

14. Jahrgang · Heft 4 · Dezember 1997

C 5842

FOCUS MUL



ZEITSCHRIFT FÜR WISSENSCHAFT, FORSCHUNG UND LEHRE
AN DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Thema ONKOLOGIE



SCHERING



Diagnostika

Wir sind als Partner da, wenn man

Wer sich in der bildgebenden Diagnostik für Schering entscheidet, hat einen Partner gefunden, der zusammen mit ihm an einer kontinuierlichen Verbesserung der Diagnosestellung arbeitet. Mit anspruchsvollem Service und zahlreichen Fortbildungsveranstaltungen, z. B. für MRT, Ultraschall und Spiral-CT. Gut, einen so kompetenten Partner an seiner Seite zu wissen.

**Schering
Diagnostika**

Wissenschaft plus Partnerschaft.

Inhalt

Editorial

- Onkologie – zwischen Grundlagenforschung und klinischer Praxis
A. C. Feller 204
-

Originalarbeiten

- Identifizierung differentiell-exprimierter Gene in der großzellig anaplastischen Zell-Linie (ALCL) L82
I. Bettinger, H. Merz, A. C. Feller 206
- Wechselwirkungen zwischen dem Tumorsuppressor p53 und dem Rekombinationsprotein Rad51
S. Buchhop, St. Miska, B. Nebe, H. Pommerenke, J. Rychly, H.-W. Stürzbecher 214
- Ein experimentelles System für Hirntumor-Zellinvasion *in vitro*
A. J. A. Terzis, H. Arnold 224
- Inhibitorische Effekte des Gonadotropin-releasing Hormon-Agonisten Triptorelin auf Epidermal growth factor (EGF)-Wirkungen in humanen Ovarial- und Endometrium-karzinomzelllinien
O. Ortman, V. Müller, G. Grossmann, K. Trautner, B.V. Stuckrad, K.-D. Schulz, K. Diedrich, A.V. Schally, G. Emons 231
- Erhöhte lösliche Interleukin-2-Rezeptor-Serumspiegel korrelieren zu Stadium und Aktivität der Langerhanszell-Histiozytose im Kindesalter
C. Schultz, M. Klouche, B. Kroehnert, N. Richter, P. Bucky 238
- FIRE AND ICE – Ganzkörperhyperthermie kombiniert mit Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE) bei Patienten mit Kopf und Halsmalignomen
K. Sommer, D. M. Katschinski, M. Mentzel, R. Touhidi, St. Remmert, Th. Feyerabend, G. J. Wiedemann 244
- Mögliche Rolle des Ifosfamid-Metaboliten Chloracetaldehyd in der Tumorthherapie – Ein neues zytostatisches Target unabhängig von Mitoseapparat der Zelle?
J. Kisro, S. Brüggemann, T. Wagner 251
- Die totale Mesorektumexzision: Standardverfahren zur chirurgischen Therapie des Rektumkarzinoms
C. Boos, A. Weigel, O. Schwandner, H.-P. Bruch 256
- Stellenwert der sekundären radikalen Prostatektomie in der Behandlung des lokal begrenzten Prostatakarzinoms
C. Durek, T. Riepe, P. Fornara, A. Böhle, R. Eichenauer, D. Jocham 261
- Realisierung der Ganzkörperbestrahlung in einer modifizierten Technik
T. Feyerabend, E. Ihnen, J. Kohlrausch, B. Riis, C. Melchert, D. Hebbinghaus, K. Hakelberg, E. Richter 268
-

Zur Abbildung auf der Titelseite vgl. den Beitrag auf S. 206 ff.

Onkologie – zwischen Grundlagenforschung und klinischer Praxis

Wir erleben ein Zeitalter der biomedizinischen Forschung, welches kaum vergleichbar ist mit vorangegangenen Epochen, allenfalls mit den Fortschritten der Physik zu Beginn des Jahrhunderts. Entwicklungen in der molekularen und strukturellen Biologie, verbunden mit der Detektion von Genen pathologischer Strukturen im menschlichen Genom zeichnen einen revolutionären Weg in der Medizin. Diese Entdeckungen sind unmittelbar mit technologischen Entwicklungen insbesondere in der Molekularbiologie verbunden, Techniken die ebenfalls uneingeschränkt als revolutionär zu beschreiben sind.

Auf der Gegenseite steht die Beobachtung, daß fast jeder vierte Bürger an Krebs sterben wird, jeder dritte daran erkranken. Teilweise werden wir mit steigenden Häufigkeiten von Krebserkrankungen z. B. beim Mammakarzinom oder beim Prostatakarzinom (20 % bzw. 17 % Zunahme in den letzten 20 Jahren) konfrontiert. Die ungeheure Last, die die Krebserkrankung für den Einzelnen wie für unsere soziale Gemeinschaft mit sich bringt, ist ohne Zweifel nicht durch wissenschaftliche Forschung alleine zu bewältigen. Prävention, Diagnose und Therapie stellen zentrale Strategien in der Bewältigung der Krebserkrankung dar. Andererseits werden gerade die letztgenannten Basislinien von dem Unternehmen und Experiment Wissenschaft zentral getragen und ständig befruchtet. Am Ende wird aber immer die Frage zu beantworten sein, welchen Benefit der Patient erfährt.

Vor 20 Jahren wurde die Krebsforschung dramatisch beeinflusst durch die Identifikation zellulärer Onkogene, konsekutiv der Tumorsuppressorgene und der daraus resultierenden Erkenntnis, daß die Krebserkrankung im wesentlichen eine genetische Erkrankung im Sinne erworbener oder angeborener genetischer Defekte darstellt.

Der Fortschritt in der Onkologie wird aber neben der Entwicklung moderner wissenschaftlicher Strategien auch zentral durch die *interdisziplinäre Kooperation* getragen. So wie sie ein wesentlicher Pfeiler für die erfolgreichen Entwicklungen der letzten 10 - 20 Jahre war, wird sie ebenso der Garant für die Zukunft sein. Durch Entwicklungen in

der Zell- und Molekularbiologie hat sich unser Verständnis zur Entstehung der Krebserkrankung in einem Ausmaß erweitert, das wir noch vor 10 Jahren nicht für möglich gehalten haben. Zweifelsfrei stehen wir heute in einer Zeit, in der der Wissenszuwachs zur Ätiologie und Pathogenese der Krebserkrankungen in einem Umfang zunimmt, welcher eine unmittelbare Umsetzung in diagnostische und therapeutische Prinzipien nicht mehr möglich macht, das heißt, wir beobachten eine zunehmende Dissoziation zwischen diesen beiden Armen. Wenn auch den Menschen die Analyse des Unbekannten, die Entdeckung des Neuen immer wieder in seinen Bann zieht, so darf darunter die Bedeutung der täglichen Arbeit in der Krankenversorgung sowie die Verfolgung wissenschaftlicher Konzepte in Diagnose und Therapie nicht in seiner Bedeutung gemindert werden. Dieses meint, daß auch unter wissenschaftlichen Aspekten die Fortentwicklung präventiver Maßnahmen, Projekte der Krebsfrüherkennung, die Durchführung von Therapiestudien, die Erforschung neuer Chemotherapeutika oder die Durchführung der Qualitätssicherung nicht im Sinne einer Minimalmedizin, sondern eines Leistungsanspruchs, eine hohe Bedeutung besitzen und daher ebenso wichtige klinische Forschungsansätze darstellen wie die molekulare Medizin.

Ganz wesentlich wird allerdings unsere heutige Situation auch durch die vielzitierte Kostenexplosion im Gesundheitswesen geprägt, allerdings auch verbunden mit der Beobachtung einer Zunahme des Benefits der Bevölkerung und des Patienten durch eine steigende Lebenserwartung und größere Heilungschancen in seiner Erkrankung. Die Krankenhäuser sind entlarvt als ständige Kostentreiber, die exponentiell steigenden Kostenkurven sprechen für sich. Wer aber von uns möchte sich heute mit einem Röntgenbild des Brustkorbes zufriedengeben, nicht sämtliche aufwendigen, teuren, diagnostischen Maßnahmen in Anspruch nehmen, um vielleicht vor einem weitreichenden Eingriff zu einer Diagnose zu gelangen. In der Tat sind die Kosten für derartige Maßnahmen gestiegen. Möchten wir auf sie verzichten? Die Prognose einzelner chirurgisch therapierter Krebspatienten ist

unter anderem auch abhängig von der Wahl der Operationsmethode wie auch dem Operateur. Möchten wir auf eine qualitativ hochwertige Ausbildung verzichten, oder aber nicht die Möglichkeit haben, die modernsten chirurgischen Verfahren oder das neueste Chemotherapeutikum im Falle einer Erkrankung für uns beanspruchen zu können?

Die Zunahme unserer Kenntnisse ist ein unaufhaltsamer Prozeß, den wir überwiegend mit Begeisterung betrachten, unser individueller Anspruch an ein geistiges, körperliches und seelisches Wohlbefinden zumindest nicht gesunken. Hier wäre die Politik gefordert, auch über Unpopuläres aufzuklären und Visionen zu zeigen. Die Deklaration der Kostentreiber entspricht allenfalls dem Niveau der Minimalmedizin. Wir stehen in einem erheblichen Dissens der ausgeprägten politischen Einflußnahme auf das Gesundheitssystem gegenüber einer nur zurückhaltenden Beteiligung in der Schaffung herausragender Strukturen für die Gesundheitsforschung.

Die Krebsforschungsbudgets aus dem Jahre 1996 sprechen für sich. Bezogen auf die Einwohner werden wir in Deutschland etwa die Hälfte der finanziellen Mittel im Vergleich zu den Niederlanden auf. Die USA weisen eine 2,5fache Ausgabe für die Krebsforschung nach. In Zahlen ausgedrückt heißt dieses: In den USA werden pro Kopf für Krebsforschung DM 10,10, in den Niederlanden DM 8,20 und in Deutschland DM 4,70 investiert. Bezogen auf die Gesamtmittel für Forschung und Entwicklung zeigt sich in den letzten 6 Jahren in Deutschland eine Abnahme der Ausgaben um insgesamt 10 %. Im gleichen Atemzug lassen sich für Deutschland Steuereinnahmen aus der Tabakindustrie von ca. 25 Mrd. DM jährlich nachweisen. Dies ist etwa das 50fache der vom Staat für die Krebsforschung aufgebrauchten Mittel.

Wir werden weiterhin vielleicht in einem noch stärkeren Ausmaß als bisher auf das persönliche Enga-

gement eines jeden Einzelnen von uns angewiesen sein. Es werden daher dringend Strukturen benötigt, welche den individuellen Enthusiasmus nicht bremsen, sondern fördern. So wie wir im Kreis der MUL Strategien zur Förderung der Wissenschaft mit dem Ziel der Etablierung tragender Schwerpunkte entwickeln, wäre die Errichtung übergeordneter Zentren gefragt, um auch hier die Entwicklung langfristiger Strategien mit definierten Zielsetzungen zu ermöglichen. Der politische Ehrgeiz, die Sinnhaftigkeit und Umsetzung von Sparmaßnahmen zu dokumentieren, zeugt allenfalls von Ideenarmut. Ein Patient erfordert eine gut geplante, tragende Diagnose- und Therapiestrategie. Diese wird ständig ergänzt durch die Beobachtung von Phänomenen und der daraus abgeleiteten neuen Ideen. Dem Mediziner ist klar, daß die Fiebersenkung nicht zur Heilung führt.

Der Verbund von onkologischer Grundlagenforschung und klinisch-onkologischer Forschung, die Entwicklung interdisziplinärer Zentren, die Durchführung von Therapiestudien, die Einbeziehung der Tumorepidemiologie umfassen das heutige Spektrum, in dem sich der krebskranke Mensch bewegt.

Innerhalb dieses Rahmens haben wir in dem vorliegenden Heft durch eine Auswahl von wissenschaftlichen Arbeiten versucht, das breite Spektrum onkologischer Forschung an der MUL von der Grundlagenforschung mit der Analyse neuer Gene oder der Beschreibung ihrer Funktion bis hin zur Evaluierung operativer Methoden mit der Möglichkeit der direkten Umsetzung zum direkten Nutzen des Patienten darzustellen.

A. Ch. Feller

Prof. Dr. med. Alfred Christian Feller, Direktor des Instituts für Pathologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, hat die vorliegende Themenausgabe „Onkologie“ von Focus MUL als Guest-Editor betreut.

Profitieren Sie von unserer Kompetenz!

WEILAND BÜCHER

Überzeugen Sie sich von der großen Auswahl und Leistungsfähigkeit unserer medizinischen Fachbuchabteilung.

23552 Lübeck, Königstr. 67a, Tel. 04 51/1 60 06-0, 23562 Lübeck, Ratzeburger Allee 111-125, Tel. 04 51/50 24 60
23611 Bad Schwartau, Markttwiete 2, Tel. 04 51/2 19 87

Aus dem Institut für Pathologie (Direktor Prof. Dr. med. A. C. Feller) der Medizinischen Universität zu Lübeck:

Identifizierung differentiell-exprimierter Gene in der großzellig anaplastischen Zell-Linie (ALCL) L82

I. Bettinger, H. Merz, A.C. Feller

Zusammenfassung

Das großzellig anaplastische Lymphom (ALCL) und das Hodgkin-Lymphom (HL) zeigen zahlreiche morphologische und immunphänotypische Ähnlichkeiten. Allerdings bestehen auch deutliche Unterschiede in der Tumorzellmasse sowie in dem Ansprechen der Patienten auf die Therapie und in der Prognose.

Die Isolierung spezifisch exprimierter Gene bei bestimmten Lymphomentitäten kann zu einem wichtigen Verständnis der Pathogenese beitragen sowie eine Hilfestellung für die Diagnose und Therapie darstellen. Obwohl zahlreiche Informationen und Spekulationen über die Genexpression, die für die Pathogenese des ALCL und HL relevant sind, existieren, ist der genaue Mechanismus des neoplastischen Transformationsprozesses in keiner Weise verstanden. Es war daher das Ziel unserer Arbeit, jene Gene zu charakterisieren, die in der Lymphomentität ALCL hoch- oder aber spezifisch exprimiert sind. Ausgehend von der Tatsache, daß mehr als 30.000 unterschiedliche Gene gleichzeitig in einer Zelle exprimiert werden und nur ein sehr kleiner Teil dieser Gene direkt oder indirekt relevant für die Transformation oder das Wachstum der Neoplasie sind, schien es sinnvoll, eine c-DNA-Bibliothek zu konstruieren, aus welcher die "irrelevanten Gene" subtrahiert wurden. Hierdurch sollte es zu einer deutlichen Anreicherung differentiell oder spezifisch transkribierter Gene kommen, einschließlich derjenigen, welche möglicherweise für initiale Schritte der Neoplasieentstehung verantwortlich sind. Das differentielle Screening der Substraktionsbibliothek führte zur Identifizierung von 68 Klonen, welche höhere Signale für die ALCL-cDNA nachweisen ließ, verglichen mit Tonsillen-cDNA. Auf RNA-Ebene zeigten 39 eine erhöhte Transkription. Diese Klone wurden sequenziert und analysiert, wobei sieben keine Homologie zu einer bekannten, bisher publizierten Sequenz aufwiesen, während die übrigen Klone

vollständige Homologien mit bekannten humanen Genen zeigten. Diese zuletzt genannten Gene sind involviert in die Transkription, Replikation und Translation, wie auch in den normalen Stoffwechsel der Zelle. Ein bisher unbekannter Klon zeigt nach den bisherigen Analysen eine außerordentlich hohe Restriktion in der Expression. Das Transkript wird in 90 % der Fälle von ALCL gefunden, während es in Fällen von Hodgkin-Lymphomen sowie anderen Non-Hodgkin-Lymphomen nicht detektiert wird.

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie mit Hilfe der Substraktions-DNA-Analyse ein Genexpressionsprofil bestimmter Lymphomentitäten dargestellt werden kann, was einerseits zum allgemeinen Verständnis der Proliferation und möglicherweise neoplastischen Transformation beitragen kann. Darüber hinaus zeigt die Analyse andererseits, daß hochspezifische, bisher unbekannte Gene detektiert werden können, die aufgrund ihrer selektiven Expression in einer definierten Lymphomentität möglicherweise eine wesentliche Bedeutung in der Entstehung der Neoplasie besitzen.

Summary

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) and Hodgkin's Disease (HL) show striking morphological and immunophenotypical parallels. However, there are also differences in tumor cell burden, tissue architecture and in response to the therapy and prognosis. The isolation of specifically expressed genes in these lymphoma entities may be important for the pathogenesis, diagnosis and therapy of neoplasias. Our aim was to characterize genes that are abundantly expressed in ALCL for which up to now no specific marker is available. We constructed a subtracted λ phage library by hybridizing double stranded cDNA from the ALCL cell line L82 with biotinylated tonsillar cDNA. Additionally we performed a differential screening using duplicate filter lifts of this subtractive library

hybridized with an ALCL (L82) and a tonsil cDNA probe respectively. Differentially expressed clones were identified, amplified and sequenced. Furthermore, the clones were identified as true differentially expressed genes by Northern Blot analysis and their value as diagnostic/prognostic markers was checked comparing the transcription in cell lines from various lymphoid and nonlymphoid tissues. We were able to identify 39 clones with increased transcription in the ALCL cell line compared with tonsillar total RNA. Seven clones did not show homology to any sequence published so far, while the others showed full homology to known human genes. These latter genes are involved in transcription, replication and translation as well as in normal cell metabolism. Some of them are expressed on the cell surface. The transcription rate of these genes varied markedly in various cell lines derived from lymphoid and non-lymphoid tissues as demonstrated by Northern Blot analysis. Our approach allowed us to identify genes, so far not known to be differentially expressed in ALCL. Further information achieved by molecular characterization of these isolated highly and/or specifically expressed genes will improve our understanding of events taking place in the pathogenesis of defined malignancies.

Einleitung

Das großzellig anaplastische Lymphom und das Hodgkin-Lymphom sind eng verwandte Entitäten bezogen auf ihre Morphologie und ihren Immunphänotyp. Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen, welche offenbar die neoplastischen Zellen des Hodgkin-Lymphoms (HL) darstellen, können häufig nicht unterschieden werden von Tumorzellen des ALCL. Die Identifizierung differentiell-exprimierter cDNA-Klone von Zell-Linien ermöglicht es, normale von neoplastischen Zellen auf der Ebene der Genexpression zu unterscheiden. Durch die subtraktive Hybridisierung können differentiell transkribierte Gene angereichert werden. Die Kenntnis derartiger hochexprimierter oder spezifisch transkribierter Gene kann unser Verständnis für die Pathogenese definierter Neoplasien erheblich erweitern. Derartige Gene können ebenfalls eine wichtige Bedeutung als prognostische Faktoren oder in der Diagnostik erlangen. Bis heute existieren wenig Informationen über eine differentielle Genexpression in Zell-Linien, die aus ALCL oder HL entstanden sind.

1992 zeigten Delabie et al eine hohe Expression des filamentassozierten Proteins Restin in HL und ALCL⁽¹⁾. Die Expression von IL-9 zeigte sich ebenfalls in ihrer Expression eingeschränkt auf die vor-

genannten Lymphomentitäten, während andere NHL eine solche Expression nicht nachweisen ließen^(2,3). Schließlich wurde gezeigt, daß in vielen Fällen von ALCL und Hodgkin, EBV klonal integriert war, was als Hinweis interpretiert wurde, daß EBV in die Pathogenese diese Lymphome involviert ist. In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, daß die Technik der Substraktionshybridisierung, kombiniert mit einer differentiellen Plaquehybridisierung es erlaubt, hoch und teilweise spezifisch transkribierte Gene in einer Zell-Linie von ALCL nachzuweisen und zu klonieren. Es ist damit das Ziel auf molekularer Ebene, Marker zu identifizieren, die weitere Aussagen über die Pathogenese erlauben, sowie hilfreich in der Diagnose und Abschätzung der Prognose der genannten Lymphome sind.

Material und Methoden

Zelllinien

Die ALCL-Zelllinie L82, mit einer t(2;5) (p23;q35) Translokation, wurde in RPMI + 20 % FCS kultiviert. Tonsillen, wurden direkt nach der operativen Entfernung in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70 ° C aufbewahrt.

Konstruktion der subtrahierten cDNA IPhagenbank

Die Konstruktion der subtrahierten cDNA IPhagenbank aus cDNA der ALCL-Zelllinie L82 und aus Tonsillen-cDNA ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

cDNA Synthese

Die Isolierung der gesamt RNA erfolgte nach der Methode von Chomczynski⁽⁴⁾. Die polyA⁺-RNA wurde mit Hilfe Oligo-dT-gekoppelten Dynabeads (DynaI, Hamburg) isoliert. cDNA wurde aus 5µg polyA⁺-RNA unter Verwendung des ZAP-cDNA Synthese Kits (Stratagene, Heidelberg) synthetisiert. Die Driver cDNA (Tonsille) wurde in Anlehnung an die PCR Methode von Lambert und Williamson hergestellt⁽⁵⁾.

Die lyophilisierte Driver cDNA wurden in H₂O gelöst und mit Photobiotin (Clontech) gemischt, auf Eis inkubiert und mit einer Lampe (250W) für 15 Min bestrahlt. Biotin, das nicht kovalent an die DNA gebunden wurde, konnte durch vierfache Extraktion mit wassergesättigtem 2-Butanol entfernt werden. Die biotinylierte cDNA wurde Ethanol präzipitiert und in einem geringen Volumen H₂O gelöst.

1µg L82 cDNA und 20µg biotinylierte Tonsillen cDNA wurden zusammen Ethanol präzipitiert, in 5µl H₂O gelöst und mit 5µl 1.5M NaCl, 50mM HEPES, 10mM EDTA,

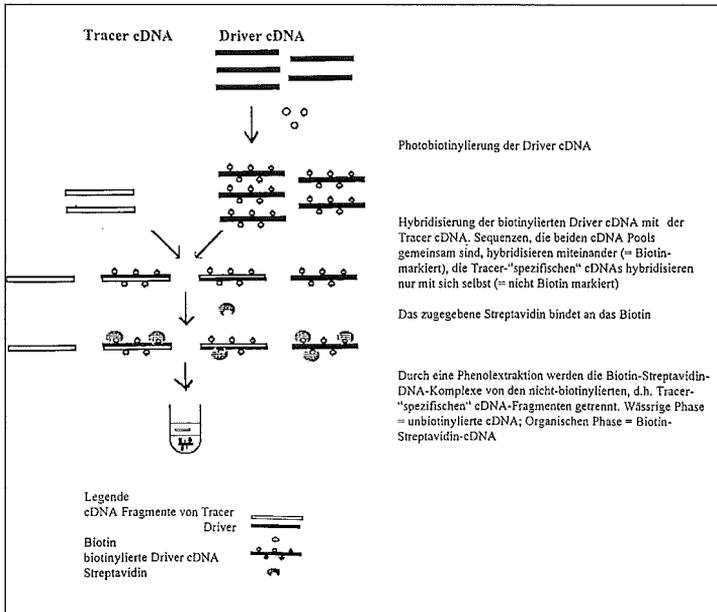


Abb. 1: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte im Verlaufe der subtrahierten Hybridisierung zur Herstellung einer Subtraktions-cDNA Bank aus der ALCL Zelllinie L82

0.2 % NaDodSO₄, pH 7.5 vermischt. Die Lösung wurde mit Mineralöl überschichtet und bei 100 ° C 1 Min und anschließend bei 68 ° C für 36 Std. inkubiert. Durch Zugabe von Streptavidin, das an das Biotin bindet, und einer mehrfachen Phenolextraktion, wurden die biotinylierten, „unspezifischen“ Hybride aus dem Reaktionsansatz entfernt. Die wässrigen Phasen wurden mit Ethanol präzipitiert und das Pellet in TE gelöst.

50ng der subtrahierten cDNA wurden in 0.5µg Lambda UniZap XR Vektor inkloniert und wie beim Hersteller beschrieben, als Phage verpackt. Diese IL82-sub Bank wurde einmal amplifiziert und unter Zugabe von 10 % DMSO bei - 70 ° C gelagert. Es wurde ebenfalls eine nicht-subtrahierte L82 lBank hergestellt.

Differentielles Plaquescreening

Die subtrahierte l cDNA Bank wurde zur Identifizierung von differentiell transkribierten Klonen im Plaquescreening untersucht. Die rekombinanten Phagen wurden zusammen mit Wirtsbakterien auf Agarplatten ausgesät und nach dem Erscheinen von Plaques nacheinander mit zwei Nitrozellulosefiltern bedeckt. Die auf die Filter transferierte Phagen-DNA wurde nach Fixierung mit Dig-markierter L82-cDNA bzw. TonsillencDNA hybridisiert. Die cDNA-Fragmente, die von differentiell transkribierten Genen abstammten, zeigten nur auf

dem, gegen L82-cDNA hybridisierten Filter ein Signal, während die nicht differentiell transkribierten gegen beide Sonden hybridisierten. Die entsprechenden Plaques wurden isoliert und im Northern Blot näher charakterisiert.

Northern Blot Analysen

Zur Bestimmung der Transkription verschiedener Gene wurden von den zu untersuchenden Zelllinien bzw. Geweben gesamt RNA in einem 1%igen Formaldehydgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die von uns isolierten cDNA-Fragmente wurden in einer PCR-Reaktion mit Vektorspezifischen Primer amplifiziert und durch Zugabe von Dig-dUTP gleichzeitig markiert. Diese Sonden wurden für die Hybridisierung der Northern Blots verwendet. Der Nachweis der Dig-markierten DNA an die entsprechende spezifische mRNA

erfolgte über die Bindung von anti-Dig-Antikörper, der mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt war, und unter Zugabe des Farbsubstrates NBT/BCIP.

Ergebnisse

Konstruktion und Screening einer differentiellen cDNA Bank

Aus der mRNA der ALCL Zelllinie L82 wurde durch subtraktive Hybridisierung mit Tonsillen

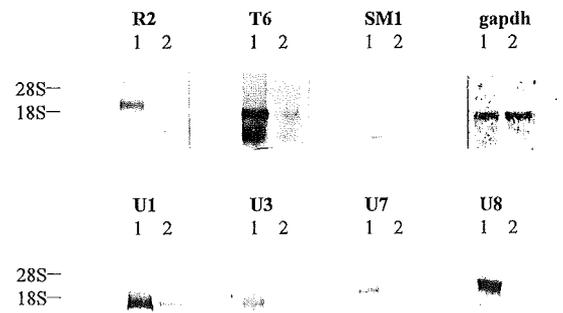


Abb. 2: Northern Blot Analyse differentiell transkribierter Gene. Es wurden jeweils 10µg gesamt RNA aus der ALCL Zelllinie L82 und aus Tonsillengewebe in einem 1%igen Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den entsprechenden, Dig-markierten DNA-Sonden hybridisiert.

Tab. 1: Stark differentiell transkribierte Klone aus der ALCL Zelllinie L82. In der Tabelle sind die Homologien der isolierten cDNA-Fragmente, die aus der ALCL Zelllinie L82 isoliert wurden, aufgelistet. Die Transkriptionsrate wurde in einem DotBlot im Vergleich zwischen gesamt RNA aus Tonsille und L82 bestimmt.

cDNA Klon	Anzahl der Isolate	RNA (kb)	Induktion	Homologie	%	Literatur
R1	1	1.5	2	Insulinoma	95%	6
R2	1	2.0	5	Arg-reiches Prot.	99%	7
R3	1	3.5		CDC2 Homolog	100%	8
				Replikation und Transkription		
T1	2	1.0	3.8	S21	98%	9
T2	1	1.5	4	S12		10
T3	1	1.8	5	SUIL; Translations-Initiation	97%	11
T4	1			P0		12
T5	2	1.6	4	S19	97%	13
T6	1			S2		14
				Metabolismus		
M1	1	1.0	10	Apoferitin	88%	20
M2	7	1.5	4	Dehydrogenase		18
M3	4	0.9	1.5	triple repeat	94%	19
M4	1	1.7	3	Ferritin	100%	21
				Oberflächenmoleküle		
SM1	3	0.5	10	Lektin	97%	15
SM2	1	1.7	4	Laminin Bindung	93%	16
SM3	1	1.8	3	MHCII	97%	17
SM4	2	3.0?	5-10	Tubulin Familie	80%	
				unbekannt		
U1	1	1.8	3	no		
U2	1	3.0	20	no		
U3	1	2.5	4	no		
U4	1	2.0	5	no		
U5	1	1.8	10	no		
U6	1	3.0	2	no		
U7	1	3.0	5	HSORF	99%	22
U8	1	4.0?	40	no		
U9	1	4.0	50	no		

cDNA im Verhältnis 1:20 eine subtrahierte cDNA-Bank konstruiert und in IPhagen verpackt. Der Titer der Bank lag bei 2.7×10^5 pfu (plaque forming unit), von denen 80 % rekombinant waren. Die Insertlängen lagen zwischen 0.5 und 4.0 kb. Kleinere cDNA-Fragmente wurden während der Konstruktion der Bank durch Sephacryl S-400 Säulen entfernt.

Bislang wurden 60.000 Phagen mit der differentiellen Plauehybridisierung untersucht, wobei 68 Klone isoliert wurden, die stärker gegen die L82 cDNA Sonde als gegen die Tonsillen Sonde hybridisierten. Diese Klone wurden nochmals im Plauescreening untersucht.

Identifizierung differentiell transkribierter Gene

39 der bislang 68 isolierten Klone (59 %) zeigten in der Northern Blot Analyse eine differentielle Transkription (Abb. 2). Diese Klone wurden mit

den Vektorprimern T3 bzw. T7 ansequenziert und die erhaltene Sequenz mit der Embl-Datenbank unter Verwendung des FASTA Programms (PC/Gene; Intelligenetics, Mountainview, CA, USA)

Tab. 2: Transkription verschiedener bekannter Gene in unterschiedlichen Lymphomzelllinien und Geweben. In der Tabelle sind die Transkriptionen bekannter Gene in verschiedenen Zelllinien und Geweben aufgelistet. Die Transkriptionen wurden im Northern Blot bestimmt. Repräsentative Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 2 dargestellt.

++ starke Transkription,
+ moderate
+/- schwache
- keine Transkription nachweisbar
n.d. not determined (nicht bestimmt)

	R1	R2	R3	T1	T5	M1	M2	SM1	SM2
ALCL									
L82	++	++	+	++	++	++	++	++	++
Karpas	++	++	+	++	++	++	++	++	++
Del	++	++	++	++	++	++	++	++	++
LCL									
FFH	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Lyk99	++	++	++	+	+	+	+/-	+	+
ML615	++	++	n.d.	++		++	+	+/-	++
HL									
L428	++	+	+/-	-	+	+	-	-	+
L540	++	+	+	-	++	+	-	-	+
Lymphatisches Gewebe									
Tonsill	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
buffy coat	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-

verglichen. Tab 2 faßt die Informationen zusammen, die wir über diese, in der ALCL-Zelllinie L82, differentiell transkribierten Gene erhalten haben. 32 Klone (80 %) zeigten eine fast vollständige Homologie zu bekannten Genen auf, während 7 unbekannt sind. Einige dieser cDNA Klone wurden unabhängig voneinander mehrfach isoliert, so daß die Anzahl der bisher isolierten, differentiell transkribierten Gene auf 25 reduziert wurde. 10 Klone wurden als *full length* Klone isoliert. Die bekannten Gene konnten auf Grund ihrer Funktion in vier Gruppen eingeteilt werden. Drei cDNA-Fragmente gehören zu Genen, die für Proteine kodieren, die bekanntermaßen bzw. möglicherweise in die Interaktion mit DNA involviert sind (R1-R3^(6,7,8)). Sechs Gene kodieren für ribosomale Proteine, die bei der Translation von Bedeutung sind (T1-T6)⁽⁹⁻¹⁴⁾. Die Proteine zweier weiterer Klone gehören zu Zelloberflächenproteinen (SM1, SM2)^(15,16) und spielen möglicherweise für die Tumormetastasierung eine wichtige Rolle. Klon SM4 hybridisiert mit einer ca 4,5Kb großen mRNA und weißt etwa 80 % Homologie zu bekannten Tubulin-Genen auf. Desweiteren ist ein Klon (SM3) 100%ig homolog zum MHCII, der in aktivierten hämatopoetischen und lymphoiden Zellen verstärkt exprimiert wird⁽¹⁷⁾. Zusätzlich konnten wir Gene isolieren, die in den normalen Zellmetabolismus, wie z. B. die NADH-Dehydrogenase (M2)⁽¹⁸⁾ oder ein triple repeat Gen (M3)⁽¹⁹⁾ involviert sind. Zwei weitere Gene dieser Gruppe, gehören zu der Familie der Ferritin-bindenden Proteine (M1,M4)^(20,21), die wichtig für den Eisen-Metabolismus der Zelle sind. Die unbekanntenen Gene wurden in eine fünfte Gruppe plaziert. cDNA Klon U7 ist homolog zu einer nicht veröffentlichten Sequenz, die für einen offenen Leserahmen mit unbekannter Funktion kodiert⁽²²⁾. Alle 25 differentiell transkribierten Gene, die in Tab. 1 aufgelistet wurden, zeigten eine gesteigerte Transkription im Vergleich von L82 zu Tonsille um den Faktor 2-50.

