lysepuffer verschiedene Proteaseinhibitoren zugesetzt. Der gesamte Puffer wurde auf Eis zusammenpipettiert.

Möglichst noch im gefrorenen Zustand wurden 30 mg Tumorgewebe in ein Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Tumorgewebe mit einem Plastikmörser zerkleinert, mit 300 μ l Lysepuffer versetzt und noch einmal gemörsert. Nun wurden die Proben mittels der „freeze-thaw“ Methode je dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Diesem Schritt folgte eine Inkubation für 20 Minuten auf Eis. Danach waren die Tumorproben weitestgehend aufgeschlossen und wurden bei 14000 rpm, 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Auf dem Boden des Eppendorfgefäßes setzten sich die Zellfragmente ab. Der Überstand enthielt den Großteil der Tumorzellproteine. Diese wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

3.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die von Bradford beschriebene Methode beruht auf der Beobachtung, daß sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung aus Coomassie Brilliant Blau G250 von 465 nm zu 595 nm verschiebt, sobald Proteinbindung auftritt. Die dabei auftretende Extinktionszunahme ist der enthaltenen Proteinkonzentration annähernd proportional. Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Tumorproben wurde eine BSA-Referenzkurve erstellt. Die Referenzlösung enthielt 1 mg BSA/ml. Von dieser Lösung wurden 1 μ l, 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l und 8 μ l mit 150 mM NaCl auf 100 μ l aufgefüllt und mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt. Von den Proteinlysaten wurden jeweils als Doppelbestimmung 1 μ l Lysat, 99 μ l 150 mM NaCl und 1 ml Bradford-Lösung eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm gegen einen Leerwert ohne Proteinlysate bestimmt. Anhand der erstellten BSA-Referenzkurve konnte die Proteinkonzentration der Lysate abgelesen werden.

3.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter denaturierenden Bedingungen wurden die Proteine aus den Zellysaten durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Proteine werden durch SDS denaturiert, indem SDS über nichtkovalente Wechselwirkungen an das Protein bindet. Das Verhältnis von gebundenen SDS-Molekülen ist konstant zur Zahl der Aminosäuren. Ladungsunterschiede werden durch eine komplette Entfaltung und den Besatz mit SDS ausgeglichen, so daß alle Proteine eine

negative Ladung erhalten und im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandern. Da die spezifische Ladung der Proteine durch das gebundene SDS gleich ist, ist deren Wanderungsgeschwindigkeit im Gel abhängig allein von ihrem Molekulargewicht. Die Trennmatrix besteht aus einem vertikalen Gel aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid und aus einem Sammelgel, je nach gewünschtem Auftrennungsgrad, ein 7 - 15 prozentiges Trenngel (Zusammensetzung der Gele siehe Material Punkt 2.3.3.). Die Polymerisation ist eine Radikalkettenreaktion, die durch den Zerfall von Peroxidsulfationen (APS 10%) eingeleitet wird. In einem zweiten Schritt aktivieren diese Radikale Tetramethyldiaminmoleküle (TEMED). Diese Radikale sind die eigentlichen Initiatoren der Radikalkettenpolymerisation. Um eine waagerechte Oberfläche zu erhalten, wurde das Trenngel während der Polymerisationsreaktion mit Isopropanol beschichtet. Nach der Entfernung des Isopropanol wird auf das Trenngel ein grobporiges Sammelgel aufpolymerisiert. Zum Befüllen der Geltaschen wurde die zuvor für 5 Minuten bei 95 °C denaturierte Proteinlösung mit dem halben Volumen 3X SDS Probenpuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Mit einer Spannung von maximal 150 Volt liefen die Proben in das Sammelgel ein, die eigentliche Trennung erfolgte bei 55 Volt über Nacht. Um eine Zuordnung der aufgetrennten Proteine anhand ihres Molekulargewichtes zu ermöglichen, lief in einer separaten Spur ein Größenstandard mit. Die Proteinbanden wurden mittels Western-Blot sichtbar gemacht. Im Sinne einer Ladekontrolle wurde jede Probe zusätzlich mit einem spezifischen Antikörper gegen CDK2 untersucht. Proben für die kein CDK2-Protein nachweisbar war, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

3.3.4. Western-Blot

Mit Hilfe spezifischer Antikörper können mit dieser Methode die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine nachgewiesen werden. Zunächst werden die Proteine in einer Blot-Apparatur mit Hilfe einer transversal zur Geloberfläche angelegten Spannung aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, wobei die Proteine dieselbe Position einnehmen wie vorher im Gel. Durch den Transfer auf die Nitrocellulose-Membran werden die Proteine immobilisiert und so der immunologischen Reaktionen zugänglich gemacht. Die Nitrocellulose-Membran wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und anschließend 1 Minute in 100% Methanol, 2 Minuten in H₂O und 5 Minuten in Blotpuffer inkubiert. Anschließend wurden 3 Whatman-3M Papiere in Blotpuffer² getränkt und blasenfrei auf der Anode der Blotapparatur aufeinandergelegt. Es folgten die Nitrocellulose-Membran, das Gel und im Anschluß erneut 3 in Blotpuffer getränkte Whatman-3M Papiere. Bei 22 Volt erfolgte über 35 Minuten der Proteintransfer auf die Membran.

Zunächst wird die Membran gewaschen und in einer Lösung inkubiert, die einen spezifisch gegen das Protein gerichteten Antikörper enthält. Nach einem Waschschrift erfolgt eine weitere Inkubation mit einem Zweitantikörper gegen den konstanten Teil des Erstantikörpers. Der Zweitantikörper ist hier mit einer „Horseradisch“-Peroxidase gekoppelt, so daß mittels Enzymreaktionen ein spezifischer Nachweis des gesuchten Proteins erfolgt.

Um unspezifische Bindung des Antikörpers auf der Membran zu vermeiden, wurde sie sofort nach dem Proteintransfer in Blocklösung überführt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation mit frischer Blocklösung, die den Erstantikörper in vorher ausgetesteter Verdünnung enthielt. Dieser Inkubationsschritt erfolgte entweder ebenfalls für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4 °C. Danach wurde 2 mal 5 Minuten und 2 mal 15 Minuten mit Waschlösung gewaschen, um dann mit der Inkubation des Zweitantikörpers, 1:3000 mit Blocklösung verdünnt, fortzufahren (2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler). Abschließend wurde die Membran erneut 2 mal 5 Minuten, 2 mal 15 Minuten und 1 mal 5 Minuten mit Waschlösung behandelt.

Die Entwicklung der Membran erfolgte mit ECL Plus. Dabei wurden die ECL-Lösungen A und B im Verhältnis 40:1 gemischt und die Membran hiermit für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zusammen mit der „Horseradisch“-Peroxidase erzeugen die ECL-Reagenzien eine Chemolumineszenz, die sich mittels eines geeigneten Films nachweisen läßt.

Die Expositionszeit auf dem ECL-Hyperfilm erfolgte je nach erwarteter Signalstärke zwischen 1 und 2 Sekunden. Die Schwärzung des Films verhält sich nahezu proportional zur Menge an spezifisch detektiertem Protein. Die Einteilung in die Gruppen negativ bzw. positiv (kein oder viel detektierbares Protein) wurden durch optischen Vergleich der Filmschwärzung vorgenommen.

3.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS Version 6.0 (A.Bühl, P.Zöfel, 1994). Zur Berechnung wurden die Rangkorrelation nach Pearson und der Chi²-Test nach Spearman genutzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die Kaplan-Meier Analysen wurden mit Hilfe der Software Winstat Version 2.0 errechnet, auch hier wurde das Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Die Bedeutung von Apoptose für das Neuroblastom und ihre prognostische Relevanz

4.1.1. Häufigkeit von Apoptose im Neuroblastom

Nach der Auswertung von 95 humanen Neuroblastomen wurden unterschiedliche Apoptoseniveaus festgestellt. 34% aller Gewebeproben waren negativ, 19% schwach positiv und 47% stark positiv. In den Abbildungen 2a und 2b sind Beispiele für die unterschiedlichen Apoptosewerte und deren Verteilung in der Gesamtgruppe bildlich dargestellt.

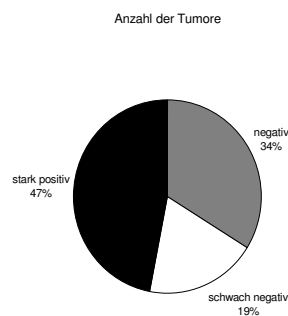


Abbildung 2a Verteilung von Apoptose in der Gesamtgruppe

4.1.2. Die prognostische Relevanz von Apoptose für das Neuroblastom

Um detailliertere Aussagen zur prognostischen Relevanz von Apoptose machen zu können, wurden die Zusammenhänge zwischen der Apoptosehäufigkeit, letalem Krankheitsverlauf, dem Zeitraum eines ereignisfreien Überlebens sowie klinischen Prognosekriterien (Alter und Stadium) überprüft. Patienten für deren Tumore keine Apoptose festgestellt wurde, verstarben zu 34%, Patienten deren Tumore schwach positiv waren zu 56% und Patienten mit stark Apoptose positiven Tumoren zu 24%. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 3a graphisch wiedergegeben.

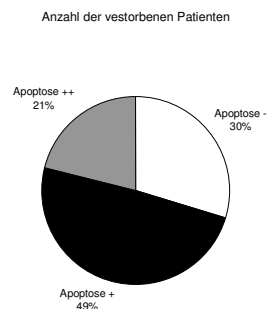


Abbildung 3a: Zusammenhang zwischen Apoptose und letalem Krankheitsausgang

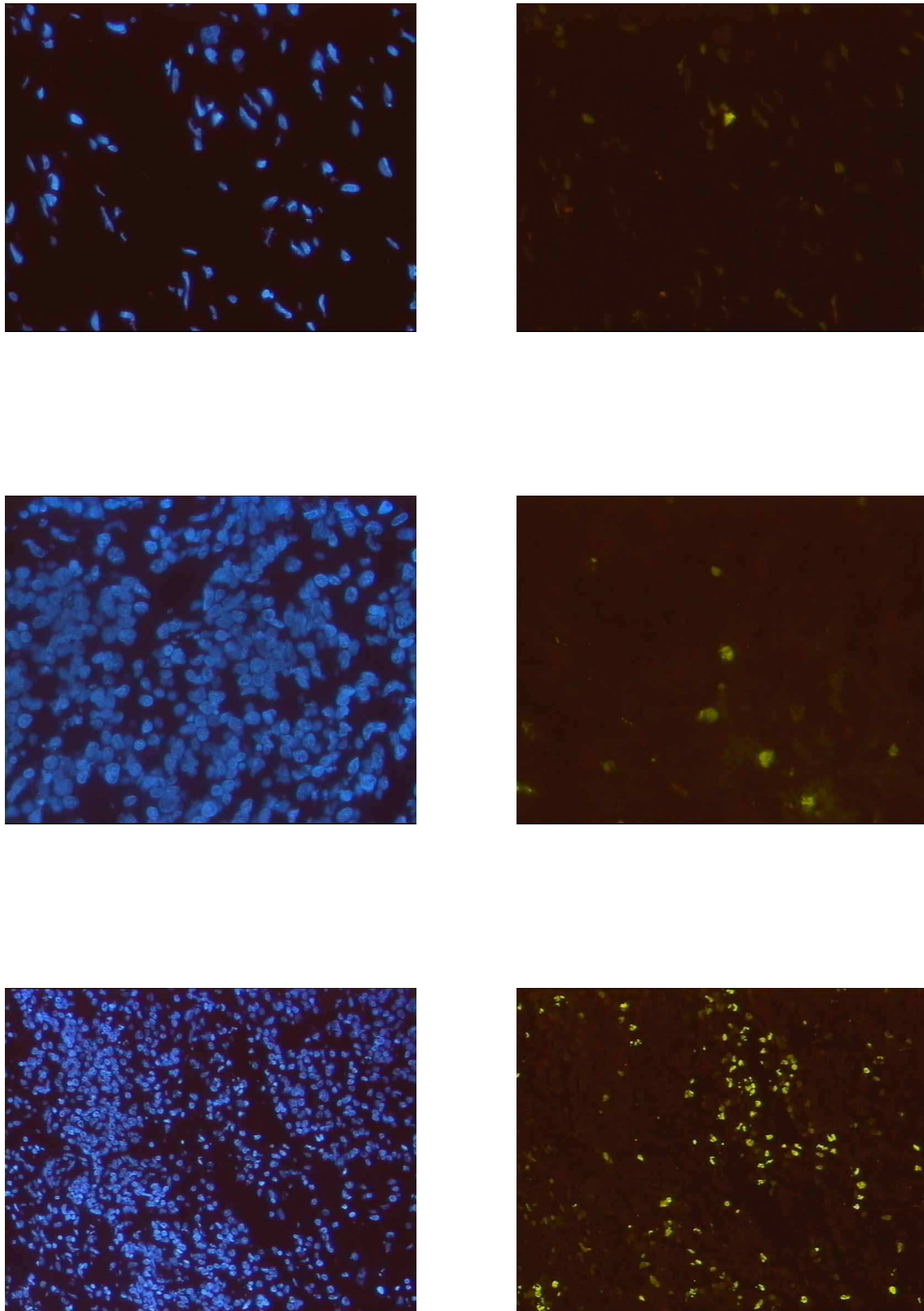


Abbildung 2b: repräsentative Bilder einer Immunfluoreszenz zum Nachweis von Apoptose, dargestellt ist jeweils ein Bild zur Apoptose mit entsprechender Kernfärbung (Dapi); oben: negativ, mitte: schwach positiv, unten: stark positiv.