Northern Blot Analysen

Die Northern Blot Analysen für die Gene M1, SM1 und SM4, sowie für die unbekanntenen Gene U3,U5,U7,U8 und U9, haben gezeigt, das diese Gene in der ALCL Zelllinie L82 sehr stark und im Tonsillengewebe nur schwach transkribiert werden. Die anderen bislang untersuchten Klone zeigten dagegen eine nur moderate Übertranskription. Das Haushaltsgen GAPDH wurde dagegen in allen Zellen und Geweben im gleichen Maße transkribiert. Für einige der hoch exprimierten Gene haben wir weitere Northern Blot Analysen durch-

geführt, um deren Transkription in anderen neoplastischen Lymphom- bzw. hämatopoetischen Zelllinien zu untersuchen. Dafür wurde die RNA von zwei weiteren ALCL (Karpas, Del), drei lymphoblastoiden (ML615, Lyk 99, FFH), zwei vom Morbus Hodgkin abgeleitete Zelllinien sowie von der T-Zell Lymphomzelllinie Molt und von der Monomyelozytären Zelllinie HL-60 im Northern Blot untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 2 und 3 dargestellt. In allen ALCL Zelllinien zeigten die untersuchten Gene eine starke Transkription, während diese in den LCLs und HL's schwächer war. Ausnahmen sind hierbei die unbekanntenen Gene U3,U5,U8 sowie R1 und R3, deren Transkription auch in den LCL's stark war. Keine der untersuchten Hodgkin Zelllinien zeigten ein signifikantes SM1- oder SM4-spezifisches Transkript. Die Transkription aller Gene war in den Normalgeweben (Tonsille, Buffy coat) verringert bzw. nicht nachweisbar, während sie in einem geringen Maße in der Zelllinie HL-60 vorkamen. Eine Ausnahme bildete das Gen U2 dessen Transkription nach unseren bisherigen Untersuchungen allein auf die Zelllinien des großzellig anaplastischen Lymphoms beschränkt ist.

Diskussion

Die Konstruktion einer subtrahierten cDNA Bank erlaubt die Identifizierung von differentiell transkribierten cDNA Klonen. Die Effizienz einer solchen Methode allein ist nicht ausreichend, da bei einer einfachen Subtraktion die Anzahl der nicht-differentiellen cDNA-Fragmente maximal um 30 % reduziert wird. Dies kann man durch mehrfache Subtraktion weiter reduzieren, die Anzahl der differentiellen Klone wird jedoch dabei durch Aufreinigerungsverluste ebenfalls verringert. Aus diesem Grunde haben wir uns dafür entschieden, die einfach subtrahierte cDNA-Bank durch differentielles Plaquescreening weiter zu untersuchen. Durch die Kombination dieser beiden Methoden, haben wir bislang 60.000 subtrahierte, rekombinante Phagenklone untersucht, und dabei 68 Klone isolieren können, die stärker mit der L82 cDNA Sonde, als mit der Tonsillen cDNA Sonde hybridisierten. 39 dieser Klone wurden, wie in den Northern Blot Analysen gezeigt, in ALCL Zelllinien sehr stark transkribiert bzw. sind restringiert. Einige dieser Klone wurden mehrfach isoliert, so daß wir 25 unterschiedliche cDNA Fragmente isoliert haben, von denen 18 Klone 89 - 100 % homolog zu bisher veröffentlichten Sequenzen sind, während 7 keine Homologie aufweisen. Ein quantitativer Vergleich zwischen der Transkriptionsstärke der Gene in der ALCL Zelllinie L82 und in Tonsille, zeigte eine

Steigerung um den Faktor 2-50. Auf Grund der möglichen Funktionen der bekannten Gene, haben wir diese in 4 Gruppen unterteilt.

Die erste Gruppe beinhaltet Gene, die möglicherweise in die Transkription und Replikation involviert sind. Eines dieser Gene (R1) ist das humane Insulinoma Gen (HSRIGA), ein wahrscheinlich DNA bindendes Protein (Helix-turn-Helix Motif), das in Insulinoma, Ösophagus- und Dickdarmkrebs aktiviert ist und potentiell an dem onkogenen Wachstum von B-Zellen des Pankreas beteiligt ist⁽²³⁾. Nach unseren Untersuchungen (Tab. 2) ist die Transkription von R1 in einer Reihe von Lymphomzelllinien erhöht, so daß man vermuten kann, das R1 auch hier in die Zellproliferation involviert ist. Das Gen R2 kodiert für ein humanes Argininreiches Nukleäres Protein, das an der Transkription, insbesondere an der pre-mRNA Prozessierung, beteiligt ist⁽⁷⁾. Desweiteren konnten wir das Gen für das CDC2 isolieren, dessen Genprodukt ein Zinkfingerprotein ist und eine wichtige Rolle bei der DNA Replikation spielt. Diese Funktion wird dem Gen auf Grund seiner Homologie zu den *Saccharomyces cerevisiae* Genen MCM3, MCM2, CDC21 und CDC46 zugesprochen, die in der Hefe für die Initiation der DNA Replikation erforderlich sind⁽⁸⁾. Die Stärke der CDC2 Transkription variiert in verschiedenen humanen Geweben, abhängig vom *turnover* der jeweiligen Zelle.

Die zweite funktionelle Gruppe beinhaltet sechs cDNA Moleküle, die für ribosomale Proteine ko-

dieren. Die Ribosomen von Säugern bestehen aus etwa 82 solcher Proteine⁽⁹⁾. Von einigen konnte gezeigt werden, das sie in Tumoren überexprimiert werden^(24,25,26). Es wird vermutet, daß die Expression einiger dieser Gene mit der Tumorprogression korreliert. Die gesteigerte Transkription der Gene T1-T6 in der ALCL Zelllinie L82 könnte daher eine Rolle in der Proliferation bzw. dem Metabolismus dieser Neoplasie spielen und insofern eher ein interessantes Epiphenomen als tumorspezifisch sein.

In der dritten Gruppe sind Gene aufgelistet, deren Genprodukte auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Von diesen wurde bei zwei Proteinen deren Bedeutung als Marker für die Malignität bzw. Metastasierung in der Literatur beschrieben^(15,16). Laminin ist ein Membran-assoziiertes Glycoprotein, das die Migration und Invasion einer Reihe von Tumorzellen fördert⁽²⁷⁾. Die Lamininrezeptor-Liganden-Interaktion ist essentiell für die Metastasierung von Tumoren⁽²⁸⁾. In der ALCL Zelllinie L82 ist die Transkription etwa um den Faktor 4 erhöht.

Desweiteren haben wir ein 14-kDa Lektin isoliert, das hochaffin an Kohlenhydrate bindet und so ebenfalls eine wichtige Rolle in der Zell/Zell bzw. Zell/Matrix Erkennung spielt. Obwohl dessen Funktion noch nicht in allen Einzelheiten geklärt ist, haben Raz und Mitarbeiter⁽²⁹⁾ zeigen können, daß die Menge an exprimiertem Lektin mit dem metastasierenden Potential der Zelle korreliert. Das Lektin bindet spezifisch an den Poly-N-Acetyllactosamin-Rest murinen Laminins und könnte

so potentiell durch Modulierung der Interaktion Krebszelle/Laminin eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung spielen⁽³⁰⁾.

Als weiteres auf der Zelloberfläche exprimiertes Gen haben wir ein cDNA-Fragment isoliert, das zur MHCII-Familie gehört. Dessen Expression ist in aktivierten/neoplastischen T-Zellen und anderen Antigen präsentierenden Zellen induziert.

	U1	U2	U3	U4	U5	U7	U8	U9	SM4
ALCL									
L82	++	++	++	++	++	++	++	++	+
Karpas	++	++	++	++	++	++	++	++	+
Del	++	++	++	++	++	++	++	++	+
LCL									
FFH	+	-	++	+	++	++	++	++	+
Lyk99	+	-	++	+	++	++	++	++	+
ML615	+	-		+	++	++	++	++	+
HL									
L428	+/-	-	++	+	n.d.	++	+/-	+	-
L540	+/-	-	++	+	n.d.	++	+/-	+	-
Carcinom									
A431	+	-	++	+	++	+	-	+	+
A496	+	-	++	+	++	+	-	+	+
5367	+++	-	++	++	+	++	+	+	++
Colo	++	-	++	++	++	++	++	++	+++
Lymph. Gewebe									
Tonsille	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-
buffy coat	-	-	+/-		-	+	+	-	-
HL60	-	-	+/-	-	+	+	+/-	+	++
Molt	-	-	+/-	+/-	+	+	-	+	+

Tab. 3: Transkription unbekannter Gene in verschiedenen Zelllinien und Geweben. In der Tabelle sind die Transkriptionen unbekannter Gene in verschiedenen Zelllinien und Geweben aufgelistet.

++	starke Transkription
+	moderate
+/-	schwache
-	keine Transkription nachweisbar
n.d.	not determined (nicht bestimmt)

Das vierte Gen dieser Gruppe zeigt eine 80%ige Homologie zu einem B-Tubulin Gen. Tubulin ist die Hauptkomponente von Mikrotubuli, einem wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts, wie z. B. den Zentriolen, der Mitosespindel und den Cilien. Tubulinmoleküle sind an wichtigen Zellereignissen wie Meiosis, Mitose, Bewegung, Organellenorganisation und Sekretion beteiligt.

Die vierte Gruppe charakterisiert Gene, die an dem normalen Zellmetabolismus beteiligt sind. Deren Transkription scheint unabhängig von neoplastischen Veränderungen in allen proliferierenden Zellen gesteigert zu sein. Zu diesen Genen gehören Eisen-speichernde Proteine, eine Dehydrogenase und ein triple repeat Gen mit unbekannter Funktion.

Die Verwendung einer subtrahierten Hybridisierung erlaubt damit die Identifizierung von Genen, die in unterschiedlichem Maße in einer Zelle übertranskribiert werden. Dazu gehören u. a. Gene die für DNA-bindende Proteine kodieren, für ribosomale Proteine oder für Proteine des Zellstoffwechsel oder die Zell/Zell-Interaktion. Die Tatsache, daß wir in der Lage waren, ein Kontingent an Genen zu isolieren, die den genannten Funktionen entsprechen, unterstreicht die erfolgreiche Strategie unserer Kombination aus subtrahierter cDNA-Bank Konstruktion und differentiellem Plaquescreening.

Zusätzlich zu den bekannten Genen konnten wir 7 cDNA-Fragmente isolieren, die keine Homologie zu schon veröffentlichten Genen aufweisen bzw. deren Funktion vollkommen unbekannt ist (U7). Die Transkription einiger dieser Gene (U2,U8, U9) in der Zelllinie L82 ist bis zu 50fach stärker als in der Tonsille.

Wir haben die Transkription einiger der bekannten und unbekannt, hochtranskribierten Gene in anderen ALCL-, EBV-infizierten Lymphoblastoiden-, Hodgkin- und anderen lymphoiden Zelllinien untersucht. Einige der Klone (R1, T5, U3, U5, U7) wurden in den meisten Lymphomzelllinien stark transkribiert (Tab. 2 und 3). Daraus könnte man schließen, daß diese Gene möglicherweise in den Zellmetabolismus oder in die Regulation des Zellzyklus involviert sind und nicht Lymphom-spezifisch angeschaltet werden. Die Gene U9 und U4 werden am stärksten in den ALCL Zelllinien transkribiert, während die Transkription in den anderen Lymphomzelllinien nur moderat ist. Diese Klone spielen eventuell eine Rolle in der Pathogenese dieser spezifischen Lymphomentität und könnten somit diagnostisch verwertbar sein. Desweiteren zeigen einige Gene eine differentielle Transkripti-

on im Vergleich ALCL/Hodgkin (SM4, SM1, U8). Weitere Experimente werden diesen bedeutsamen Aspekt klären. Das Gen U2 zeigte nach unseren bisherigen Untersuchungen eine restringierte Transkription in den ALCL-Zelllinien. Damit kommt diesem Gen eine möglicherweise ALCL-spezifische Bedeutung zu, die Einblicke in die Pathogenese dieses Lymphom geben könnte und unter Umständen diagnostisch verwertbar ist.

In der Literatur finden sich bisher nur einzelne Arbeiten, die sich mit der differentiellen Expression von Genen im großzellig-anaplastischen Lymphomen beschäftigen. 1992 konnten Delabie und Mitarbeiter zeigen, daß das Filament-assoziierte Protein Restin (Reed-Sternberg cell intermediate filament-associated protein), das nicht im normalen Gewebe vorkommt, in Sternberg-Reed-Zellen und in großzellig-anaplastischen Lymphomen hoch exprimiert wird⁽¹⁾. Vom Restin wird angenommen, daß es eine Rolle bei der Leukozytenaktivierung spielt.

Im Gegensatz zur Expression des CD30-Antigens konnten Merz und Mitarbeiter⁽³⁾ zeigen, daß die Expression von Interleukin-9 auf den Morbus Hodgkin und das großzellig-anaplastische Lymphom beschränkt ist. Diese Assoziation legt nahe, daß Interleukin-9 eine entscheidene Rolle in der Pathogenese des Morbus Hodgkin und des großzellig-anaplastischen Lymphoms spielt und hier möglicherweise als autokriner Wachstumsfaktor involviert ist.

Bislang wurde nur eine immunhistochemische Analyse eines b-Galaktose-bindenden Lektin, Galektin-3, veröffentlicht, dessen Expression auf die K1⁺ALCL beschränkt ist⁽³¹⁾. Galektin-3 wird in geringem Maße auch in normalen Lymphozyten exprimiert und wird in HTLV-I infizierten T-Zellen heraufreguliert⁽³²⁾.

Mit unseren bisherigen Untersuchungen haben wir die Möglichkeit geschaffen, weitere ALCL-spezifische Gene zu isolieren und die bislang gefundenen auf ihre Bedeutung für die Pathogenese und Diagnostik dieser besonderen Lymphomentität hin zu untersuchen.

Literatur

1. Delabie J, Shipman R, Brügggen J, de Strooper B, van Leuven F, Tarcsay L, Cerletti N, Odink K, Diehl V, Bilbe G, de Wolf-Peeters C. Expression of the Novel Intermediate Filament-Associated Protein Restin in Hodgkin's Disease and Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *Blood*. 80, 2891-2896, 1992
2. van Snick J, Goethals A, Renauld JC, van Roost E, Uyttenhove C, Rubira MR, Moritz RL, Simpson RJ. Cloning and

- characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40). *J Exp Med.* 169, 363-371, 1989
3. Merz H, Horssiau FA, Orscheschek K, Renaud JC, Fliedner A, Herin M, Noel H, Kadin M, Müller-Hermenlink HK, van Snick J, Feller AC. Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. *Blood.* 78, 1311-1317, 1991
 4. Chomeczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-159, 1987
 5. Lambert KN, Williamson VM. cDNA library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads and PCR. *Nucl Acids Res.* 775-777, 1993
 6. Shiga K, Yamamoto H, Okamoto H. Isolation and characterization of the human homologue of *rig* and its pseudogene: The functional gene has features characteristic of housekeeping genes. *Proc Natl Acad Sci.* 87, 3594-3598, 1990
 7. Chaudhary N, McMahon C, Blobel G. Primary structure of a human arginine-rich nuclear protein that colocalizes with spliceosome components. *Proc Natl Acad Sci.* 88, 8189-8193, 1991
 8. Nakatsuru S, Sudo K, Nakamura Y. Isolation and mapping of a human gene (MCM2) encoding a product homologous to yeast proteins involved in DNA replication. *Cytogenet Cell Genet.* 68, 226-230, 1995
 9. Bhat KS, Morrison SG. Primary structure of human ribosomal protein S21. *Nucl Acids Res.* 21, 2939, 1993
 10. Héroult Y, Michel D, Chatelain G, Brun G. cDNA and predicted amino acid sequences of the human ribosomal proteins *e n e s rpS12* and *rpL17*. *Nucl Acids Res.* 19, 4001, 1991
 11. Fields C, Adams MD. Expressed sequence tags identify a human isoform of the translation initiation factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 198, 288-291, 1994
 12. Rich BE, Steitz JA. Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1 and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis and assembly. *Mol Cell Biol.* 7, 4065-4074, 1987
 13. Kondoh, Schweinfest CW, Henderson KW, Papas TS. Differential expression of S19 ribosomal protein, laminin-binding protein, and human lymphocyte antigen class I messenger RNAs associated with colon carcinoma progression and differentiation. *Cancer Res.* 52, 791-796, 1992
 14. Slynn G, Jenner D, Potts W, Elvin P, Morten, JEN, Markham AF. Human cDNA sequence homologous to the mouse LLRep3 gene family. *Nucl Acids Res.* 18, 681, 1989
 15. von den Ouweland AM, van Duijnhoven HL, Deichmann KA, van Groningen JJ, de Leij L, van de Ven WJ. Characteristics of a multicopy gene family predominantly consisting of processed pseudogenes. *Nucl Acids Res.* 17, 3829-3843, 1989
 16. Couraud PO, Casentini-Borocz D, Bringman TS, Griffith J, McGrogan M, Nedwin GE. Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14-kDa lectin. *J Biol Chem.* 264, 1310-1316, 1989
 17. Meyer CG, May J, Spanke D, Schnittger L. DPA1*02012: A DPA1*0201 related MHC class II allele in West Africa. *Immunogen.* 40, 309, 1994
 18. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290, 457, 1981
 19. Li SH, McInnis MG, Margolis RL, Antonanakis SE, Ross CA. Novel triplet repeat containing genes in human brain: cloning, expression and length polymorphisms. *Genomics.* 16, 572-579, 1993
 20. Hentze MW, Keim S, Papadopoulos P, O'Brien S, Modi W, Drysdale J, Leonard WJ, Harford JB, Klausner RD. Cloning, characterization, expression, and chromosomal localization of a human ferritin heavy-chain gene. *Proc Natl Acad Sci.* 83, 7226-7230, 1986
 21. Boyd D, Vecoli C, Belcher DM, Swatantra KJ, Drysdale JW. Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *J Biol Chem.* 260, 11755, 1985
 22. Nomura N, Miyajima N, Kawarabayashi Y, Tabata S. Prediction of new human genes by entire sequencing of randomly sampled cDNA clones. Unpublished
 23. Inoue C, Shiga K, Takasawa S, Kitagawa M, Yamamoto H. Evolutionary conservation of the insulinoma gene *rig* and its possible function. *Proc Natl Acad Sci.* 84, 6659-6662, 1987
 24. Sharp MGE, Adams SM, Elvin P, Walker RA, Brammar WJ, Varley JMA. A sequence previously identified as metastasis-related encodes an acidic ribosomal phosphoprotein P2. *Br J Cancer.* 61, 83-88, 1990
 25. Chester KA, Robson L, Begent RHJ, Talbot IC, Pringle JH, Primrose L, MacPherson AJS, Boxer G, Skouthall P, Malcolm ADB. Identification of a human ribosomal protein mRNA with increased expression in colorectal tumors. *Biochem Biophys Acta.* 1009, 297-300, 1989
 26. Pogue-Geile K, Geiser JR, Shu M, Miller C, Wool IR, Meisler AI, Pipas JM. Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein. *Mol Cell Biol.* 11, 3842-3849, 1991
 27. Bresalier RS, Schwartz B, Kim YS, Duh QY, Kleinman HK, Sullam PM. The laminin alpha 1 chain Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV)-containing peptide promotes liver colonization by human colon cancer cells. *Cancer Res.* 55, 2476-2480, 1995
 28. Iwamoto Y, Robey FA, Graf J, Sasaki M, Kleinman HK, Yamada Y, Martin GR. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science.* 238, 1132-1134, 1987
 29. Raz A, Meromsky L, Lotan R. Differential expression of endogenous lectins on the surface of nontumorigenic, tumorigenic, and metastatic cells. *Cancer Res.* 46, 3667-3672, 1986
 30. Castronovo V, Luyten F, van den Brûle F, Sobel ME. Identification of a 14-kDa Laminin binding protein (HLBP 14) in human melanoma cells that is identical to the 14-kDa galactoside binding lectin. *Arch Biochem Biophys.* 297, 132-138, 1992
 31. Konstantinov KN, Robbins BA, Liu FT. Galectin-3, a β -galactoside-binding animal lectin, is a marker of anaplastic large-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 148, 25-30, 1996
 32. Hsu DK, Hammers SR, Kuwabara J, Greene WC, Liu FT. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the β -galactoside-binding lectin galectin-3. *Am J Pathol.* 148, 1771-70, 1996

Wechselwirkungen zwischen dem Tumorsuppressor p53 und dem Rekombinationsprotein Rad51

S. Buchhop¹, St. Miska¹, B. Nebe², H. Pommerenke², J. Rychly² und H.-W. Stürzbecher^{*1}

Zusammenfassung

Der Tumorsuppressor p53 verhindert durch Anhalten des Zellwachstums die Entstehung von Tumoren nach DNA Schädigungen, so daß die Läsionen repariert werden können, bevor sie an Tochterzellen weitergegeben werden oder es leitet die Eliminierung geschädigter Zellen durch programmierten Zelltod ein. Mutationen im p53 Gen werden in über 50 % aller Tumoren des Menschen gefunden. Betroffene Zellen können nicht mehr adäquat auf Stresssituationen reagieren. Dies führt unausweichlich zur Anhäufung von Veränderungen im Erbgut und letztlich zur Entstehung von Tumoren. Die auftretenden chromosomalen Läsionen beruhen zum Teil auf Mechanismen, die rekombinatorische Prozesse beinhalten. In einer kürzlichen Veröffentlichung konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, daß p53 mit dem Rad51 Protein interagiert und *in vitro* biochemische Aktivitäten des Rad51/RecA Proteins wie den DNA-Strang austausch und die Einzelstrang-DNA (ssDNA) abhängige ATPase-Aktivität hemmt. Rad51 gehört zu einer von Bakterien bis zum Menschen konservierten Familie von Proteinen, die eine zentrale Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie der mitotischen und meiotischen Rekombination spielt. Immunzytochemische Untersuchungen an humanen diploiden Fibroblasten und Krebszelllinien mit definiertem genetischen Status für p53 zeigen, daß DNA Schädigung durch γ -Bestrahlung eine Umverteilung des Rad51 Proteins im Zellkern induziert. Bereits 3h nach Bestrahlung akkumuliert das sonst homogen dispers im Kern verteilte Rad51 in einer Reihe diskreter nukleärer Foci. Diese Umverteilung korreliert mit dem genetischen p53 Status der Zellen; sie findet nur in Wildtyp p53 exprimierenden Zellen nicht aber in p53 defizienten oder in Zellen, die mutiertes p53 exprimieren, statt.

Diese Befunde liefern Hinweise darauf, daß p53 durch die Wechselwirkung mit Rad51 eine ent-

scheidende Funktion in der Regulation rekombinatorischer Prozesse ausübt. Durch DNA-Schädigung ausgelöste Signale könnten von p53 registriert und integriert werden, so daß die Zelle in der Lage ist, adäquate Reparaturmechanismen zu selektieren sowie Ausmaß und Zeitpunkt Rad51 abhängiger Prozesse zu kontrollieren. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß die Bewahrung der genomischen Integrität auch in Abwesenheit von DNA-Läsionen eine generelle Funktion von p53 und Rad51 ist.

Summary

The tumor suppressor p53 prevents tumour formation after DNA damage by halting cell cycle progression to allow DNA repair or by inducing apoptotic cell death. Loss of wild-type p53 function renders cells resistant to DNA damage-induced cell cycle arrest and ultimately leads to genomic instabilities some of which are based on mechanisms that involve recombinational events. In a recent report we demonstrated that p53 physically interacts with the Rad51 protein which is a homologue of the bacterial RecA protein and is involved in mitotic and meiotic recombination and in repair of double-strand breaks of DNA. *In vitro*, p53 modulates functional activities of RecA protein. The current immunocytological and biochemical study on human diploid fibroblasts and cancer cell lines with defined p53 genetic backgrounds shows that DNA damage induced by γ -irradiation renders the distribution of Rad51 protein in the cell nucleus from a homogeneously dispersed form to a distinct focus-like staining pattern as early as 3h after irradiation treatment. Rad51 redistribution appears strictly correlated with the p53 status of the cells in that it occurs only in wild-type p53 expressing cells, but only marginally in mutant p53 cells.

The appearance of Rad51 foci after DNA damage in correlation to the p53 status of the cells suggests an intimate link between the regulation of Rad51 functions in DNA repair and recombination and the p53 dependent DNA damage response pathway. Thus, functional wildtype p53 may select

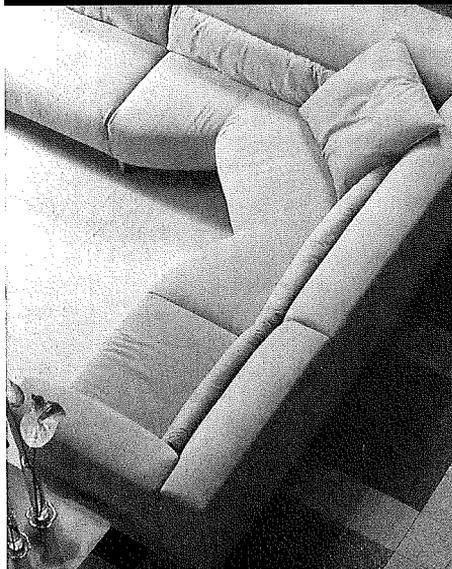
* korrespondierender Autor

the appropriate pathway for DNA repair and, as a direct consequence, control the extent and timing Rad51 dependent processes.

Einleitung

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in Industrieländern. Der Begriff „Krebs“ beschreibt jedoch nicht ein einziges definiertes Krankheitsbild, sondern wird als Sammelbegriff für eine Palette von Erkrankungen mit verschiedenen Ursachen verwendet. Für alle Tumorerkrankungen gilt aber, daß sie aufgrund genetischer Veränderungen und Defekten im Erbgut entstanden sind. In vielen Tumorzellen sind daher spezifische Chromosomenveränderungen wie Deletionen, Translokationen, Inversionen und Amplifikationen zu beobachten. Das Zellwachstum eines komplexen Organismus wie dem des Menschen unterliegt einer sensibel regulierten Kontrolle. Teilung, Differenzierung und Tod der Zellen müssen räumlich und zeitlich gesteuert und kontrolliert werden, damit ein funktionsfähiger Organismus entstehen und sich erhalten kann. Auf molekularer Ebene besteht eine ausgewogene Balance in der Expression Wachstum stimulierender Faktoren (Proto-Onkogene) und negativer Regulatoren des Zellwachstums, den Tumorsuppressoren. Mutationen in diesen Kontrollgenen können zur deregulierten Zellteilung und somit letztlich zur Tumorgenese führen (Levine, 1993, Nowell, 1989). Obwohl viele bösartige Tumoren den betroffenen Organismus töten, ist der Körper der Entstehung von Tumorzellen nicht schutzlos ausgeliefert. Er verfügt über Verteidigungssysteme, die Veränderungen im Erbgut jeder einzelnen Zelle detektieren und entweder dafür sorgen, daß die Schäden repariert oder aber betroffene Zellen durch programmierten Zelltod eliminiert werden. Ein prominentes Beispiel hierfür ist der „Wächter des Genoms“, der Tumorsuppressor p53. Mutationen im p53 Gen gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen während der Tumorgenese und werden in mehr als 50 % aller menschlichen Tumore gefunden (Harris und Hollstein, 1993; Vogelstein und Kinzler, 1992). Wenn Zellen mit intaktem p53 Stresssituationen wie Hypoxie, Nukleotiddepletion, Mangel an Wachstumsfaktoren oder dem Einfluß genotoxischer Agenzien ausgesetzt sind, steigt der Gehalt an p53 Protein drastisch an. p53 bewirkt entweder einen Wachstumsarrest, um die Reparatur der geschädigten DNA zu ermöglichen, oder es induziert den kontrollierten Zelltod durch Apoptose. Zellen ohne funktionsfähiges p53 werden nach DNA-Schädigung weder durch Apoptose eliminiert noch wird die Weitergabe des geschädigten Erbguts an die

Cassina met



Wenn eigene, unverwechselbare Sitzkompositionen den Raum prägen sollen, bietet „Cassina met“ jede Freiheit zu kombinieren. Die Sofa- und Polster Elemente sind so flexibel, daß sie überall ihren Platz finden und auch behaupten - komfortabel, elegant und zeitlos. Jetzt bei uns aus Italien eingetroffen.

MOBEL REESE

DAS LÜBECKER EINRICHTUNGSHAUS
Töpferweg 20-22 • Lübeck • Tel.: 0451/ 830 44

Parkplätze vor der Tür.

HABN • BÜTTNER & HAHN

nächste Generation verhindert (Lane, 1992). Chromosomale Instabilitäten (Tlsty et al., 1993), Allel-Verlust (Kinzler und Vogelstein, 1994) und Gen-Amplifikationen (Livingstone et al., 1992) treten daher in einem breiten Spektrum von Tumoren mit defekter p53-Antwort auf. Neuen Befunden zufolge könnte einer der Mechanismen, durch welche p53 die genomische Integrität aufrechterhält, der physische Kontakt mit dem Schlüsselfaktor der homologen Rekombination und DNA Reparatur, dem Rad51 Protein, sein (Stürzbecher et al., 1996). Die molekularen Mechanismen der Rekombination und DNA Reparatur sind intensiv an Bakterien und niederen Eukaryonten untersucht worden. Das Rad51 Protein aus der Hefe *S. cerevisiae* spielt wie sein Homolog aus dem Bakterium *E. coli*, RecA, eine bedeutende Rolle bei der Reparatur von durch ionisierende Strahlung und andere DNA schädigende Agenzien entstandene DNA Läsionen sowie bei der meiotischen und mitotischen Rekombination. Rad51 verwandte Proteine aus höheren Eukaryonten scheinen darüber hinaus auch für weitere physiologische Prozessen wichtig zu sein, da i) Rad51 essentiell für die Lebensfähigkeit von Säugerzellen ist, ii) Rad51 während der prämeiotischen S-Phase von Spermatozyten und Oozyten der Maus assoziiert mit einem Teil des Chromatins vorliegt; und iii) Rad51 während der S-Phase stimulierter Lymphozyten in definierten fokalen Bereichen des Zellkerns lokalisiert ist. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß Rad51 eine funktionelle Rolle für bestimmte Schritte der fundamentalen zellulären Homeostase wie DNA Replikation und/oder Regulation der Zellproliferation spielt. Aus diesen Überlegungen heraus haben wir uns entschlossen, die funktionelle Verbindung zwischen der p53 abhängigen Reaktion der Zelle auf DNA Schädigung und Rad51 in Zellen mit definiertem genetischen Hintergrund für p53 zu untersuchen.

Material und Methoden

Sera und monoklonale Antikörper

Die Hybridomzelllinien PAb122 (Gurney et al., 1980) und PAb421 (Harlow et al., 1981) wurden von D.P. Lane zur Verfügung gestellt. Der Antikörper Do1 wurde von Calbiochem erworben. Die polyklonalen und monoklonalen anti Rad51 Antikörper wurden gegen gereinigtes humanes Rad51 Protein hergestellt (Buchhop et al., 1996).

Radioaktive Markierung zellulärer Proteine

Für metabolische Markierungen mit [³⁵S]Methionin-Cystein (Tran[³⁵S]Label, ICN) wur-

den subkonfluent gewachsene, adhärenente Zellen einmal mit Markierungsmedium ohne Methionin und Cystein gewaschen und 30 min bei 37° C in Markierungsmedium ausgehungert. Für die Markierung wurden je nach Fragestellung 50-500 µCi Tran[³⁵S]Label (ICN; spez. Akt. 1200 Ci/mmol) zugegeben und die Zellen 30 min bis 2 h bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit 0,5 ml EBC Puffer (50mM Tris-HCl, pH 8,0; 120mM NaCl; 0,5% NP-40; 10µg/ml Aprotinin und PMSF) überschichtet und 15 min lysiert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation (4° C; 15 min; 14.000 rpm) geklärt. Für die Immunpräzipitation wurden Zellextrakte mit einem gleichen Volumen NET-N Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 % NP-40) versetzt, der den entsprechenden Antikörper enthielt und 1 h bei 4° C geschüttelt. Anschließend wurden 20 µl gewaschene, mit 5 % BSA equilibrierte Protein-A Sepharose hinzugefügt und für weitere 30 min bei 4° C inkubiert. Die Immunkomplexe wurden fünfmal mit NET-N gewaschen. Die Elution der Immunkomplexe erfolgte durch Zugabe von SDS Proben-Puffer. Die Proben wurden anschließend durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Fluorographie analysiert.

Partielle Proteolyse mit Staphylococcus aureus V8-Protease

Die Proteine wurden zunächst in einem 11,5 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Das unfixierte Gel wurde sofort auf Whatman-Filterpapier getrocknet und über Nacht bei Raumtemperatur exponiert. Die zu analysierenden Proteinbanden wurden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und für 10 min in Rehydrierungspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1 mM EDTA; 0,1 % SDS; 1 mM 2-Mercaptoethanol; 30 % Glycerin; 0,001 % Bromphenolblau) gequollen. Die gequollenen Gelstreifen wurden danach in die Geltaschen eines 15 % PAA-Gels plaziert und mit 10 µl Rehydrierungspuffer überschichtet. Anschließend wurde die gewünschte Menge an V8-Protease (25-50 ng) in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 18 mA begonnen. Zum Start der Verdauungsreaktion wurde die Elektrophorese kurz vor Eintritt der Proben in das Trenngel für 30 min gestoppt. Die Auftrennung der proteolytisch gespaltenen Fragmente erfolgte bei 25 mA.