Der Zeitraum eines ereignisfreien Überlebens für Patienten mit Tumoren ohne Apoptose betrug durchschnittlich 42,23 Monate, für Patienten mit schwach positiven Neuroblastomen 27,73 Monate und 35,79 Monate für Patienten, deren Tumore stark Apoptose positiv waren. Für Patienten mit Tumoren, in denen entweder keine oder stark positive Apoptose nachweisbar war, zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Apoptose und einem Lebensalter über bzw. unter 18 Monate zum Diagnosezeitpunkt. Demgegenüber zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Alter und Apoptose bei Patienten mit Neuroblastom, die schwach positiv Apoptose aufwiesen. 33% der Patienten waren jünger als 18 Monate und 67% älter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Diesen Trend verdeutlicht Abbildung 3b.

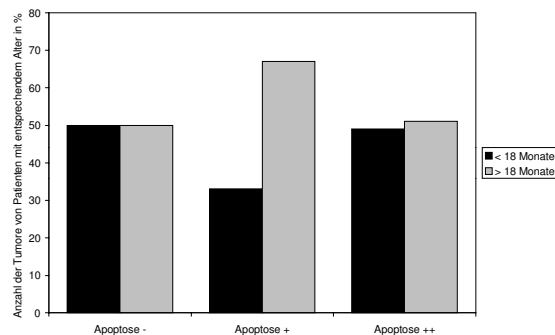


Abbildung 3b: Zusammenhang zwischen Apoptose und Lebensalter

In Bezug auf das klinische Prognosekriterium Stadium zeigte sich, daß bei disseminierter Erkrankung (Stadium 4 und 4s) seltener Apoptose stattfand, als in den übrigen Krankheitsstadien. Den Zusammenhang zwischen Apoptosewerten und Krankheitsstadium zeigt Abbildung 3c.

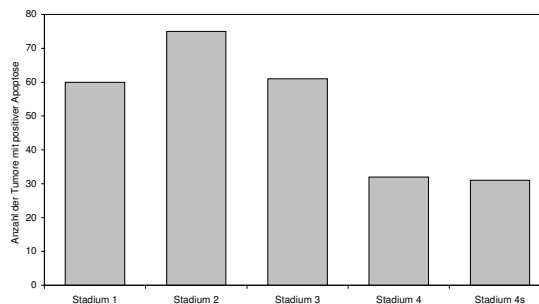


Abbildung 3c: Zusammenhang zwischen Apoptose und Krankheitsstadium

Neben dieser Beobachtung zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem prognostisch ungünstigen Krankheitsverlauf im Stadium 4 und Tumoren mit schwach positiver Apoptose. 61% aller Tumore mit schwach positiver Apoptose waren dem Stadium 4 zugeordnet. Abbildung 3d stellt dieses graphisch dar.

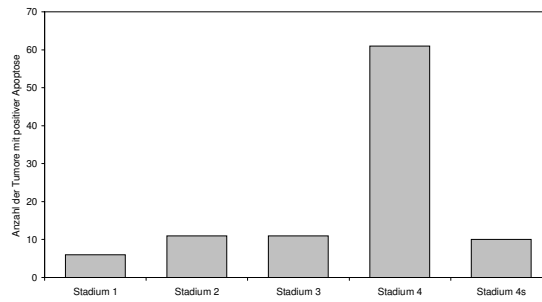


Abb. 3d Verteilung der Tumore mit schwach positiver Apoptose auf die Krankheitsstadien

Innerhalb des Gesamtkollektivs konnte keine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit Tumoren ohne im Vergleich zu Tumoren mit positiver Apoptose festgestellt werden. Eine graphische Veranschaulichung dieses Befundes findet sich in Abbildung 3e.

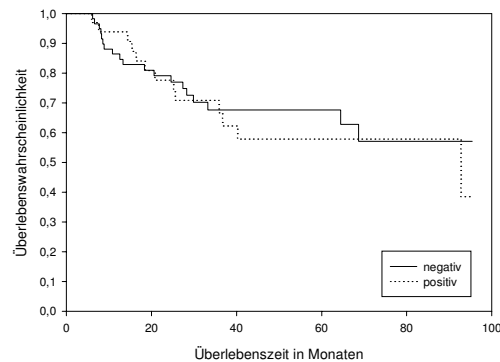


Abbildung 3e: Kaplan-Meier Analyse für Apoptose positiv vs. negativ

Patienten mit Tumoren schwacher apoptotischer Aktivität zeigten eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit ($p = 0,02$) im Vergleich zur Restgruppe. Abbildung 3f veranschaulicht die schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit graphisch.

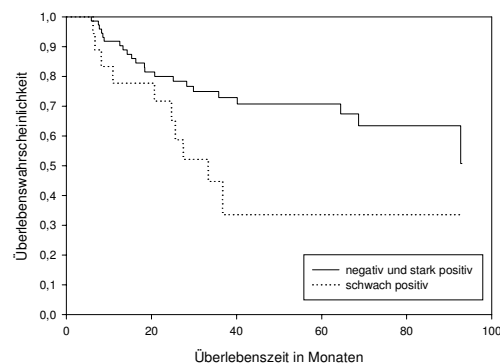


Abbildung 3f: Kaplan-Meier Analyse für Apoptose schwach positiv (+) vs. negativ (-) und stark positiv (++)

4.2. Möglicher Zusammenhang zwischen Amplifikation des N-Myc Gens, Apoptose und Prognose im Neuroblastom

In Neuroblastomen mit amplifiziertem N-Myc Gen wurde deutlich weniger häufig Apoptose nachgewiesen, im Vergleich zu nicht N-Myc amplifizierten Tumoren. Keine oder schwach positive Apoptose wurde in 70% N-Myc amplifizierter Tumore gefunden, während das Verhältnis von negativer oder schwach positiver (48%) zu stark positiver Apoptose (52%) in N-Myc nicht amplifizierten Tumoren annähernd ausgeglichen war. Dies ist in Abbildung 4 dargestellt.

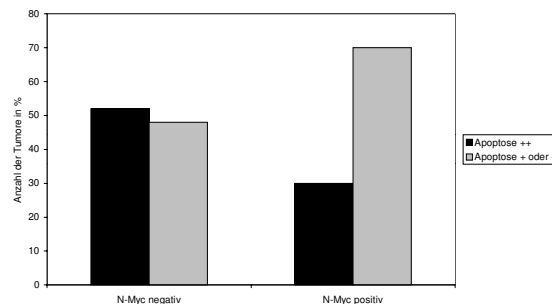


Abbildung 4: Apoptose in Abhängigkeit von N-Myc

Obwohl 30% der Tumore mit amplifiziertem N-Myc Gen starke apoptotische Aktivität zeigten, ergab sich für die entsprechenden Patienten daraus kein Überlebensvorteil. Überdurchschnittlich häufig (67%) kam es für diese Patienten zu einem Rezidiv oder letalem Krankheitsverlauf, bei einem durchschnittlichen ereignisfreien Überlebenszeitraum (EFS) von 25,73 Monaten. Im Vergleich dazu kam es für Patienten mit Tumoren ohne amplifiziertes N-Myc Gen und stark positiver Apoptose nur in 28% der Fälle zu einem Rezidiv oder letalem Krankheitsverlauf, bei einem durchschnittlichen ereignisfreien Überlebenszeitraum von 37,35 Monaten. In Tabelle 1 sind diese Ergebnisse verdeutlicht.

Tabelle 1: Zusammenhang zwischen einer Amplifikation des N-Myc Gens, Apoptose und Prognose

	EFS (Monate)	Rezidiv oder Tod (%)
+ N-Myc / - Apoptose	18,93	50
+ N-Myc / + Apoptose	23,3	83
+ N-Myc / ++ Apoptose	25,73	67
- N-Myc / - Apoptose	46,96	32
- N-Myc / + Apoptose	29,99	58
- N-Myc / ++ Apoptose	37,35	28

4.3. Expression des Antiapoptoseprotein bcl-2 im Zusammenhang mit Apoptose, Amplifikation des N-Myc Gens und Prognose im Neuroblastom

Wie in Abbildung 5a gezeigt, ist zwischen dem Antiapoptoseprotein bcl-2 und Apoptose war eine inverse Korrelation nachweisbar ($p = 0,02$). Dies wird auch durch die Blotergebnisse in Abbildung 5b belegt.

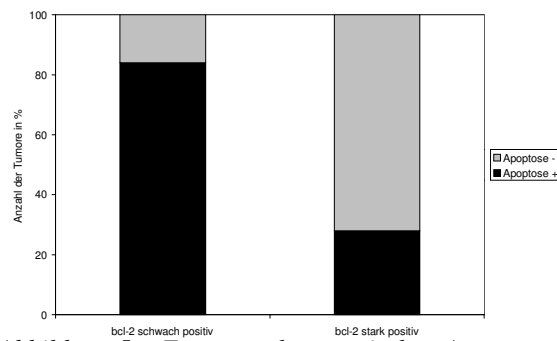


Abbildung 5a: Zusammenhang zwischen Apoptose

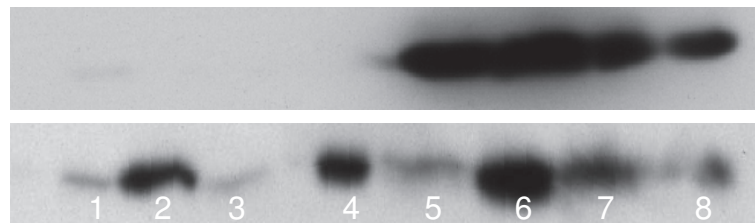


Abbildung 5b: Repräsentative Bilder eines Western-Blots für bcl-2 (oben) und der entsprechenden Ladekontrolle mit CDK2 (unten);
Bande 1 - 4: Apoptose stark positiv / **bcl-2 negativ**
Bande 5 - 8: Apoptose negativ / **bcl-2 stark positiv**

In 84% N-Myc amplifizierter Tumore konnte eine bcl-2 Expression nachgewiesen werden, während in Tumoren ohne amplifiziertes N-Myc Gen nur in 54% der untersuchten Gewebe eine gleichzeitige bcl-2 Expression nachweisbar war. Graphisch veranschaulicht wird dies in Abbildung 5c.