Western Blot

Die Proteine wurden im SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und in einer „semi dry“ Blot-Apparatur auf PVDF-Membran (BioRad, München) übertragen. Der Transfer fand 1 h bei

0,8 mA pro cm² Gelfläche statt. Die freien Bindungsstellen der Membran wurden mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T (20 mM Tris-HCL, pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,1 % Tween-20) abgesättigt. Nach dem Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in TBS-T/1 % Magermilch für 40 min. Die Membran wurde gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppeltem Spezies spezifischem Zweitantikörper 40 min inkubiert. Nach weiterem Waschen in TBS wurde der Filter 1 min in Detektionsreagenz (ECL, Amersham) gelegt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

Für DNA-Bindungsstudien wurden entweder rekombinant hergestellte Proteine aus Baculoviren oder *in vitro* translatierte Proteine (TnT, Promega, Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Zur Kontrolle der Proteinsynthese bei *in vitro* Translationen wurde ein Aliquot jedes Ansatzes mit ³⁵S markiert und mittels SDS-PAGE analysiert (nicht gezeigt). Zur Verstärkung und Verifikation der spezifischen DNA-Bindung von p53 wurde der monoklonale Antikörper Pab421 eingesetzt (Hupp et al., 1995). 1-3 µl des unmarkierten *in vitro* Translationsansatzes oder der gereinigten rekombinanten Proteine wurden mit 1 µl 5'-endmarkiertem doppelsträngigem Oligonukleotid (5'-CAAACGCGT A G C C A G G C A T G C C T A G G - CATGCCTTCGCGACAGGTCC-3') in Gegenwart von 2 µg poly-dI:dC in Protein-Bindpuffer (20 % Glycerin; 40 mM Hepes, pH 8,0; 50 mM KCl; 1 mg/ml BSA; 0,1 % Triton X-100; 50 µM EDTA 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT) 15 min bei Raumtemperatur bzw. bei 30° C inkubiert und dann direkt auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel geladen (4 % Acrylamid : Bisacrylamid 30:1, 0,3 x TBE, 0,1 % Triton X-100). Die Gelelektrophorese wurde mit 200 V bei 4° C in 0,3 x TBE mit 0,1 % Triton X-100 durchgeführt. Das Gel wurde fixiert (10 % Essigsäure/5 % Glycerin/40 % Ethanol) und getrocknet. Die quantitative Auswertung wurde mit einem Bas 2000 Phosphor Imager (Raytest, Essen) durchgeführt.

Immunfluoreszenz-Färbung

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und 1-2 Tage kultiviert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit 3 % Formaldehyd/PBS fixiert (5 min/37° C). Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-100/PBS permeabilisiert (5 min/37° C) und nochmals mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolg-

te für 30 min bei 37° C. Nach dreimaligem Waschen wurden die Präparate mit DTAF- oder Texas-Red-konjugierten Spezies spezifischen Zweitantikörpern (Sigma, München) für 30 min bei 37° C inkubiert und mit PBS gewaschen und die Präparate in Mowiol eingebettet.

Ergebnisse

Viele Funktionen des Tumorsuppressors p53 werden durch die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt. Sowohl die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen durch rekombinatorische Prozesse als auch die mitotische und meiotische Rekombination werden durch multifaktorielle Proteinkomplexe katalysiert. Die biologische Funktion von Rekombinationsfaktoren könnte somit durch Interaktion mit p53 moduliert werden. Es wurde daher untersucht, ob p53 *in vivo* mit dem Rekombinationsprotein Rad51 Proteinkomplexe ausbildet. Diese Studien wurden an der menschlichen Hepatom-Zelllinie HepG2 (Aden et al., 1979) durchgeführt, da durch genetische Analysen sichergestellt ist, daß diese Zellen Wildtyp p53 exprimieren. Die Proteine von HepG2 Zellen wurden mit [³⁵S]Methionin radioaktiv markiert und p53 (Abb. 1, links, Spur a) oder Rad51 (Abb. 1, links, Spur b) mit spezifischen monoklonalen Anti-

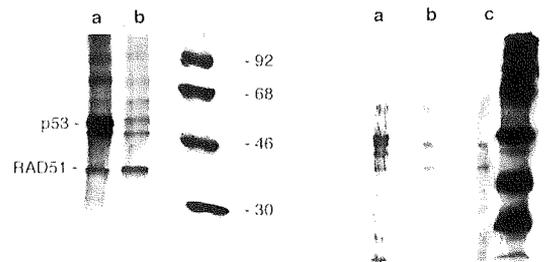


Abbildung 1: Komplexbildung zwischen p53 und Rad51 in HepG2 Zellen, [³⁵S]Methionin markierte HepG2 Zellsate wurden mit dem monoklonalen p53 Antikörper Do1 und monoklonalen Rad51 Antikörpern (5D10, 9D1) immunpräzipitiert und in der SDS-PAGE analysiert (linke Abbildung). Die Rad51 Proteinbanden wurden ausgeschnitten und zusammen mit der V8-Protease auf ein SDS-PAA Gel (15 %) geladen. Nach dem Verdau der Proteine an der Grenze von Sammel- und Trenngel, erfolgte die Analyse durch Trennung der Spaltprodukte im Trenngel und Fluorographie (rechte Abbildung). Links a : copräzipitiertes Rad51 aus anti-p53 Immunkomplexen (Do1); b : Rad51 aus anti-Rad51 Immunkomplexen ; Rechts V8-Proteolyse Muster a : authentisches Rad51; b und c : copräzipitiertes Rad51 aus anti-p53 Immunkomplexen (Do1).

körpern immungefällt und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dargestellt. In Spur a ist deutlich ein Proteinsignal mit einem Molekulargewicht von 38 kDa zu erkennen. Dieses Signal entspricht dem Rad51 Protein, das in den Zellen im Komplex mit p53 vorliegt und hier in den Immunkomplexen aufgrund seiner Interaktion mit p53 nachgewiesen wird. Spur b zeigt das entsprechende Ergebnis für p53. Hier wurde mit einem Antikörper gegen Rad51 immungefällt. Die Immunkomplexe enthalten sowohl Rad51 als auch das komplexierte p53. Dieses Ergebnis zeigt also, daß in lebenden Zellen Komplexe zwischen p53 und Rad51 ausgebildet werden.

Um die Authentizität von Rad51 in anti-p53 Immunkomplexen zu verifizieren, wurde das proteolytische Spaltungsmuster nach Verdau mit der V8-Protease aus *Staphylococcus aureus* von Rad51 aus Anti-Rad51 Immunkomplexen mit dem von Rad51 aus anti-p53 Immunkomplexen verglichen. Dazu wurden [³⁵S]Methionin markierte HepG2 Zellysate mit dem anti-Rad51 Serum sowie mit dem p53 Antikörper Do1 immunpräzipitiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die korrespondierenden Rad51 Banden wurden ausgeschnitten, mit V8-Protease (Boehringer Mannheim) verdaut und die Spaltprodukte mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Spaltungsmuster aus anti-Rad51 Präzipitaten entspricht dem von Do1 copräzipitiertem Rad51.

Diese Ergebnisse verifizieren die Identität von Rad51 in anti-p53 Immunkomplexen und somit die spezifische Bindung von p53 und Rad51 *in vivo*. Weitere Untersuchungen ergaben, daß die Bindung von Rad51 an p53 abhängig von der p53 Wildtyp-Konformation ist (Stürzbecher et al., 1996). Die an der Bindung beteiligten Regionen der beiden Proteine beinhalten wichtige biologische Funktionen: die zentrale Domäne von p53, die Sequenz spezifisch DNA bindet, sowie die Oligomerisierungsdomäne von Rad51, die für die Nukleoproteinfilamentbildung und die DNA Strangaustauschreaktion benötigt werden (Buchhop et al., 1997). Die Interaktion der Proteine könnte daher biochemische Aktivitäten beider Proteine beeinflussen. In früheren Analysen konnten wir bereits diese Frage näher untersuchen. Es wurden RecA/Rad51 katalysierte Reaktionen wie der Austausch komplementärer DNA Stränge sowie die Einzelstrang DNA (ssDNA) abhängige ATPase Aktivität in Gegenwart von p53 analysiert. Die Ergebnisse demonstrieren, daß p53 sowohl die DNA Strangaustausch-Reaktion als auch die ATPase Aktivität spezifisch inhibiert (Stürzbecher et al., 1996).

p53 bindet spezifisch an DNA mit einer bestimmten Folge von Basen (Selivanova und Wiman,

1995). Die p53 Bindesequenz wird in den regulatorischen Einheiten (Promotoren) bestimmter Gene gefunden. Bindung von p53 an diese Sequenz bewirkt eine Aktivierung der Expression dieser Gene. Die Interaktion mit Rad51 könnte also die Bindung von p53 an seine Konsensus-Sequenz modulieren und so die Funktion von p53 als Transak-

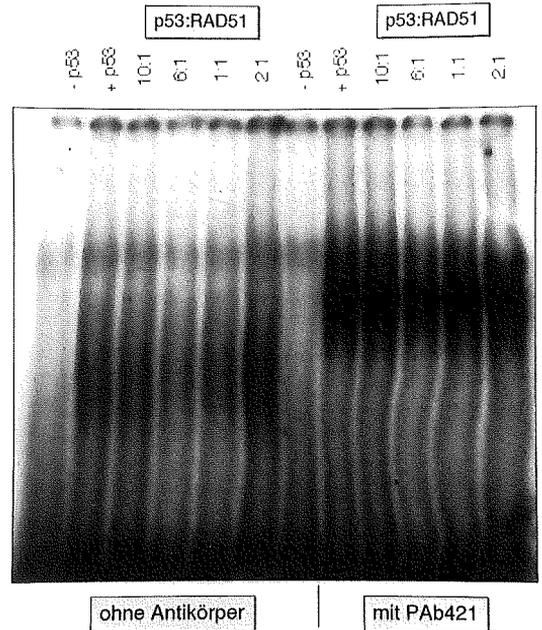


Abbildung 2: Einfluß von Rad51 auf die spezifische DNA-Bindung von p53

Gleiche Mengen von *in vitro* translatiertem p53 wurden mit steigenden Mengen Rad51 versetzt. Quantitative Unterschiede in der Signalstärke sind nicht nachweisbar. Als Negativkontrolle (-p53) wurde ein *in vitro* Translationsansatz ohne Matrizen-DNA eingesetzt. Der monoklonale Antikörper PAb421 aktiviert die spezifische DNA-Bindung von p53 und verifiziert gleichzeitig die Anwesenheit von p53 in den retardierten Banden.

tivator beeinflussen. Diese Hypothese wurde mittels „Electrophoresis Mobility Shift Assays“ (EMSA) *in vitro* geprüft. Hierzu wurden gereinigte oder *in vitro* translatierte Proteine mit der entsprechenden radioaktiv markierten DNA Sequenz inkubiert und die entstandenen Komplexe aus Protein und DNA durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Änderung des Laufverhaltens der Komplexe gegenüber der nicht gebundenen DNA nachgewiesen. Es wurde sowohl überprüft, ob Rad51 die DNA Bindung von baculoviral exprimiertem und gereinigtem p53 oder *in statu nascenti*

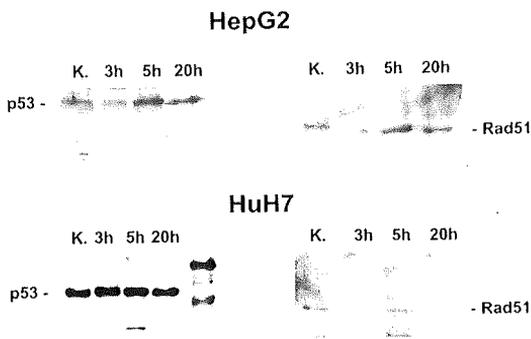


Abbildung 3: Western Blot Analyse zur Detektion des p53 und Rad51 Proteingehalts zu verschiedenen Zeiten nach γ -Bestrahlung. HepG2 und HuH7 Zellen wurden mit einer Energiedosis von 5 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung lysiert. 20 μ g Protein wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von p53 erfolgte durch Verwendung eines Polyklonalen anti-p53 Schaf-Serums. Zur Detektion von Rad51 wurden monoklonale anti-Rad51 Antikörper (5D10, 9D1) verwendet. Als sekundäre Antikörper dienten HRP-konjugierte anti-Schaf bzw. anti-Maus Antikörper. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Detektions-System.

di mit Rad51 *in vitro* cotranslatiertem p53 beeinflusst. In Kontrolluntersuchungen wurden die angegebenen Proteinmengen sichergestellt. Abbildung 2 zeigt das Ergebnis dieser Analysen für den Einfluß von Rad51 auf die spezifische Bindung von p53 an DNA. Selbst bei Anwesenheit großer Mengen an Rad51 Protein oder nach Aktivierung der p53 DNA-Bindung mit dem monoklonalen Antikörper PAb421 ist kein Einfluß von Rad51 auf die Interaktion von p53 mit DNA zu beobachten. Ob Rad51 *in vivo* einen Einfluß auf die Transaktivatorfunktion von p53 ausübt, ist Teil gegenwärtiger Untersuchungen.

Inaktivierung des Wildtyp p53 Proteins hat den Verlust der zellulären Antwort auf DNA Schädigung zur Folge und führt zum Auftreten genetischer Veränderungen und genomischer Instabilitäten und so unausweichlich zur Tumorgenese (Lane, 1992). In Zellen ohne funktionelles p53 Protein treten daher sehr schnell chromosomale Defekte auf. Diese Überlegungen führen direkt zur Frage, welche Wirkung DNA Schädigung auf die Interaktion zwischen p53 und Rad51 besitzt. Da DNA Doppelstrangbrüche Rekombinationsprozesse initiieren können, wurde die γ -Bestrahlung gewählt, die unter anderem Doppelstrangbrüche verursacht. Für die Analysen wurden drei Zel-

linien ausgewählt, die sich in ihrem genetischen Status für p53 unterscheiden. Die Hepatomzelllinie HepG2 besitzt Wildtyp p53 Allele. Bei der Leberkarzinomzelllinie HuH7 (Nakabayashi et al., 1982) ist der Thyrosin-Rest an Position 220 des p53 Proteins durch Cystein substituiert. Die Osteosarkomzelllinie Saos-2 ist p53 negativ (Diller et al., 1990).

Aus der Literatur ist bekannt, daß nach γ -Bestrahlung der Gehalt von Wildtyp p53 in Zellen auf Grund der erhöhten Translationsrate und Stabilität des Proteins zunimmt. Zur Ermittlung der Kinetik der p53 Akkumulation wurden Zellen mit einer Energiedosis von 5 Gy bestrahlt und nach verschiedenen Zeitintervallen lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Die anschließende Western Blot-Detektion bestrahlter Wildtyp p53 exprimierender HepG2 Zellen zeigte 3 h und 5 h nach Bestrahlung einen Anstieg des p53 Gehalts im Vergleich zu Kontrollzellen um den Faktor 2-3. 20 h nach Bestrahlung nahm der p53 Gehalt wieder ab und kehrte auf das Ausgangsniveau zurück. Der p53 Spiegel in HuH7 Zellen, die ein mutiertes p53 produzieren, blieb nach Bestrahlung unverändert. Auf den Rad51 Gehalt hatte die γ -Bestrahlung keine Auswirkung. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse mit HepG2 und HuH7 Zellen dargestellt.

Zur Klärung der Frage, ob Saos-2 Zellen, die kein p53 enthalten, trotzdem Rad51 exprimieren, und zur Ermittlung der optimalen Bedingungen wurden die Zellen mit verschiedenen Energiedosen bestrahlt. Nach der anschließenden metabolischen Markierung zellulärer Proteine mit [³⁵S]Methionin folgte die Lyse der Zellen 4 h nach Bestrahlung. Gleiche Proteinmengen wurden mit polyklonalen Rad51 Antikörpern immunpräzipitiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie sichtbar gemacht. Die Rad51 Proteinsynthese blieb jedoch auch nach γ -Bestrahlung von Saos-2 Zellen konstant (Abbildung 4).

Um den Einfluß der Bestrahlung auf die Progression im Zellzyklus zu untersuchen, wurden die Zelllinien einer FACS-Analyse (fluorescence activated cytometric analysis) unterzogen. Bei einem großen Anteil der HepG2 Zellen war nach γ -Bestrahlung ein geringerer DNA Gehalt als 2N, ein charakteristisches Merkmal apoptotischer Zellen, zu beobachten. Darüber hinaus zeigten HepG2 Zellen einen Zellzyklus-Arrest in der G₁- und auch in der G₂-Phase des Zellzyklus. Der Anteil von Zellen in der DNA Synthese-Phase war stark reduziert. In Mutanten p53 exprimierenden HuH7 Zellen konnte nach γ -Bestrahlung weder ein Zellzyklus-Arrest

noch Apoptose beobachtet werden. Der große Anteil von Zellen in der DNA Synthese-Phase zeigt, daß die Zellen proliferieren. Ebenso zeigten p53 negative Saos-2 Zellen weder Zellzyklus-Arrest noch Apoptose (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von DNA Schädigung auf p53 und Rad51 wurden Immunfluoreszenz-Studien zur Detektion von Rad51 in Zellen nach γ -Bestrahlung durchgeführt. Die Fluoreszenz-Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie. Die Zellen wurden γ -bestrahlt und nach verschiedenen Zeitintervallen fixiert sowie permeabilisiert. In der anschließenden Immunfluoreszenz wurden monoklonale Rad51 Antikörper verwendet. In unbehandelten Kon-

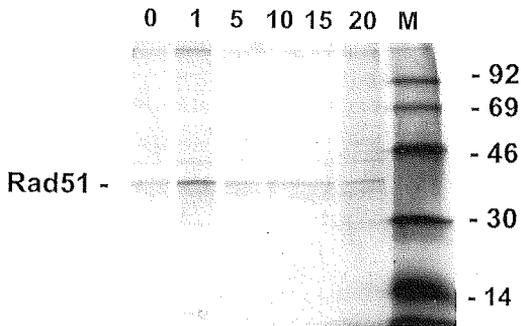


Abbildung 4: Immunpräzipitations-Analyse zur Detektion von radioaktiv markiertem Rad51

Protein nach γ -Bestrahlung mit verschiedenen Energiedosen. Saos-2 Zellen wurden mit verschiedenen Energiedosen (1, 5, 10, 15, 20 Gy) bestrahlt. Nach der metabolischen Markierung zellulärer Proteine mit [³⁵S]Methionin folgte die Lyse der Zellen 4 h nach Bestrahlung. Gleiche Proteinmengen wurden mit polyklonalen Rad51 Antikörpern immunpräzipitiert, in der SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt und mittels Fluorographie sichtbar gemacht. P: Maus Präimmenserum.

trollzellen lag Rad51 in einer homogen verteilten Form innerhalb des Nukleoplasmas vor (Abbildung 5). Drei Stunden nach Bestrahlung hatte in HepG2 Zellen eine Umverteilung des Rad51 Proteins stattgefunden. Die Immunfluoreszenz zeigte jetzt eine Reihe diskreter Foci, in denen das Protein konzentriert vorlag. Zu diesem Zeitpunkt wiesen etwa 50 % der Zellen die Foci auf. Fünf Stunden nach Bestrahlung stieg der Anteil auf 75 % und nahm anschließend wieder ab. Das ursprüngliche homogene Verteilungsmuster von Rad51 war zwanzig Stunden nach Bestrahlung wieder herge-

stellt. Im Gegensatz dazu konnte weder in HuH7 noch in Saos-2 Zellen das Auftreten hervorragender nukleärer Rad51 Foci nach Bestrahlung beobachtet werden. Eine sehr geringe Anzahl kleiner Foci war in etwa 5 % der HuH7 Zellen detektierbar, keine Veränderung der Rad51 Verteilung fand jedoch in Saos-2 Zellen statt. Auch 24 h und 48 h nach Bestrahlung blieb Rad51 in Saos-2 Zellen homogen im Kern verteilt.

Diese Studien zeigen, daß DNA Schädigung Konsequenzen auf die nukleäre Verteilung des Rad51 Proteins hat. In unbehandelten Zellen liegt Rad51 homogen im Zellkern vor, nach Bestrahlung findet jedoch eine Konzentration in nukleären Foci statt. Weiterhin weisen die Experimente auf eine strikte Korrelation zwischen dem Auftreten der Rad51 nukleären Foci nach DNA Schädigung und dem genetischen p53 Status der Zellen hin. Nur in Wildtyp p53 exprimierenden Zellen (HepG2) konnte die Umverteilung des Rad51 Proteins beobachtet werden. Diese Befunde implizieren, daß das Auftreten Rad51-spezifischer Foci nach DNA Schädigung abhängig vom Wildtyp p53 Status der Zellen ist. Wildtyp p53 exprimierende Zellen zeigen als eine Reaktion auf DNA Schädigung die physikalische Trennung von Rad51-p53 Komplexen und deren Lokalisation in verschiedenen Bereichen des Zellkerns (Daten nicht gezeigt). Die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen erfolgt möglicherweise durch rekombinatorische Prozesse unter Beteiligung von Rad51. In ungeschädigten Zellen wird möglicherweise homologe Rekombination durch Bindung von Wildtyp p53 an Rad51 inhibiert. Mutiertes p53 Protein bindet nicht an Rad51. Die Inhibition rekombinatorischer Prozesse durch funktionelles p53 wäre aufgehoben und resultiert in der Entstehung genomischer Instabilität.

Diskussion

In normalen Körperzellen sind Rekombinationsprozesse streng reguliert und werden erst nach Auftreten bestimmter DNA-Läsionen wie Doppelstrangbrüchen, die z. B. bei der DNA-Replikation, durch γ -Strahlung oder durch genotoxische Agenzien entstehen können, aktiviert, um solche Schäden zu reparieren. Unregulierte Rekombinationsereignisse fördern das Auftreten von Veränderungen im Erbgut, die mit neoplastischer Transformation und Progression assoziiert sind (Nelson und Kastan, 1994). Genomische Instabilität ist daher ein häufig beobachtetes Kennzeichen von Krebszellen. Ob solche Veränderungen jedoch als Sekundärereignis in bereits etablierten Krebszellen zu betrachten sind, oder ob sie ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt sind, ist bisher nicht

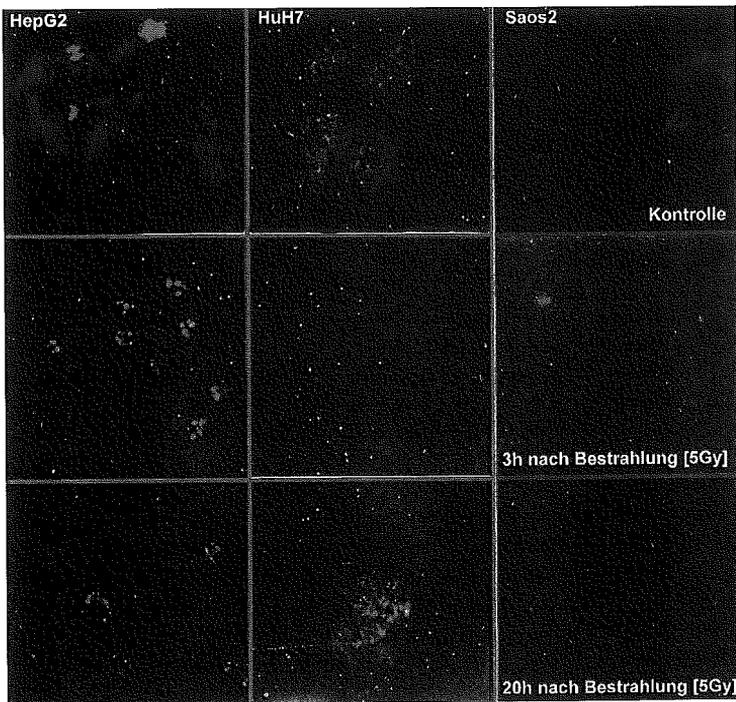


Abbildung 5: Immunfluoreszenz zur Analyse der intrazellulären Verteilung von Rad51 in Zellen nach γ -Bestrahlung. Bestrahlte Zellen (5 Gy) wurden 3h oder 20h nach Bestrahlung fixiert. Die Zellen wurden gewaschen, permeabilisiert und nochmals gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (Polyklonales Kaninchen anti-p53 Serum, monoklonale anti-Rad51 Antikörper 5D10, 9D1) für 30 min bei 37°C. Die Zellen wurden gewaschen und mit DTAF-konjugierten anti-Maus und Texas-Red-konjugierten anti-Kaninchen Antikörpern gefärbt. Unbestrahlte Zellen dienen als Kontrolle. Colokalisationsanalysen wurden unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops LSM410 (Karl Zeiss, Jena) durchgeführt.

eindeutig geklärt. Die hier dargestellten Beobachtungen sprechen für die zweite Möglichkeit. Die Interaktion von p53 und Rad51 stellt eine Verbindung zwischen rekombinatorischen Prozessen und der Zellzykluskontrolle her und scheint wichtig für die Bewahrung der genomischen Stabilität zu sein.

Über die molekularen Mechanismen der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen und homologen Rekombination in Säugerzellen ist wenig bekannt. Es gibt jedoch indirekte Hinweise, die auf eine Beteiligung von Rad51 an diesen Vorgängen schließen lassen. Rad51 Protein bildet Nukleoproteinfilamente, es bindet kooperativ an einzelsträngige DNA (ssDNA), besitzt ssDNA abhängige ATPase Aktivität und ist in der Lage, doppelsträngige DNA (dsDNA) zu entwinden (Benson et al.,

1994; Baumann et al., 1996). Die Hemmung des Rad51/RecA abhängigen Strangaustausches und seiner ATPase Aktivität durch p53 macht deutlich, daß p53 Rad51 vermittelte rekombinatorische Ereignisse modulieren kann. Die Mechanismen der Hemmung sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. p53-Rad51 Komplexbildung scheint jedoch eine notwendige Voraussetzung zu sein, da nicht bindende p53 Varianten keinen Einfluß auf biochemische Aktivitäten des Rekombinationsproteins haben. p53 eigene biochemische Aktivitäten, wie die Renaturierung kurzer einzelsträngiger DNA Moleküle, die bevorzugte Bindung von p53 an ssDNA-dsDNA Übergänge und der p53 katalysierte DNA Strangtransfer zwischen kurzer dsDNA (30bp) und komplementärer ssDNA (Oberosler et al., 1993; Bakalkin et al., 1994) könnten ebenfalls an der Inhibition biochemischer Aktivitäten von RecA/Rad51 beteiligt sein. Übereinstimmend mit diesen *in vitro* Befunden steht die Beobachtung, daß Wildtyp p53 auch *in vivo* Rekombinationsvorgänge inhibiert (Wiesmüller et al., 1996). Inaktivierung des Wildtyp Proteins resultiert dagegen in einer erhöhten Rate an homologer Rekombination (Mekeel et al., 1997).

Wildtyp p53 scheint also sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an der Kontrolle rekombinatorischer Prozesse beteiligt zu sein, das Ausmaß und den Zeitpunkt dieser Vorgänge zu regulieren und dadurch die genomische Stabilität der Zellen zu beeinflussen. Andererseits moduliert Rad51 *in vitro* die Sequenz spezifische Bindung von p53 an DNA nicht. Es bleibt jedoch zu überprüfen, ob Rad51 *in vivo* biochemische Funktionen von p53 wie die Transaktivierung bestimmter Gene oder die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst.

Versuche, Rad51 negative Mäuse zu züchten, weisen darauf hin, daß Rad51 höherer Eukaryonten neben seiner Funktion bei der Rekombination an weiteren physiologischen Prozessen wie z. B. der DNA-Replikation oder bei der Trennung neu re-

plizierter DNA-Stränge beteiligt sein könnte (Tsuzuki et al., 1996; Lim und Hasty, 1996). Homozygote Mäuse einer Rad51 null Mutation sind nicht lebensfähig. Die Embryonen sterben bereits, bevor sie das 8-Zellstadium erreichen (Tsuzuki et al., 1996) oder die Embryonalentwicklung arretiert am Tag 5,5-6,5 (Lim und Hasty, 1996). In der Hefe ist eine Rad51 Mutation dagegen nicht letal. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist, daß Rad51 in Mammalia zusätzliche Funktionen ausführt. Einen Hinweis auf eine Zellzyklus abhängige Regulation von Aktivitäten des Rad51 Proteins liefern Untersuchungen von Tashiro et al. (1996) an stimulierten Lymphozyten. Dort können zu bestimmten Zeitpunkten der S-Phase des Zellzyklus Rad51 spezifische nukleäre Foci detektiert werden. Zellen in anderen Zellzyklus-Phasen zeigen eine homogene Verteilung des Rad51 Proteins. Interessanterweise zeigen Rad51 negative embryonale Mauszellen eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber γ -Strahlung, die auf einen Defekt in der Reparatur von DNA-Schäden zurückzuführen ist. Als Konsequenz fehlender oder defekter Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen sind darüber hinaus Chromosomenverluste in den sich mitotisch teilenden Zellen der Embryonen zu beobachten. Die hier beschriebenen Beobachtungen zeigen, daß DNA Schädigung zu einer Umverteilung des ursprünglich homogen im Nukleus vorliegenden Rad51 Proteins führt. Nach γ -Bestrahlung akkumuliert das Protein in einer Reihe diskreter nukleärer Foci. Diese Umverteilung korreliert mit dem genetischen p53 Status der Zellen und findet nur in Wildtyp p53 exprimierenden Zellen statt. Aus anderen Studien ist bekannt, daß das Auftreten von Rad51 Foci unter anderem das Vorhandensein von DNA-Strangbrüchen anzeigt. Da in Rad51 Foci kein p53 nachweisbar ist, kann hier homologe Rekombination möglicherweise ungestört durch p53 im Rahmen der DNA-Reparatur ablaufen. Diese Regulation ist offensichtlich in Zellen ohne funktionelles p53 Protein gestört und möglicherweise eine der molekulare Ursachen der genetischen Instabilität von Tumorzellen.

Gestützt wird diese These auch von der Beobachtung, daß Rad51 defiziente Mausembryonen eine höhere Lebenserwartung haben, wenn das p53 Gen ebenfalls deletiert ist. Solche doppelt mutierten Embryonen sterben erst am Tag 8,5-9,5 der Embryonalentwicklung. Eine Ursache könnte die fehlende Zellzykluskontrolle in Abwesenheit von p53 sein. Embryonen mit Wildtyp p53 zeigen eine stark reduzierte Zellproliferation, gefolgt vom programmierten Zelltod. Apoptose kann in Zellen von Doppelmutanten nicht beobachtet werden. Der Verlust

der p53 abhängigen Apoptose könnte ein Grund für die gesteigerte Lebenszeit sein. In diesem Fall zeigen die Zellen replikative Seneszenz, die wahrscheinlich eine Folge fehlender DNA Reparatur darstellt und zum Tod der Embryonen führt (Tsuzuki et al., 1996; Lim und Hasty, 1996).

Kürzlich wurde entdeckt, daß Rad51 ebenfalls mit den Tumorsuppressorproteinen BRCA1 und BRCA2 interagiert (Scully et al., 1997; Sharan et al., 1997). Keimbahnmutationen im *brca1* Gen bewirken eine Prädisposition, an Brust- oder Gebärmutterkrebs zu erkranken, wohingegen ererbte Mutationen im *brca2* Gen hauptsächlich das Brustkrebs Risiko erhöhen. Beide Proteine besitzen eine Domäne, die aktivierend auf die Transkription bestimmter Gene wirkt, die Funktionen der Proteine sind bisher jedoch weitgehend unbekannt. Beide Proteine werden, wie Rad51, Zellzyklus abhängig in proliferierenden Zellen exprimiert, mit einem Expressionsmaximum am G₁-S Übergang (Rajan et al., 1996). Histologische Analysen von Maus Embryonen zeigten, daß *Brca2* und Rad51 coexprimiert werden (Sharan et al., 1997). Scully et al. (1997) berichteten, daß *Brca1*, wie Rad51, S-Phase spezifische nukleäre Foci bildet, die mit Rad51 colokalisieren. Auch in meiotischen Zellen lagen *Brca1* und Rad51 assoziiert vor.

Brca1 sowie *Brca2* defiziente Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie Rad51 „knock-out“ Mäuse (Lim und Hasty, 1996; Hakem et al., 1996; Sharan et al., 1997). Alle sterben bereits in einem sehr frühen Entwicklungsstadium (d 6,5), besitzen einen Defekt in der Zellproliferation und sind hypersensitiv bezüglich γ -Strahlung. Diese Daten sprechen dafür, daß BRCA1 und BRCA2 funktionell an einer Rad51 abhängigen Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen beteiligt sein könnten. Rad51 defiziente Mäuse zeigen eine höhere Sensitivität gegenüber γ -Strahlung als BRCA2 defiziente Mäuse; möglicherweise ein Hinweis auf eine auxiliäre Funktion von BRCA2. In Zellen, die die Aktivität von BRCA1 oder BRCA2 verloren haben, sind Rad51 abhängige Aktivitäten wahrscheinlich stark beeinträchtigt oder zerstört. Die Folge wäre eine Destabilisierung des Genoms. Die Interaktion mit BRCA1 und BRCA2 sowie p53 ist ein Hinweis, daß Rad51 ebenfalls Tumor suppressierende Eigenschaften besitzt. Rad51 ist möglicherweise selbst ein Tumorsuppressor. Dafür spricht, daß Brusttumoren sehr häufig einen Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 15 zeigen, auf welchem das Rad51 Gen lokalisiert ist (Wick et al., 1996).

Zusammenfassend sprechen diese Befunde dafür, daß das Auftreten genetischer Instabilität ursächlich an der Entstehung von Krebs beteiligt ist. Die

doppelte Funktion von p53 in der Regulation von Zellzyklus und homologen Rekombination/DNA-Reparatur wäre eine Erklärung, warum dieses Gen in so vielen Tumoren mutiert bzw. funktionell inaktiviert ist. Vieles spricht dafür, daß auch Rad51 selbst ein Tumorsuppressorgen ist. Eine Mutationsanalyse verschiedener Tumoren, vor allem solcher, die genetische Instabilität zeigen, könnte helfen, diese Frage zu klären.