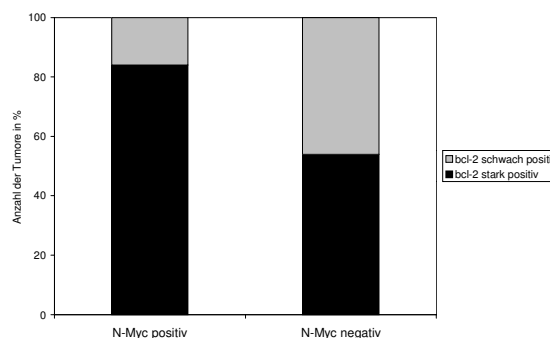


Abbildung 5c: Zusammenhang zwischen starker bcl-2 Expression und einer N-Myc Genamplifikation

Eine eindeutige Auswirkung auf das Apoptoseniveau wurde bei bcl-2 Expression und gleichzeitiger Amplifikation des N-Myc Gens nicht gefunden. 40% dieser Tumore zeigten starke apoptotische Aktivität, 60% waren negativ. Dieser Befund ist in Abbildung 5d graphisch veranschaulicht.

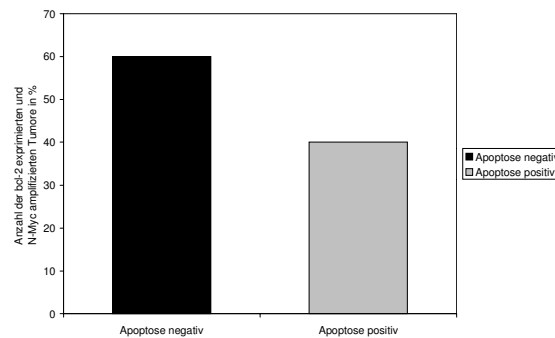


Abbildung 5d: Auswirkung der bcl-2 Expression bei gleichzeitiger Amplifikation des N-Myc Gens auf das Apoptoseniveau

schaulicht. Stark positive Apoptose war demgegenüber in Tumoren ohne amplifiziertes N-Myc Gen mit gleichzeitiger bcl-2 Expression nur in 23% nachweisbar, 77% waren negativ. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Zusammenhang zwischen Amplifikation des N-Myc Gens, Expression von bcl-2, Apoptose und Prognose

	n	EFS (Monate)	Rezidiv oder Tod (%)	Apoptose stark positiv (%)	Apoptose negativ (%)
+ N-Myc / - bcl-2	1	1,32	100	100	0
+ N-Myc / + bcl-2	5	11,55	80	40	60
- N-Myc / - bcl-2	11	32,01	45	82	18
- N-Myc / + bcl-2	13	70,45	15	23	77

Obwohl eine deutliche Auswirkung auf das Apoptoseniveau in N-Myc amplifizierten Tumoren mit gleichzeitiger bcl-2 Expression nicht nachweisbar war, scheint das Zusammentreffen beider Merkmale von prognostischer Relevanz zu sein. Während Patienten mit Tumoren, die sowohl amplifiziertes N-Myc Gen als auch exprimiertes bcl-2 zeigten, in 80% der Fälle ein Rezidiv erlitten oder verstarben und eine mittlere Zeit eines ereignisfreien Überlebenszeitraumes von 11,55

Monaten aufwiesen, war dieser Zeitraum für Patienten, deren Tumoren bcl-2 exprimierten aber kein N-Myc Gen amplifizierten, mit 70,45 Monaten deutlich länger. Ein Rezidiv oder letaler Krankheitsverlauf wurde hier nur in 15% der Fälle beobachtet. Diese Befunde sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

4.4. Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Apoptose und Prognose im Neuroblastom

Für das gesamte Patientenkollektiv konnte eine Expression des p75NGFR in 40% der Fälle nachgewiesen werden. In Abbildung 6a sind Beispiele für unterschiedliche Expressionsraten des p75NGFR dargestellt. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Expression des p75NGFR und der Apoptosehäufigkeit war nicht nachweisbar. Bei 66% der p75NGFR exprimierenden Tumore konnte Apoptose nachgewiesen werden. In Tumoren, die kein p75NGFR exprimierten, war Apoptose in 63% der Fälle nachweisbar. Abbildung 6b verdeutlicht diesen Befund graphisch.

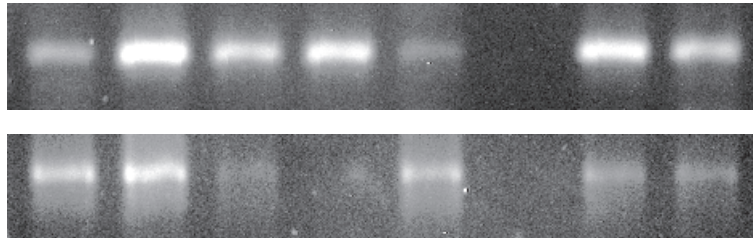


Abbildung 6a: Repräsentative Bilder einer Agarosegelelektrophorese nach RT-PCR für die Expression von p75NGFR (oben) und beta-Aktin (unten)

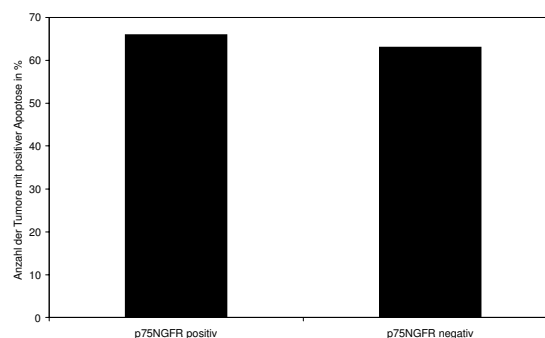


Abbildung 6b: Zusammenhang zwischen Apoptose und Expression des p75NGFR

Um detailliertere Aussagen zur prognostischen Relevanz des p75NGFR für das Neuroblastom machen zu können, wurden die Zusammenhänge zwischen einer Expression des p75NGFR, letalem Krankheitsverlauf, dem Zeitraum eines ereignisfreien Überlebens sowie klinischen Prognosekriterien (Alter und Stadium) überprüft. Wie in Abbildung 6c zu sehen ist, fanden sich unter den verstorbenen Patienten in 33% der Fälle p75NGFR exprimierende Tumore, in 67% der Fälle war der Rezeptor nicht nachweisbar. Der Zeitraum eines ereignisfreien Überlebens betrug für Patienten mit p75NGFR exprimierenden Tumoren durchschnittlich 62 Monate, wäh-

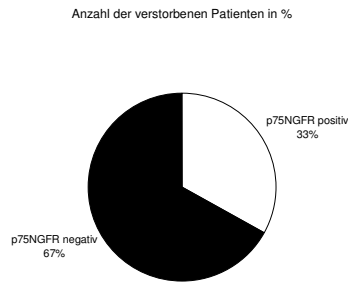


Abbildung 6c: p75NGFR Expression unter den verstorbenen Patienten

rend dieser Zeitraum für Patienten mit Tumoren ohne Expression des p75NGFR mit 29,22 Monaten deutlich kürzer war. Für das klinische Prognosekriterium Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose konnte kein Zusammenhang mit einer Expression des p75NGFR in Tumoren dieser Patienten gefunden werden. Patienten, die zum Diagnosezeitpunkt jünger als 18 Monate waren hatten Tumore, in denen zu 41 % eine Expression des p75NGFR nachweisbar war, 59% der Tumore waren p75NGFR-negativ.

Unter Patienten, die älter als 18 Monate zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren fanden sich im gleichen Verhältnis p75NGFR exprimierende und nicht exprimierende Tumore. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 6d dargestellt.

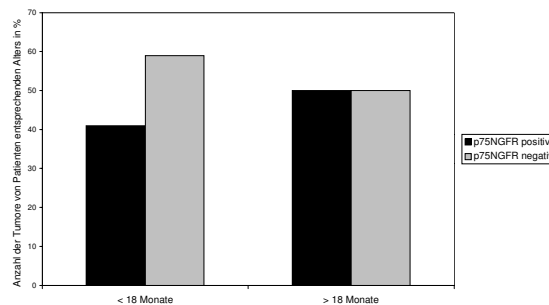


Abbildung 6d: Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR und dem Lebensalter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt

Im Hinblick auf das Erkrankungsstadium als klinisches Prognosekriterium zeigte sich eine signifikant verringerte Expression des p75NGFR in den Tumoren mit fortgeschrittenem Stadium 4 im Vergleich zu Tumoren der Stadien 1 - 3 ($p = 0,03$). Diesen Zusammenhang stellt Abbildung 6e dar. Abbildung 6f stellt graphisch dar, daß sich für das Gesamtkollektiv eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben im Zusammenhang mit p75NGFR exprimierenden Tumoren nachweisen ließ ($p = 0,059$).

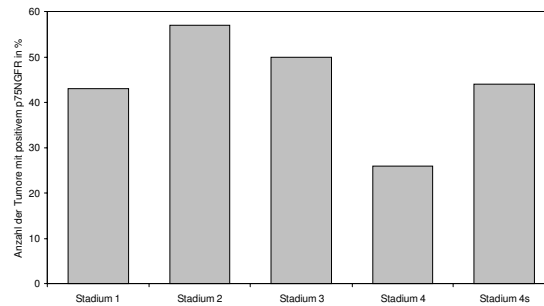


Abbildung 6e: Abhängigkeit der p75NGFR Expression vom Krankheitsstadium

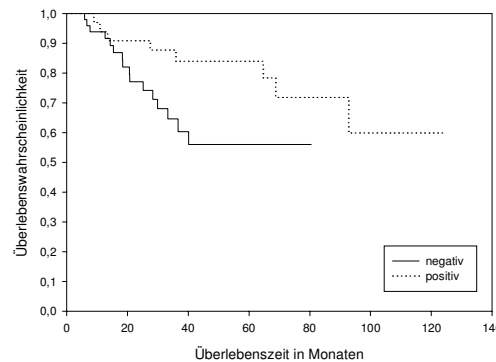


Abbildung 6f: Kaplan-Meier Analyse für p75NGFR positiv vs. negativ

4.5. Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Amplifikation des N-Myc Gens, Apoptose und Prognose im Neuroblastom

In den Tumorproben mit nachgewiesener N-Myc Genamplifikation war lediglich bei 20% gleichzeitig eine Expression des „low affinity nerve growth factor receptor“ nachweisbar. Unter den Tumoren ohne N-Myc Genamplifikation zeigte sich ein annähernd gleiches Verhältnis zwischen meßbarer p75NGFR Expression und fehlender Expression, dargestellt in Abbildung 7a.

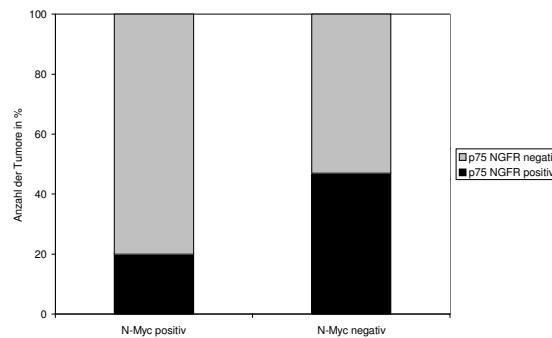


Abbildung 7a: p75NGFR Expression in Abhängigkeit von einer N-Myc Genamplifikation

Um der Frage nachzugehen, ob es einen Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Amplifikation des N-Myc Gens, Apoptose und Prognose gibt, wurden die beiden Patientengruppen (+N-Myc Gen/ +p75NGFR und +N-Myc Gen/ -p75NGFR) jeweils auf ihr Apoptoseniveau und die Zeit des ereignisfreien Überlebens untersucht. Für Tumore mit nachgewiesener N-Myc Genamplifikation, ohne exprimierten p75NGFR war in 81% der Fälle keine oder schwach positive Apoptose nachweisbar, was in Abbildung 7b graphisch verdeutlicht wird. Abbildung 7c stellt dar, daß es für 69% der Patienten zu einem weiteren Ereignis (Rezidiv oder Tod) im Krankheitsverlauf kam.

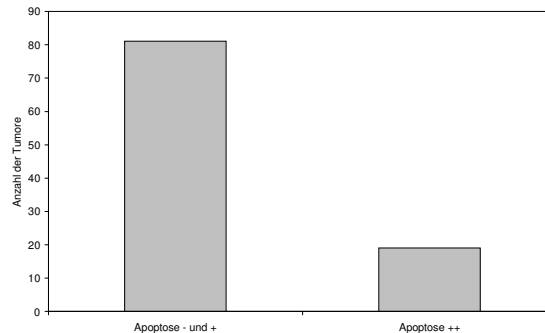


Abbildung 7b: Apoptosenivea der Tumore mit + N-Myc Gen / - p75NGFR

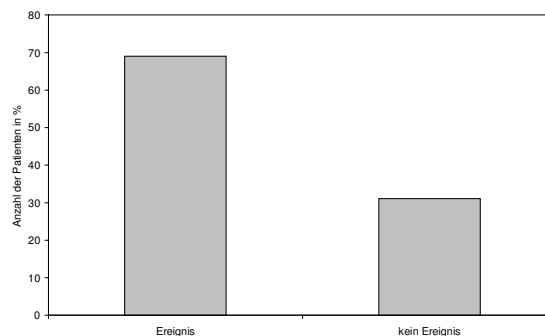


Abbildung 7c: Häufigkeit eines ereignisfreien Überlebens für Patienten mit: +N-Mcy Gen / -p75NGFR

Die Zeit bis zum Eintritt eines solchen Ereignisses betrug durchschnittlich 18 Monate. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung war in der Vergleichsgruppe von Tumoren mit Expression des p75NGFR und Amplifikation des N-Myc Gens ein deutlicher Unterschied im Apoptoseniveau und Krankheitsverlauf zu erkennen. Alle Patienten dieses Kollektivs zeigten stark erhöhte apoptotische Aktivität, wie in Abbildung 7d verdeutlicht, und hatten zu 67% ein ereignisfreies Überleben. Die durchschnittliche Zeit bis zum Eintritt eines Ereignisses lag mit 44,3 Monaten deutlich über dem Zeitraum der Patientengruppe mit N-Myc genamplifizierten Tumoren ohne p75NGFR Expression. Die Häufigkeit eines ereignisfreien Überlebens für Patienten in deren Tumoren N-Myc amplifiziert und ebenfalls p75NGFR exprimiert war, stellt Abbildung 7e graphisch dar.

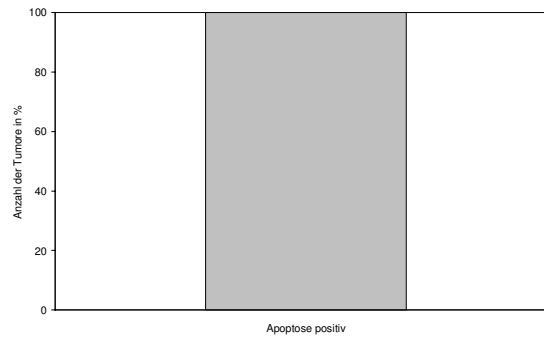


Abbildung 7d: Apoptoseniveau der Tumore mit +N-Myc Gen / +p75NGFR

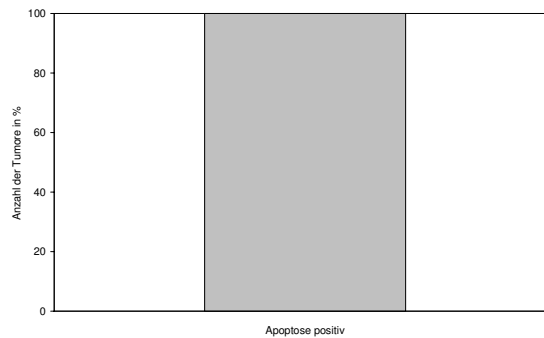


Abbildung 7e: Häufigkeit eines ereignisfreien Überlebens von Patienten mit +N-Myc Gen / +p75NGFR

Diese deutlichen Unterschiede in Bezug auf Apoptoseniveau und ereignisfreien Überlebenszeitraum in Abhängigkeit von vorhandener oder fehlender Expression des p75NGFR waren für Patienten ohne N-Myc Genamplifikation nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Amplifikation des N-Myc Gens, Apoptose und Prognose

	n	EFS (Monate)	Rezidiv/Tod (%)	Apoptose - (%)	Apoptose + (%)	Apoptose ++ (%)
+N-Myc / + p75NGFR	3	44,26	33	0	0	100
+N-Myc / - p75NGFR	16	18	69	44	37	19
-N-Myc / + p75NGFR	30	52,1	33	37	13	50
-N-Myc / - p75NGFR	35	33,96	20	34	9	57

4.6. Zusammenhang zwischen Stadium 4s und Apoptose

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen hoher apoptotischer Aktivität und Tumoren des Stadium 4s besteht, um über einen solchen Zusammenhang möglicherweise indirekt Rückschlüsse auf eine ursächliche Beteiligung von Apoptose an spontaner Regression zu ziehen. Ein solcher Zusammenhang war anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht nachweisbar. Nur 30% aller Tumore des Stadium 4s zeigten starke apoptotische Aktivität, was in Abbildung 8 verdeutlicht wird.

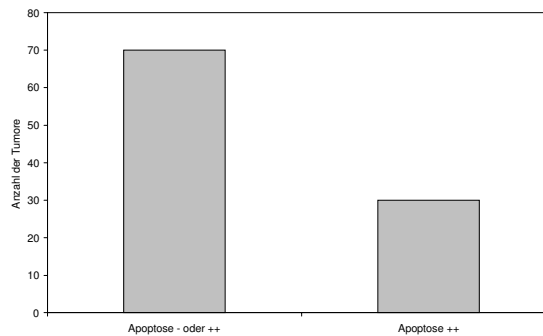


Abbildung 8: Apoptosehäufigkeit im Stadium 4s

4.7. Ein möglicher Einfluß einer begonnenen Chemotherapie vor Probenentnahme

Zur Prüfung der Hypothese, ob eine vor Probenentnahme begonnene Chemotherapie Einfluß auf das Apoptoseniveau haben könne, wurden Patienten aus dem Stadium 4, die 0 - 1 Monat nach dem Stadium 4, die 0 - 1 Monat nach Diagnosestellung biopsiert oder operiert wurden mit solchen verglichen, deren Gewebe erst 3 - 5 Monate nach Erstdiagnose gewonnen wurde. Die Häufigkeit nachgewiesener Apoptose bei der Gruppen unterschied sich kaum, wie in Abbildung 9 graphisch veranschaulicht ist, so daß der Einfluß einer möglichen Chemotherapie in der Auswertung der erhobenen Daten vernachlässigt wurde. Diese Patientenproben wurden aus der Auswertung nicht ausgeschlossen.

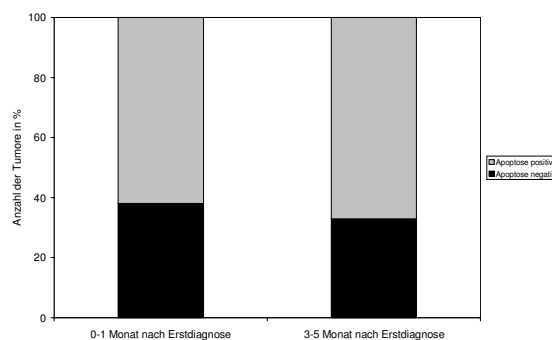


Abbildung 9: Möglicher Einfluß von Chemotherapie auf das Apoptoseniveau

5.1. Die Bedeutung von Apoptose für das Neuroblastom

Apoptose ist ein essentieller Bestandteil in vielen physiologischen Prozessen, wie z.B. embryonale Entwicklung oder klonale Selektion des Immunsystems. Man findet den programmierten Zelltod sowohl während der Embryogenese als auch im normalen Gewebeumsatz (Evan G.I. et al., 1992; Raff M., 1992; Raff M., 1998; Williams G.T., 1991). Vor diesem Hintergrund ist es problematisch zu entscheiden, ob der Nachweis von Apoptose in einem Tumor generell positiv oder negativ ist. Genau so wird Apoptose jedoch von Tonini et al. (1997) betrachtet. Diese Autoren kommen zu dem Schluß, daß es eine gleichmäßige Verteilung von Apoptose über alle Stadien, in lokalisierten sowie in metastasierten Tumoren gebe und Apoptose daher keine prognostische Relevanz zukomme. Unterteilt man die hier untersuchten Tumore in eine Gruppe mit positiver bzw. negativer Apoptose, so zeichnet sich ebenfalls keine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für eine der beiden Gruppen ab. Dem Auftreten von Apoptose unter anderem als physiologischer Prozeß in normalen Geweben kommt es jedoch vielmehr entgegen, wenn man die apoptotische Aktivität in Tumorgeweben quantitativ, quasi als „Mengenproblem“ auffasst. Auf diese Weise findet man Gruppen mit unterschiedlichen Zahlen von apoptotischen Zellen pro Gewebe. Für die in dieser Arbeit untersuchten Tumorproben konnte jeweils sehr unterschiedliches Auftreten von Apoptose in den Geweben nachgewiesen werden. Der Apoptoseindex (AI) erstreckte sich von einem Minimum mit einem AI von 0,1 bis zu einem Maximum mit einem AI von 4,17. Eine quantitative Betrachtung nachweisbarer Apoptose findet man bei Takaharu et al. (1996). Sie kommen zu dem Ergebnis, daß der Apoptoseindex in den Stadien 1,2 und 4s sowie bei Kindern unter einem Jahr signifikant höher sei. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß prozentual weniger Apoptose bei disseminierter Erkrankung (Stadium 4 und 4s) auftrat. Auffällig war eine bestimmte Häufigkeit von apoptotischen Zellen pro Gewebe mit einem AI zwischen 0,5 und 0,9, der weder zu einer sehr hohen noch zu einer sehr geringen apoptotischen Aktivität zugeordnet werden konnte. Für diese Patienten zeigte die vorliegende Untersuchung jedoch eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit und einen Zusammenhang mit anderen prognostisch ungünstigen Merkmalen, wie Stadium 4 oder fortgeschrittenes Lebensalter (Brodeur G.M. et al., 1993; Neuroblastomstudie NB 97, Fassung vom 30.04.1997). Für die vorgeschlagene quantitative Auswertung apoptotischer Aktivität in Tumorgeweben zeigten die Ergebnisse, daß mäßige apoptotische Aktivität, d.h. ein AI zwischen 0,5 und 0,9, im Zusammenhang mit weiteren negativen Prognosekriterien, einen Beitrag zur Risikodiskriminierung leisten kann, jedoch kein unabhängiges prognostisches Merkmal darstellt.