Literatur

- Aden, D., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., und Knowles, B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615-616.
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., und Wiman, K.G. (1994) p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 413-417.
- Baumann, P., Benson, F.E. und West, S.C. (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87: 757-766.
- Benson, F., Stasiak, A., und West, S.C. (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO J.* 13: 5764-5771.
- Buchhop, S., Donzelmann, B., Nastainczyk, W., und Stürzbecher, H.-W. (1996) Isolation and characterization of six monoclonal antibodies raised against human Rad51 recombination protein. *Hybridoma* 15: 205-210.
- Buchhop, S., Gibson, M.K., Wang, X.W., Wagner, P., Stürzbecher, H.-W., und Harris, C.C. (1997) Interaction of p53 with the human Rad51 Protein. *Nucleic Acids Research*, im Druck.
- Diller, L., et al. (1990) p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5772-5781.
- Gurney, E.Q., Harrison, R.O., und Fenno, J., (1980) Monoclonal antibodies against simian virus 40 T antigens: evidence for distinct subclasses of large T antigen and for similarities among non-viral T antigens. *J. Virol.* 34: 752-763.
- Harlow, E., Crawford, L.V., Pim, D.C., und Williamson, N.M. (1981) Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J. Virol.* 39: 861-869.
- Harris, C.C. und Hollstein, M. (1993) Clinical implications of the p53-tumor-suppressor gene. *N Engl. J. Med.* 329: 1318-1327.
- Hakem, R., de la Pompa, J.L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmaier, A., Billia, F., Firpo, E., Hui, C.C., Roberts, J., Rossant, J., und Mak, T.W. (1996) The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* 85: 1009-1023.
- Hupp, T. R., Sparks, A. und Lane, D. P. (1995). Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* 83: 237-45.
- Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1994) Cancer therapy meets p53. *N. Engl. J. Med.* 331: 49-50.
- Lane, D.P. (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.
- Levine, A.J. (1993) The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 623-651.
- Lim, D.S., und Hasty, P. (1996) A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol. Cell. Biol.* 16: 7133-7143
- Livingston, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T., und Tlsty, T.D. (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70: 923-935.
- Mekeel, K.L., Tang, W., Kachnic, L.A., Luo, C.-M., DeFrank, J.S., und Powell, S.N. (1997) Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 14: 1847-1857.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. und Sato, J. (1982) Growth of human hepatoma cell lines with differential functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 42: 3858-3863.
- Nelson, W.G. und Kastan, M.B. (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1815-1823.
- Nowell, P.C. (1989). The clonal nature of neoplasia. *Cancer Cells* 1: 29-30.
- Obersoler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., und Stahl, H. (1993) p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J.* 12: 2389-2396.
- Rajan, J.V., Wang, M., Marquis, S.T., und Chodosh, L.A. (1996) Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13078-13083.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., und Livingston, D.M. (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88: 265-275.
- Selivanova, G., und Wiman, K.G. (1995) p53: A cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv. Cancer Res.* 66: 143-179.
- Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., und Bradley, A. (1997) Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 386: 804-810.
- Stürzbecher, H.-W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., und Buchhop, S. (1996) p53 is linked directly to homologous recombination processes via Rad51/RecA protein interaction. *EMBO J.* 15: 1992-2002.
- Tashiro, S., Kotomura, N., Shinohara, A., Tanaka, K., Ueda, K., und Kamada, N. (1996) S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene* 12: 2165-2170.
- Tlsty, T.D., Jonczyk, P., White, A., Sage, M., Hall, I., Schaefer, D., Briot, A., Livanos, E., Roelofs, H., Poulouse, B., et al. (1993) Loss of chromosomal integrity in neoplasia. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58: 645-654.
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tomiyama, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., und Morita, T., (1996) Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6236-6240.
- Vogelstein, B. und Kinzler, K.W. (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 523-526.
- Wick, W., Petersen, I., Schmutzler, R.K., Wolfarth, B., Lenartz, E., Bierhoff, E., Hummerich, J., Muller, D.J., Stangl, A.P., Schramm, J., Wiestler, O.D., und von Deimling, A. (1996) Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* 12: 973-978.
- Wiesmüller, L., Cammenga, J., und Deppert, W. (1996) In vivo assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J. Virol.* 70: 737-744.

Ein experimentelles System für Hirntumor-Zellinvasion *in vitro*

A.J.A Terzis, H. Arnold

Zusammenfassung

Wichtige Charaktereigenschaften maligner Gliome sind unkontrollierte Zellproliferation und invasives Wachstum in das umgebende Hirngewebe. Die Mechanismen dieses Invasionsprozesses sind bisher noch nicht hinreichend verstanden. Durch neueste Entwicklungen in der Gewebekultur ist es möglich, die Invasion in einem organotypischen Ko-Kultursystem, bestehend aus Gliomsphäroiden und zu Aggregaten geformten Rattenhirnzellen, zu studieren. Die Tumorsphäroide stammten alle aus humanem Biopsiematerial und wurden mit diesem Modell auf ihre Invasionskapazität untersucht. Alle Sphäroide, die aus Glioblastomen gewonnen wurden, zeigten eine extensive Invasion in die Rattenhirn-Aggregate. Das Invasionsmuster war gekennzeichnet durch diffuse Infiltration von Tumorzellen in das normale Hirngewebe. Über einen Zeitraum von 96 Stunden war eine Zerstörung des Hirngewebes um 90% zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl Meningeome, als auch intrakranielle Metastasen eine gut definierte Grenze zwischen beiden Geweben ohne Invasion von Tumorzellen in Hirnaggregate. Somit hat das dreidimensionale Zellkultursystem *in vitro* große Ähnlichkeiten mit dem *in vivo* Verhalten von Tumorzellen. Dieses System könnte als ein wertvolles Werkzeug zur Untersuchung der Invasionsmechanismen von Gliomzellen dienen.

Summary

Malignant human glioma is characterized by an uncontrolled cell proliferation and infiltrative growth into the brain. The mechanisms by which invasion occurs are poorly understood. Due to recent development in tissue culture methods, it is possible to study invasion in organotypic co-culture systems consisting of glioma spheroids and re-aggregated fetal brain cells. Spheroids from biopsy material have been tested for invasiveness in this model. All spheroids from glioblastomas showed extensive invasion into the brain aggregates. For these tumors, the invasion pattern was characterized by diffuse infiltration of tumor cells into the brain tissue, destroying about 90% of the brain tis-

sue during the 96-hour observation period. This observation was in contrast to the metastatic tumors as well as the meningiomas that showed a well-defined border between the two tissues with no invasion into the brain aggregates. The three dimensional cell culture *in vitro* system which appropriately reflects tumor-cell behavior *in vivo* could represent a powerful tool for studying the mechanisms of glioma cell invasion.

Einleitung

Maligne Gliome stellen mehr als 40% der intrakraniellen Malignome dar. Das Glioblastom, ein Tumor des Erwachsenenalters, ist mit einer schlechten Prognose behaftet. Dieser Tumor tritt mit einer relativen Häufigkeit zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr und einer Streuung vom 25. Lebensjahr bis ins hohe Alter auf.

Maligne Gliome haben einige biologische und klinische Merkmale, die unter den malignen Neoplasien einzigartig sind. Es ist bekannt, daß die Tumorstadiumskinetik und die Heterogenität der Tumorzellen (Proliferationsgradienten, Ruhephasen) von Glioblastom zu Glioblastom differieren. Die schlechte Prognose liegt insbesondere in der Resistenz der Tumorzellen gegenüber Zytostatika sowie der Bestrahlung begründet. Wegen des diffus infiltrativen Wachstums und der Wanderung von Tumorzellen, oft über mehrere Zentimeter, in das umgebende Hirngewebe ist eine vollständige Tumorsektion nicht möglich.

Während der letzten 2 Jahrzehnte bestand die übliche Behandlung aus einer Kombination aus chirurgischer Tumorentfernung, Bestrahlung und Chemotherapie. Darunter überlebten 35% bis 50% der Pat. 1 Jahr, aber nur 10% bis 20% das 2. Jahr.

Unbehandelte Pat. überleben durchschnittlich nur 2 bis 4 Monate. Die Operation allein verlängert das Leben durchschnittlich um 4 bis 6 Monate. Glioblastom-Patienten, die lediglich operiert wurden, überleben das 1. Jahr zu 1% bis 32%. Nur in Ausnahmen wird das 3. Jahr überlebt. Die postoperative Bestrahlung kann zu einer Lebensverlängerung führen. Das 1. Jahr nach Diagnosestellung überle-

ben Pat. mit Glioblastom nach Operation und Bestrahlung zu 32% bis 48%, nach 3 Jahren leben noch 4% bis 10%.

Die besten Ergebnisse wurden mit der Kombination von Operation, Bestrahlung und Chemotherapie erzielt, doch erreichte auch damit die Überlebenszeit durchschnittlich nicht mehr als 12 bis 13 Monate.

Biologische Charakteristika der Sphäroide

Um einen besseren Therapieeffekt zu erhalten, wurden präklinische Chemosensitivitätstests entwickelt. Im allgemeinen wurden solche Screening-Tests an Monolayer-Kulturen von Glioblastomen vorgenommen; sie sind bisher alles andere als zufriedenstellend.

Das biologische Verhalten von Zellen in einer Kultur ist sehr von den Kulturbedingungen abhängig (14). Zell-zu-Zell-Kontakte beeinflussen die Zellbiologie essentiell. Um in Monolayer-Kulturen mit den schwach ausgebildeten Zell-zu-Zell-Kontakten das Überleben der Zellen zu verlängern, werden beispielsweise besondere „Feeder“-Schichten benötigt (18, 29).

Während der letzten drei Jahrzehnte wurden multizelluläre Sphäroide von normalen und von Tumorzellen benutzt, um das dreidimensionale Wachstum und die Differenzierung *in vitro* zu studieren (11, 12). An Sphäroiden können komplexe Zell-zu-Zell Interaktionen *in vitro* untersucht werden.

Tumorzellen reaggregieren auf einer nicht-adhäsiven Oberfläche (31) und bilden dreidimensionale Strukturen, Sphäroide. Dieses Modell zeigt eine große Ähnlichkeit mit der *in vivo* Situation (2, 19). Sphäroide gleichen in vielen biologischen Charakteristika Mikrotumoren *in vivo*, so in der Volumenzunahme, der zellulären Heterogenität und der zellulären Nahrungs- bzw. Sauerstoffversorgung (Abb.1).

Matrixkomponenten wie Glykosaminoglykane, Laminin, Fibronectin und Kollagen konnten sowohl in Tumorsphäroiden als auch im Originaltumor identifiziert werden (13). Im Vergleich zu Sphäroiden zeigen Zellen in Monolayer-Kulturen ein geringeres Synthesevermögen von extrazellulären Bestandteilen (16). Ein weiterer Unterschied: Monolayerkulturen sind gleichförmig. Tumorsphäroide weisen eine geschichtete Variabilität in der Zellproliferation im Sinne eines Proliferationsgradienten auf, die äußeren Zellschichten proliferieren, die inneren ruhen (8, 9, 21). Die Diffusionsgradienten für O_2 und Nährstoffe in Sphäroiden sind denen der Oxygenierung und Nährstoffaufnahme

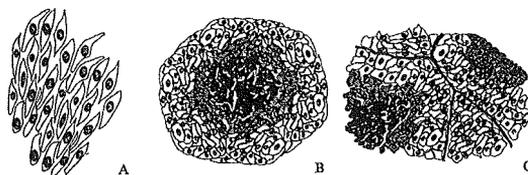


Abb.1: Die schematische Darstellung der Monolayer-Gewebskultur (A), der dreidimensionalen Sphäroidkultur (B) und des vaskularisierten Gewebes *in vivo* (C). In der Monolayerkultur haben die Zellen direkten Kontakt mit der Plastikoberfläche und ändern ihre Form. Alle Zellen werden mit der gleichen Menge an Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Zellen die in dreidimensionaler Kultur wie z.B. der Sphäroidkultur wachsen, haben eine eher dreidimensionale Form und einen engeren Kontakt der Zelloberflächen mit benachbarten Zellen. Diese Zellschichten bilden eine Diffusionsbarriere, so daß die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff im Sphäroidinneren umgekehrt proportional zum Abstand zur Sphäroidoberfläche ist (zu erkennen an den dunklen Zellen im Zentrum des Sphäroids in B). Ein ähnliches Phänomen zeigt sich *in vivo*, wo die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff umso geringer ist, je größer der Abstand zu den Kapillaren ist (C).

aus der Mikrovaskularisierung in *in vivo* Tumoren ähnlich (4, 10, 30). Im Zentrum von Sphäroiden mit einem Durchmesser größer als 400 bis 700 Mikrometer finden sich oft massive Nekrosen. Dieses Wachstumsmuster gleicht jenem vieler solider Tumorknoten *in vivo*, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Kapillaren proliferierende Zellen enthalten, während ruhende Zellen erst im Anschluß daran zu finden sind und nekrotische Zonen noch weiter entfernt von den Gefäßen auftreten.

Biologische Charakteristika der Rattenhirn-Aggregate

Ein wichtiger Gesichtspunkt ist das infiltrative Wachstum maligner Gliome in das normale Hirngewebe (17). Bezüglich der biologischen Mechanismen dieser Gliomzellinvasion in das Hirngewebe ist nicht sehr viel bekannt. Jedoch wurden in den letzten Jahren viele Methoden entwickelt, um die Invasivität der Gliome *in vitro* zu untersuchen. Diese Systeme beinhalten Konfrontationskulturen mit Fragmenten von Hühnerherzen (6, 7) oder mit artefiziellen Membranen (1, 15). Die Wahl des angemessenen Zielgewebes für die Invasionsstudien ist von großer Bedeutung, da sich die Gliomzellinvasion fast ausschließlich auf das Hirngewebe beschränkt. Ein Zielgewebe, bestehend aus lebenden

Zellen, ist einem Substrat aus Matrixkomponenten oder toten Zellen vorzuziehen. In Studien mit Kulturen, bestehend aus normalen und malignen Zellen, kann der lebende Teil der normalen Zellen als Referenz für den selektiven toxischen Effekt auf Tumorzellen bei experimentellen Behandlungen dienen (25, 26, 27, 28). Weiterhin sollten die normalen Zellpopulationen eine stabile Architektur aus differenzierten Zellen aufweisen (24). Deshalb verwenden wir Rattenhirnzell-Aggregate als Zielgewebe, die durch Reaggregation von immaturren neuroektodermalen Zellen *in vitro* gewonnen werden. Viele zelluläre Elemente des Gehirns finden sich in Hirnzellaggregaten wieder. Tumorzellen *in vivo* müssen mit verschiedenen Zelltypen interagieren.

Methoden und Ergebnisse

Herstellung von Sphäroiden

Tumorsphäroide werden aus permanenten Zelllinien oder Biopsaten nach Einbringen von Einzelzell-suspensionen in Kulturflaschen, deren Boden mit Agar bedeckt ist („Agar-Overlay-Kultur“), hergestellt (31). Nach 7 bis 10 Tagen in Kultur können die Sphäroide für Migrations-, Proliferations- und Invasionsexperimente verwendet werden (20, 22, 23) (Abb.2).

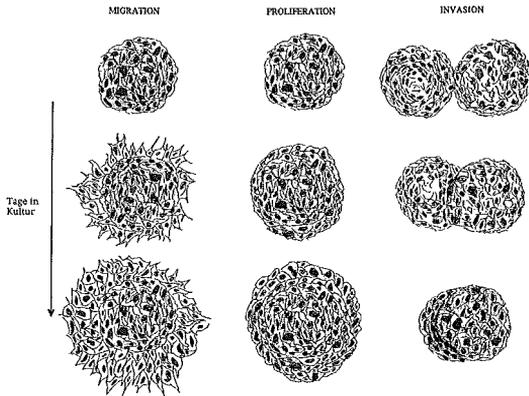


Abb.2: Schematische Darstellung der Zellmigration, Zellproliferation und Zellinvasion in einem dreidimensionalen Zellkultur-System; modifiziert nach Terzis, 1995 (23)

Tumorsphäroide aus Tumorbiopsien bleiben unter standardisierten Kulturbedingungen über Monate vital (3, 5) (Abb.3). Sie zeigen eine dem Originaltumor ähnliche histiotypische Architektur (Abb.4) und die gleiche Ploidie wie das primäre Biopsat (Abb.5).

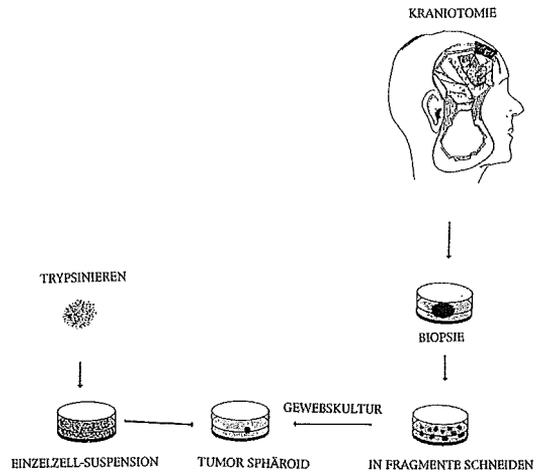


Abb.3: Schematische Darstellung der Herstellung von Tumorsphäroiden aus permanenten Zelllinien und aus Tumorbiopsien.

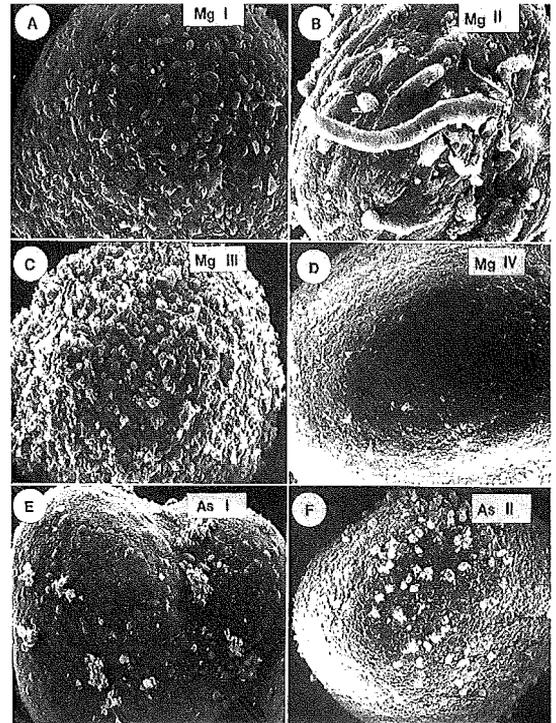


Abb.4: Elektronenmikroskopische Darstellungen von Gliomsphäroiden zeigen eine ausgesprochene Variabilität in der Oberflächenstruktur, z.B. zeigen sich Blutgefäße assoziiert mit der Sphäroid-Oberfläche (B, Pfeil). (Mg = malignes Gliom, vier verschiedene Patienten (I, II, III, IV); As = Astrozytom, zwei verschiedene Patienten (I, II). x 530.

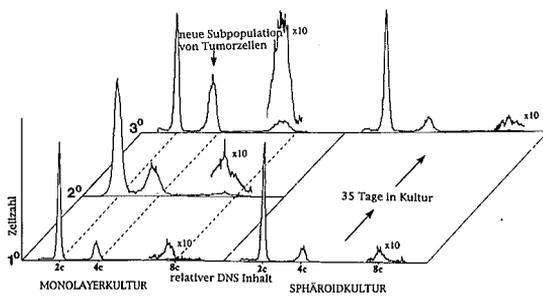


Abb.5: Ergebnisse der Durchflußzytometrie. Gezeigt wird der relative DNS-Gehalt aus dem Gewebe eines Glioblastoms nach 3 Passagen in Monolayerkultur (1°, 2°, 3°). Zu erkennen ist eine Veränderung in der DNS Verteilung zwischen 1°, 2° und 3° mit einer Selektion einer hypertetraploiden Tumorsubpopulation (linke Seite der Graphik). Zum Vergleich wurde derselbe Tumor als Sphäroid für 35 Tage kultiviert (Zeitraum identisch zur Monolayerkultur). Anschließend wurde der DNS-Gehalt der Sphäroide mit dem DNS-Gehalt der Biopsie des Patienten verglichen. Kein Unterschied in der DNS-Verteilung war zu beobachten (rechte Seite der Graphik).

Als Sphäroide wachsende Glioblastomzellen sind bezüglich Zellproliferation, der Anzahl ruhender Zellen und der Nekrosebildung annähernd so heterogen wie Glioblastomknoten *in vivo*. Auch hinsichtlich der räumlichen Verteilung der Zellen und der therapeutischen Effekte der gesamten antitumoralen Behandlung verhalten sie sich heterogen. Die Wirkung verschiedener Pharmaka variiert erheblich sowohl zwischen verschiedenen Typen von Sphäroiden als auch zwischen verschiedenen Zellkomplexen innerhalb der Sphäroide. Der pO₂, der pH und die Nutritionsgradienten beeinflussen die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika und die Radiosensitivität in Sphäroiden *in vitro* ähnlich wie in Tumormikroregionen *in vivo*. Für das Wachstum von Tumorsphäroiden läßt sich ein generelles Wachstumsmuster beschreiben. Die Sphäroide haben eine äußere Lage von proliferierenden Zellen, während in ihrem Inneren hauptsächlich ruhende Zellen vorhanden sind.

Herstellung von Rattenhirn-Aggregaten

Fetale Rattenhirnzellen werden von 18 Tage alten Feten von Wistarratten gewonnen. Die Gehirne werden unter aseptischen Bedingungen entnommen und nach Entfernung der Meningen in sterile Petrischalen mit Kalzium- und Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) überführt. Anschließend wird das Gewebe in kleine Stücke zerteilt, in PBS gewaschen und durch serielles Trypsinieren (Trypsin Konzentration 0.025%) in eine Einzelzellsuspension überführt. Mit Hilfe eines Coulter Counters wird die resultierende Zellzahl bestimmt. Fetale Rattenzell-Aggregate entstehen nach Überführung von 6×10^6 Zellen in 1 ml Medium in 16 mm Loch Multiwell Schalen (Nunc, Roskilde, Dänemark), bedeckt mit einem nicht-adhärenenten 0.75% Medium-Agar-Substrat. Die Zellen werden in „Dulbecco's modified Eagle's medium“ (DMEM) für 21 Tage unter standardisierten Gewebekulturbedingungen gehalten (Abb.6).

Während der ersten 4 Tage formen sich immature Zellaggregate. Die unreifen Rattenhirnzellen reifen in der Kultur zu Neuronen und Gliazellen innerhalb von 12 bis 20 Tagen. Sie arrangieren sich in einer Zellstruktur innerhalb der Mikrosphären, so daß man neuronreiche Zellagen erkennen kann, die von einer äußeren Lage aus Gliazellen und gut

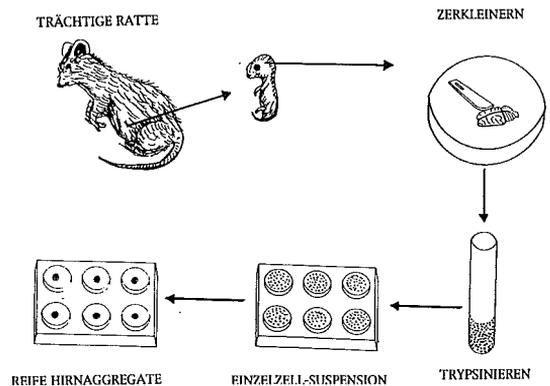


Abb.6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Herstellung von Rattenhirn-Aggregaten.

VERSICHERUNGSMAKLERBÜRO

Unser Service für Ärzte und Studenten:

Kostenlose Analyse bestehender Versicherungsverträge • Vermittlung sämtlicher Rahmen- und Gruppenverträge mit Verbänden und Organisationen für Ärzte • Dadurch konsequent preiswert • Finanzierungen • Niederlassungsberatung

Karl-Ludwig Jänicke GmbH

Königstraße 47 · 23552 Lübeck · Tel. 04 51/79 15 · Fax 04 51/70 46 23

Versicherungen

Jänicke

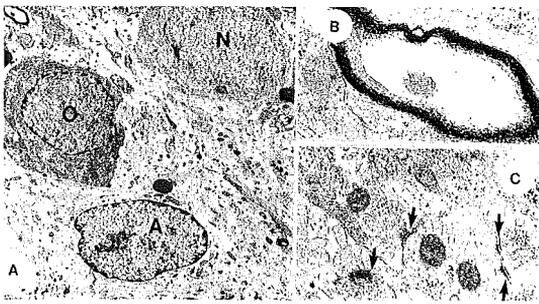


Abb.7: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines 21 Tage alten Rattenhirn-Aggregats mit Neuronen (N), Oligodendrozyten (O) und Astrozyten (A) in einem ausgereiften Neuropil. $\times 4000$ (A). Ein myelinisiertes Axon im Neuropil. $\times 20000$ (B). Synaptische Komplexe (Pfeil) sind ebenfalls zu erkennen. $\times 20000$ (C).

entwickeltem Neuropil umgeben sind. Gelegentlich zeigen sich auch Ependymzellen, Makrophagen und einige undifferenzierte Zellen. Die Zellen färben sich positiv mit Antikörpern gegen Marker neuronaler und glialer Zellen, wie z.B. saures Gliafaserprotein (GFAP), das S-100-Protein und neuronenspezifische Enolase (NSE). Elektronenmikroskopische Beobachtungen bestätigten das Vorkommen von Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen; ZNS-Strukturen wie myelinisierte Axone und vesikelhaltige Synapsen waren zu erkennen (Abb.7). Die Aggregate zeigten eine große Ähnlichkeit zu adultem Hirngewebe.

Dreidimensionales Zellkultursystem als Invasionsmodell *in vitro*

Spezielle Zellkulturen wurden entwickelt, um multizelluläre Tumorsphäroide bei der Konfrontation mit Zellaggregaten aus fetalem Rattenhirn als ein Modell nutzen zu können, das Untersuchungen des Invasionsverhaltens erlaubt (2, 24, 25, 26, 27, 28).

Unter einem Stereomikroskop werden die Kokultur-Komponenten (200-300 μm Durchmesser) mit Hilfe von sterilen Nadeln in Kontakt gebracht. Nach einer Inkubation von 2 Stunden sind die Strukturen fest miteinander verbunden. Nach 96 Stunden werden die Proben für die lichtmikroskopische Untersuchung vorbereitet (Abb.8).

Diskussion

In der klinischen Erfahrung besitzen die Glioblastome im Gegensatz zu benignen Hirntumoren und auch Hirnmetastasen die spezifische Fähigkeit zur Invasion in das normale Hirngewebe.

Bei unseren Experimenten *in vitro* zeigten die Sphäroide aller Glioblastome eine extensive Inva-

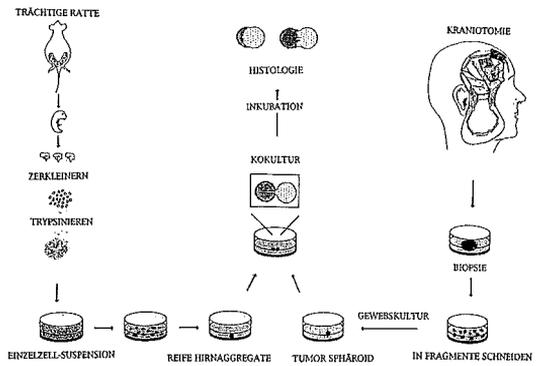


Abb.8: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Beobachtung der Interaktionen zwischen fetalem Rattenhirn-gewebe und Biopsien intrakranieller Tumoren.

sion in die Hirnaggregate. Für diese Tumoren war das Invasionsmuster durch eine diffuse Infiltration von Tumorzellen in das Hirngewebe mit einer 90%igen Zerstörung des Hirngewebes während des 96-stündigen Beobachtungszeitraums charakterisiert. Ein extensiver Ersatz von normalem Hirngewebe durch Tumorzellen war zu erkennen (Abb.9 A).

Im Gegensatz dazu respektierten eine Hirnmetastase (Adenokarzinom der Lunge) und das Meningeom die definierte Grenze zum Hirnaggregat, die Tumorzellen invadierten das Hirnaggregat nicht (Abb.9 B,C)!

Diese *in vitro* nachgewiesenen Invasionsmuster entsprechen weitgehend den klinischen Beobachtungen bei Patienten mit verschiedenen Hirntumoren.

Die Untersuchungen zeigten außerdem, daß bei Verwendung von Ko-Kulturen aus Tumorsphäroiden und Rattenhirnaggregaten sowohl Sphäroide aus Hirntumorbiopsien als auch solche aus Hirntumor-Permanent-Zelllinien fähig waren, die Hirnaggregate zu invadieren und zu zerstören. In Therapie- und biologischen Experimenten konnte das Invasionsverhalten der Tumorzellen gemessen und quantifiziert werden. Computerassistierte morphometrische Messungen von Zonen invadierender und invadierter Zellen ermöglichten es, die fortschreitenden Veränderungen im Verhältnis zwischen den beiden Gewebsarten objektiv festzustellen.

Im Gegensatz zu Untersuchungen mit Monolayerkulturen kommt diese Methode somit der *in vivo* Situation wesentlich näher.

Zellinvasion und -metastasierung beinhalten komplexe Interaktionen zwischen Tumor und normalem Hirngewebe. Die Untersuchungen der Expres-

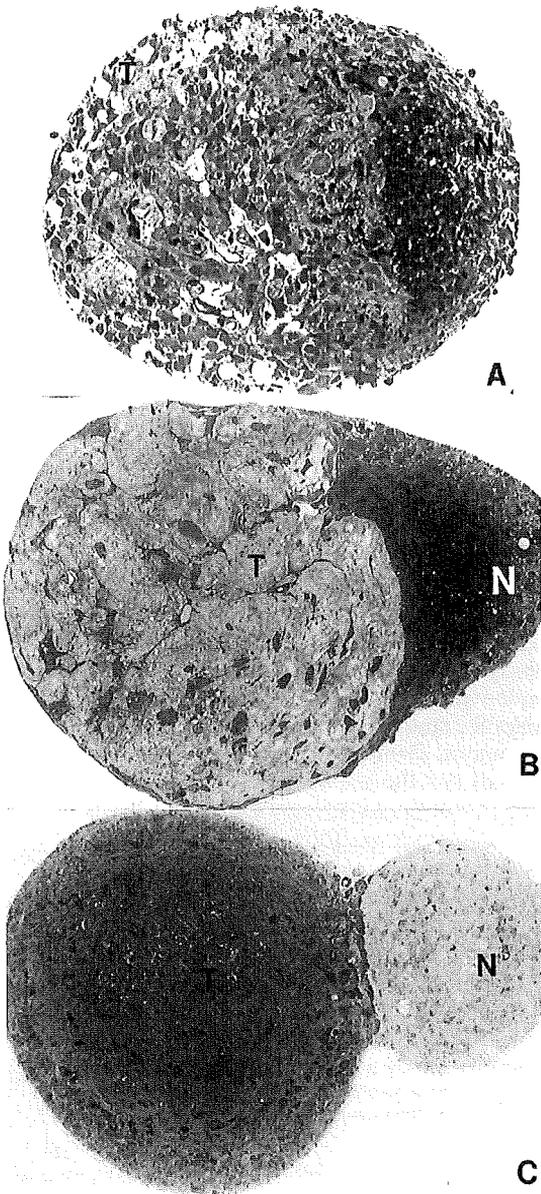


Abb.9: Mikroskopisches Photo der Kokultur nach 96 Stunden x 300. (A) Konfrontationskultur von einem Hirnaggregat (N) mit menschlichem Glioblastom-Sphäroid (T). Zu erkennen ist eine deutliche Invasion und Zerstörung von Hirngewebe. (B) Konfrontation von Hirnaggregat (N) mit einer Hirnmetastase (Adenokarzinom der Lunge) (T). Zu erkennen ist eine scharfe Grenze zwischen beiden Geweben und kein Zeichen der Invasion. (C) Kokultur zwischen einem Meningeom (T) und einem Hirnaggregat (N). Wieder zeigt sich eine scharfe Grenze zwischen beiden Geweben ohne Zeichen der Invasion.

sion von extrazellulären Matrix- Komponenten, von Zelladhäsionsmolekülen sowie Wachstumsfaktoren und deren Zelloberflächenrezeptoren im normalen Hirngewebe sowie im Tumor während des Invasionsprozesses sind von großer Bedeutung, diese Mechanismen zu verstehen. Das dreidimensionale Zellkultursystem könnte hilfreich sein, diese biologischen Mechanismen *in vitro* zu untersuchen.