5.2 Zusammenhang zwischen N-Myc Genamplifikation, Apoptose, dem Antiapoptoseprotein bcl-2 und Prognose im Neuroblastom

In verschiedenen Studien wurde die Rolle des Myc Onkogens während der Kontrolle normaler Zellproliferation beschrieben. Über eine ektope Myc-Induktion ist es möglich, ruhende, an Wachstumsfaktor verarmte Fibroblasten wieder in den Zellzyklus einzuschleusen (Eilers M. et al., 1991). Demgegenüber beobachtet man während des Entzugs von mitogenen Signalen eine

rasche Herunter-Regulation von c-Myc sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene unabhängig davon, in welcher Zellzyklusphase sich die Zelle gerade befindet (Dean M. et al., 1986; Waters C. et al., 1991). Die wachstumsfaktorunabhängige Expression von c-Myc findet man in Tumorzellen als ein Resultat eines c-Myc Gendefektes oder Mutationen in der Signalkaskade, die die c-Myc Expression regulieren. In Zellkulturen induziert eine solche c-Myc Expression die Proliferation, selbst bei völliger Abwesenheit von Wachstumssignalen. Unter diesen Bedingungen ist eine Proliferation lediglich durch gleichzeitige c-Myc induzierte Apoptose zu limitieren (Bouchard C. et al., 1998). Evan et al. zeigten, daß das Ausmaß einer c-Myc induzierten Apoptose abhängig von der Menge an aktivem c-Myc Protein in der Zelle ist. Sie vermuten, daß c-Myc in die Induktion von Apoptose über Regulation spezifischer „Apoptoseproteine“ (Evan G. et al., 1992) direkt involviert ist. Neuere Studien belegen eine c-Myc induzierte Apoptose über Interaktionen mit p53 oder dem CD95 Rezeptor (Hermeking H. et al., 1994; Hueber A-O. et al., 1997; Jacobs J.J. et al., 1999). Für N-Myc, ein Mitglied der Myc Oncogenfamilie, konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Zellzykluskontrolle und Apoptose gezeigt werden. Eine verminderte N-Myc Expression geht einer Differenzierung humaner Neuroblastomzellen voraus (Thiele C.J. et al., 1985), während Lutz et al. eine N-Myc induzierte Zellzyklusprogression nachweisen konnten (Lutz et al., 1996). Eine N-Myc induzierte Apoptose fand man sowohl in Neuroblastomzellen als auch in einem hepatozellulären Karzinom (Galderisi U. et al., 1999; Ueda K. et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen N-Myc Amplifikation und der oben beschriebenen, im Neuroblastom nachgewiesenen Apoptose gestellt. In 70% der Tumore, in denen N-Myc amplifiziert vorkam, war kaum Apoptose nachweisbar. Während es für Patienten mit Tumoren ohne amplifiziertes N-Myc Gen und stark positiver Apoptose nur in 28% der Fälle zu einem Rezidiv oder letalen Krankheitsverlauf kam, war ein solches Ereignis bei 67% der Patienten zu beobachten, deren Tumore stark positive Apoptose und gleichzeitig eine Amplifikation des N-Myc Gens aufwiesen. Aufgrund dieser Daten kann man von keinem Überlebensvorteil durch stark positive apoptotische Aktivität in N-Myc gen-amplifizierten Tumoren ausgehen. Hueber et al. behaupten in ihren Untersuchungen, daß die potente apoptotische Aktivität von dereguliertem c-Myc vermutlich meine, daß ein Tumor erst nach Anhäufung kompensatorischer antiapoptotischer Mutationen wachsen könne. Hierin vermuten sie den onkogenen Synergismus zwischen c-Myc und bcl-2 (Hueber A-O. et al., 1997). Bcl-2 als Antiapoptoseprotein ist in der Lage, die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, einen essentiellen Schritt in der Apoptosekaskade, zu hemmen (Martinou J.M. et al., 1999; Shimizu S. et al., 1999). In mehreren Arbeiten konnte für das Neuroblastom bereits ein Zusammenhang zwischen bcl-2 Überexpression und niedriger Apoptoserate bzw. prognostisch ungünstigen Faktoren wie z.B. einer N-Myc Amplifikation gezeigt werden (Castle V.P. et al., 1993; Mejia M.C. et al., 1998). Die Autoren konnten ferner einen funktionellen Zusammenhang nachweisen, nämlich daß bcl-2 spezifisch Myc induzierte Apoptose hemmt, während die Fähigkeit des Myc Proteins Zellproliferation zu induzieren, davon unberührt bleibt (Bissonnette R.P. et al., 1992; Fanidi A. et al., 1992). Zunächst konnte, nach Western-blot Analyse von bcl-2, eine signifikant negative Korrelation ($p=0,02$) zwischen Apoptosehäufigkeit und der zellulären

Konzentration an dem Apoptoseinhibitor bcl-2 nachgewiesen werden. Castle et al. (1993) leiten aus solchen Ergebnissen ab, daß bcl-2 in diesen Tumoren Apoptose hemmt. Jedoch erlauben die Ergebnisse der eigenen Arbeit und der von Castel et al. gemachten Expressions- bzw. Immunfluoreszenzmessungen keine direkten Aussagen über funktionelle bzw. kausale Zusammenhänge. Dennoch soll hier die inverse Korrelation zwischen bcl-2 Überexpression und kaum nachweisbarer Apoptose hervorgehoben werden. Ein wahrscheinlicher ursächlicher Zusammenhang aufgrund der Kenntnisse über bcl-2 Wirkung (Bissonnette R.P. et al, 1992; Fanidi A., et al., 1992; Martinou J.C., 1999; Shimizu S. et al., 1999) und die Apoptosekaskade (Green D.R., 1998; Raff M., 1998; Prendergast G.C., 1999) wird somit nicht ausgeschlossen.

Eine Erwartung an Apoptose ist, daß sie einen Mechanismus darstellen könne, der in der Lage ist, Tumorprogression zu limitieren. Dem stehen die Ergebnisse dieser Arbeit gegenüber, die zeigen, daß es Bedingungen gibt, wie z.B. eine N-Myc Genamplifikation, unter denen nachweisbare Apoptose keinen Überlebensvorteil bietet. Vor dem Hintergrund eines vermuteten onkogenen Synergismus zwischen bcl-2 und c-Myc (Hueber A-O. et al., 1997) und dem Nachweis, daß bcl-2 spezifisch c-Myc induzierte Apoptose hemmen kann (Bissonnette R.P. et al., 1992; Fanidi A. et al., 1992), sollte analysiert werden, ob es einen Zusammenhang zwischen bcl-2 Überexpression und N-Myc Amplifikation an der vorliegenden Untersuchungsgruppe gibt. Es zeigte sich eine überdurchschnittlich häufige Assoziation von starker bcl-2 Expression und einer N-Myc Genamplifikation. Eine im Zusammenhang mit dieser Konstellation stehende drastische Reduktion apoptotischer Aktivität war nicht zu beobachten. In ähnlicher Häufigkeit zeigten diese Tumore kaum nachweisbare bzw. stark positive Apoptose. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß das Zusammentreffen beider Merkmale, Amplifikation des N-Myc Gens und Expression von bcl-2, prognostisch relevant sein kann. Patienten mit Tumoren, die beide Merkmale zeigten, erlitten zu 80% ein Rezidiv oder verstarben, bei einem mittleren Zeitraum eines ereignisfreien Überlebens von 11,55 Monaten. Demgegenüber war dieser Zeitraum mit 70,45 Monaten deutlich verlängert bei Patienten mit Tumoren, die bcl-2 exprimierten, aber keine Amplifikation des N-Myc Gen zeigten. Die Interpretation der Ergebnisse aus Western-blot Untersuchung und Immunfluoreszenz an humanen Neuroblastomen lassen keine Rückschlüsse darauf zu, ob in diesen Tumoren Myc Apoptose induziert und eine spezifische Hemmung Myc induzierter Apoptose durch bcl-2 stattfindet. Der vorliegende Versuchsaufbau eignet sich nicht, um mechanistische Aussagen über das Zusammenwirken einzelner Parameter zu treffen. Vielmehr ist es möglich zu entscheiden, ob ein molekularbiologisches Merkmal prognostische Relevanz besitzt und in Zukunft im Rahmen der Diagnostik des Neuroblastoms bestimmt werden sollte. Als isoliertes prognostisches Merkmal, gemessen an der Aussagekraft von N-Myc (Brodeur G.M. et al., 1987; Brodeur G.M. et al., 1997; Cohen P.S. et al, 1988; Cohn S.L. et al., 1995), eignen sich weder bcl-2 noch Apoptose. Dennoch kann eine Analyse dieser Parameter für die Diagnostik lohnenswert sein, da sie bei einer Betrachtung im Kontext aus N-Myc Amplifikation, bcl-2 Expression und Apoptose Hinweise auf ein mögliches Verhalten eines Tumors geben können.

5.3. Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Apoptose und Prognose im Neuroblastom

Viele Neurone sind abhängig von Neurotrophinen (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) während ihrer Entwicklung. Bei der Regulierung einer normalen Differenzierung scheinen unterschiedliche Ligand-Rezeptor Signalkaskaden eine Rolle zu spielen. Eine wichtige Signalkaskade, verantwortlich für Differenzierung und Überleben sympathischer und sensorischer Neurone, scheint über NGF und seinen Rezeptor zu funktionieren (Johnson D. et al., 1986). Er bindet an spezifische Zelloberflächenrezeptoren: TrkA („high affinity nerve growth factor receptor“) und p75NGFR („low affinity nerve growth factor receptor“). Über die Bindung an zwei Rezeptoren lassen sich möglicherweise die gegensätzlichen Effekte von NGF erklären. Eine Bindung an TrkA wird umgesetzt in ein Signal für Differenzierung und Überleben neuronaler Zellen. Bei einer Coexpression von TrkA und p75NGFR scheint p75NGFR die Affinität von TrkA für NGF zu steigern (Hempstead B.C. et al., 1991). Über den p75NGFR kann NGF Apoptose induzieren (Frade J.M. et al., 1996; Kuner P. et al., 1998; Rabizadeh S. et al., 1993). Dieses Phänomen wurde bereits in einer früheren Studie beobachtet, wo man zeigen konnte, daß NGF in sich entwickelnden Neuronen der Retina von Hühnern Apoptose induziert (Frade J.M. et al., 1996). Kogner et al. stellen die Hypothese auf, daß der Verlust eines funktionellen „high affinity nerve growth factor“ Rezeptors einen frühen Schritt in der Tumorigenese von Neuroblastomen mit ungünstiger Prognose bilde. Dies resultiere in einem aufrechterhaltenem Stadium undifferenzierten Zellwachstums dieser Tumore. Da Tumorzellen ohne funktionellen NGFR nicht auf NGF reagieren, folge daraus für diese Patienten eine Tumorprogression und letaler Ausgang (Kogner P. et al., 1994). Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf einen positiven Zusammenhang zwischen nachweisbarer p75NGFR Expression und statistisch höherer Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben hin. Vor allem unter den verstorbenen Patienten findet man Tumore mit geringerer p75NGFR Expression und eine Assoziation mit anderen prognostisch ungünstigen Merkmalen wie Alter und fortgeschrittenes Stadium (Brodeur G.M. et al., 1993; Neuroblastomstudie NB97, Fassung vom 30.04.97).

Unumstritten scheint in der Literatur die Tatsache zu sein, daß es eine p75NGFR vermittelte Apoptose über Aktivierung der Sphingomyelinlipasesignalkaskade gibt (Rabizadeh S. et al., 1993; Frade J.M. et al., 1996; Kuner P. et al., 1998). Uneinigkeit besteht jedoch darüber, ob diese Signalkaskade durch Entzug oder Bindung von NGF an den p75NGFR aktiviert wird. Die Mehrzahl der Autoren neigen zu der Ansicht, daß NGF-Verarmung diese Signalkaskade auslöst (Miknyoczki S.J. et al., 1996; Nakagawara A. et al., 1992; Rabizadeh S. et al., 1993). Es wird aber ebenso beschrieben, daß NGF Apoptose in p75NGFR exprimierenden Zelllinien induziert (Kuner P. and Hertel C., 1998). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, daß es nur eine statistisch unsichere Korrelation zwischen p75NGFR Expression und gleichzeitig beobachteter Apoptose gibt. Somit kann eine Apoptoseinduktion im Zusammenhang mit einer Expression des p75NGFR weder ausgeschlossen noch bewiesen werden. Da die bessere Überlebenschance von Patienten mit exprimiertem p75NGFR nicht in einen engen Zusammen-

hang mit hoher apoptotischer Aktivität gebracht werden kann, besteht die Vermutung, daß der Tumor über die NGF-NGFR Signalkaskade auch weiter zu einer benigneren Variante differenzieren könne. Diese Vermutung gründet sich auf deutliche Hinweise aus der Literatur über eine positive Korrelation zwischen NGFR Expression und dem Grad neuronaler Differenzierung (Baker D. et al., 1991; Kogner P. et al., 1994; Matushima H. et al., 1990; Nakagawara A. et al., 1993). Möglicherweise stehen Tumoren mit exprimiertem p75NGFR beide Wege offen, sowohl Apoptose als auch Differenzierung in eine benignere Tumorvariante wie ein Ganglioneuroblastom oder Ganglioneurom. Hinweise auf die vielfältigen Reaktionen von Zellen auf eine NGF-NGFR Interaktion finden sich auch in nicht-neuronalen Geweben während ihrer Entwicklung, einer Beteiligung an Gewebereparatur und Remodeling in adulten Geweben sowie in malignen Zellen nicht-neuronaler Karzinome (Prostata, Colon, Lunge, Pankreas u.a.) (Miknyoczki S. et al., 1996).