Literatur

1. Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozolowski JM, McEvan RN : A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* **47**, 3239-3245 (1987)
2. Bjerkvig R, Steinsvåg SK, Laerum OD : Reaggregation of fetal rat brain cells in a stationary culture system. I: Methodology and cell identification. *In Vitro Cell Dev Biol* **22**, 180-192 (1986)
3. Bjerkvig R, Tønnesen A, Laerum OD, Backlund EO : Multicellular tumor spheroids from human gliomas maintained in organ culture. *J Neurosurg* **72**, 463-475 (1990)
4. Carlsson J, Stålnacke CG, Acker H, Haji-Karim M, Nilsson S, Larsson B : The influence of oxygen on viability and proliferation in cellular spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **5(11-12)**, 2011-2020 (1979)
5. Darling JL, Oktar N, Thomas DGT : Multicellular tumour spheroids derived from human brain tumours. *Cell Biol Int Rep* **7**, 23-30 (1983)
6. De Ridder L, Laerum OD : Invasion of rat neurogenic cell lines in embryonic chick heart *in vitro*. *J Natl Cancer Inst* **66**, 723-728 (1981)
7. De Ridder L, Mørk SJ, Laerum OD : Invasiveness of human glioma cell lines *in vitro*: Relation to tumorigenicity in athymic mice. *Acta neuropathol* **72**, 201-213 (1987)
8. Dertinger H, Luecke-Huhle D : A comparative study of post-irradiation growth kinetics of spheroids and monolayers. *J Radiat Biol* **28**, 255-265 (1975)
9. Durand RE : Cell cycle kinetics in an *in vitro* tumor model. *Cell Tiss Kinet* **9**, 403-412 (1976)
10. Haji-Karim M, Carlsson J : Proliferation and viability in cellular spheroids of human origin. *Cancer Res* **38**, 1457-1464 (1978)
11. Holtfreter J : A study of the mechanics of gastrulation. *J Exp Zool* **106**, 197-222 (1944)
12. Moscona A : Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Exp Cell Res* **3**, 535-539 (1952)
13. Mueller-Klieser W, Freyer JP, Sutherland RM : Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. *Br J Cancer* **53**, 345-353 (1986)
14. Raff MC, Miller RH, Noble M : A glial progenitor cell that develops *in vitro* into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* **303**, 390-396 (1983)
15. Repesh AL : A new *in vitro* invasion assay for quantitating tumor cell invasion. *Invasion Metastasis* **9**, 192-208 (1989)
16. Rucklidge GJ, Bjerkvig R, Dean V, Robins S, Mella O : Immunolocalization of extracellular matrix proteins during

- brain tumour invasion in BD IX rats. *Cancer Res* 49, 5419-5423 (1989)
17. *Russell DS, Rubinstein LJ* : In: Pathology of Tumours of the Nervous System. (5thed) Edward Arnold, London-Melbourne-Auckland, pp 421-448 (1989)
 18. *Rutka JT, Giblin JR, Dougherty DV* : An ultrastructural and immunocytochemical analysis of leptomenigeal and meningioma cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 45, 285-303 (1986)
 19. *Steinsvaag SK, Laerum OD* : Fetal rat brain hemisphere tissue in nonadherent stationary organ culture. *Experientia* 41, 529-549 (1985)
 20. *Sutherland RM* : Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. *Science* 240, 177-184 (1988)
 21. *Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR* : Growth of multicellular spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 46, 113-120 (1971)
 22. *Sutherland RM, Durand RE* : Radiation response of multicell spheroids - An *in vitro* tumor model. *Curr Top Radiat Res* 11, 87-139 (1976)
 23. *Terzis AJA* : Malignant Brain Tumours: Biology and Therapy Related to Tumour Cell Invasion. *PHILOSOPHIAE DOCTOREM* Bergen, Norwegen (1995)
 24. *Terzis AJA, Arnold H, Laerum OD, Bjerkvig R* : Interaction between human medulloblastomas and fetal rat brain aggregates *in vitro*. *Acta Neurochir (Wien)* 126, 11-16 (1994)
 25. *Terzis AJA, Dietze A, Bjerkvig R, Arnold H* : Effects of photodynamic therapy on glioma spheroids. *B J Neurosurg (1997) Im Druck*
 26. *Terzis AJA, Fiskerstrand T, Refsum H, Ueland P, Arnold H, Bjerkvig R* : Proliferation, migration and invasion of human glioma cells exposed to antifolate drugs. *Int J Cancer* 54, 112-118 (1993)
 27. *Terzis AJA, Pedersen PH, Feuerstein BG, Arnold H, Bjerkvig R, Deen DF* : Effects of DFMO on human glioma spheroids: migration, proliferation and invasion *in vitro*. *J Neuro-Oncol (1997) Im Druck*
 28. *Terzis AJA, Thorsen F, Heese O, Visted T, Dahl O, Arnold H, Bjerkvig R, Gundersen G* : Proliferation, Migration and Invasion of Human Glioma Cells exposed to Paclitaxel (Taxol) *in vitro*. *Br J Cancer (1997) Im Druck*
 29. *Walsh JW, Zimmer SG, Oeltgen J* : Invasiveness in primary intracranial tumors: part 2. *Neurosurg* 21, 361-370 (1987)
 30. *Yuhas JM, Li AP* : Growth fraction as the major determinant of multicellular tumor spheroid growth rates. *Cancer Res* 38, 1528-1532 (1978)
 31. *Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ* : A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 37, 3639-3643 (1977)

Inhibitorische Effekte des Gonadotropin-releasing Hormon-Agonisten Triptorelin auf Epidermal growth factor (EGF)-Wirkungen in humanen Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien*

O. Ortmann^{1,3}, V. Müller¹, G. Grossmann¹, K. Trautner¹, B.V. Stuckrad¹, K.-D. Schulz¹, K. Diedrich³, A.V. Schally², G. Emons¹

Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, die Signaltransduktionsmechanismen zu identifizieren, die antiproliferative Effekte von Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH)-Analoge auf humane Ovarial- (EFO-21, EFO-27) und Endometriumkarzinomzellen (HEC-1A, Ishikawa) vermitteln. Der GnRH-Agonist Triptorelin hatte in diesen Zellen keine Wirkung auf die Aktivität der Phospholipase C, der Proteinkinase C oder der Adenylylcyclase, obwohl diese durch pharmakologische Stimuli induzierbar waren. Die Proliferation von EFO-21, EFO-27 und HEC-1A-Zellen wurde signifikant durch Epidermal growth factor (EGF) unter serumfreien Kulturbedingungen stimuliert. Dieser mitogene Effekt von EGF wurde durch Triptorelin antagonisiert. Die EGF (1 nM)-induzierte Tyrosinphosphorylierung wurde durch 10 µM Triptorelin fast komplett supprimiert. Dieser inhibitorische Effekt des GnRH-Agonisten wurde teilweise durch 100 µM Natriumvanadat, einem Inhibitor der Phosphotyrosinphosphatase antagonisiert. EGF (100 nM) aktivierte in EFO-21, EFO-27 und HEC-1A-Zellen die mitogen activated protein kinase (MAPK). Dieser EGF-Effekt wurde durch Behandlung mit 10 µM Triptorelin aufgehoben. Diese Daten weisen darauf hin, daß GnRH-Signaltransduktionsmechanismen, die in der gonadotropen Hypophysenzelle operant sind, für antiproliferative Wirkungen von Triptorelin auf Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien nicht relevant sind. Vielmehr wird die Hypothese unterstützt, daß

Triptorelin einen inhibitorischen Effekt auf mitogene Signaltransduktionswege besitzt. Diese Wirkung von Triptorelin läßt sich in Zukunft möglicherweise als effektives therapeutisches Prinzip in der Behandlung des Ovarial- und Endometriumkarzinoms nutzen.

Summary

This study was designed to elucidate the signal transduction mechanisms, mediating the antiproliferative effects of analogs of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on cells derived from human cancers of the ovary (EFO-21, EFO-27) and the endometrium (HEC-1A, Ishikawa). The GnRH agonist triptorelin had no measurable effects of the activity of phospholipase C, protein kinase C, or adenylyl cyclase in all 4 cell lines, though these enzymes could be activated through pharmacological stimuli. The proliferation of EFO-21, EFO-27, and HEC-1A cells in serum / phenol red-free medium was significantly stimulated by epidermal growth factor (EGF). This mitogenic effect of EGF was antagonized by triptorelin. Net tyrosine phosphorylation induced by 1 nM EGF was nearly completely suppressed by simultaneous addition of 10 µM triptorelin. This inhibitory effect of the GnRH agonist on EGF-induced tyrosine phosphorylation was partly antagonized by exposure to 100 µM sodium vanadate, an inhibitor of phosphotyrosine phosphatase. In EFO-21, EFO-27, and HEC-1A cells exposure to 100 nM EGF for 5 min induced an approximately 5-fold increase in activity of mitogen activated protein kinase (MAPK) which was virtually nullified, when the cells were exposed for 15 min to 10 µM triptorelin. These data suggest that GnRH signal transduction mechanisms which operate in pituitary gonadotrophs do not necessarily mediate antiproliferative effects of

* Die vorliegende Arbeit wurde bereits in umfangreicherer Form publiziert: Emons G et al. (1996) *Int. J. Oncol.* 9:1129-1137.

Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 215, B10) und die P. E. Kempkes Stiftung, Marburg.

triptorelin in these ovarian and endometrial cancer cell lines. Instead, our findings support the hypothesis that triptorelin interferes with mitogenic signal transduction, probably through antagonizing tyrosine kinase activity of the EGF receptor. The effect of Triptorelin might be used in future as an effective therapeutic principal for treatment of ovarian and endometrial carcinoma.

Einleitung

Das Dekapeptid Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH) wird pulsatil aus Neuronen des mediobasalen Hypothalamus freigesetzt, bindet an hochaffine Rezeptoren der gonadotropen Hypophysenzelle und induziert die Sekretion von luteinisierendem Hormon (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH). Dies ist die primäre physiologische Funktion des Neuropeptids. Neben den hypophysären GnRH-Rezeptoren wurden auch Bindungsstellen für GnRH in extrahypophysären Geweben, wie z. B. der Plazenta und dem Ovar nachgewiesen. Interessanterweise konnte in einigen jüngeren Studien gezeigt werden, daß humane Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien sowie Biopsien solcher Tumoren den GnRH-Rezeptor exprimieren (1-7). Zusätzlich wurde nachgewiesen, daß diese Zelllinien und Tumoren immuno- und bioaktives GnRH und die mRNA für das Dekapeptid produzieren (7-9). Die Proliferation der Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien, die den Rezeptor exprimieren, konnte durch agonistische und antagonistische GnRH-Analoga supprimiert werden (1, 3, 4). Bisher gelang es jedoch nicht zu zeigen, daß diese biologischen Effekte von GnRH-Analoga über eine Aktivierung GnRH-rezeptorabhängiger Signaltransduktionsmechanismen mediiert werden. Da die Nukleotidsequenzen von GnRH-Rezeptoren in Ovarial- und Mammakarzinomen denen des hypophysären Rezeptors entsprechen, wäre es denkbar, daß deren Kopplung an Signaltransduktionsmechanismen ähnlich ist (5, 11). Andererseits wäre es möglich, daß in den Tumorzellen Interaktionen zwischen GnRH-induzierter Signaltransduktion und den Signalwegen bekannter mitogener Stimuli – wie z. B. Wachstumsfaktoren – bestehen. Ein derartiger Mechanismus wurde für GnRH-Wirkungen in Pankreas- und Mammakarzinomen postuliert (12, 13). In gonadotropen Hypophysenzellen führt die Bindung von GnRH an seinen Rezeptor zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese bewirkt die Hydrolyse von Membranphospholipiden und führt zur Produktion von Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DG). IP_3 bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} aus

intrazellulären Speichern. DG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Beide Prozesse sind an der Gonadotropinsekretion und -synthese beteiligt (11). Wachstumsfaktorrezeptoren benutzen einen Signaltransduktionsweg, der zur Induktion der mitogen-activated protein Kinase (MAPK) führt, die ihrerseits zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt (14, 15). Ein entscheidender Prozeß der Initiierung wachstumshormonabhängiger Signaltransduktion ist die Phosphorylierung des Wachstumsfaktorrezeptors. Der Phosphorylierungsgrad wird durch eine spezifische Tyrosinkinase und eine Phosphotyrosin Phosphatase (PTP) reguliert. Der PTP kommt somit möglicherweise eine Rolle als Gegenregulator der Tyrosinkinase-vermittelten proliferativen Aktivität zu (15, 16). Diese Gegenregulation kann auch durch hormonelle Stimuli aktiviert werden. So wurde gezeigt, daß Somatostatin, Somatostatin-Analoga und GnRH-Agonisten in verschiedenen Karzinomzelllinien zu einer erhöhten PTP-Aktivität führen (12, 13, 17).

In der vorliegenden Untersuchung sollte daher geprüft werden, ob der GnRH-Agonist Triptorelin in Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien Signaltransduktionsmechanismen aktiviert, die für den hypophysären GnRH-Rezeptor bekannt sind. Des weiteren sollte untersucht werden, ob der GnRH-Agonist in der Lage ist, Epidermal growth factor (EGF)-induzierte Signaltransduktion und Zellproliferation zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit den humanen Ovarialkarzinomzelllinien EFO-21 und EFO-27 sowie den Endometriumkarzinomzelllinien HEC-1A und Ishikawa durchgeführt.

Materialien und Methoden

Zelllinien und Kulturbedingungen

Die humanen Ovarialkarzinomzelllinien stammen von einem wenig differenzierten serösen Adenokarzinom (EFO-21) und einem mucinösen papillären Adenokarzinom mittleren Differenzierungsgrades (EFO-27) (18, 19). Die HEC-1A-Zelllinie stammt von einem mäßig differenzierten papillären Adenokarzinom des Endometriums, die Ishikawa-Zelllinie wurde aus einem endometrialen Adenokarzinom etabliert (20, 21). Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben in Minimal Essential Medium kultiviert, welches mit Earle's Salzen, 40 IU Insulin/Liter und 10 % fetalem Kälberserum supplementiert wurde (1, 3, 13).

Peptide

Der GnRH-Agonist [D-Trp⁶]-GnRH (Triptorelin) wurde von Ferring Arzneimittel, Kiel, zur Verfü-

gung gestellt. Der Somatostatin-Agonist RC-160 (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂) wurde synthetisiert, wie kürzlich beschrieben (22).

Effekte von Triptorelin auf die Phospholipase C (PLC)-Aktivität

Die Aktivität der PLC wurde durch die Akkumulation von [³H] Inositolphosphat bestimmt (23, 24, 25). Dazu wurden die Zellen 24 h mit myo [2-³H] Inositol markiert und mit 10 µM Triptorelin oder als Kontrolle mit 50 µM Natriumfluorid für 0,5, 1, 5 und 15 min stimuliert. Danach erfolgte die Bestimmung der Inositolphosphatakkumulation (25).

Effekte von Triptorelin auf die Proteinkinase C (PKC)-Aktivität

Die Zelllinien wurden für 20 min oder 48 h mit Triptorelin behandelt und anschließend homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde die PKC-Aktivität mittels eines Phosphorylierungsassays in der Cytosol- und Membranfraktion bestimmt (26, 27).

Effekte von Triptorelin auf die Adenylylcyclase-Aktivität

EFO-21, EFO-27, HEC-1A und Ishikawa-Zellen wurden nach einer 30 min Inkubation mit 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin 24 h mit 10 µM Triptorelin oder 10 µM Forskolin behandelt. Zyklisches AMP (cAMP) wurde mit 65 % Ethanol extrahiert (28). Nach Eindampfung des Lösungsmittels wurde cAMP mittels eines cAMP [¹²⁵I] Scintillation Proximity Assays (Amersham) bestimmt.

Effekte von Triptorelin auf die EGF-induzierte Zellproliferation

Die o. a. Zelllinien wurden unter serumfreien Bedingungen 3 Tage mit 100 nM rekombinantem h EGF (Amersham), Triptorelin (1 nM, 100 nM, 10 µM) oder dem Somatostatin-Analog RC-160 (1 nM, 100 nM, 10 µM) und Kombinationen dieser Substanzen behandelt. Nach diesen Inkubationen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (1).

Effekte von Triptorelin auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung

Es wurden Plasmamembranen von EFO-21, EFO-27 und HEC-1A-Zellen präpariert (29). Die Tyrosinphosphorylierung wurde durch die Phosphorylierung eines für die Kinase spezifischen Substrates (RCM-Lysozym, Gibco, Eggenstein) analysiert. Diese Reaktion erfolgte unter Kontrollbedingungen, unter Zugabe von 1 nM EGF, 10 µM Triptorelin

und dem PTP-Inhibitor Natriumvanadat (100 µM) (12, 30).

Effekte von Triptorelin auf die EGF-induzierte p42 / p44 MAPK-Aktivität

EFO-21, EFO-27 und HEC-1A Zellen wurden 15 min mit 10 µM Triptorelin behandelt, bevor sie 5 min mit 100 nM EGF inkubiert wurden. Nach Homogenisierung und Zentrifugation wurde im Überstand die MAPK-Assays (Amersham) bestimmt (31, 32).

Ergebnisse

Effekte von Triptorelin auf die PLC-Aktivität

Triptorelin induzierte in keiner der Zelllinien die Akkumulation von [³H] Inositolphosphaten. Ein falsch negatives Ergebnis konnte ausgeschlossen werden, da Natriumfluorid ein unspezifischer Stimulator der PLC zu einer deutlichen Steigerung der [³H] Inositolphosphatproduktion führte. Daneben konnte gezeigt werden, daß Triptorelin in Hypophysenzellen zu einer PLC-Aktivierung führte.

Effekte von Triptorelin auf die PKC-Aktivität

Triptorelin war in allen vier Zelllinien ohne Wirkung auf die Translokation der PKC von der cytosolischen in die membrangebundene Form. Hingegen konnte dieser Effekt nach Inkubation der Zellen mit dem Phorbol ester TPA beobachtet werden.

Effekte von Triptorelin auf die Adenylylcyclase-Aktivität

Die Behandlung von EFO-21, EFO-27, HEC-1A und Ishikawa-Zellen mit Triptorelin hatte keinen Effekt auf die cAMP Akkumulation, die nach Forskolin-Inkubation in allen Zellen nachweisbar war.

Effekte von Triptorelin auf die EGF-induzierte Zellproliferation

EGF führte in EFO-21, EFO-27 und HEC-1A-Zellen zu einer signifikanten Proliferation. Im Vergleich zu den Kontrollen waren die Zellzahlen um 20 - 40 % erhöht. In Ishikawa-Zellen, die nach unseren Untersuchungen keine EGF-Rezeptoren besitzen, ließ sich keine Wirkung von EGF nachweisen. Der mitogene Effekt von EGF ließ sich in EFO-21, EFO-27 und HEC-1A-Zellen durch Triptorelin antagonisieren. In hohen Konzentrationen wurde eine Suppression der Proliferation unter das Kontrollniveau beobachtet. Triptorelin alleine hatte ebenfalls einen proliferationshemmenden Effekt. Ähnliche Wirkungen wurden nach Behandlung der Zellen mit RC-160 gemacht. Kombination

nen der Hormonagonisten wiesen auf eine additive Wirkung hin (Abb. 1).

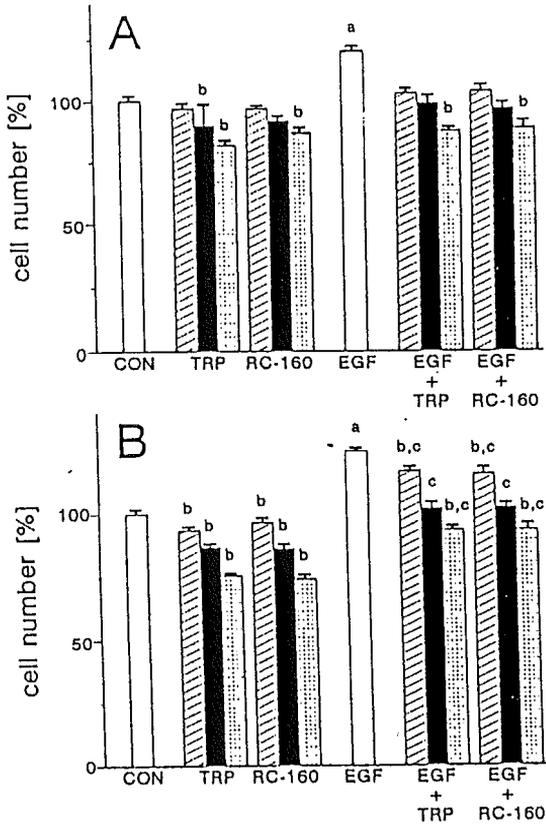


Abb. 1 Effekte von Triptorelin, RC-160, EGF oder Kombinationen dieser Substanzen auf die Proliferation von EFO-21 (A) und HEC-1A-Zellen (B). a, $p < 0.01$ vs alle anderen Gruppen; b, $p < 0.01$ vs Kontrolle (CON); c, $p < 0.01$ vs Triptorelin (TRP) und RC-160

Effekte von Triptorelin auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung

EGF führte zu einer deutlichen Stimulation der Tyrosinphosphorylierung in Membranpräparationen von EFO-21, EFO-27 und HEC-1A-Zellen. Dieser Effekt wurde durch Triptorelin fast komplett supprimiert. Diese Triptorelin-Wirkung war weniger ausgeprägt auch bei zusätzlicher Inkubation mit dem PTP-Inhibitor Vanadat nachweisbar (Abb. 2).

Effekte von Triptorelin auf die EGF-induzierte p42 / p44 MAPK-Aktivität

Triptorelin alleine hatte keinen Effekt auf die MAPK-Aktivität. Die EGF-Behandlung führte allerdings zu einer deutlichen Steigerung der Aktivi-

tät dieses Enzyms. Wenn die Zellen mit Triptorelin vorbehandelt wurden, war dieser EGF-Effekt kaum nachweisbar (Abb. 3).

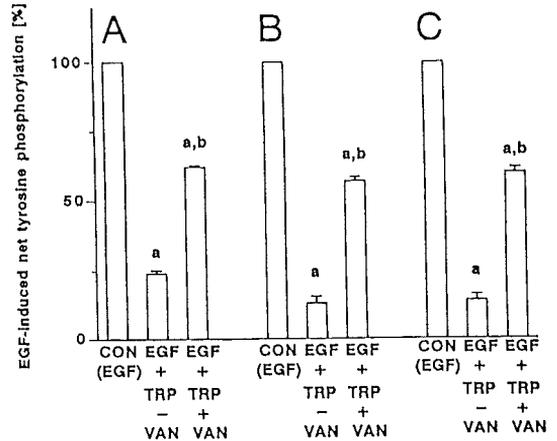


Abb. 2 Effekte von Triptorelin auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung in solubilisierten Membranen von EFO-21 (A), EFO-27 (B) und HEC-1A-Zellen (C) mit und ohne Vanadat (VAN). a, $p < 0.001$ vs Kontrolle (CON); b, $p < 0.001$ vs EGF + TRP - VAN.

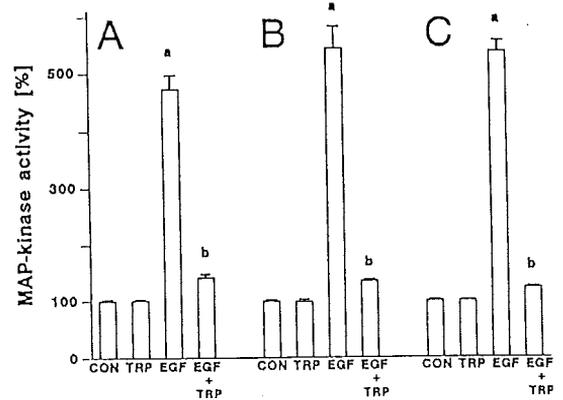


Abb. 3 Effekte von Triptorelin und EGF auf die p42 / p44 MAP-Kinase-Aktivität von EFO-21 (A), EFO-27 (B) und HEC-1A (C)-Zellen. a, $p < 0.001$ vs alle anderen Gruppen; b, $p < 0.001$ vs Kontrolle (CON).

Diskussion

In gonadotropen Hypophysenzellen bewirkt die Bindung von GnRH an seinen G-Protein-gekoppelten Rezeptor die PLC-vermittelte Hydrolyse von Membranphospholipiden, die zur Produktion von IP_3 und DG führt. Die hier aufgeführten Experimente konnten eindeutig nachweisen, daß in den

verwendeten Ovarial- und Endometriumkarzinomzelllinien die Aktivierung des GnRH-Rezeptors nicht zu einer Inositolphosphatakkumulation führt.

Auch die PKC, die bei der Tumorzellproliferation eine Rolle spielen könnte, wurde nicht durch Triptorelin aktiviert. Im Gegensatz dazu konnte Triptorelin in gonadotropen α T3-1 Zellen eine Translokation der PKC induzieren. GnRH bewirkt nach längeren Inkubationszeiten in Hypophysenzellen eine Akkumulation von cAMP. Da dieser second messenger bei prolongierten zellulären Antworten auf extrazelluläre Stimuli eine Funktion haben könnte, wurde die Wirkung von Triptorelin auf die cAMP-Produktion untersucht. Weder nach kurzen noch nach langen Behandlungszeiten mit Triptorelin fanden wir einen Effekt auf die cAMP Konzentration in den Tumorzellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Hypothese verworfen werden, daß der GnRH-Agonist seine Wirkung auf die Tumorzellen über einen PLC-abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt. Es wurde daher geprüft, ob Triptorelin eine PTP aktiviert. Dieses Enzym kann Wachstumshormon-aktivierte Tyrosinkinase-Aktivität inhibieren, die eine Schlüsselfunktion in der mitogenen Signaltransduktion besitzt (12-17). Zunächst wurde gezeigt, daß die EGF-induzierte Zellproliferation der EGF-Rezeptor positiven Zellen (EFO-21, EFO-27, HEC-1A) durch Triptorelin gehemmt werden konnte. Diese Wirkung wurde auch durch RC-160 Behandlung erzielt. Da die Effekte von Triptorelin und RC-160 auch in Abwesenheit von exogenem EGF und in serumfreien Milieu nachweisbar waren, ist eine Interaktion beider Agonisten mit dem endogenen autokrinen Wachstumsfaktorsystem der Tumorzellen wahrscheinlich.

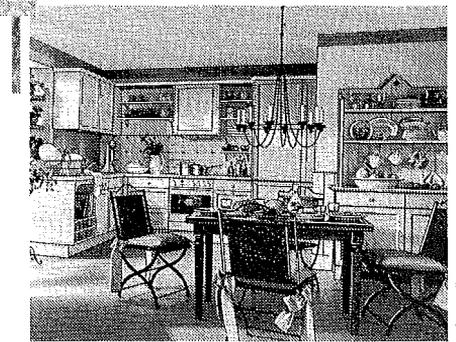
Wir konnten nachweisen, daß Triptorelin keinen Effekt auf die EGF-Rezeptoren von EFO-21, EFO-27 und HEC-1A-Zellen hatte. Daher haben wir untersucht, ob Postrezeptormechanismen durch Triptorelin beeinflusst werden können. Triptorelin hatte einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung. Diese Triptorelin-Wirkung könnte auf der Aktivierung einer PTP beruhen, da der PTP-Inhibitor Vanadat zu einer Abschwächung des Triptorelin-Effektes führte. Diese Hypothese muß durch weitere Experimente, die direkt die Phosphorylierung und Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors oder anderen Substraten der Tyrosinkinase und -phosphatase prüfen, untermauert werden.

Wenn die Inhibition der Tyrosinkinase-Aktivität durch Triptorelin funktionell relevant sein sollte, so wäre zu fordern, daß weiter distal gelegene Pro-

zesse des mitogenen Signaltransduktionsweges ebenfalls inhibiert werden. Dies wurde für die MAPK geprüft, die den letzten zytoplasmatischen Bestandteil dieses Weges darstellt, bevor das Signal im Zellkern die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren bewirkt (14, 15). Die EGF-induzierte Aktivierung der MAPK wurde durch Triptorelin fast komplett supprimiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen eindeutige proliferationshemmende Wirkungen von Triptorelin auf Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen. Ein relevanter Mechanismus, der diesem Effekt zugrundeliegt, besteht in der inhibitorischen Wirkung des GnRH-Agonisten auf den mitogenen Signaltransduktionsweg. Diese Wirkung von Triptorelin läßt sich in Zukunft möglicherweise als effektives therapeutisches Prinzip in der Behandlung des Ovarial- und Endometriumkarzinoms nutzen.

Miele KÜCHEN



Wir beraten Sie gerne.
Ihre Wünsche und unsere Erfahrung
bringen die individuelle Lösung!

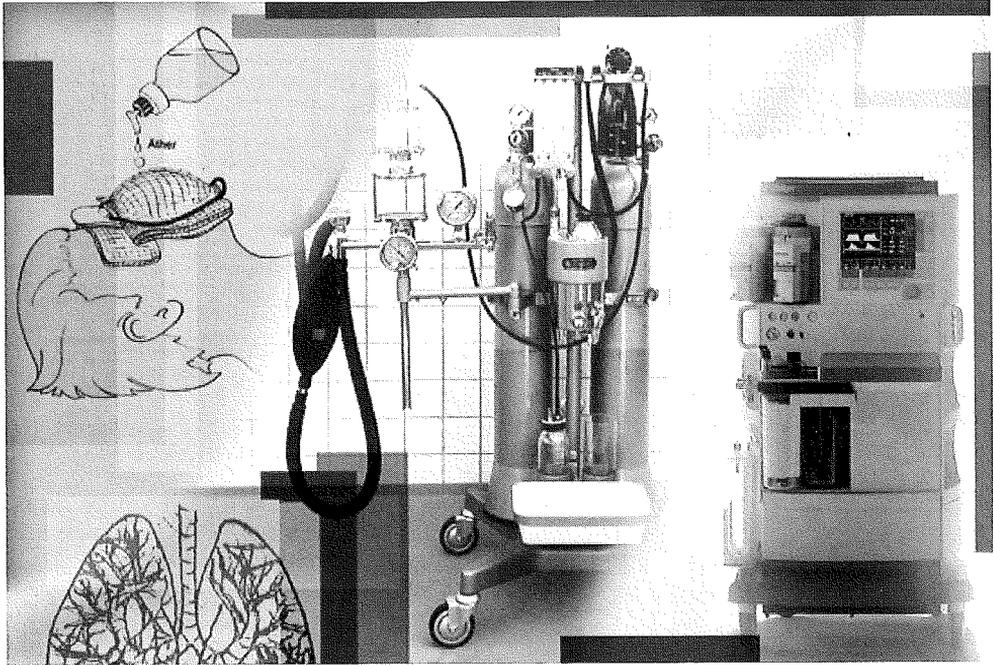
Schöppich hat 'Ihre' Küche

Bad Schwartau / Gewerbegebiet
Langenfelde 2-4 • ☎ 0451-280 880



Literatur

- Emons G, Ortman O, Becker M, Inner G, Springer B, Laun R, Hölzel F, Schulz KD, Schally AV. High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 1993; 53: 5439-5446
- Srkalic G, Wittliff JL, Schally AV. Detection and partial characterization of receptors for [D-Trp6]-luteinizing hormone-releasing hormone and epidermal growth factor in human endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 1841-1846
- Emons G, Schröder B, Ortman O, Westphalen S, Schulz KD, Schally AV. High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1458-1464
- Yano T, Pinski J, Radulovic S, Schally AV. Inhibition of human epithelial ovarian cancer cell growth in vitro by agonistic and antagonistic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1701-1705
- Kakar SS, Grizzle WE, Neill JD. The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 106: 145-149
- Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T. Gonadotropin-releasing hormone receptor in gynecologic tumors. Frequent expression in adenocarcinoma histologic types. *Cancer* 1994; 74: 2555-2561
- Irmer G, Bürger C, Müller R, Ortman O, Peter U, Kakar SS, Neill JD, Schulz KD, Emons G. Expression of the messenger RNAs for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and its receptor in human ovarian epithelial carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 817-822
- Ohno T, Imai A, Furui T, Takahashi K, Tamaya T. Presence of gonadotropin-releasing hormone and its messenger ribonucleic acid in human ovarian epithelial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 605-610
- Irmer G, Bürger C, Ortman O, Schulz KD, Emons G. Expression of luteinizing hormone releasing hormone and its mRNA in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 916-919
- Emons G, Schally AV. The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod* 1994; 9: 1364-1379
- Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 1994; 15: 462-499
- Lee MT, Liebow C, Kamer AR, Schally AV. Effects of epidermal growth factor and analogues of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine residues of specific protein substrates in various tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1656-1660
- Liebow C, Lee MT, Kamer AR, Schally AV. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone receptor binding by heterologous and autologous receptor-stimulated tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2244-2248
- Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80: 179-185
- Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; 80: 225-236
- Walton KM, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 101-120
- Pan MG, Florio T, Stork PJ. G protein activation of a hormone-stimulated phosphatase in human tumor cells. *Science* 1992; 256: 1215-1217
- Simon WE, Albrecht M, Hänsel M, Dietel M, Holzel F. Cell lines derived from human ovarian carcinomas: growth stimulation by gonadotropic and steroid hormones. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70: 839-845
- Kunzmann R, Hölzel F. Karyotype alterations in human ovarian carcinoma cells during long-term cultivation and nude mouse passage. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 28: 201-212
- Kuramoto H, Tamura S, Notake Y. Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 114: 1012-1019
- Nishida M, Kasahara K, Kaneko M, Iwasaki H, Hayashi K. Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1985; 37: 1103-1111
- Cai RZ, Szöke B, Lu R, Fu D, Redding TW, Schally AV. Synthesis and biological activity of highly potent octapeptide analogs of somatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1896-1900
- Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem J* 1982; 206: 587-595
- Emons G, Frevert EU, Ortman O, Fingscheidt U, Sturm R, Kiesel L, Knuppen R. Studies on the subcellular mechanisms mediating the negative estradiol effect on GnRH-induced LH-release by rat pituitary cells in culture. *Acta Endocrinol Copenh* 1989; 121: 350-360
- Ortman O, Bakhit M, Bloh P, Schulz KD, Emons G. Ovarian steroids modulate gonadotropin-releasing hormone-induced biphasic luteinizing hormone secretory responses and inositol phosphate accumulation in rat anterior pituitary cells and α T3-1 gonadotrophs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 54: 101-109
- Hirota K, Hirota T, Aguilera G, Catt KJ. Hormone-induced redistribution of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in pituitary gonadotrophs. *J Biol Chem* 1985; 260: 3243-3246
- Thomas TP, Gopalakrishna R, Anderson WB. Hormone- and tumor promoter-induced activation or membrane association of protein kinase C in intact cells. *Methods Enzymol* 1987; 141: 399-411
- Horn F, Bilezikjian LM, Perrin MH, Bosma MM, Windle JJ, Huber KS, Blount AL, Hille B, Vale W, Mellon PL. Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of the gonadotrope lineage. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 347-355
- Donato NJ, Gallick GE, Steck PA, Rosenblum MG. Tumor necrosis factor modulates epidermal growth factor receptor phosphorylation and kinase activity in human tumor cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 20474-20481
- Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH. Purification of protein-tyrosine phosphatases from human placenta. *Meth Enzymol* 1991; 201: 427-442
- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3', 5'-monophosphate. *Science* 1993; 1065-1069
- Clark-Lewis I, Sanghera JS, Pelech SL. Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* 1991; 266: 15180-15184



Mehr als 150 Jahre ist es nun her, seit Morton 1846 in Boston die moderne Anästhesie einlütete. Erstmals gelang

Ohne Schmerzen

es damals, bei einer Operation den Schmerz wirksam auszuschalten. Vor genau 96 Jahren begann bei Dräger die Geschichte der Anästhesie mit dem ersten Narkoseapparat, dem 1924 das erste Kreissystem der Welt und später noch viele weitere Meilensteine folgten. Ganz aktuell der Julian, ein Anästhesiearbeitsplatz, der in seiner Klasse neue Standards setzt, oder der PhysioFlex, das einzige System für geschlossene Anästhesie. Drägerwerk AG, Medizintechnik, Tel. (0451) 882-4596, <http://www.draeger.com>.