Die vorliegende Untersuchung liefert Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen p75NGFR Expression und einer besseren Überlebenswahrscheinlichkeit, diese Ergebnisse erreichen jedoch keine statistische Signifikanz. Diesem könnte man mit einer höheren Zahl von Versuchen begegnen. Eine mögliche andere Erklärung ist, daß dem p75NGFR als eine Komponente des "high affinity nerve growth factor receptor complex" (Hempstead B. et al., 1991; Miknyoczki S.J. et al., 1996) in verschiedenen Studien eine deutlich geringere prognostische Bedeutung zukommt, als seinem Partner TrkA. TrkA wird eine starke Prädiktion für günstigen Krankheitsverlauf zugesprochen und in seiner Sensitivität wird er mit prognostischen Markern wie N-Myc verglichen (Nakagawara A. et al., 1993; Tanaka T. et al., 1995).

5.4. Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Amplifikation den N-Myc Gens, Apoptose und Prognose im Neuroblastom

Eine N-Myc Amplifikation ist streng assoziiert mit einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium, rascher Tumorprogression und ungünstiger Überlebenswahrscheinlichkeit, unabhängig vom Stadium des Tumors oder dem Alter des Patienten (Brodeur G.M. et al., 1997). Während die N-Myc Expression in differenziertem Gewebe deutlich vermindert ist (Thiele C., et al., 1985), findet man häufig eine Assoziation zwischen einer p75NGFR Expression und dem Grad neuronaler Differenzierung (Baker D., et al., 1991; Kogner P. et al., 1994; Matushima H. et al., 1990; Nakagawara A. et al., 1993). Im Hinblick auf die prognostische Bedeutung eines inversen Zusammenhangs zwischen p75NGFR und N-Myc Expression zeigen zwei Arbeiten an humanen Neuroblastomen, daß Patienten mit der höchsten N-Myc und der niedrigsten p75NGFR Expression die schlechtesten Überlebenswahrscheinlichkeiten haben (Christiansen N.M. et al., 1993; Nakagawara A. et al., 1993). Unter den in dieser Arbeit untersuchten N-Myc amplifizierten Tumoren konnte nur in wenigen Fällen eine p75NGFR Expression nachgewiesen werden. Gleichzeitige N-Myc Amplifikation und hohe p75NGFR Expression ging jedoch einher mit starker apoptotischer Aktivität und einer verlängerten, ereignisfreien Überlebenszeit für die Patienten, verglichen mit den Daten aus Tumoren mit amplifiziertem N-Myc Gen ohne gleichzeitige Expres-

sion des p75NGFR. Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen für p75NGFR legen nahe, daß der p75NGFR alleine kein sensitives prognostisches Merkmal darstellt. Dennoch erscheint es lohnenswert, innerhalb der Neuroblastomdiagnostik die p75NGFR Expression zu bestimmen und sie als zusätzliche Information für die Risikodiskriminierung von Neuroblastompatienten zu nutzen. Aus der Beobachtung, daß bei N-Myc amplifizierten Tumoren mit gleichzeitiger p75NGFR Expression auch eine starke apoptotische Aktivität sichtbar ist, könnte sich eine „therapeutische Vision“ entwickeln. So könnte man für Patienten mit nachgewiesener N-Myc Genamplifikation eine Therapie entwickeln, die bei vorhandener p75NGFR Expression vor allem auf eine Induktion von Apoptose hinarbeitet.

5.5. Zusammenhang zwischen Stadium 4s und Apoptose

1963 berichteten bereits Beckwith und Perrin, daß in Säuglingen unter 3 Monaten neuroblastische Knoten gefunden wurden, die einem Neuroblastoma in situ ähnlich sind. Aus diesen Sektionsstudien interpretieren sie, daß ein Neuroblastom sehr viel häufiger angelegt ist, als es klinisch manifest wird, bzw. daß der Tumor in den meisten Fällen spontan regrediert. Weitere Studien in der Folgezeit zeigten, daß diese neuroblastischen Knoten in untersuchten Feten zwischen der 17. und 20. Gestationswoche nachweisbar waren und zur Geburt oder kurz darauf regredierten (Beckwith J. et al., 1963; Ikeda Y. et al., 1981; Turkel S.B. et al., 1975). Eine in der Literatur häufig geäußerte Vermutung ist, daß vor allem Apoptose an dieser spontanen Regression beteiligt sei (Ikeda H. et al., 1996; Nakagawara A., 1998; Takaharu O. et al., 1996; Pritchard J. et al., 1994). Pritchard und Hickman vermuten, daß im Stadium 4s ein Apoptoseprogramm, welches nach Geburt aktiviert sei, verzögert abgeschaltet werde und so an einer Regression des Tumors beteiligt sei (Pritchard J. et al., 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen lediglich in 30% der Tumore des Stadium 4s eine hohe apoptotische Aktivität. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß eine spontane Regression nicht hauptsächlich durch eine hohe apoptotische Aktivität in solchen Tumoren erklärbar ist. Vielmehr scheint Apoptose hier nur einer unter mehreren Faktoren für das bislang weitgehend ungeklärte Phänomen spontaner Regression zu sein. Zu hinterfragen bleibt auch, ob die in den Sektionsstudien gefundenen neuroblastischen Knoten tatsächlich Neuroblastoma in situ waren, oder ob es sich auch um noch undifferenziertes adrenales Gewebe gehandelt haben könnte. In der Gesamtgruppe zeigte sich, daß Patienten, deren Tumore mäßige apoptotische Aktivität aufweisen, verstarben häufiger als Patienten, deren Tumore negative oder stark positive Apoptose zeigten. Nur 10% der Patienten mit Tumoren des Stadiums 4s haben nach der eigenen Untersuchung mäßige apoptotische Aktivität und damit eine schlechtere Prognose in Bezug auf die Überlebenschancen. Dies unterstützt die klinische Beobachtung einer guten Prognose für Patienten mit Tumoren des Stadium 4s und stützt nicht die Ansicht vieler Autoren, die eine hohe Apoptoserate für eine gute Prognose oder spontane Regression bei Tumoren im Stadium 4s verantwortlich machen. Die Tatsache, daß in der vorliegenden Arbeit nur in 30% der Tumore des Stadium 4s eine hohe apoptotische Aktivität gemessen wurde, könnte anhand des folgenden Gedankenganges erklärt werden. Zugrunde liegt die Vorstellung, daß das Neuroblastom verschiedene Phasen der Ent-

wicklung von Proliferation hin zu Progression oder Involution durchmacht. Es ist also nicht gesagt, daß es in einem Tumor keine Apoptose gibt, sondern zum Zeitpunkt der Untersuchung läßt sich keine wesentliche apoptotische Aktivität nachweisen. Um diese Hypothese zu kontrollieren, müßte man serielle Untersuchungen von Tumoren eines Patienten zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten, z.B. 1 / 6 / 12 Monate, anfertigen.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage, ob Apoptose ursächlich für spontane Regression im Neuroblastom verantwortlich gemacht werden kann bzw. ob ihr anderweitig prognostische Bedeutung für dieses Tumorsystem beigemessen werden kann. Ferner interessierte die Frage nach einem Zusammenhang zwischen dem Antiapoptoseprotein bcl-2, N-Myc Amplifikation und Apoptose, sowie seiner prognostischen Relevanz für das Neuroblastom. In einem zweiten Schritt soll analysiert werden, ob die in Neuroblastom-Zelllinien beobachtete LNGFR induzierte Apoptose auf das humane Neuroblastom übertragen werden kann und welche Bedeutung p75NGFR als prognostisches Merkmal hat. Dazu wurden Versuchsdaten von 95 humanen Neuroblastomen ausgewertet. Die Anwendung der TUNEL-Methode lieferte Ergebnisse zum Apoptoseniveau, die p75NGFR Expression wurde mittels RT-PCR untersucht, während Western-Blot Analysen Daten über die Expression des Antiapoptoseprotein bcl-2 lieferten.

Es zeigte sich, daß für die Gesamtgruppe eine Assoziation zwischen niedrigem Apoptoseindex und disseminierter Erkrankung (Stadium 4 und 4s), Entdifferenzierung (Histologie 3) sowie N-Myc Amplifikation nachgewiesen werden konnte. Im Stadium 4s spielte Apoptose keine so herausragende Rolle, daß ihr ursächliche Bedeutung für die vor allem in diesem Stadium beobachtete spontane Regression beigemessen werden konnte. Eine Beteiligung als ein Faktor der für spontane Regression verantwortlich gemacht werden kann, wird jedoch nicht ausgeschlossen. Es kristallisierte sich immer deutlicher ein kritischer Apoptoseindex zwischen 0,5 und 0,9 heraus, für den mittels Kaplan-Meier Analyse eine signifikant schlechtere Wahrscheinlichkeit für ereignisfreies Überleben nachgewiesen werden konnte. Unter Patienten mit den prognostisch günstigen Stadien 1, 2 und 4s konnte diese Untergruppe in deutlich geringerem Maße nachgewiesen werden. Vielmehr zeigte sich eine starke Assoziation mit schlechten prognostischen Merkmalen. Patienten dieser Gruppe waren im Durchschnitt älter, gehörten häufiger dem fortgeschrittenen Stadium 4 an und wiesen in hohem Maße eine Amplifikation des Protooncogens N-Myc auf. Es wird spekuliert, daß es in dieser Gruppe mit einem kritischen Apoptoseindex zwischen 0,5 und 0,9 zu einer N-Myc abhängigen Inhibition der Apoptose kommen könnte.

Wie in mehreren Veröffentlichungen für das Neuroblastom beschrieben (Castle V.P. et al., 1993; Mejia M.C. et al., 1998), so konnte auch in dieser Arbeit eine signifikant negative Korrelation ($p = 0,02$) zwischen Apoptosehäufigkeit und zellulärer Konzentration des Apoptoseinhibitors bcl-2 nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund eines vermuteten onkogenen Synergismus zwischen bcl-2 und c-Myc (Hueber A-O. et al., 1997) und dem Nachweis, daß bcl-2 spezifisch c-Myc induzierte Apoptose hemmen kann (Bissonnette R.P. et al., 1992; Fanidi A. et al., 1992) interessierte vor allem die Frage nach einem Zusammenhang zwischen bcl-2 Überexpression und N-Myc Amplifikation. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine überdurchschnittlich häufige Assoziation zwischen starker bcl-2 Expression und N-Myc Genamplifikation. In dieser Konstellation kam es jedoch nicht zu einer deutlichen Reduktion apoptotischer Aktivität. Dennoch konnte gezeigt werden, daß ein Zusammentreffen beider Merkmale (bcl-2 Expression, N-Myc

Amplifikation) von prognostischer Relevanz sein kann. Patienten, deren Tumore beide Merkmale aufwiesen, erlitten häufiger ein Rezidiv oder verstarben als Patienten, deren Tumore zwar bcl-2 exprimierten, aber keine N-Myc Amplifikation aufwiesen.

Eine Analyse der Expression von LNGFR konnte nur eine lockere Korrelation zwischen p75NGFR mRNA und gleichzeitig beobachteter Apoptose zeigen. Somit sind alleine über gleichzeitige LNGFR Expression nicht alle innerhalb der Gesamtgruppe beobachteten Fälle von Apoptose über p75NGFR induzierten Zelltod erklärbar. Daher wird spekuliert, daß es in diesem Tumorsystem mehrere Signalkaskaden nebeneinander gibt, die in Apoptose münden. Ein möglicher Kandidat könnte c-Myc sein (Bouchard C. et al., 1998) Im Rahmen der Diskussion über die Bedeutung von LNGFR als prognostisches Merkmal zeigte sich eine Assoziation von geringer p75NGFR Expression bei fortgeschrittener Erkrankung (Stadium 4), hoher N-Myc Expression oder Amplifikation und hohem Gehalt an PCNA als Merkmal für Proliferation. Mit Hilfe einer Kaplan-Meier Analyse konnte gezeigt werden, daß Patienten mit exprimiertem LNGFR tendenziell eine höhere Wahrscheinlichkeit für ereignisfreies Überleben haben.