Dräger. Technik für das Leben.

Erhöhte lösliche Interleukin-2-Rezeptor-Serumspiegel korrelieren zu Stadium und Aktivität der Langerhanszell-Histiozytose im Kindesalter

C. Schultz¹, M. Klouche², B. Kroehnert¹, N. Richter¹, P. Bucsky¹

Zusammenfassung

Die Langerhanszell-Histiozytose (LCH) ist eine Erkrankung ungeklärter Ätiologie und Pathogenese. Trotz monoklonaler Proliferation von Langerhanszellen (LC) wird die LCH nicht als maligner Prozeß, sondern als Folge einer gestörten Interaktion immunkompetenter Zellen verstanden. Es konnte gezeigt werden, daß LCH-Zellen ein breiteres Spektrum an Zytokinen als epidermale LC gesunder Probanden produzieren. Welche Bedeutung die Zytokine in der Pathogenese der Erkrankung spielen, ist bisher ungeklärt.

Die Serumspiegel der Zytokine IL-1 β , IL-2, sIL-2R und TNF- α wurden bei sieben Kindern mit verschiedenen Formen der LCH mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse wurden mit einem Normal-kollektiv verglichen.

Der sIL-2R-Serumspiegel war bei allen Kindern mit LCH im Vergleich zu gesunden Erwachsenen (Mean \pm SEM: 5256 \pm 3751 U/ml versus 73 \pm 5.5 U/ml; $p < 0.005$) und gesunden Kindern erhöht (Mean \pm SEM: 10195 \pm 2798 pg/ml versus 2638 \pm 156 pg/ml; $p < 0.01$). Die Höhe korrelierte positiv zum Stadium und zur Aktivität der Erkrankung. In der Phase der Remission kam es zum Abfall der sIL-2R-Serumspiegel. Die Zytokine IL-1 β , IL-2 und TNF- α waren im Serum der untersuchten Patienten nicht erhöht.

Der sIL-2R-Serumspiegel ist bei Kindern mit LCH deutlich erhöht und korreliert zu Stadium und Aktivität der Erkrankung.

Der erhöhte sIL-2R-Serumspiegel spricht für eine pathologisch gesteigerte T-Zellaktivierung als pathogenetischen Faktor der LCH. Darüber hinaus stellt er möglicherweise einen wichtigen Parameter zur Aktivitätsbeurteilung und Prognoseeinschätzung der Erkrankung dar.

Summary

Langerhans cell histiocytosis (LCH) is characterized by monoclonal proliferation of activated Langerhans cells. Neither aetiology nor pathomecha-

nism of this disorder are presently known. However, despite monoclonality LCH seems to be rather a reactive disorder induced by immune dysfunction than a malignant process. To investigate a putative cytokine dysregulation in the pathogenesis of this disorder and searching for parameters of both disease activity and prognosis, serum concentrations of proinflammatory and T-cell derived cytokines were evaluated in LCH patients.

Serum levels of IL-1 β , IL-2, sIL-2R and TNF- α were determined by ELISA in seven children with different types of LCH: Three children (age: six, ten and 14 years, respectively) with single system/single bone disease; one child (11 years) with recurrent single system/multiple bone disease and three children (one, two and two years, respectively) with multisystem disease.

sIL-2R was elevated at diagnosis in seven children as compared to healthy adults (mean \pm SEM: 5256 \pm 3751 pg/ml versus 73 \pm 5.5 pg/ml; $p < 0.005$) or healthy children (mean \pm SEM: 10195 \pm 2798 pg/ml versus 2638 \pm 156 pg/ml; $p < 0.01$). A positive correlation between serum levels of sIL-2R and extent of the disease could be observed ($r = 0.9$; $p < 0.005$). During remission, sIL-2R levels declined. IL-1 β , IL-2 and TNF- α remained within the normal range during the study period.

Elevated sIL-2R levels seem to correlate positively with both extent and activity of LCH, thus indicating a pathological T-cell activation as a pathogenetic factor. sIL-2R level is a promising parameter to monitor disease activity in LCH and may also be of prognostic relevance.

Einleitung

Die Langerhanszell-Histiozytose (LCH) umfaßt eine klinisch heterogene Gruppe von Erkrankungen, deren Ätiologie und Pathogenese bis heute nicht geklärt ist (21). Das klinische Spektrum reicht von einem lokalen Befall mit günstiger Prognose (z.B.: eosinophiles Granulom des Knochens) bis zur Systemerkrankung mit maligner Dignität

(z.B.: Abt-Letterer-Siwe Krankheit) (14). Während Patienten mit lokalisiertem Befall gelegentlich Spontanheilungen zeigen, können multisystemische Erkrankungen einen malignen Verlauf nehmen.

Bisher besteht nur Einigkeit darüber, daß die LCH eine Erkrankung der Langerhanszellen darstellt. Ob es sich hierbei um ein reaktives Phänomen oder um eine maligne Entartung der Zellen handelt, ist unklar. Aufgrund der hohen Rate an Spontanremissionen und dem benignen histopathologischen Aspekt wird die LCH derzeit eher als reaktives Phänomen eingestuft (5, 21).

Es konnte gezeigt werden, daß LCH-Zellen ein breiteres Spektrum an Zytokinen als epidermale Langerhanszellen gesunder Probanden produzieren (12, 22). Die von den LCH-Zellen gebildeten Zytokine GM-CSF und TNF- α sind in der Lage, aus CD 34 positiven Stammzellen und Blutmonozyten eine Differenzierung zu CD 1a positiven antigenpräsentierenden Zellen zu induzieren (6). Die ungehemmte Proliferation der Langerhanszellen bei Patienten mit LCH könnte demnach Folge einer Stimulation durch auto- bzw. parakrine Zytokinsekretion sein. Genauere Untersuchungen zur pathogenetischen Rolle von Zytokinen bei Patienten mit LCH stehen jedoch aus. Ausgehend von einer gestörten Kommunikation auf der Ebene immunkompetenter Zellen untersuchten wir die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α sowie das von T-Lymphozyten produzierte Zytokin IL-2 und dessen löslicher Rezeptor im Serum von Kindern mit LCH und setzten die Höhe der gemessenen Zytokine mit dem Stadium der Erkrankung und dem Verlauf in Beziehung.

Material and Methoden

Es wurden sieben Kinder unterschiedlicher Krankheitsstadien untersucht (Tabelle 1). Die Therapie

erfolgte entsprechend dem LCH-I Protokoll der Histiocyte Society (10).

Die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) sowie Interleukin-2 (IL-2) und der lösliche Interleukin-2 Rezeptor (sIL-2R) wurden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Pat. 2-7), unter Therapie (Pat. 3 und 4) und 1-19 Monate nach Durchführung der Therapie bestimmt (Pat. 1, 2, 3, 4 und 7).

Bei vier Patienten (Pat. 1-4) und 46 gesunden Erwachsenen erfolgte die Analyse mittels ELISA der

Pat. Nr.	Alter	Stadium	Organbeteiligung	Remissionsstatus
1	14,5 J.	1	Knochen	Remission
2	6,3 J.	1	Knochen	Remission
3	5 J.	2	Knochen	Remission
4	25 M.	3	Knochen, KM, DI	Remission
5	11 M.	3	Lunge, Haut, LK	unbekannt
6	30 M.	3	Knochen, Lunge, Haut, Leber	verstorben
7	11 J.	1	Knochen	Remission

Stadium: 1 = monosystemisch; unifokal; 2 = monosystemisch; multifokal; 3 = multisystemisch

KM = Knochenmark; DI = Diabetes insipidus; LK = Lymphknoten

Abkürzungen: J = Jahre; M = Monate

Tabelle 1: Charakteristika der Kinder mit Langerhanszell-Histiozytose

Firma R & D Systems (Methode 1). Aufgrund methodischer Erwägungen wurden die Serumproben von 5 Patienten (Pat. 3-7) und 48 gesunden Kindern mit Kits der Firma Immunotech analysiert (Methode 2). Da für den sIL-2R unterschiedliche Einhei-



Schütt & Grundei Sanitätshaus GmbH

BERUFSKLEIDUNG FÜR MEDIZINER · SAUERSTOFFGERÄTE
REHABILITATIONSMITTEL · KOMPRESSIONSSTRÜMPFE
ROLLSTÜHLE · GESUNDHEITSSANDALEN · KRANKENBETTEN
KRANKENPFLEGEBEDARF · LEIBBINDEN · BRUCHBÄNDER
FUSSEINLAGEN · INHALIERGERÄTE · SAUERSTOFFGERÄTE

**Auch am Klinikum
Ratzeburger Allee 111-125
im Wirth-Center**

Lübeck: Königstraße/Ecke Wahnstr.
Fackenburger Allee 30 a
Ratzeburger Allee 111-125
Grapengießerstraße 21

Bad Schwartau: Lübecker Straße 12

in jedem Fall.....Tel.: 04 51/89 07-0

SEIT ÜBER 20 JAHREN VERTRAGSPARTNER DER ORTHOPÄDISCHEN
KLINIK DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

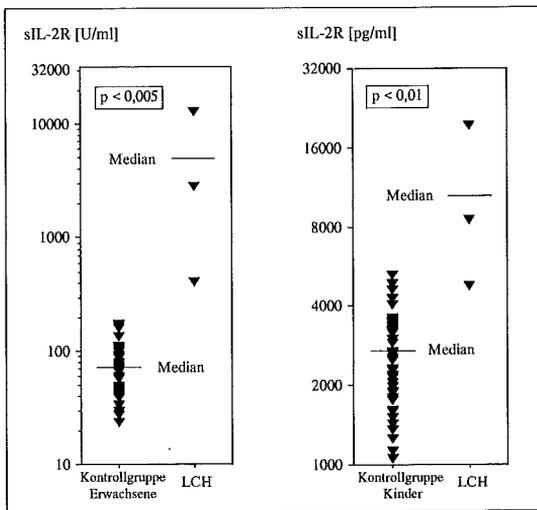


Abb. 1 Der sIL-2R-Serumspiegel ist bei Kindern mit LCH bei Diagnosestellung im Vergleich zu gesunden Erwachsenen ($n = 46$; Methode 1) und gesunden Kindern ($n = 48$; Methode 2) erhöht.

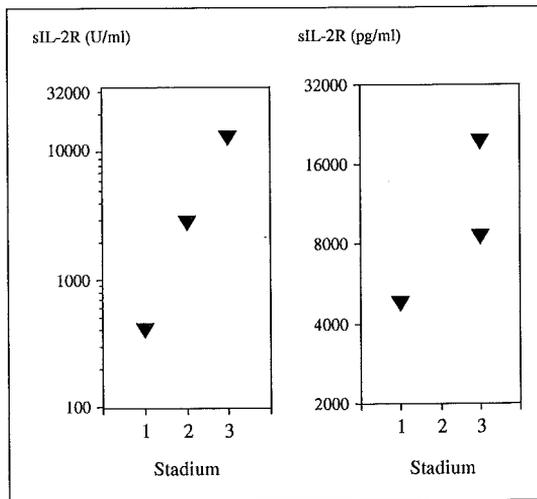


Abb. 2 Die Höhe des sIL-2R-Serumspiegel korreliert mit dem Stadium der LCH. Aufgrund der geringen Fallzahl in den beiden Gruppen ist eine statistische Prüfung der beiden Gruppen nicht zulässig. Stadium: 1 = monosystemisch, unifokal; 2 = monosystemisch, multifokal; 3 = multisystemisch

ten in Methode 1 und 2 verwandt wurden, sind die Meßwerte nicht vergleichbar. Es wurde deshalb für beide Methoden eine Kontrollgruppe gebildet.

Die Probenentnahmen gesunder Kinder erfolgten im Rahmen einer präoperativen Blutentnahme im Einverständnis mit den Eltern, die Probenentnah-

Pat. Nr.	Diagnose	unter Therapie	nach Therapie	Referenzbereich
Methode 1 (R & D systems) (U/ml)				
1	–	–	190	< 150
2	393	–	291	< 150
3	2740	1624	460	< 150
4	12635	9850	943	< 150
Methode 2 (Immunotech) (pg/ml)				
3	–	–	13929	< 4500
4	–	–	4752	< 4500
5	19133	–	–	< 4500
6	8450	–	–	< 4500
7	4711	–	3664	< 4500

Tabelle 2: sIL-2R-Serumspiegel bei Kindern mit LCH

men Erwachsener nach Aufklärung im Rahmen einer Blutspende. Die Abnahme erfolgte in Lithium-Heparin (R & D Systems) oder EDTA versetzten Probenröhrchen (Immunotech). Nach Zentrifugation wurde das Plasma auf -80°C bis zur Messung tiefgefroren. Einmal aufgetautes Material wurde nach der Messung verworfen.

Die Bestimmung der Zytokine erfolgte mittels ELISA entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (R & D Systems, vertrieben von Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland; Immunotech, Frankreich, vertrieben von Dianova-Immunotech GmbH, Hamburg, Deutschland). Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Nachweisgrenze betrug 5 pg/ml für IL-1 β , IL-2, TNF- α (R&D, Immunotech), 5 U/ml für sIL-2R (R&D) sowie 200 pg/ml für sIL-2R (Immunotech).

Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests verglichen und auf Signifikanz geprüft. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Ergebnisse wurden als Median \pm Standard Error of the Mean (SEM) angegeben.

Ergebnisse

Bei Diagnosestellung war der sIL-2R im Serum von Kindern mit LCH im Vergleich zu gesunden Erwachsenen (Methode 1: 5256 ± 3751 U/ml versus $73 \pm 5,5$ U/ml; $p < 0,005$) und gesunden Kindern (Methode 2: 10195 ± 2798 pg/ml versus 2638 ± 156 pg/ml; $p < 0,01$) erhöht (Abb. 1).

Die Höhe korrelierte positiv zum Stadium und zur Aktivität der Erkrankung. Trotz der geringen Patientenzahl bestätigt sich diese Beobachtung in beiden Methoden (Abb. 2). Eine statistische Prüfung der Korrelation war aufgrund der geringen Fallzahl der beiden Gruppen nicht zulässig.

Drei Kinder mit lokalisiertem Befall (Patient 1, 2 und 7) wiesen erhöhte sIL-2R-Serumspiegel auf. Noch höhere Serumspiegel konnten bei den Kindern mit multifokalem Befall oder multisystemischer Erkrankung nachgewiesen werden (Patient 3, 4, 5 und 6; Tab. 2). In der Phase der Remission kam es zum deutlichen Abfall der sIL-2R-Serumspiegel (Patient 2, 3, 4 und 7; Tab. 2).

Das Zytokin IL-2 konnte nur bei einem Mädchen mit multisystemischer Erkrankung bei Diagnosestellung nachgewiesen werden (Patient 4). Die Zytokine IL-1 β und TNF- α lagen im Normbereich oder waren nicht nachweisbar.

Diskussion

Die Langerhanszell-Histiozytose ist eine Erkrankung ungeklärter Ätiologie, die durch eine Proliferation von Langerhanszellen charakterisiert ist (9, 17). Obwohl Langerhanszell-Histiozytose-Zellen mehr kostimulatorische Marker als normale Langerhanszellen exprimieren, ist deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation deutlich eingeschränkt (7, 24). Darüber hinaus produzieren sie eine größere Zahl an Zytokinen, verglichen mit epidermalen Langerhanszellen (12, 22). Es konnte gezeigt werden, daß die Zytokine GM-CSF und TNF- α eine Reifung von CD 34 positiven Stammzellen zu dendritischen Zellen induzieren können (6). Eine pathologisch gesteigerte Zytokinproduktion könnte demnach die Proliferation von Langerhanszellen bewirken bzw. unterhalten. Auch die typischen Symptome Fieber, Gedeihstörung und Osteolysen können Folge einer pathologisch gesteigerten Zytokinproduktion sein.

Der Nachweis klonaler LCH-Zellen deutet auf eine Mutation als Ursache der Langerhanszellproliferation hin (20, 23). Das Auftreten von Spontanremissionen (5) und der normale DNA-Gehalt von LCH-Zellen (15) sprechen jedoch gegen das Vorliegen einer malignen Erkrankung. Eine monoklonale Proliferation kann auch Folge einer chronischen Stimulation sein, vergleichbar mit der Proliferation eines B-Zellklons nach Antigenkontakt. Unter ähnlichen Bedingungen können ebenso LC-Klone selektioniert werden. Der Nachweis des Interleukin-2 Rezeptors auf LCH-Zellen zeigt, daß es sich hierbei um aktivierte Zellen handelt (3, 8) und unterstützt die Hypothese einer pathologischen Aktivierung.

Bisher gibt es weder einen Hinweis auf ein gestörtes Immunsystem bei Patienten mit LCH noch konnten erhöhte Spiegel des löslichen Interleukin-2 Rezeptors im Serum nachgewiesen werden (12, 13, 16). Im Gegensatz dazu konnten wir bei allen untersuchten Kindern mit LCH unterschiedlicher

Stadien erhöhte sIL-2R-Serumspiegel messen (18). Der sIL-2R gilt als Marker einer starken Antigenstimulation und kann bei Erkrankungen, die mit einer T-Zellaktivierung einhergehen, wie z. B. der Graft versus Host Disease, der T-Zell-Leukämie, dem nephrotischen Syndrom und bei Autoimmunerkrankungen gefunden werden (4, 11, 19). Aus der Gruppe der histiozytären Erkrankungen wurde bisher nur bei Kindern mit hämophagozytischer Lymphohistiozytose ein erhöhter sIL-2R-Serumspiegel beschrieben (13).

Bei sieben Kindern mit LCH konnten wir eine positive Korrelation zwischen der Höhe des sIL-2R und dem Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nachweisen. Abfallende sIL-2R-Serumspiegel unter der Therapie betonen die Rolle des IL-2/sIL-2R-Komplexes in der Pathogenese der Erkrankung. Die gesteigerte sIL-2R Produktion könnte Folge eines ausbleibenden negativen Feedbacks auf dem Boden einer gestörten Antigenpräsentation (7, 24) zwischen der Langerhanszelle und dem T-Lymphozyten sein (Abb. 3).

IL-2 spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation der Apoptose aktivierter T-Lymphozyten. Unter dem Einfluß von IL-2 wird die Apoptose durch Hochregulation apoptosehemmender Proteine

Hypothese zur Pathogenese der LCH

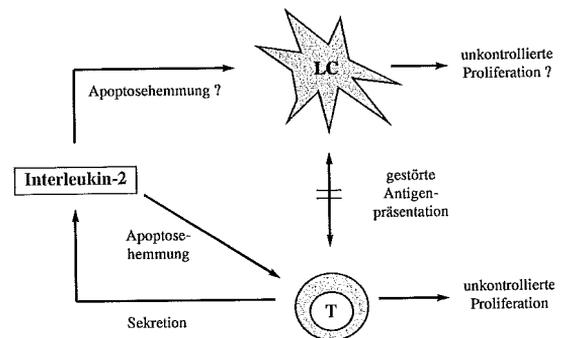


Abb. 3 Die Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Langerhanszelle (LC) und T-Lymphozyt (T) führt zur Produktion von Interleukin-2. Aufgrund einer verminderten Fähigkeit der LCH-Zelle zur Antigenpräsentation (7, 24) könnte über einen ausbleibenden negativen Feedback vermehrt Interleukin-2 von T-Lymphozyten sezerniert werden. Interleukin-2 kann die Apoptose aktivierter T-Lymphozyten (1, 2) und möglicherweise auch der LCH-Zellen, die den IL-2 Rezeptor exprimieren, blockieren. Die Folge wäre eine unkontrollierte Proliferation dieser Zellen.

verhindert (2). Feinste Störungen in diesem Regelkreis erlauben eine unkontrollierte Proliferation von T-Lymphozyten und möglicherweise auch von Langerhanszellen, die den IL-2R ebenfalls exprimieren (3, 8). Die Bedeutung des IL-2R in der Unterdrückung der Apoptose wird durch die Beobachtung unterstützt, daß die Zytokine IL-4, IL-7 und IL-15 ihre apoptosehemmende Wirkung ebenfalls über diesen Rezeptor entfalten (1).

Obwohl unsere Ergebnisse nicht den zugrundeliegenden Pathomechanismus der LCH erklären können, betonen sie die Rolle der T-Lymphozyten und deren Interaktion mit antigenpräsentierenden Langerhanszellen in der Pathogenese der Erkrankung.

Werden weitere Untersuchungen diese Ergebnisse bestätigen, so kann der sIL-2R einen verlässlichen Parameter zur Aktivitätsbeurteilung und Prognoseeinschätzung der Erkrankung darstellen.

Danksagung

Die Arbeit wurde durch die „Lübeck-Hilfe für krebskranke Kinder e.V.“ unterstützt.

Literatur

1. Akbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG et al: Interleukin-2 receptor common γ -chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol* 26: 294-299, 1996
2. Akbar AN, Salmon N: Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death. *Immunol Today* 18: 72-76, 1997
3. Barbey S, Gane P, Pelletier OL et al: Histiocytosis X Langerhans cells react with antiinterleukin-2 receptor monoclonal antibody. *Pediatr Pathol* 7: 569-574, 1987.
4. Bock GH, Ongkingco JR, Patterson LT et al: Serum and urine soluble interleukin-2 receptor in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 7: 523-528, 1993
5. Broadbent V, Pritchard J, Davies EG: Spontaneous remission of multisystem histiocytosis X. *Lancet* 1: 253-254, 1984.
6. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D et al: GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261, 1992.
7. Chu T, Jaffe R: The normal Langerhans cell and the LCH cell. *Br J Cancer* 70: (Suppl. XXIII) S4-10, 1994.
8. Emile JF, Freitag S, Leborgne M et al: Langerhans' cell histiocytosis cells are activated Langerhans' cells. *J Pathol* 174 (2): 71-76, 1994.
9. Favara BE, Jaffe R: The histopathology of Langerhans cell histiocytosis. *Br J Cancer* 70 (Suppl. XXIII) S17-S23, 1994 .
10. Gadner H, Heitger A, Grois N et al: A treatment strategy for disseminated Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol* 23: 72-80, 1994
11. Greene WC, Leonard WJ, Depper JM et al: The human interleukin-2 receptor: normal and abnormal expression in T cells and in leukemias induced by the human T-lymphotropic retroviruses. *Ann Intern Med* 105: 560-572, 1986.
12. Kannourakis G, Abbas A: The role of cytokines in the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. *Br J Cancer* 70: (Suppl. XXIII) S37-40, 1994.
13. Komp DM, McNamara J, Buckley P: Elevated soluble interleukin-2 receptor in childhood hemophagocytic histiocytic syndromes. *Blood* 73: 2128-2132, 1989.
14. Lichtenstein P: Histiocytosis X. Integration of eosinophilic granuloma of bone, „Letterer-Siwe Disease“, and „Schüller-Christian Disease“ as related manifestations of a single nosologic entity. *Arch Pathol* 56: 84-102, 1953.
15. McLelland J, Newton JA, Malone M et al: A flow cytometric study of Langerhans cell histiocytosis. *Br J Dermatol* 120: 485-491, 1989.
16. Nesbit M, O'Leary M, Dehner LP et al: Histiocytosis. The immune system and the histiocytosis syndromes. *Am J Pediatr Hemat Oncol* 3: 141-149, 1981
17. Nezelof C, Basset F, Rousseau MF: Histiocytosis: Histogenetic arguments for a Langerhans' cell origin. *Biomedicine* 18: 365-371, 1973.
18. Schultz C, Wößmann W, Klouche M et al: Serum analyses of cytokines in three children affected by different types of Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol (Abstract)* 25: 155, 1995.
19. Waldmann TA: The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Immunol Today* 14: 264-269, 1993.
20. Willman CL, Busque L, Griffith BB et al: Langerhans cell histiocytosis (Histiocytosis X): a clonal proliferative disease. *N Engl J Med* 331: 154-160, 1994.
21. Writing Group of the Histiocyte Society. Histiocytosis syndromes in children. *Lancet* 1: 208-9, 1987.
22. Yu R, Buluwela L, Alaibac M et al: Cytokine expression by human epidermal Langerhans cells and Langerhans cell histiocytosis cells. *Br J Dermatol* 129 (S42), 29, 1993.
23. Yu RC, Chu C, Buluwela L et al: Clonal proliferation of Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Lancet* 343: 767-768, 1994.
24. Yu RC, Morris JF, Pritchard J et al: Defective alloantigen-presenting capacity of Langerhans histiocytosis cells. *Arch Dis Child* 67: 1370-72, 1992.

Warum hat Heinz B. immer noch kein eigenes Haus ?



Eigentlich wollte Heinz B. (34) für sich und seine Familie schon lange ein Stadthaus kaufen. Doch seit zwei Jahren „wackelt“ sein Arbeitsplatz, und deshalb hat er Angst vor dem Risiko.

Das soll und kann sich jetzt ändern. SCHÜTT bietet die Lösung und die Sicherheit:



Das ist einmalig in Deutschland !!!

Die RÜCKNAHME-GARANTIE gilt:

- Für alle Immobilienverkäufe •
- 5 Jahre ab Kaufvertrag ohne Angabe von Gründen •
- 90 % des notariellen Kaufpreises werden zurückerstattet •

Darüber sollten wir sprechen!

Wir laden Sie ein zum ausführlichen Infogespräch nach persönlicher Terminabstimmung:

Vertriebsbüro Hamburg, Tel.: 040/220 15 10

Vertriebsbüro Lübeck, Tel.: 0451/47 00 11 11



Friedrich Schütt + Sohn Baugesellschaft mbH & Co.KG,
Wisbystraße 2, 23558 Lübeck, Tel.: (0451) 47 00 11 11

Bauen mit Vertrauen

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Weerda)¹, University of Wisconsin, Department of Medicine K4/666 (Direktor: Prof. Dr. med. H. I. Robins, PhD)², aus der Klinik für Strahlentherapie und Nuklearmedizin (Direktor: Prof. Dr. med. E. Richter)³ und der Medizinischen Klinik I der Medizinischen Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. H. L. Fehm)⁴ für die Systemic Hyperthermia Oncology Working Group*:

FIRE AND ICE – Ganzkörperhyperthermie kombiniert mit Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE) bei Patienten mit Kopf- und Halsmalignomen

K. Sommer¹, D. M. Katschinski², M. Mentzel⁴, R. Touhidi⁴, S. Remmert¹, T. Feyerabend³, G. J. Wiedemann¹

Zusammenfassung

Präklinische Untersuchungen an menschlichen Tumorzellen in vitro und an menschlichen Tumorexograften, die auf Nacktmäusen wuchsen, führten zum Nachweis einer erheblichen Verbesserung des therapeutischen Index einer Ifosfamid- und Carboplatinchemotherapie unter einer gleichzeitig verabreichten Ganzkörperhyperthermie. Die maximal tolerable Dosis (MTD) jedes Medikaments wurde unter den Bedingungen einer 41.8° C Ganzkörperhyperthermie (für 60 Minuten) im Tierversuch ermittelt. Anhand dieser Daten wurden die Zytostatikadosen für klinische Phase I/II Studien abgeschätzt. An diese präklinischen Untersuchungen schlossen sich zwei klinische Phase I/II Studien an Krebspatienten mit unheilbaren Leiden an (Carboplatin plus 41.8° C Ganzkörperhyperthermie; Ifosfamid plus Carboplatin plus 41.8° C Ganzkörperhyperthermie). Nach einer Dosisescalation des Ifosfamids bei einer konstanten Carboplatindosis von 300 mg/m² wurde die Ifosfamiddosis auf 5g/m² festgelegt. Etoposid (100 mg/m², Tage 1-3) wurde dem Chemotherapieschema (ICE) zugefügt. Es schlossen sich zwei klinische Phase II Studien zur Prüfung von ICE plus 41.8° C Ganzkörperhyperthermie (Therapieoptimierungsstudien) bei Patienten mit bis dahin therapierefraktären Sarkomen (inoperable, metastasierende Leiden) an. Durchschnittlich wurde bei jedem zweiten Patienten mit einem therapierefraktären Sarkom eine Tumorregression festgestellt, die zwischen 3-4 Monaten anhielt. Die Lebenserwartung dieser Patienten betrug durchschnittlich 12 Monate. Die dosislimitierende Toxizität (DLT) war die Knochenmarkstoxizität (WHO IV). Die aus der Literatur bekannten Ansprechraten für konventionell hoch dosierte Chemotherapie ohne Ganzkörperhyperthermie liegen bei 6-8 %; die mittlere Lebenserwartung der Patienten mit therapierefraktären Sarkomen liegt bei 3-4 Monaten (32). Auf der

Grundlage dieser Daten wurde die prospektiv randomisierte klinische Phase III Studie (Multizenterstudie: ICE plus 41.8° C Ganzkörperhyperthermie versus ICE) bei Patienten mit de novo diagnostizierten metastasierenden G II-III Sarkomen von den deutschen öffentlich-rechtlichen Ethikkommissionen Lübeck, Essen und Frankfurt sowie von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) und dem National Cancer Institute (NCI) genehmigt. In unserer gemeinsamen Arbeitsgruppe (Systemic Hyperthermia Oncology Working Group*) werden wir 130-150 Patienten behandeln um endgültig zu klären, ob die Kombination der ICE Chemotherapie mit Ganzkörperhyperthermie der alleinigen Gabe von ICE Chemotherapie überlegen ist.

Neben den klinischen Phase II Therapieoptimierungsstudien mit ICE mit Ganzkörperhyperthermie bei Patienten mit metastasierendem Mammarkarzinom und Ovarialkarzinom, sowie mit metastasierendem nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom wurde kürzlich eine neoadjuvante klinische Phase I/II Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom des Oropharynx inanguriert.

* Institutionen der Systemic Hyperthermia Oncology Working Group und der damit assoziierten Forschergruppen (Mitglieder): Medizinische Universität Lübeck (S. Eleftheriadis, Th. Feyerabend, F. Heits, B. Jäger, W. Jelkmann, W. Kühnel, A. S. Mendoza †, M. Mentzel, H. Pagel, E. Richter, P. Schmucker, P. Sieg, K. Sommer, R. Touhidi, Th. Wagner, H. Weerda, C. Weiss, G. J. Wiedemann, W. Wössmann); Universität Essen (W. Harvers, R. van Heek-Romanowski); Nordwest Krankenhaus Frankfurt (D. Jäger, E. Jäger, A. Knuth); University of Amsterdam, Niederlande (R. C. Rietbroek); University of Rotterdam, Niederlande (C. van der Zee); University of Bergen, Norway (O. Dahl, J. Geisler, O. Mella); University of Wisconsin, Clinical Cancer Center, Madison WI, USA (W. Gillis, E. Grosen, D.M. Katschinski, M. Kutz, W. Longo, D. L. Mulkerin, F. d'Oleire, H. I. Robins, R. Steeves, B. Storer, C. L. Tiggelaar); Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA (D. Spriggs); University of Colorado, Denver CO, USA (J. D. Cohen)

Summary

Preclinical experiments in our laboratories has shown synergistic cytotoxicity with hyperthermia and simultaneously applied DNA damaging agents (alkylating agents and platinum analogs). The combination of 41.8° C (60 min.) whole body hyperthermia with ifosfamide and carboplatin resulted in increased tumor cell killing over chemotherapy alone. However, despite the increased cytotoxicity, the main side effect of chemotherapy, bone marrow suppression was not worsened by concurrent whole body hyperthermia and chemotherapy. Thus, our preclinical studies are consistent with the concept that 41.8° C whole body hyperthermia can enhance the therapeutic index of specific chemotherapeutic agents. These laboratory investigations resulted in two phase I clinical studies, which also support this hypothesis. These trials were extended to two sequential phase II investigations of 41.8° C whole body hyperthermia plus ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE chemotherapy) for refractory sarcoma. An earlier phase II trial combined 41.8° C (x60 min.) extracorporeal whole body hyperthermia with ICE chemotherapy, i.e. ifosfamide (5 g/m², d1), carboplatin (300 mg/m², d1) and etoposide (given with whole body hyperthermia at d1, as well as, d2 and d3 post whole body hyperthermia at 100 mg/m²). Therapy was given every 4 weeks. This study closed prematurely after the accrual of 12 patients due to unacceptable (reversible) cardiopulmonary, and renal toxicity. In spite of this toxicity, 7 partial remissions (PR) were observed (58 %); 3 patients experienced disease stabilization. To reduce morbidity, a less toxic whole body hyperthermia technology, i. e. the radiant heat *Aquatherm* was adopted to combine with ICE chemotherapy as described above. Projections regarding the elimination of cardiopulmonary/renal morbidity were correct. After the completion of this phase II trial a randomized multi-institutional phase III trial for refractory sarcoma was initiated. This study will represent the first comparison of 41.8° C whole body hyperthermia with standard ICE chemotherapy to ICE chemotherapy alone. On the basis of the presented clinical experience the first *neoadjuvant* phase I/II trial with whole body hyperthermia plus ICE chemotherapy for advanced head and neck cancer has been initiated. An international cooperative whole body hyperthermia group using only group protocols, identical whole body hyperthermia equipment, and having a central operations office has been formed. The group is funded by the Cancer Research Institute, NYC, NY, USA. A NCI approved data audit system is in place. International ba-

sed studies have institutional review board approvals, as well as approval at the federal level. The American Food and Drug Administration has approved the distribution of the whole body hyperthermia equipment and protocols to member institutions.

Einleitung

In Studien an menschlichen Tumorzellen in vitro und an Tumorexograften, die auf Nacktmäusen wuchsen, zeigten wir, daß eine Erhöhung der Tumortemperatur (Hyperthermie) allein zwar kaum eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum hat (40-43, 47), den zytotoxischen Effekt einiger Zytostatika jedoch deutlich verstärkt (Übersicht: 45, 46). Insbesondere nimmt die Wirkungsstärke klinisch wichtiger alkylierender Zytostatika, wie Ifosfamid und Carboplatin in Kombination mit Hyperthermie deutlich zu (3-4, 19, 36, 41, 43, 47). Die präklinischen Untersuchungen zur Wirkungsverstärkung des Ifosfamids durch eine 41° C Ganzkörperhyperthermie (60 Minuten lang) ergaben, daß die therapeutische Effektivität um den *Faktor 3 bis 5*, hingegen die für Alkylanzien kritische Myelotoxizität nicht zunimmt (36, 43, Übersicht: 52).

Eine kombinierte Therapie mit Ganzkörperhyperthermie und ICE- Chemotherapie könnte grundsätzlich alle notwendigen Voraussetzungen zur Verbesserung der bisher schlechten Therapieergebnisse bei Patienten mit fortgeschrittenen Malignomen im Kopf- und Halsbereich erfüllen.

Methoden

Präklinische Basis für die Kombination von Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid (ICE) mit 41.8°C Ganzkörperhyperthermie

1. Antitumoreffekt

Es ist allgemein anerkannt, daß DNA schädigende Zytostatika wie Ifosfamid und Carboplatin, wenn sie *gleichzeitig* mit Hyperthermie gegeben werden, sehr viel effektiver maligne Zellen zerstören. Es gibt viele Gründe für die Ursache dieser Wirkungsverstärkung durch Hyperthermie (Übersicht:26). Wahrscheinlich ist aber die Hemmung der Reparaturmechanismen, verursacht durch eine Synthesehemmung von NAD⁺ (34, 36) aufgrund der Hyperthermie, für diesen Effekt verantwortlich (Übersicht: 26, 27). Für Alkylantien wie Ifosfamid und Cyclophosphamid ist belegt, daß die Alkylierungsrate mit der Temperatur zunimmt (19). Für Carboplatin konnte in vivo eine gesteigerte Platinum/DNA Addukt-Formierung unter Ganzkörperhyperthermie gezeigt werden (23). Gleichzeitig wird

die Tumordurchblutung und Tumorgewebeoxygenierung gesteigert (9, 31). Die verbesserte Tumordurchblutung fördert den Antransport der Zytostatika und hilft dadurch wirksame Zytostatikakonzentrationen selbst in vorher schlecht durchbluteten Tumorbezirken zu erreichen (20, 43). In diesen präklinischen Untersuchungen konnte eine Wirkungsverstärkung des Ifosfamids um den Faktor 2,5 gezeigt werden (Dose enhancement ratio DER=2,5) (19, 43). Für Carboplatin ist sogar eine DER von 4,5 beschrieben worden (3, 4). Eine Wirkungsverstärkung des Etoposids *gleichzeitig* mit Hyperthermie gegeben, wurde bisher nicht beobachtet (3). Etoposid wirkt am besten, wenn die intrazellulären NAD⁺ Konzentrationen am höchsten sind (1); unter Ganzkörperhyperthermie fallen die intrazellulären NAD⁺ Konzentrationen akut drastisch ab (27); Hyperthermie *gleichzeitig* mit Etoposid eingesetzt führt daher sogar zu einem Wirkungsverlust des Zytostatikums. Allerdings wurden 24 Stunden nach Ganzkörperhyperthermie beim Menschen stark überschießende intrazelluläre NAD⁺ Konzentrationen (*overshoot*) gemessen (27). Etoposid muß also frühestens 24 Stunden nach der Ganzkörperhyperthermie gegeben werden (15).

2. Toxizität am kritischen

Normalgewebe Knochenmark

Die Steigerung der zytotoxischen Wirkung der Chemotherapie müßte wegen der unspezifischen und praktisch nur antiproliferativen Wirkung der Zytostatika das Tumorgewebe gleichermaßen wie das kritische Normalgewebe mit vielen proliferierenden Progenitorzellen treffen. Der therapeutische Index müßte konstant bleiben; eine höhere Wirkungsstärke der Chemotherapie würde mit einer verstärkten Toxizität erkaufte werden müssen. Interessanterweise konnten weder in den präklinischen in vivo Studien noch in den klinischen Studien eine gesteigerte Knochenmarktoxizität für Zytostatika unter Ganzkörperhyperthermie verglichen mit den exakt gleich hoch dosierten Zytostatika ohne Ganzkörperhyperthermie beobachtet werden (21, 23, 43, 44). Die im Vergleich zur gesteigerten Antitumorwirkung geringere Myelotoxizität ist zunächst als *Myeloprotektion* beschrieben worden (24). Mittlerweile wissen wir, daß das Knochenmark nicht etwa durch eine Ganzkörperhyperthermie (z. B. über die Induktion von *heat shock proteins*) (16, 53) geschützt wird, sondern daß die Ganzkörperhyperthermie Zytokine und Wachstumshormone induziert (7, 8, 11, 13, 14, 17, 18, 21, 24) und damit die Knochenmarksprogenitorzellen stimuliert (12). Im Rahmen dieser Untersuchungen über die Zytokinproduktion in Abhän-

gigkeit von einer Ganzkörperhyperthermie konnte unsere Arbeitsgruppe erhöhte Konzentrationen von granulocyte stimulating factor (G-CSF), Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF- α) sowie des regulatorisch wirkenden IL-10 zeigen (24). Für die genannten Zytokine konnte eine Erhöhung von bis zu 600 % verglichen zu Ausgangswerten vor Therapie nachgewiesen werden (24). Diese Spitzenkonzentrationen werden etwa 3 Stunden nach 41.8° C (über 60 Minuten) Ganzkörperhyperthermie im peripheren Blut erreicht (24). Die Induktion von G-CSF, IL-1 β und IL-6 hat direkt stimulatorische Wirkung auf Knochenmarksstammzellen, so daß durch die verstärkte Bildung dieser Zytokine im peripheren Blut eine Stimulation der Hämatopoese erklärt werden kann.

Im Gegensatz zu den obengenannten Zytokinen konnte im peripheren Blut keine erhöhten Konzentrationen der folgenden Faktoren nachgewiesen werden: granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Interferon γ , IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-11, IL-12, macrophage colony stimulating factor und macrophage inflammatory protein 1 α . Erhöhte Konzentrationen für IL-3 nach Ganzkörperhyperthermie waren nur inkonstant meßbar (25). Da neben dem G-CSF besonders IL-3 und GM-CSF als hämatopoetische Wachstumsfaktoren eine bedeutende Rolle spielen, ist die Bildung dieser Zytokine weiter untersucht worden. Untersuchungen über den Konzentrationsverlauf dieser Zytokine im zirkadianen Verlauf vor und nach Ganzkörperhyperthermie ergaben, daß GM-CSF weder vor noch nach Therapie im peripheren Blut der Tumorpatienten nachweisbar ist. Zusätzlich zu den Wachstumsfaktoren der weißen Blutzellreihe untersuchten wir Erythropoietin (EPO) (13) und Thrombopoietin (8) im peripheren Blut. In diesen Untersuchungen konnte eine signifikante EPO-Erhöhung im peripheren Blut 12-24 Stunden nach Ganzkörperhyperthermie unabhängig von Schwankungen des Hämoglobins nachgewiesen werden (13).

Im peripheren Blut ergibt sich somit das Bild einer Ganzkörperhyperthermie induzierten typischen monozytären Stimulation. Für einige Monokine, v. a. IL-1 β , IL-6 und TNF ist aus in vitro Untersuchungen bekannt, daß sie Knochenmarksstromazellen zur Zytokinproduktion anregen können. Vor allem die Produktion von IL-3 und GM-CSF kann auf diese Weise reguliert werden. Im Knochenmarkblut ganzkörperhyperthermierter Patienten konnten wir dann auch signifikant erhöhte IL-3 und GM-CSF Konzentrationen nachweisen (12). Ganzkörperhyperthermie führt also zu einer

Stimulation von Monozyten im peripheren Blut. Neben einer direkt stimulatorischen Wirkung der neu produzierten Monokine auf Knochenmarkstammzellen, kommt es zusätzlich als Folgereaktion zur Zytokinproduktion im Knochenmark (12).

Klinische Basis für die Kombination von Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid mit 41.8°C Ganzkörperhyperthermie

Robins et al. veröffentlichten 1993 eine klinische Phase I Studie über Carboplatin (Dosiseskala­tion von 100 mg/m² bis 575 mg/m²) und Ganzkörperhyperthermie (41.8° C für 60 Minuten) bei 30 Patienten mit therapierefraktären Tumoren (23; Übersicht: 26). Patienten mit kompletter oder partieller Remission oder minor response wurden in vierwöchentlichen Abständen bis zu fünfmal mit Carboplatin und Ganzkörperhyperthermie behandelt. Die dosislimitierende Toxizität bestand in der Myelosuppression, wobei auf dem jeweiligen Dosisniveau keine signifikante Differenz für Carboplatin alleine oder Carboplatin und Ganzkörperhyperthermie bestand. Des weiteren konnte keine klinisch relevante Nephrotoxizität beobachtet werden. Sechs Patienten sprachen auf die Behandlung an: zwei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen zeigten eine Normalisierung der Tumormarker, ein Patient mit einem gastrointestinalen neuroendokrinen Tumor mit Lebermetastasen erreichte eine komplette Remission, die über ein Jahr anhielt. Nach dem Rezidiv konnte durch Cisplatin und Etoposid ohne Ganzkörperhyperthermie erneut eine Vollremission erzielt werden. Ein Patient mit Pankreaskarzinom und ein Patient mit Dünndarmkarzinom erreichten partielle Remissionen mit einer tumorprogressionsfreien Zeit von 96 Tagen bzw. 208 Tagen. Ein Patient mit einem nicht-kleinzelligen Karzinom zeigte minor response.

Wiedemann et al. publizierten 1994 eine Phase I/II Studie (44) mit Ifosfamid (Dosiseskala­tion 5 - 7.5 g/m²) und Carboplatin (300 mg/m²) in Kombination mit Ganzkörperhyperthermie (41.8° C für 60 Minuten) bei 19 Patienten mit refraktären Sarkomen (19), malignen Teratomen (3) und kleinzelligem Bronchialkarzinom (1). Bei sieben Patienten wurde eine Partialremission festgestellt (zwei Patienten mit malignen Teratomen, ein Patient mit kleinzelligem Bronchialkarzinom und vier Patienten mit Weichteil-Sarkomen). Von den Patienten mit Partialremission waren zwei bereits mit Ifosfamid und Carboplatin, zwei mit Ifosfamid und einer mit Carboplatin vorbehandelt. Die dosislimitierende Toxizitäten waren einerseits die Myelotoxizität, die durch die zusätzliche Ganzkörperhyperthermie im Vergleich zur ICE-Chemotherapie alleine nicht

verstärkt wurde, und andererseits die Nephrotoxizität (sechs Patienten zeigten Nephrotoxizität, zwei Patienten waren vorübergehend dialysepflichtig).

Ergebnisse

Wiedemann et al. berichteten 1996 (48) über eine Phase II Studie an 12 Patienten mit fortgeschrittenen Sarkomen, die unter konventioneller Therapie progredient waren und mindestens eine messbare Tumormanifestation aufwiesen. Die Patienten erhielten Ifosfamid (5 g/m², 60 min. i.v. unter GKHT, Tag 1), Carboplatin (300 mg/m², 90 min. i.v. unter GKHT, Tag 1), Etoposid (100 mg/m², 60 min. i.v. unter GKHT, Tag 1, und ohne GKHT Tage 2-3) in Kombination mit einer extrakorporalen Ganzkörperhyperthermie (41.8° C für 60 min. unter Vollnarkose, hämodynamischen Monitoring und Katecholamingabe mittels Retransfusion von extrakorporal auf 45° C erwärmten Blut). Die Kombinationstherapie wurde maximal viermal durchgeführt. Nach den WHO-Kriterien erzielten sieben von zwölf Patienten eine partielle Remission, drei eine Krankheitsstabilisierung, zwei waren unter Therapie progredient. Von den sieben Patienten mit partieller Remission waren vier nach 114 bis 246 Tagen progredient, drei zeigten nach 119 bis 209 Tagen noch keine erneute Progression. Fünf der sieben Patienten hatten bereits in vorangehenden Behandlungsversuchen Ifosfamid erhalten, einer auch Etoposid. Kein Patient war mit Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid vorbehandelt. Wichtigste Toxizitäten waren die Myelotoxizität (Grad IV nach WHO) und Nephrotoxizität. Ein Patient war elf Wochen dialysepflichtig. Wegen der unverhältnismäßigen Nephrotoxizität (44-45) wurde diese Phase II Studie abgebrochen. Als Ursache wird die arterielle Hypotension (Vollnarkose mit Sympathikolyse und arterieller Hypotonie bei extrakorporaler Ganzkörperhyperthermie) in Verbindung mit zwei potentiell nephrotoxischen Zytostatika, dazu kombiniert, und die notwendige Katecholamingabe angesehen (49).

Wiedemann et al. wiederholten die Phase II Studie (46) mit ICE (in gleicher Dosierung) und Ganzkörperhyperthermie (41.8° C für 60 min., Aquatherm) (28-29) ohne Vollnarkose (die Patienten waren nur sediert). Bei acht von zwölf Patienten mit refraktären Sarkomen konnte ein Therapieansprechen erreicht werden. Die dosislimitierende Toxizität war die Myelotoxizität (Grad IV WHO). Nur ein Patient erlitt Nephrotoxizität (Tumor-Lyse-Syndrom). Alle Patienten waren unter der Therapie normotensiv (keine Vollnarkose – keine Sympathikolyse); sie benötigten keine Katecholamine (50, 51).

Die präklinischen und klinischen Ergebnisse veranlaßten die Planung einer Phase III Studie mit Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid (6) mit/ohne Ganzkörperhyperthermie (52-53).

Weitere klinische Phase II Studien mit ICE und Ganzkörperhyperthermie sind mittlerweile aktiviert worden:

- bei Patientinnen mit einem metastasierenden Mammakarzinom nach einer früher durchgeführten Standardchemotherapie (endokrin resistent)
- bei Patientinnen mit einem metastasierenden Ovarialkarzinom nach sicherer Cisplatin und Taxol/Taxotere-Resistenz
- bei Patienten mit metastasierendem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (Stadium IV, unvorbehandelt).

Ausblick

Bisher gibt es Hinweise für eine gute Effektivität bei einer vertretbaren Toxizität des Therapiekonzepts. Heilungen haben wir bisher damit nicht erreichen können. Dies könnte sich durch die neue neoadjuvante Phase I/II-Studie zu den Toxizitäten und Wirkungen von ICE kombiniert mit Ganzkörperhyperthermie bei grundsätzlich heilbaren Patienten mit Kopf- und Halsmalignomen ändern.

Präoperative Chemotherapie mit Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid in Kombination mit einer 41.8° C Ganzkörperhyperthermie bei Patienten mit resektablen Oropharynxkarzinomen

Trotz aller Fortschritte in der Kopf- und Halschirurgie und in der Strahlentherapie konnte die Prognose von Patienten mit einem fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinom der Zunge und des Oropharynx nicht entscheidend verbessert werden. Bei Patienten mit Tumoren dieser Region im Stadium III und IV liegt die Fünfjahresüberlebensrate, je nach Literaturangabe und Behandlungsmodalität zwischen 30 -50 %. In den Studien, denen eine Kombinationsbehandlung bestehend aus einer chirurgischen Tumorsektion und einer anschließenden Bestrahlung zugrunde liegt, wird über eine etwas niedrigere lokale Rezidivrate und längere durchschnittliche Überlebenszeit berichtet, im Gegensatz zu Studien, die nur den Therapieerfolg von Monotherapien untersucht haben (2, 22, 35).

Mit dem Hinzufügen einer Chemotherapie zu dem Standardtherapieschema, (Chirurgie und Bestrahlung) werden drei Ziele verfolgt: Die Überlebensrate soll erhöht, die Morbidität der Standardtherapie gesenkt und das Ausmaß der radikalen Chirurgie

eingeschränkt werden. In vielen Pilotstudien wird über eine Ansprechrates bis zu 80 % und einer kompletten Remissionsrate bis zu 50 % nach einer Induktionschemotherapie bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches berichtet (10, 30, 39). Viele Studien, die eine Induktionschemotherapie mit dem Standardtherapieverfahren verglichen, konnten allerdings keine höheren Überlebensraten belegen (33). In einigen Untersuchungen wird allerdings von einer geringeren Rate von Fernmetastasen berichtet (5). Bei genauerer Betrachtung dieser Studien fällt auf, daß die Patienten an einem weit fortgeschrittenen Stadium ihrer Tumorerkrankung litten und teilweise als inoperabel eingestuft waren. Bei vielen Patienten handelte es sich um eine palliative Therapie.

Gute Ergebnisse einer Induktionschemotherapie können aber nur bei Patienten erwartet werden, die an einem operablen Tumor mit einer begrenzten Tumormasse leiden. In einer neueren randomisierten Multicenterstudie konnte gezeigt werden, daß eine präoperative Chemotherapie bei resektablen Tumoren der Mundhöhle und der Zunge in Kombination mit der Standardtherapie (Operation und Radiatio), zu einer deutlich höheren Überlebensrate führt als die alleinige Standardtherapie (37, 38).

Eine weitere Möglichkeit der Erhöhung der Wirksamkeit der Chemotherapie besteht, wie bereits ausgeführt, in der Anwendung einer zusätzlichen Ganzkörperhyperthermie.

Aufgrund dieser Tatsachen führen wir bei Patienten, die an einem resektablen Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle oder der Zunge (T2-T3, N0-N2) leiden, eine Phase I/II Studie durch, bestehend aus einer präoperativen ICE-Chemotherapie in Kombination mit einer Ganzkörperhyperthermie. Anschließend erfolgt die Standardtherapie mit Tumorsektion und Bestrahlung.

Aus den oben angeführten Gründen geht hervor, daß dieses Therapiekonzept vermutlich zu einer verbesserten lokalen Tumorkontrolle und somit zu einer verbesserten Überlebensrate führt. Da die Behandlung nicht mit einer wesentlich höheren Nebenwirkungsrate verbunden ist, halten wir die Überprüfung dieser Therapiekombination für notwendig und gerechtfertigt.

Gefördert durch: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Ka 1269/1-1; Wi 1152/1-1 + 1-2); Deutsche Krebshilfe (M 40/91 Va 1); Werner und Klara Kreutz-Stiftung Kiel; ASTA Medica, Frankfurt; AMGEN, München; AMGEN Inc., Thousand Oaks, CA, USA; Cancer Research Institute, New York, USA; National Institute of Health (NIH, RRO3186-11)

Literatur

1. Chatterjee S., Cheng M., Berger S., Berger N.: Induction of Mr 78,000 glucose-regulated stress protein in poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase- and nicotinamide adenine dinucleotide deficient v79 cell lines in its relation to resistance to the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Cancer Res.* 54:4405-4411, 1994.
2. Callery C.D., Spiro R.H., Strong E.W.: Changing trends in the management of squamous cell carcinoma of the tongue. *Am. J. Surg.* 148: 449-454, 1984
3. Cohen J.D., Robins H.I., Schmitt C.L.: Tumorcidal interactions of hyperthermia with carboplatin, cisplatin and etoposide. *Cancer letters* 44:205-210, 1989.
4. Cohen J.D., Robins H.I.: Thermal enhancement of tetraplatin and carboplatin in human leukemia cells in vitro. *Int. J. Hyperthermia* 6:1013-1017, 1990.
5. Ervin T.J., Clark J.R., Weichselbaum R.R., Fallon B.G., Miller D., Fabian R.L., Posner M.R., Morris C.M., Tuttle S.A., Schoenfeld D.A., Price K.N., Frei I.E.: An analysis of induction adjuvant chemotherapy in the multidisciplinary treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol.* 5: 10-20,1987.
6. Fields K., Zorsky P., Hiemenz J., Kronish L., Elfenbein G.: Ifosfamide, carboplatin and etoposide: A new regimen with a broad spectrum of activity. *J. Clin. Oncol.* 12:544-552, 1994.
7. Heits F., Katschinski D.M., Weiss C., Wiedemann G.J., Jelkmann W.: Vascular endothelial growth factor (VEGF), a serological tumour marker. *Int. J. Oncol.* 10:333-337, 1997.
8. Heits F., Katschinski D.M., Wilmsen U., Wiedemann G.J., Jelkmann W.: Serum thrombopoietin and interleukin 6 in tumour patients and response to chemotherapy- induced thrombocytopenia. *Eur. J. Haematol.* 59:53-58, 1997.
9. Jähde E., Roszinski S., Volk T., Glüsenkamp K.H., Wiedemann G.J., Rajewsky M.F.: Metabolic response of AH13r rat tumors to chemotherapy monitored by pO₂ and pH semimicroelectrodes: Possible implications for treatment planning. *Eur. J. Cancer* 29A:116-122, 1993.
10. Jacobs C., Makuch R.: Efficacy of adjuvant chemotherapy for patients with resectable head and neck cancer: a subset analysis of the Head and Neck Contracts Program. *J. Clin. Oncol.* 8: 838-847, 1990.
11. Katschinski D.M., Wiedemann G.J., Mentzel M., Mulkerin D., Robins H.I.: Optimization of chemotherapy administration for clinical 41.8° C whole-body hyperthermia. *Cancer letters* 115:195-199, 1997.
12. Katschinski D.M., Wiedemann G.J., d'Oleire F., Longo W., Robins H.I.: Whole body hyperthermia cytokine induction: an unifying hypothesis for myeloprotection in the setting of cytotoxic therapy. *Clin. Cancer Res.*, in press.
13. Katschinski D.M., Jelkmann W., Wiedemann G.J., Mentzel M., Mulkerin D.L., Touhidi R., Robins H.I.: Dynamic changes in serum erythropoietin levels in solid tumor patients undergoing 41.8° C whole body hyperthermia and/or chemotherapy. *Int. J. Hyperthermia*, in press.
14. Katschinski D.M., Wiedemann G.J., Mentzel M., Mulkerin D.L., Touhidi R., Robins H.I.: Influence of circadian rhythms on 41.8° C whole body hyperthermia induced induction on hemopoietic growth factors. *Int. J. Hyperthermia*, in press.
15. Katschinski D.M., Jacobsen E.L., Wiedemann G.J., Robins H.I.: Modulation of VP 16 cytotoxicity by the combination of carboplatin and 41.8° C hyperthermia through NAD⁺ mediated downregulation of glucose regulated stress protein 78. *Cancer Res.*, in press.
16. Katschinski D.M., Brauer L., Benndorf R., Wiedemann G.J., Mulkerin D.L., Touhidi R., Robins H.I.: Heat shock protein antibodies in sarcoma patients undergoing 41.8° C whole body hyperthermia. *Eur. J. Cancer*, in press.
17. Kekow J., Wiedemann G.J.: Transforming growth factor beta: A cytokine with multiple actions in oncology and potential clinical applications. *Int. J. Oncol.* 7:177-182, 1995.
18. Kekow J., Wiedemann G.J., Katschinski D.M., Kisro J., Geisler J., Wagner T., Szykowiak W.: Transforming growth factor beta production induced by whole-body hyperthermia. *Int. J. Oncol.* 7:1427-1432, 1995.
19. Kutz M.E., Mulkerin D.L., Wiedemann G.J., Katschinski D.M., Robins H.I.: In vitro studies of the hyperthermic enhancement of activated ifosfamide (4-hydroxyperoxy-ifosfamide) and glucose isophosphoramidate mustard. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 40:167-171, 1997.
20. Mentzel M., Wiedemann G.J., Mendoza A.S.: The effect of ifosfamide on tumor oxygenation at different tumor temperatures. *Adv. Exp. Med. Biol.* XV:509-515, 1994.
21. d'Oleire F., Robins H.I., Cohen J.D., Schmitt C.L., Spriggs D.: Cytokine induction in humans by 41.8° C whole body hyperthermia. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 833-834, 1993.
22. Quenelle D.J., Crissmann J.D., Shumrick D.A.: Tonsil carcinoma - treatment results. *Laryngoscope* 89: 1842-1846, 1979.
23. Robins H.I., Cohen J.D., Schmitt C.L., Tutsch K.D., Feyerabend C., Arzooonian R.Z., Alberti D., d'Oleire F., Longo W., Heiss C., Rushing D., Spriggs D.: Phase I clinical trial of carboplatin and 41.8° C whole body hyperthermia in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 11:1787-1794, 1993.
24. Robins H.I., Kutz M., Wiedemann G.J., Paul D., Katschinski D.M., Grosen E., Tiggelaar C.L., Spriggs D., Gillis W., d'Oleire F.: Cytokine induction by 41.8° C whole-body hyperthermia. *Cancer letters* 97:195-201, 1995.
25. Robins H.I., Katschinski D.M., d'Oleire F., Mulkerin D., Wiedemann G.J.: Lack of evidence for whole body hyperthermia-induced changes in MHC and non-MHC immunological function via cytokine induction. *Int. J. Hyperthermia*, in press.
26. Robins H.I., Neville A.J., Cohen J.D.: Whole body hyperthermia: biological, and clinical aspects. *Clinical Thermology*, ed. M. Gauthrie. Germany: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992.
27. Robins H.I., Jonsson G.G., Jacobson E.L., Schmitt C.L., Cohen J.D., Jacobson M.K.: Effect of hyperthermia in vitro and in vivo on adenine and pyridine nucleotide pools in human peripheral lymphocytes. *Cancer* 67:2096-2102, 1991.
28. Robins H.I., Schmitt-Tiggelaar C.L., Cohen J.D., Woods J.P., Heiss C., Gillis W., d'Oleire F.: A new technological approach to radiant heat whole body hyperthermia. *Cancer Letters* 79:137-145, 1994.
29. Robins H.I., Grossman J., Davis T. E., Dennis W.H., AuBuchon J.P.: Whole body hyperthermia: A porcine model for whole body hyperthermia: A preclinical trial of a radiant heat device for whole body hyperthermia using a porcine model. *Cancer Res.* 43:2018-2022, 1983.

30. Rooney M., Kish J., Jacobs J., Kinzie J., Weaver A., Crissman J., Al-Sarraf M.: Improved complete response rate and survival in advanced head and neck cancer after three course induction therapy with 20-hour 5-FU infusion and cisplatin. *Cancer* 55: 1123-1128, 1985.
31. Roszinski S., Wiedemann G.J., Jiang S.Z., Wagner T., Baretton G., Weiss C.: Effects of hyperthermia and/or hyperglycaemia on pH and pO₂ in well oxygenated xenotransplanted human sarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20: 1273-1280, 1991.
32. Santoro A., Tursz T., Mouridsen H., Verweij J., Steward W., Samers R., Buesa J., Casali P., Spooner D., Rankin E., Kirkpatrick A., Van Glabbeke M., Van Oosterom A.: Doxorubicin versus CYVADC versus doxorubicin plus ifosfamide in first-line treatment of advanced soft tissue sarcomas: A randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer soft tissue and bone sarcoma group. *J. Clin. Oncol.* 13:1537-1545, 1995.
33. Schuller D.E., Metch B., Stein D.W., Mattox D., McCracker J.D.: Preoperative chemotherapy in advanced resectable head and neck cancer: final report of the Southwest Oncology Group. *Laryngoscope* 98: 1205-1211, 1988.
34. Seifert M., Kaiser G., Gallmeier W.M.: Ganzkörperhyperthermie in der Tumortherapie. *Münch. med. Wschr.* 139:227-231, 1997.
35. Spiro J.D., Spiro R.H.: Carcinoma of the tonsillar fossa: An update. *Head Neck Surg.* 115: 1186-1189, 1989.
36. Tapazoglou E., Cohen J.D., Khatana A., Schmitt C.L., Sapareto C.L., Robins H.I.: Whole body hyperthermia and carboplatin: cytotoxicity for murine leukemia and normal marrow. *Brit. J. Cancer* 64:528-530, 1991.
37. Voelling P., Stennert E., Schroeder M.: Adjuvante Chemotherapie der Karzinome im Kopf-/Hals-Bereich sinnvoll, nutzlos oder schädlich? *Arch. Otorhinolaryngol. Suppl* II: 50-56, 1991.
38. Voelling P.: Stellenwert der sequentiellen Chemo-/Radiotherapie bei inoperablen Kopf-/Halstumoren. Eigne Ergebnisse und Literaturübersicht. *HNO* 39: 254-259, 1991.
39. Vokes E.E., Weichselbaum R.R., Mick R., McEvilly J.M., Haraf D.J., Panje W.R.: Favourable long term survival following induction chemotherapy with cisplatin, fluoruracil and leucovorin and concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 877-882, 1992.
40. Wiedemann G.J., Schem B.C., Dahl O., Mella O., Wagner T.: Hyperthermie. Grundlagen und Stellenwert einer neuen Therapiemodalität in der Onkologie. *Dtsch. med. Wschr.* 113:787-790, 1988.
41. Wiedemann G.J., Roszinski S., Biersack A., Mentzel M., Weiss C., Wagner T.: Treatment efficacy, intratumoral pO₂ and pH during thermochemotherapy in xenotransplanted human tumors growing on nude mice. *Contrib. Oncol.* 42:556-565, 1992.
42. Wiedemann G.J., Mella O., Roszinski S., Weiss C., Wagner T.: Local hyperthermia enhances mitoxantrone cytotoxicity on human derived breast carcinoma and sarcoma xenografts in nude mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 24:669-673, 1992.
43. Wiedemann G.J., Siemens A., Mentzel M., Biersack A., Wössmann W., Knocks D., Weiss C., Wagner T.: Effects of temperature on the therapeutic efficacy and pharmacokinetics of ifosfamide. *Cancer Res.* 53:4268-4272, 1993.
44. Wiedemann G.J., d'Oleire F, Eleftheriadis S., Knop E., Feddersen S., Klouche W., Geisler J., Mentzel M., Schmucker P., Weiss C., Wagner T.: Ifosfamide and carboplatin combined with 41.8° C whole-body hyperthermia in patients with refractory sarcoma and malignant teratoma. *Cancer Res.* 54:5346-5350, 1994.
45. Wiedemann G.J., Feyerabend T., Mentzel M., Feddersen S., Wößmann W., Siemens H.J., Mendoza A.S., Wagner T.: Thermochemotherapie: Gründe für die Kombinationsbehandlung mit Hyperthermie und Chemotherapie. *FOCUS MUL* 11:42-50, 1994.
46. Wiedemann G.J.: Temperaturabhängigkeit der Zytostatikawirkung. *Fortschr. Med.* 113:166, 1995.
47. Wiedemann G.J., Roszinski S., Biersack A., Weiss C., Wagner T.: Local hyperthermia enhances cyclophosphamide, ifosfamide, and cis-diamminodichloroplatinum (II) cytotoxicity on human-derived breast carcinoma and sarcoma xenografts in nude mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118:129-135, 1992.
48. Wiedemann G.J., Robins H.I., Gutsche S., Katschinski D.M., Mentzel M., Deeken M., Eleftheriadis S., Crahe R., Weiss C., Storer B., Wagner T.: Ifosfamide, Carboplatin and etoposide (ICE) combined with 41.8° C whole-body hyperthermia in patients with refractory sarcoma: A phase II study. *Eur. J. Cancer* 32A:888-892, 1996.
49. Wiedemann G.J., Katschinski D.M., Mentzel M., Mulkerin D., Robins H.I.: Extracorporeal whole body hyperthermia: toxicity assessment. *Int. J. Hyperthermia* 13:249-250, 1997.
50. Wiedemann G.J., Katschinski D.M., Mentzel M., Wagner T., Touthidi R., d'Oleire F., Robins H.I.: Ifosfamide, carboplatin and etoposide combined with Aquatherm induced 41.8°C whole-body hyperthermia (WBH) for refractory sarcoma. *J. Clin. Oncol.* 14:1751, 1996.
51. Wiedemann G.J., Robins H.I., Katschinski D.M., Mentzel M., van Heck R., Bucsky P., Gillis W., Feyerabend T., d'Oleire F., Freund C., Eleftheriadis S., Weiss C., Wagner T.: Klinische Studien zur Kombination von Ifosfamid, Carboplatin und Etoposid (ICE) mit 41.8° C Ganzkörperhyperthermie. *Med. Klin.* 91:279-283, 1996.
52. Wiedemann G.J., Katschinski D.M., Mentzel M., d'Oleire F., Wagner T., Robins H.I.: Systemic hyperthermia and ICE chemotherapy for sarcoma patients: Rationale and clinical status. *Anticancer Res.*, in press.
53. Wössmann W., Siemens H.-J., Beck B., Jansen B., Wiedemann G.J., Wagner T.: Influence of induction of HSP 70 on the cytotoxicity of oxazaphosphorine compounds and cisplatin. *Int. J. Oncol.* 9:305-312, 1996.

Mögliche Rolle des Ifosamid-Metaboliten Chloracetaldehyd in der Tumorthherapie – Ein neues zytostatisches Target unabhängig vom Mitoseapparat der Zelle?