Während der Diskussion dieser erhobenen Daten mit früheren Ergebnissen aus der Literatur kristallisierte sich heraus, daß eine Analyse der Expression von p75NGFR mRNA zwar durchaus in der Lage ist, prognostische Aussagen zu machen, die Aussagekraft jedoch nicht so stark scheint, wie ein Vergleich mit der TrkA Expression. Gemeinsam bilden p75NGFR (low affinity nerve growth factor receptor) und TrkA (high affinity nerve growth factor receptor) den „high affinity nerve growth factor receptor complex“. Daher wird eine zusätzliche Analyse der TrkA Expression empfohlen.

Mit dieser Arbeit wurde versucht, die komplexen Vorgänge von Apoptose und ihrer Induktion, sowie die Bedeutung eines apoptoseinduzierenden Rezeptors als prognostisches Merkmal an einem Primärtumorsystem zu untersuchen. Es hat sich gezeigt, daß ein solches System nicht statisch gesehen werden kann, sondern man durchaus Untergruppen innerhalb des Patientenkollektivs findet, die sich in ihrer Prognose von der Gesamtgruppe unterscheiden. Möglicherweise gelingt es einmal mit Hilfe sehr vieler zu bestimmender Parameter individuelle Krankheitsverläufe nachzuvollziehen oder auch vorhersagen zu können.

7. Literaturverzeichnis

Acheson A., Conover J.C., Fandi J.P. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374, 450 - 453.

Amati B., Dalton S., Brooks M.W., Littlewood T.D., Evan G., Land H. (1992). Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 359, 423 - 426.

Ambros I.M., Zellner A., Roald B., Amann G., Ladenstein R., Printz D., Gardner H., Ambros P.F. (1996). Role of ploidy, chromosome 1p, and schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.* 334, 1505 - 1511.

Baker D.L., Reddy U.R., Pleasure D., Thorpe C.L., Evans A.E., Cohen P.S., Ross A.H. (1989). Analysis of nerve growth factor receptor expression in human neuroblastoma and neuroepithelioma cell lines. *Cancer Res.* 49, 4142 - 4146.

Baker D.L., Molenaar W.M., Trojanowski J.Q., Evans A.E., Ross A.H., Rorke L.B., Packer R.J., Lee V.M-L., Pleasure D. (1991). Nerve growth factor receptor expression in peripheral and central neuroectodermal tumors, other pediatric brain tumors, and during development of the adrenal gland. *Am.J.Pathol.* 139, 115 - 122

Beckwith J., Perrin E. (1963). In situ neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am.J.Pathol.* 43, 1089 ff.

Berthold F., Hero B. (2000). Current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* 59 (6), 1261 - 1277.

Bissonnette R.P., Echeverri F., Mahboubi A., Green D.R. (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359, 552 - 554

Bouchard C., Staller P., Eilers M. (1998). Control of cell proliferation by myc. *Cell Biology* 8, 202 - 206.

Brodeur G.M., Sekhon G.S., Goldstein M.N. (1977). Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* 40, 2256 - 2263.

Brodeur G.M., Seeger R.C., Schwab M., Varmus H.E., Bishop J.M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease stage. *Science* 224, 1121 - 1124.

Brodeur G.M., Hayes F.A., Green A.A., (1987). Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res.* 47, 4248 - 4253.

Brodeur G.M., Pritchard J., Berthold F., Carlsen N.L., Castel V., Castleberry R.P., De Bernade B., Evans A.E., Favrot M., Hedborg F. (1993). Revision of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J.Clin.Oncol.* 11, 1466 - 1477.

- Brodeur G.M., Maris J.M., Yamashiro D.J., Hogarty M.D., White P.S. (1997). Biology and genetics of human neuroblastomas. *J. Pediat. Hemat. Oncol.* 19(2), 93 - 101.
- Brodeur G.M., Castleberry R.P. (1997). Neuroblastoma. Chapter 29 (S. 761 - 797) aus *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 3. edition, Lippincott-Raven Verlag.
- Bühl A., Zöfel P. (1994). *SPSS für Windows Version 6.0*. Addison-Wesley Verlag
- Canossa M., Twiss J.L., Verity A.N., Shooter E.M. (1996). p75^{NGFR} receptor collaborate to rapidly activate a p75^{NGFR}-associated protein kinase. *EMBO Journal* 15 (No.13), 3369 - 3376.
- Carter B.D., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B., Offenhäuser N., Böhm-Matthaei R., Baeuerle P.A., Barde Y.A. (1996) Selective activation for NFκB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272, 542 - 545.
- Castle V., Heidelberg P., Bromberg J., Ou X., Dole M., Nuñez G. (1993). Expression of the apoptosis suppressing protein bcl-2 in neuroblastoma is associated with unfavourable histology and N-myc amplification. *Am.J.Pathol.* 143, 1543 - 1550.
- Christiansen N.M., Christiansen H., Berthold F., Lampert F. (1993). Transcriptional activity of N-myc and ngf-r in 50 primary human neuroblastomas as predictor for clinical outcome. *International Journal of Oncology* 3, 853 - 857.
- Cohn S.L., Look A.T., Joshi V.V., Holbrook J.T., Salwen H., Chagnovich D., Chesler L., Rowe S.T., Valentine M.B., Komuro H., Castleberry R.P., Bowman L.C., Rao P.V., Seeger R.C., Brodeur G.M. (1995). Lack of correlation of N-myc gene amplification with prognosis in localized neuroblastoma: a pediatric oncology group study. *Cancer Res.* 55, 721 - 726
- Cohn S.L., London W.B., Huang D., Katzenstein H.M., Salwen H.R., Reinhart T., Madafiglio J., Marshall G.M., Norris M.D., Haber M. (2000). Mycn Expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified mycn. *J.of Clin.Oncol.*, Vol18, No 21, 3604 - 3613.
- Cohen P.S., Seeger R.C., Triche T.J., Israel M.A. (1988). Detection of N-myc gene expression in neuroblastoma tumors by in situ hybridisation. *Am.J.Pathol.* 131, 391 - 397.
- Dean M., Levine R.A., Ran W., Kindy M.S., Sonnenshein G.E., Campisi J. (1986). Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *J. Biol. Chem.* 261, 9161 - 9166.
- Eilers M., Schirm S., Bishop J.M. (1991). The myc protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* 10, 133 - 141.
- Evan G.I.,Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Waters C.M., Penn L.Z., Hancock D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119 - 128.

- Evans A.E., D'Angio G.J., Randolph J. (1971). A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. *Cancer* 27, 374 - 378
- Evans A.E., D'Angio G.J., Propert K., Anderson J., Hann H-W.L. (1987). Prognostic factors in neuroblastoma. *Cancer* 59, 1853 - 1859.
- Fanidi A., Harrington E.A., Evan G.I. (1992). Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* 359, 554 - 556.
- Farmer G., Bargonetti J., Zhu H., Friedman P., Prywes R., Prives C. (1992). Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 358, 83 - 86.
- Fields S., Jang S.K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249, 1046 - 1049.
- Frade J.M., Rodríguez-Tébar A., Barde Y.A. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383, 166 - 168.
- Fraser A., Evan G. (1996). A licence to kill. *Cell* 85, 781 - 784.
- Galderisi U., Di Bernardo G., Cipollaro M., Peluso G., Cascino A., Cotrufo R., Melone M.A.B. (1999). Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-myc gene product. *J. Cell. Biochem.* 73, 97 - 105
- Green D.R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94, 695 - 698.
- Harrington E.A., Bennett M.R., Fanidi A., Evan G.I. (1994). c-Myc - induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO Vol.13 No.14*, 3286 - 3295.
- Hempstead B.L., Martin-Zanca D., Kaplan D.R., Parada L.F., Chao M.V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350, 678 - 682.
- Hermeking H. and Eick D. (1994). Mediation of c-myc induced apoptosis by p53. *Science* 265, 2091 - 2093.
- Hueber A.-O., Zörnig M., Lyon D., Suda T., Nagata S., Evan G.I. (1997). Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc induced apoptosis. *Science* 278, 1305 - 1309.
- Horvitz HR (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*, Apr. 1; 59 (7Suppl):1701 - 1706.
- Ikeda H., Hirato J., Akami M., Suzuki N., Takahashi A., Kuroiwa M., Matsuyama S. (1996). Massive apoptosis detected by in situ DNA nick end labeling in neuroblastoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 20 (6), 649 - 655.
- Ikeda Y., Lister J., Bouton J.M., Buyukpamukcu M. (1981). Congenital neuroblastoma in situ, and the normal fetal development of the adrenal. *J. Pediatr. Surg.* 16, 636 ff.

Jacobs J.J.L., Kieboom K., Marino S., DePinho R.A., vanLohuizen M. (1999). The oncogene and polycombgroup gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397, 164 - 168.

Jacobs J.J.L., Scheijen B., Voncken J-W., Kieboom K., Berns A. v.Lohuizen M. (1999). *Bmi-1* collaborates with *c-myc* in tumorigenesis by inhibiting *c-myc* induced apoptosis via *ink4a/arf*. *Genes and Development* 13, 2678 - 2690.

Johnson D., Lanahan A., Buck C.R., Sehgal A., Morgan C., Mercer E., Bothwell M., Chao M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545 - 554.

Kaletsch U., Kaatsch P., Michaelis J. : Jahresbericht 1995 des Deutschen Kinderkrebsregisters, 1996.

Kaplan D.R., Martin-Zanca D., Parada L.F. (1991). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the *trk* proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350, 158 - 160.

Kato G.J., Barrett J., Villa-Garcia M., Dang C.V. (1990). An amino-terminal *c-myc* domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol.Cell.Biol.* 10, 5914 - 5920.

Klein R., Jing S., Nanduri V., O'Rourke E., Barbacid M. (1991) The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell.* 65, 189 - 197.

Knudson A.G.J., Meadow A.T. (1976). Developmental genetics of neuroblastoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 57, 675 - 682.

Kogner P., Barbany G., Dominici C., Castello M.A., Raschella G., Persson H. (1993). Coexpression of messenger RNA for *trk* protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favourable prognosis. *Cancer Res.* 53, 2044 - 2050.

Kogner P., Barbany G., Björk O., Castello M.A., Donfrancesco A., Falkmer U.G., Hedborg F., Kouvidou H., Persson H., Raschella G., Dominici C. (1994). *Trk* mRNA and low affinity nerve growth factor receptor mRNA expression and triploid DNA content in favourable neuroblastoma tumors. *Adv. Neurobl. Res.* 4, 137 - 145.

Kuner P., Hertel C. (1998). NGF induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line expressing the neurotrophin receptor *p75^{NTR}*. *J. Neurosci. Res.* 54, 465 - 474.

Kuner P., Schubanel R., Hertel C. (1998). β -amyloid binds to *p75^{NTR}* and activates NF κ B in human neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 54, 798 - 804.

Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L. (1988), The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759 - 1764.

Look A.T., Hayes F.A., Nitschke R., McWilliams N.B., Green A.A. (1984). Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.* 311, 231 ff.

- Look A.T., Hayes F.A., Shuster J.J., Douglas E.C., Castelberry R.P., Brodeur G.M. (1991). Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J.Clin.Oncol.* 9, 581 ff.
- Lutz W., Stöhr M., Schürmann J., Wenzel A., Löhr A., Schwab M. (1996). Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of α -prothymosin or ornithin decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene* 13, 803 - 812.
- Maris J.M., White P.S., Beltinger C.P., Sulman E.P., Castleberry R.P., Shuster J.J., Look A.T., Brodeur G.M. (1995). Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer Res.* 55, 4664 - 4669.
- Maris J.M., Kyemba S.M., Rebbeck T.R. (1996). Familial predisposition to neuroblastoma does not map to chromosome band 1p36. *Cancer Res.* 56, 3421 - 3425.
- Martinou J-C. (1999). Key to the mitochondrial gate. *Nature* 399, 411 - 412.
- Matsushima H., Bogenmann E. (1990). Nerve growth factor (NGF) induces neuronal differentiation in neuroblastoma cells transfected with the NGF receptor cDNA. *Molecular and Cellular Biology* Sept, 5015 - 5020.
- Mejia M.C., Navarro S., Pellin A., Castel V., Llombart-Bosch A. (1998). Study of bcl-2 protein expression and the apoptosis phenomenon in neuroblastoma. *Anticancer Res.* 18, 801 - 806.
- Miknyoczki S.J., Klein-Szanto A.J.P., Ruggeri B.A. (1996). Neurotrophin-trk receptor interactions in neoplasia: a possible role interstitial and perineural invasion in ductal pancreatic cancer. *Critic.Rev. Oncog.* 7, 89 - 100.
- Molekularbiologie der Gene, Kapitel 36.10, B.Lewis, Spektrum Verlag.
- Murre C., Schonleber McCaw P., Baltimore D. (1989). A new DNA binding and dimerisation motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777 - 783.
- Nakagawara A., Arima M., Azar C., Scavarda N., Brodeur G.M. (1992). Inverse relationship between trk-expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res.* 52, 1364 - 1368
- Nakagawara A., Arima-Nakagawara M., Scavarda N.J., Azar C.G., Cantor A.B., Brodeur G.M. (1993). Association between high level of expression of the trk gene and favourable outcome in human neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.* 328, 847 - 854.

Nakagawara A. (1998). Molecular basis of spontaneous regression of neuroblastoma: role of neurotrophic signals and genetic abnormalities. *Hum.Cell* 11, 115 - 124.

Neuroblastomstudie NB97, Fassung von 30.04.1997

Pomerantz J., Schreiber-Agus N., Liégeois N.J., Silverman A., Alland L., Chin L., Chen K., Orlow J., Lee H-W., Cordon-Cardo C., DePinho R.A. (1998). The ink4a tumor suppressor gene product, p19^{ARF}, interacts with Mdm2 and neutralizes Mdm2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713 - 723.

Prendergast G.C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18, 2967 - 2987.

Principals and Practice of Pediatric Oncology, 3. Edition, Chapter 29, 761 - 797, Lippincott-Raven.

Pritchard J., Hickman J.A. (1994). Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *The Lancet* 344, 869 - 870.

Rabizadeh S., Oh J., Zhong L., Yang J., Bitler C.M., Butcher L.L., Bredesen D.E. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261, 345 - 348.

Raff M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397 - 400.

Raff M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature* 396, 119 - 122.

Rouach E. Y., Deguin C.C., Breugnot C., May E. (1996). The role of p53 as a transcription factor in the induction of apoptosis. *Behring Inst. Mitt.* 97, 60 - 71.

Roussele M., Saule S., Largou C., Rommens C., Beug H., Graf T., Stehelin D. (1979). Three new types of viral oncogenes of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* 281,452 - 455.

Sarid J., Halazonetis T.D., Murphy W., Leder P. (1987). Evolutionarily conserved regions of the human c-myc protein can be uncoupled from transforming activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84,170 - 173.

Shimada H., Catten J., Newton W.A., Sachs N., Hamoud A.B., Chiba T., Marsden H.B., Misugi K. (1984). Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: Definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastoma. *J.Natl.Can.Inst.* 73, 405 - 413.

Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483 - 487.

Stürzbecher H-W., Brain R., Addison C., Rudge K., Remm M., Grimaldi M., Keenan E., Jenkins J.R. (1992). A c-terminal α -helix plus basic region the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene* 7, 1513 - 1523.

- Takaharu O., Masahiro F., Takeshi K., Yosuka K., Kenji I., Susumu N., Akira O. (1996). In situ detection of DNA-fragmentation and expression of bcl-2 in human neuroblastoma: relation to apoptosis and spontaneous regression. *J.of Ped.Surg.* Vol 31(2), 251 - 257.
- Takeda O., Hanaka M., Uehara T., Maseki N., Sakashita A., Sakurai M., Kanda N., Arai Y., Kaneko Y. (1996). An increased NM23H1 copy number may be a poor prognostic factor independent of LOH on 1p in neuroblastomas. *British J. Cancer.* 74, 1620 - 1626.
- Tanaka T., Hiyama E., Sugimoto T., Sawada T., Tanabe M., Ida N. (1995). trkA gene expression in neuroblastoma the clinical significance of an immunohistochemical study. *Cancer* 76, 1086 - 1095.
- Thiele C.J., Reynolds C.P., Israel M.A. (1985). Decreased expression of N.-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313, 404 - 406.
- Tonini G.P., Mazzocco K., di Vinci A., Geido E., de Bernardi B., Giaretti W. (1997). Evidence of apoptosis in neuroblastoma at onset and relapse. *J. Neuro-Oncol.*31, 209 - 215.
- Turkel S.B., Itabashi H.H. (1975). The natural history of neuroblastic cells in fetal adrenal gland. *Am J Pathol* 76, 225 ff.
- Ueda K. and Ganem D. (1996). Apoptosis is induced by N-myc expression in hepatocytes, a frequent event in hepadnavirus oncogenesis, and is blocked by insulin-like growth factor II. *J. Virol.*, March, 1375 - 1383.
- Verheij M., Bose R., Hua Lin X., Yao B., Jarvis W.D., Grant S., Birrer M.J., Szabo E., Zon L.I., Kyriakis J.M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R.N. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75 - 79.
- Waters C., Littlewood T., Hancock D., Moore J. Evan G. (1991). c-myc protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene* 6, 797 - 805.
- Weber J.D., Taylor L.J., Rossel M.F., Sherr C.J. Bar-Sagi D. (1999). Nucleolar arf sequesters mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biol.* 1, 20 - 26.
- White P.S., Maris J.M., Beltinger C. (1995). A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within 1p36.2-.3. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 5520 - 5524
- Williams G.T. (1991) Programmed cell death: apoptosis an oncogenesis. *Cell* 65, 1097 - 1098.

Abkürzungsverzeichnis

a-	anti-
AB	antibody (Antikörper)
Apaf-1	apoptotic protease activation factor 1
APO-1	CD95/Fas
APS	Ammoniumpersulfat
Bak	bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	bcl-2 associated x protein
bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia 2
BDNF	brain derived nerve growth factor
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serum Albumin
CDK	Cyclin abhängige Kinase
CD95	Fas/APO-1 Antigen
Dapi	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	ethylendiaminetetraacetic acid
EFS	event free survival (ereignisfreies Überleben)
FADD	Fas associated death domain
Fas	APO-1/CK95
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
LNGFR	low affinity nerve growth factor receptor
Max	Max Protein
Mad	Max dimerisation protein
Mdm2	mouse double minute 2 = humanes Homolog des p53 bindenden Protein
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NT-3	Neurotrophin 3
NT-4/5	Neurotrophin 4/5
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Bufered Salin
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
p75NGFR	low affinity nerve growth factor receptor
RT	Reverse Transkription
SAPK	Stress-activated Proteinkinase

SDS	Dodecylsulfat-Natrium-Salz
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TBS	Tris Buffered Saline
TESPA	Tri-ethoxysilylpropylamin
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRADD	TNFR-associated death domain
TrkA	Tyrosinkinase A Rezeptor
Tris	Tris-hydroxyethyl-aminomethan
VDAC	voltage dependent anion channel

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1	Zusammenhang zwischen einer Amplifikation des N-Myc Gens, Apoptose und Prognose
Tabelle 2	Zusammenhang zwischen Amplifikation des N-Myc Gens, Expression von bcl-2, Apoptose und Prognose
Tabelle 3	Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR, Amplifikation des N-Myc Gens, Apoptose und Prognose
Abbildung 1	Übersicht über den Versuchsaufbau
Abbildung 2a	Verteilung von Apoptose in der Gesamtgruppe
Abbildung 2b	Immunfluoreszenzbilder zum Nachweis von Apoptose
Abbildung 3a	Zusammenhang zwischen Apoptose und letalem Krankheitsausgang
Abbildung 3b	Zusammenhang zwischen Apoptose und Lebensalter
Abbildung 3c	Zusammenhang zwischen Apoptose und Krankheitsstadium
Abbildung 3d	Verteilung der Tumore mit schwach positiver Apoptose auf die Krankheitsstadien
Abbildung 3e	Kaplan-Meier Analyse für Apoptose positiv versus negativ
Abbildung 3f	Kaplan-Meier Analyse für Apoptose schwach positiv versus negativ und stark positiv
Abbildung 4	Apoptose in Abhängigkeit von N-Myc
Abbildung 5a	Zusammenhang zwischen Apoptose und bcl-2
Abbildung 5b	Repräsentative Bilder eines Western-Blots für bcl-2
Abbildung 5c	Zusammenhang zwischen starker bcl-2 Expression und einer N-Myc Genamplifikation
Abbildung 5d	Auswirkung der bcl-2 Expression bei gleichzeitiger Amplifikation des N-Myc Gens auf das Apoptoseniveau
Abbildung 6a	Repräsentative Bilder einer Agarosegelelektrophorese für p75NGFR und β -Aktin
Abbildung 6b	Zusammenhang zwischen Apoptose und Expression des p75NGFR
Abbildung 6c	p75NGFR Expression unter den verstorbenen Patienten
Abbildung 6d	Zusammenhang zwischen Expression des p75NGFR und dem Lebensalter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt
Abbildung 6e	Abhängigkeit der p75NGFR Expression vom Krankheitsstadium
Abbildung 6f	Kaplan-Meier Analyse für p75NGFR positiv versus negativ
Abbildung 7a	p75NGFR Expression in Abhängigkeit von einer N-Myc Genamplifikation
Abbildung 7b	Apoptoseniveau der Tumore mit +N-Myc Gen/ -p75NGFR
Abbildung 7c	Häufigkeit eines ereignisfreien Überlebens für Patienten mit: +N-Myc Gen / - p75NGFR
Abbildung 7d	Apoptoseniveau der Tumore mit +N-Myc Gen / +p75NGFR

-
- Abbildung 7e Häufigkeit eines ereignisfreien Überlebens von Patienten mit:
+N-Myc Gen / +p75NGFR
- Abbildung 8 Apoptosehäufigkeit im Stadium 4s
- Abbildung 9 möglicher Einfluß von Chemotherapie auf das Apoptoseniveau

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg folgende Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Doss, Engel, Feuser, Geus, Gotzen, Griss, Gröne, Habermehl, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Kern, Klenk, Kneg, Koolmann, Krieg, Lang, Lennartz, Oertel, Reichardt, Renschmidt, Schachtschabel, Schäfer, Schneyer, Schulz, Seitz, Seyberth, Vohland, Voigt, Weihe, Werner

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben:

Herrn Priv.Do. Dr.med. Holger Christiansen: Für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seinem Labor und für konstruktive Kritik und Ratschläge bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Professor Dr.med. Seyberth: Für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit im Zentrum für allgemeine Kinderheilkunde der Philipps-Universität Marburg.

Eckhard Bergmann und Marco Theobald: Ihre freundliche Unterstützung bei der Erarbeitung in dieser Arbeit verwendeter Methoden, sowie anregende Diskussionen und Ratschläge haben tatkräftig zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof.Dr. Martin Eilers und seiner Arbeitsgruppe (insbesondere Michael Wanzel): Für hilfreiche Auskünfte bezüglich des molekularbiologischen Teils dieser Arbeit und eine gute methodische Anleitung.

Den Mitarbeitern des Neuroblastomlabors (insbesondere Sybille Dumke, Axel Weber, In-Hee Shin): Für die kooperative Zusammenarbeit und die entgegengebrachte freundliche Atmosphäre.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Nüsing: Für die zur Verfügung gestellten technischen Geräte und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die mir entgegengebracht wurde.

Dorothee und Marc Dechmann: Ihre geduldige Hilfe war mir bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit unverzichtbar.

Kai und Klaus-Peter Koller: Über den gesamten Zeitraum meiner Promotion standen sie mir mit Geduld und wertvoller Unterstützung bei der Erstellung der Grafiken und Korrektur dieser Arbeit zur Seite.