J. Kisro, S. Brüggemann, T. Wagner

Zusammenfassung

Die Chemotherapie maligner Erkrankungen zielt klassischerweise auf die DNA und den Mitoseapparat als zytostatischen Angriffspunkt. Aufgrund ihres hohen Stoffwechsels sowie einer oft unzureichenden Gefäßversorgung können Tumorzellen Schwierigkeiten in ihrer Energiebereitstellung haben. Es ist also folgerichtig, nach Substanzen zu forschen, die hier ihren Angriffspunkt besitzen. Bei der Metabolisierung des Zytostatikums Ifosamid entsteht neben 4-OH-Ifosamid in hohem Maße Chloracetaldehyd (CAA). Wurde dem CAA bisher nur Bedeutung für Neuro- und Nephrotoxizität beigemessen, so konnten wir in vitro eine zytotoxische Wirkung nicht nur gegenüber Nierentubulus-, sondern auch gegen Mamma-Ca- sowie Sarkomzelllinien demonstrieren, die der des alkylierenden Metaboliten 4-OH-Ifosamid mindestens gleichwertig war. Obwohl auch alkylierende Eigenschaften für das CAA beschrieben wurden, sind die Fähigkeit zur Glutathiondepletion sowie die Störung der oxidativen Phosphorylierung mit konsekutivem ATP-Abfall und Lipidperoxidation der Zellmembran bedeutende zytotoxische Mechanismen. Den hieraus zu erwartenden Verstärkungseffekt mit alkylierenden Substanzen konnten wir in Kombinationsversuchen mit 4-OH-Ifosamid demonstrieren. Präliminäre Ergebnisse aus in vitro Untersuchungen zur Tumorselektivität und Therapieversuchen am Tiermodell unterstützen die Bedeutung des CAA in der Antitumorwirkung und weisen möglicherweise auf ein neues zytostatisches Angriffsziel unabhängig vom Mitoseapparat der Zelle.

Summary

The chemotherapy of malignancies is classically targeted against DNA and the mitotic apparatus. Due to their high metabolic rate and an often insufficient vascular supply, tumor cells are jeopardized regarding their energetic demands. Hence it is sensible to look for substances, which could use this as a cytostatical target. In the metabolism of the cyto-

static drug ifosamide besides 4-OH-ifosamide a high amount of chloroacetaldehyde (CAA) is produced. So far CAA was only considered to contribute to neuro- and nephrotoxicity. By contrast we could demonstrate an in vitro cytotoxicity not only against a renal tubular-, but also against a breast carcinoma- and a sarcoma-cell-line, which was at least comparable to the cytotoxicity of the alkylating 4-OH-ifosamide. Although alkylating properties are described for CAA's too, its capability to deplete cells of glutathion and interfere with the oxidative phosphorylation, which causes an ATP-depletion and membrane lipidperoxidation, are important cytotoxic mechanisms. Hence one could expect an augmentation with alkylating substances, which we could demonstrate in combination tests with 4-OH-ifosamide. Preliminary results from in vitro experiments concerning CAA's tumorselectivity and treatment-experiments with an animal model further support the importance of CAA as an antitumor-agent and potentially direct to a new cytostatic target independently of the mitotic apparatus of the cell.

Einleitung

Traditionelle Konzepte in der Chemotherapiebehandlung maligner Erkrankungen zielen auf die DNA und den Mitoseapparat von Tumorzellen als „zytostatisches Target“. Aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate, des hohen Stoffwechsels sowie der häufig unzureichenden Gefäßversorgung haben Tumorzellen auch hinsichtlich ihres Energiebedarfes (insbesondere im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung) einen neuralgischen Punkt. Es ist somit ein interessanter und folgerichtiger Ansatz, nach Substanzen zu forschen, die hier ihren zytostatischen Angriffspunkt besitzen und dabei noch eine ausreichende Tumorselektivität aufweisen.

Bei Untersuchungen zur Fragestellung, ob das Zytostatikum Ifosamid (IFO) ein einfaches Analogon des langbewährten Cyclophosphamids (5) ist und worin die Mechanismen seiner Nephrotoxizität bestehen, testeten wir die beiden Ifosamid-Hauptmetaboliten 4-OH-Ifosamid (4-OH-IFO)

und Chloroacetaldehyd (CAA) an verschiedenen menschlichen Zelllinien. Ifo- und Cyclophosphamid sind beides Alkylantien aus der Klasse der Oxazaphosphorine, die sich nur durch die Positionsveränderung einer Chloräthylgruppe unterscheiden. Aus diesem scheinbar geringen strukturellen Unterschied resultiert jedoch bei der Cytochrom P 450 abhängigen Aktivierung und Metabolisierung ein höherer Anteil an CAA beim IFO (Abb.1) (4,8,18). Bisher wurde dem 4-OH-IFO die Funktion des alkylierenden Hauptmetaboliten zu-

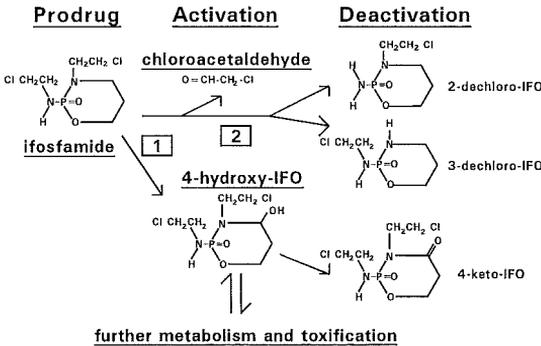


Abb.1: Erste Schritte der Ifosfamidmetabolisierung: 1. Ringoxidation mit Bildung von 4-Hydroxy-ifosfamid analog zu 4-Hydroxycyclophosphamid. 2. Seitenkettenoxidation mit Freisetzung von Chloroacetaldehyd

gesprachen, während man CAA nur Bedeutung für die Nephro- und Neurotoxizität von IFO beimaß.

Klinische Beobachtungen zeigten jedoch, daß IFO bei einigen Tumoren (z. B. Keimzelltumoren, Weichteilsarkomen) höhere Ansprechraten besitzt als Cyclophosphamid und keine komplette Kreuzresistenz zwischen beiden Substanzen existiert (1,14,19). Da kein substanziiell unterschiedliches Wirkprinzip zwischen Cyclo- und Ifosfamid bekannt ist, interessierte bei unseren Untersuchungen insbesondere, ob dem CAA eine Bedeutung für die Antitumorwirkung beizumessen ist. Um unsere Testbedingungen der klinischen Situation anzunähern, bestimmten wir zuerst die Plasmaspiegel der beiden Hauptmetaboliten bei Patienten, die im Rahmen einer Zytostatikatherapie mit IFO behandelt wurden und paßten die bei den in-vitro-Versuchen angewendeten Konzentrationen entsprechend an.

Material und Methoden

Patienten und Pharmakokinetik:

Die pharmakokinetischen Daten der beiden Hauptmetaboliten 4-OH-IFO und CAA wurden

bei 10 Patienten mit nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen bestimmt, die mit dem ICE-Schema (Ifosfamid 5g/m² über 60 Min. Tag 1; Carboplatin 300 mg/m² über 60 Min. Tag 1; Etoposid 100 mg/m² über 60 Min. Tag 1-3) behandelt wurden. 10 ml Vollblutproben wurden zur Stunde 0, 1,5, 2, 3, 4, 8, und 24 ab Beginn der IFO-Infusion entnommen und mittels Gaschromatographie und HPLC nach einer von uns beschriebenen Methode weiter verarbeitet (9).

In-vitro-Versuche:

Behandelt wurden 2 Tumorzelllinien (MX 1 Mammarkarzinom; S 117 Schilddrüsen Sarkom) sowie die Landa-Leyden Nierentubuluszelllinien. Die Zelldichte betrug 5 x 10⁴ Zellen/ml für die MX 1 und S 117 Zellen und 1 x 10⁵ Zellen/ml für die LL-Nierenzellen. Die Inkubationszeit betrug 4 Tage für MX 1 und LL-Zellen sowie 3 Tage für S 117 Zellen. Die eingesetzten Konzentrationen von IFO, 4-OH-IFO und CAA betragen jeweils 2,5, 5, 10, 15, 20, 30 und 40 nmol/ml. Bestimmt wurde die Zellüberlebensrate mit dem MTT-Assay nach Mosmann (13). Für jede eingesetzte Konzentration wurden mindestens 10 Versuche durchgeführt. Die Zellüberlebensrate wurde in Prozent im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle angegeben.

Ergebnisse

Pharmakokinetik:

Die pharmakokinetischen Daten wurden zur Anpassung der in-vitro zu wählenden Konzentrationen und zur Evaluation der klinischen Relevanz der beiden Metaboliten bestimmt. Abb. 2 zeigt die Konzentrations-Zeitkurven nach der Gabe von 5 g/m² IFO über 1 Stunde. Die Spitzenspiegel und

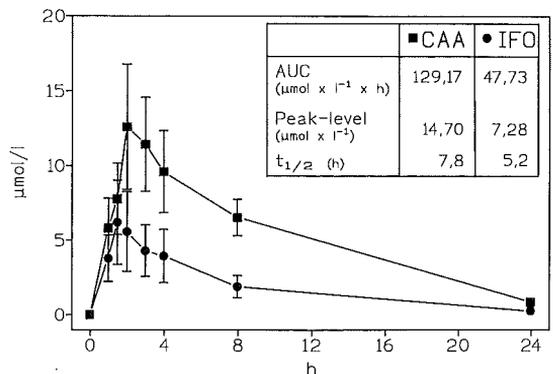


Abb.2: Pharmakokinetische Daten der Ifosfamid-Metaboliten 4-OH-Ifosfamid (4-OH-IFO) und Chloroacetaldehyd (CAA) nach einer Infusion von 5g/m² Ifosfamid (IFO) über eine Stunde

AUC von CAA sind 2-3-fach höher als die korrespondierenden 4-OH-IFO-Werte. Hingegen sind die Zeitprofile und terminalen Halbwertszeiten der beiden Metaboliten in einem vergleichbaren Bereich.

Zytotoxischer Effekt von CAA und 4-OH-IFO auf Tumorzellen

Abb. 3 zeigt eine enge Konzentrations-Wirkungs-Beziehung sowohl des CAA als auch für 4-OH-IFO gegen MX-1 und S-117 Zellen, wohingegen erwartungsgemäß die Muttersubstanz IFO (ein

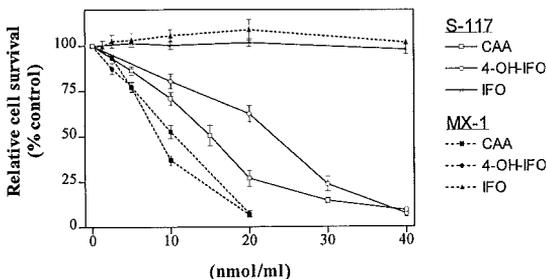


Abb. 3: Zytotoxizität von Ifosfamid (IFO), 4-OH-Ifosfamid (4-OH-IFO), und Chloracetaldehyd (CAA) auf MX-1-Mamma-Ca und S-117 Sarkomzelllinien

„prodrug“) keinerlei zytotoxischen Effekt ausübt. Weiterhin erkennt man, daß bei jeder getesteten Konzentration das CAA mindestens die Toxizität des 4-OH-IFO erreicht, meist sogar jedoch zu einer höheren Reduktion der Zellüberlebensrate führt. Analog zur klinischen Beobachtung ist die S-117 Sarkomzelllinie vergleichsweise resistenter als die Mammakarzinom-Zelllinie gegenüber beiden Metaboliten.

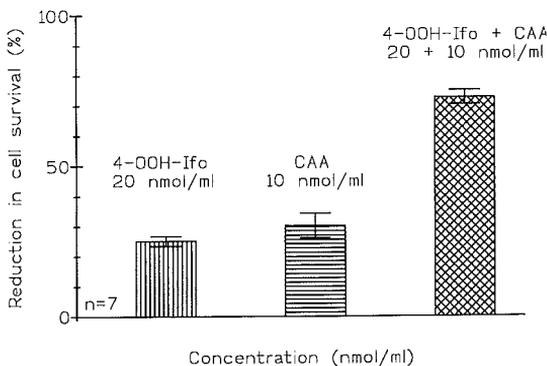


Abb. 4: Zytotoxizität in der Mono- und Kombinationsbehandlung von S-117-Sarkom - Zellen mit 4-OH-Ifosfamid und Chloracetaldehyd

Um der Tatsache gerecht zu werden, daß im Menschen 4-OH-IFO und CAA gleichzeitig wirken, testeten wir die Wirkung auf die Zellüberlebensrate einer Kombination beider Metaboliten an den S-117-Zellen. Abb. 4 zeigt, daß die Zytotoxizität verstärkt und annähernd additiv ist. Es wurden hierbei Konzentrationen beider Metaboliten gewählt, bei denen sowohl ein Einzeleffekt als auch ein Kombinationseffekt eindeutig demonstrierbar waren.

Zytotoxizität von CAA und 4-OH-IFO auf LL-Nierentubulus-Zellen

Um nähere Erkenntnisse über die Nephrotoxizität zu erhalten, untersuchten wir auch den Effekt von IFO, 4-OH-IFO und CAA auf LL-Nierentubuluszellen. Während die Muttersubstanz auch in hoher Konzentration keinerlei Wirkung aufweist, kommt es bei 4-OH-IFO und CAA wieder zu einem dosisabhängigen zytotoxischen Effekt. Entgegen den bisherigen Vermutungen liegt die toxische Potenz des CAA jedoch bei keiner der getesteten Konzentrationen signifikant höher als die des 4-OH-IFO's (Abb. 5).

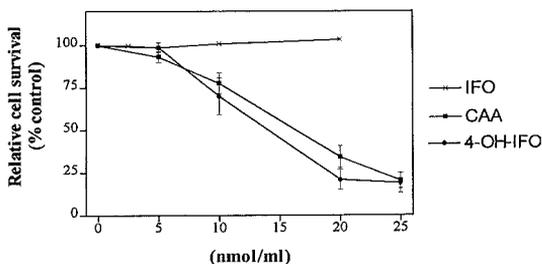


Abb. 5: Vergleich der Zytotoxizität von Ifosfamid (IFO), 4-OH-Ifosfamid (4-OH-Ifosfamid) und Chloracetaldehyd (CAA) auf distale Nierentubuluszellen (Landa-Leyden)

Diskussion

Obwohl das Oxazaphosphorin-Zytostatikum IFO ein einfaches Analogon des Cyclophosphamid zu sein scheint, entsteht bei seiner Metabolisierung ein bis zu 100-fach höherer Anteil des Metaboliten CAA. Da die unter IFO-Behandlung auftretenden Nephro- und Neurotoxizitäten nach Cyclophosphamidgabe nicht beobachtet wurden, mußte auch aufgrund weiterer Beobachtungen (3, 15) das CAA für das besondere Nebenwirkungsspektrum des IFO verantwortlich gemacht werden. Eine eigene zytotoxische Wirkung des CAA gegenüber Tumorzellen war bisher weder beschrieben noch postuliert worden.

Unsere in-vitro-Versuche ließen jedoch ein hohes zytotoxisches Potential von CAA nicht nur gegen

LL-Nierentubuluszellen, sondern auch gegenüber den getesteten Tumorzelllinien erkennen. Diese Zytotoxizität entsprach der Wirkung des bisher als Hauptmetaboliten angesehenen 4-OH-IFO. Es ist also anzunehmen, daß CAA nicht nur für die Nebenwirkung sondern auch für die Antitumorwirkung des IFO's eine bedeutende Rolle spielt. Besonders hervorzuheben ist hierbei, daß die getesteten Metabolitenkonzentrationen in Bereichen lagen, die den Blutspiegeln bei Patienten nach klinisch üblichen IFO-Dosierungen entsprachen.

Zur Frage der molekularen Wirkmechanismen von CAA auf Zellen gibt es auch außerhalb der Zytostatikaforschung einige Untersuchungen, die wir dem Umstand verdanken, daß CAA in der chemischen Industrie häufig verwendet wird. Obwohl eine alkylierende Eigenschaft von CAA beschrieben wurde (6, 17), scheinen weitere Mechanismen eine wichtigere Bedeutung zu haben. Es konnte gezeigt werden, daß es zu irreversiblen Konjugaten zwischen CAA und Glutathion (dem wichtigsten zelleigenem Protektorthiol) mit Abfall des intrazellulären Glutathiongehaltes kommt (11, 12). Dies macht die Zelle vulnerabler sowohl gegenüber ungebundenem CAA als auch gegenüber den eigentlichen alkylierenden Metaboliten wie dem 4-OH-IFO.

Ein weiterer besonderer Effekt des CAA ist seine Fähigkeit, Störungen in der mitochondrialen Atmungskette mit konsekutivem ATP-Abfall und Lipidperoxidation der Zellmembran zu erzeugen (16). Der noch nicht vollständig geklärte molekulare Mechanismus scheint die Einschleusung des CAA nach Dehydrierung durch Aldehyddehydrogenasen in den Tricarbonsäurezyklus über das Coenzym A zu sein. Im weiteren Verlauf kommt es wahrscheinlich zu einem Abbruch auf der Stufe des Succinats, da dessen Dehydrierung zu Fumarat durch die Chlorgruppe behindert wird. Elektronentransport und Energiegewinnung über ATP-Bildung (oxidative Phosphorylierung) werden gestoppt. Gestützt wird diese These durch die klinische Beobachtung, daß die Neurotoxizität des CAA durch Methylenblau verringert werden kann (7). Methylenblau könnte in seiner Eigenschaft als Elektronendonator zur Reduktion des FAD beitragen. Der bereits in Leberzellen nachgewiesene ATP-Abfall durch CAA (16) könnte für Tumorzellen, die sich häufig in einer energetisch kritischen Situation befinden, den Zelltod bedeuten.

Weiterhin findet die Ausschleusung toxischer Substanzen über die von einigen Tumoren sehr stark exprimierte MDR (multi-drug-resistance)-Pumpe in einem ATP gekoppelten Transport statt, so daß auch eine Verminderung der Tumorresistenz ge-

genüber weiteren Zytostatika eine durchaus erwünschte Folge sein könnte.

Schlußfolgerung

Mit dem Chloracetaldehyd (CAA) ist eine Substanz aufgefallen, deren Eingriff in die oxidative Phosphorylierung (bei möglicher relativer Tumorselektivität) auf einen neuen zytostatischen Angriffspunkt hinweist. Seine potentielle Bedeutung als Modulator und Verstärker der Alkylantienwirkung ist bei dem Oxazaphosphorin-Zytostatikum Ifosfamid durch unsere Untersuchungen bereits gezeigt.

Welche Bedeutung CAA in der Antitumor-Therapie als Monosubstanz zukommen kann, muß in weiteren in-vitro (z. B. Tumor- und Stammzell-Assays) und in vivo-Versuchen herausgefunden werden. Präliminäre Versuche mit menschlichen Tumorexograften auf immuninkompetenten Nacktmäusen bestätigen die Wirksamkeit von CAA. Das Mitochondrion als Target einer Zytostatikawirkung wäre auch ein neuer Wirkort, da bisher fast alle Zytostatika proliferationsabhängig am Mitoseapparat der Zelle angreifen.

Eine eingehendere Darstellung dieses Themas findet sich in unserer Publikation in der Zeitschrift „Cancer Research“ (2).

Literatur

1. Bramwell, V.H., Mouridsen, H.T., Santoro, A., Blackledge, G., Somers, R., Verwey, J., Dombrowsky, P., Onsrud, M., Thomas, D., Sylvester, R., and et al. Cyclophosphamide versus ifosfamide: final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* 23: 311-321, 1987.
2. Brüggemann, S., Kistro, J., Wagner, T. Ifosfamide Cytotoxicity on Human Tumor and Renal Cells: Role of Chloroacetaldehyde in Comparison to 4-Hydroxyifosfamide. *Cancer Research* 57, July 1, 1997, S. 2676-2680
3. Goren, M.P., Wright, R.K., Pratt, C.B., and Pell, F.E. Dechloroethylation of ifosfamide and neurotoxicity [letter]. *Lancet.* 2: 1219-1220, 1986.
4. Kaijser, G.P., Beijnen, J.H., Bult, A., and Underberg, W.J. Ifosfamide metabolism and pharmacokinetics (review). *Anticancer. Res.* 14: 517-531, 1994.
5. Kamen, B.A., Frenkel, E., and Colvin, O.M. Ifosfamide: should the honeymoon be over? [editorial]. *J. Clin. Oncol.* 13: 307-309, 1995.
6. Kandala, J.C., Mrema, J.E., DeAngelo, A., Daniel, F.B., and Guntaka, R.V. 2-Chloroacetaldehyde and 2-chloroacetal are potent inhibitors of DNA synthesis in animal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167: 457-463, 1990.
7. Kuepfer, A., Aeschlimann, C., Wermuth, B., and Cerny, T. Prophylaxis and reversal of ifosfamide encephalopathy with methylene-blue. *Lancet.* 343: 763-764, 1994.

8. Kurowski, V., Cerny, T., Kuepfer, A., and Wagner, T. Metabolism and pharmacokinetics of oral and intravenous ifosfamide. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 117 Suppl 4: S148-53, 1991.
9. Kurowski, V. and Wagner, T. Comparative pharmacokinetics of ifosfamide, 4-hydroxyifosfamide, chloroacetaldehyde, and 2- and 3-dechloroethylifosfamide in patients on fractionated intravenous ifosfamide therapy. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 33: 36-42, 1993.
10. Lewis, L.D. and Meanwell, C.A. Ifosfamide pharmacokinetics and neurotoxicity [letter]. *Lancet.* 335: 175-176, 1990.
11. Lind, M.J., McGown, A.T., Hadfield, J.A., Thatcher, N., Crowther, D., and Fox, B.W. The effect of ifosfamide and its metabolites on intracellular glutathione levels in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1835-1840, 1989.
12. Meier, T., Allenbacher, A., Mueller, E., Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., and Issels, R. Ifosfamide induced depletion of glutathione in human peripheral blood lymphocytes and protection by mesna. *Anticancer. Drugs.* 5: 403-409, 1994.
13. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63, 1983.
14. Rodriguez, V., McCredie, K.B., Keating, M.J., and et al. Ifosfamide therapy for hematological malignancies in patients refractory to prior treatment. *Cancer Treatment Report*, 62: 493-497, 1978
15. Skinner, R., Sharkey, I.M., Pearson, A.D., and Craft, A.W. Ifosfamide, mesna, and nephrotoxicity in children. *J. Clin. Oncol.* 11: 173-190, 1993.
16. Sood, C. and O'Brien, P.J. Molecular mechanisms of chloroacetaldehyde-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 46: 1621-1626, 1993.
17. Spengler, S.J. and Singer, B. Formation of interstrand cross-links in chloroacetaldehyde-treated DNA demonstrated by ethidium bromide fluorescence. *Cancer. Res.* 48: 4804-4806, 1988.
18. Wagner, T. Ifosfamide clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 26: 439-456, 1994.
19. Wheeler, B.J., Loehrer, P.J., Williams, S.D., and et al. Ifosfamide in refractory male germ cell tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 4: 28-34, 1986.

FOCUS MUL

Zeitschrift für Wissenschaft, Forschung und Lehre an der Medizinischen Universität zu Lübeck

Herausgeber: Das Rektorat der Medizinischen Universität zu Lübeck

Schriftleitung: H.-P. Bruch, H. L. Fehm, D. Kömpf

Guest-Editor: A. Ch. Feller

Wissenschaftlicher Beirat: H. Arnold, R. Birngruber, K. Diedrich, H. Dilling, H. v. Domarus, P. Dominiak, W. Dosch, D. v. Engelhardt, A. Fenner, B. Fischer, H.-D. Flad, W. Gross, H. Halsband, M. Herczeg, D. Hogrefe, D. Jocham, H. A. Katus, R. Kessel, H. Kirchner, U. Knölker, E. Konecny, K. Kruse, W. Kühnel, H. Laqua, V. Linnemann, K. Lorentz, E. Maehle, P. Müller, D. O. Nutzinger, M. Oehmichen, Th. Peters, S. Pöpl, H.-H. Raspe, K. R. Reischuk, E. Richter, E.-Th. Rietschel, G. Schäfer, M. Schlaak, F. Schmielau, P. Schmucker, E. Schwinger, H. H. Sievers, W. Solbach, O. Strubelt, W. Traut, A.X.Trautwein, H. Weerda, H. D. Weiss, H. H. Wolff (alle Medizinische Universität zu Lübeck)

Redaktion: Ch. Weiss, R. Labahn, Telefon (04 51) 5 00 30 04

Anschrift: Medizinische Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23562 Lübeck

Auflage: 5000 Exemplare

Verlag: Hansisches Verlagkontor Heinz Scheffler, Mengstraße 16, D-23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-0

Anzeigen: Hansisches Verlagkontor H. Scheffler, Christiane Kermel

Druck: Verlag Schmidt-Römhild KG, Mengstraße 16, 23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-0

Erscheinen: FOCUS MUL erscheint vierteljährlich

Redaktionsschluß: 6 Wochen vorher

Bezugspreis: Einzelheft DM 18,-, Jahresabonnement DM 70,- zuzügl. Versandkosten. In den Mitgliedsbeiträgen der Gesellschaft der Freunde und Förderer der Medizinischen Universität zu Lübeck enthalten

ISSN 0940-9998

Die totale Mesorektumexzision: Standardverfahren zur chirurgischen Therapie des Rektumkarzinoms

C. Boos, H.-P. Bruch, A. Weigel, O. Schwandner

Zusammenfassung

Die totale Mesorektumexzision (TME) wird als Optimierung der onkologischen Radikalität im Rahmen der kontinenzserhaltenden Rektumresektion beim Rektumkarzinom seit Mitte der achtziger Jahre zunehmend propagiert. Seit 1990 wird an der Chirurgischen Klinik der Medizinischen Universität zu Lübeck die tiefe anteriore Resektion mit TME als Standardverfahren beim Rektumkarzinom durchgeführt. Um den Einfluß der TME auf die lokoregionäre Rezidivrate im Vergleich zur konventionellen anterioren Resektion mit partieller Mesorektumexzision (PME) zu ermitteln, wurden 248 im Tumornachsorgeprogramm erfaßte Patienten mit anteriorer R0-Rektumexzision aus dem Zeitraum 1979-4/90 (PME) sowie 5/90-1996 (TME) hinsichtlich ihrer lokoregionären Rezidivrate ausgewertet. Bei vergleichbaren demographischen Patientendaten beider Gruppen konnte gezeigt werden, daß sich die lokoregionäre Rezidivrate durch eine tiefe anteriore Resektion mit totaler Mesorektumexzision von 19,8 % auf 5,4 % verminderte. Die Gesamtüberlebensrate verbesserte sich signifikant um 16 % im dritten und fünften postoperativen Jahr ($p < 0,007$).

Summary

Since the middle of the 80's total mesorectal excision (TME) has significantly improved the success of surgery for rectal cancer. TME has performed at the Department of Surgery, Medical University of Luebeck, since 1990. This study focusses on an evaluation of the influence of TME on the rate of local recurrence in comparison to the conventional anterior resection with only partial mesorectal excision (PME). A total of 133 patients who underwent an anterior resection with PME between 1979 and 1990 were compared with 115 patients who were surgically treated by an anterior resection with TME. The rate of local recurrence in the PME group was 19,8 %. It could be decreased to only 5,4 % in the TME group. The postoperative survival rate could significantly be improved by 16 % in the third and fifth year.

Einleitung

Das Rektumkarzinom ist mit einer Inzidenz von ca. 30 Neuerkrankungen pro Jahr bezogen auf 100.000 Einwohner (1), eine der häufigsten malignen Erkrankungen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr, es erkranken Männer häufiger als Frauen (33). Ca. 50 % aller kolorektalen Karzinome sind im Rektum oder an der Grenze zwischen Rektum und Sigma lokalisiert. Die Rektumkarzinome wachsen überwiegend an der Vorder- (42 %) bzw. Hinterwand (46 %) und entstehen nur in 10 % der Fälle primär seitlich (29,30).

Die chirurgische Therapie des Rektumkarzinoms wurde erstmals 1889 durch Czerny im Sinne einer Rektumexstirpation durchgeführt. Dieses Vorgehen blieb als Standardverfahren aufgrund der Untersuchungen von Miles (22) seit 1908 für ca. 30 Jahre dominierend. Erst 1930 wurden die Miles'schen Maxime der Metastasierung des Rektumkarzinoms von Dukes (7) angezweifelt. Dukes hatte in zahlreichen Autopsiestudien und Präparatuntersuchungen herausgefunden, daß die von Miles vermutete distale und laterale Ausbreitung des Tumors selten vorkam und meistens nur im Rahmen einer bereits bestehenden, ausgedehnten, proximalen Metastasierung bestand. Beeinflußt durch diese Ergebnisse etablierte Dixon 1939 die anteriore Resektion als kontinenzserhaltende Technik. Zu diesem Zeitpunkt war für die Anwendung der anterioren Resektion ein mindestens 6-8 cm langer anorektaler Stumpf Voraussetzung, so daß sich diese Operationstechnik zur Behandlung tiefer gelegener rektaler Karzinome als problematisch erwies. Erst 1972 zeigte Parks (16) die Möglichkeit der Kontinenzserhaltung bei intakter Beckenbodenmuskulatur auch bei kürzerem oder sogar völlig fehlendem anorektalem Stumpf. Durch die Entwicklung der maschinellen Anastomosengeräte Mitte der 80er Jahre wurde die Anastomosentechnik weiter erleichtert und standardisiert. Gleichzeitig wurde die Prognose nach anteriore Resektion, insbesondere die lokoregionäre Rezidivrate, durch die Mitnahme der abdominalen Metastasenstraßen entscheidend

	TME n=115 (4)		PME n=133 (2)	
	Pat.	%	Pat.	%
OP-Verfahren				
anteriore Resektion			n=85 (2)	64 %
tiefe anteriore Resektion	n=89 (4)	77 %	n=48	96 %
ultratiefe anteriore Resektion (intersphinktere Anastomose)	n=26	23 %		

Tab. 1: OP-Verfahren der zwischen 1979-96 R0-resezierten Patienten (n=248) mit Rektumkarzinom in Abhängigkeit von der Mitnahme des Mesorektums (TME=totale Mesorektumexzision, PME=partielle Mesorektumexzision). In Klammern die Anzahl der innerhalb von 30 Tagen postoperativ Verstorbenen. (In der Rezidivratenberechnung nicht berücksichtigt!)

verbessert (4, 5, 6, 15, 17, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 31, 32).

Betrachtet man die in der Literatur angegebenen lokoregionären Rezidivraten, so schwanken diese zwischen 2,6 und 32 % (1). Die Ursachen für diese Spannbreite sind vielfältig. Neben der Bedeutung der Anastomosentechnik – die Klammernahttechnik hat 50 % weniger Rezidive (3) – zeigen Einmannstatistiken einen eindeutigen Bezug zur individuellen Qualität des Operateurs. In diesem Zusammenhang konnte Heald (9, 10, 11, 12) die Verminderung der lokoregionären Rezidivrate auf 4 % durch eine subtile totale Exzision des Mesorektums (TME) zeigen. Andere Autoren konnten diese Ergebnisse bestätigen (2, 8, 13, 18, 20, 27, 29), dennoch wird die TME als Standardverfahren beim Rektumkarzinom weiterhin diskutiert.

Probanden und Methoden

Seit 1979 werden alle Patienten der Chirurgischen Klinik mit kolorektalem Karzinom prospektiv nachuntersucht. Seit Mai 1990 wird bei jedem Rektumkarzinom routinemäßig eine tiefe anteriore Resektion mit totaler Mesorektumexzision durchgeführt, wohingegen zuvor die konventionelle anteriore Resektion mit partieller Mesorektumexzision den Standardeingriff darstellte. In Hinblick auf die lokoregionäre Rezidivrate wurden die Patienten mit R0-Resektion dieser beiden Behandlungszeiträume ausgewertet. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels log-rank Test am Kaplan-Meier Modell.

Ergebnisse

248 Patienten mit Rektumkarzinom wurden im Zeitraum 1979 bis 1996 kontinenterhaltend R0 anterior reseziert. 133 Patienten wurden bis Mai 1990 anterior reseziert, bei 48 Patienten wurde eine tiefe Anastomose angelegt. Von Mai 1990 bis 1996 wur-

den 115 Patienten tief anterior reseziert, wovon 26 Patienten eine ultratiefe intersphinktere Anastomose erhielten (Tab. 1). Das Durchschnittsalter aller Patienten lag bei 67,7 Jahren, wobei die in der Anzahl gering überwiegenden Frauen im Durchschnitt ca. 4 Jahre älter waren. Die demographischen Patientendaten beider Zeiträume unterschieden sich nur unwesentlich. Die TME-Gruppe unterschied sich von den PME-Patienten durch einen geringeren Anteil an T3-Tumoren, jedoch höheren Anteil an T4-Karzinomen (Tab. 2). Desweiteren wurden in der TME-Gruppe wesentlich mehr

	TME		PME	
	N	Rez.	N	Rez.
T1N0M0	14 (1)		13	
T1N1-2M0	1		2	
T2N0M0	24 (1)		17	2
T2N1-2M0	7		6	1
T2N0M1	0		1	
T3N0M0	30 (2)	1	62 (2)	10
T3N0M1	1		1	
T3N1-2M0	26	2	30	12
T3N2M1	4	1		
T4N1-0M0	7	2	1	1
T4N0M1	1			
Gesamt	115 (4)	6	133	26

Tab. 2: Rezidivverteilung in Abhängigkeit vom diagnostizierten Tumorstadium der zwischen 1979-96 R0-resezierten Patienten (n=248) mit Rektumkarzinom. In Klammern die Anzahl der innerhalb von 30 Tagen postoperativ Verstorbenen. (In der Rezidivratenberechnung nicht berücksichtigt!)

OP-Verfahren	TME n=115 (4)			PME N=133 (2)		
	Rez.	ges.	%	Rez.	Ges.	%
anteriore Resektion	n=0	n=0	n=0	N=18	N=85 (1)	21,4 %
tiefe anteriore Resektion	n=5	n=89 (4)	5,6 %	N=8	N=48 (1)	17,0 %
ultratiefe anteriore Resektion (intersphinktere Anastomose)	n=1	n=26	3,8 %	N=0	N=0	0 %
gesamt	n=6	n=115 (4)	5,4 %	N=26	N=133 (2)	19,8 %

Tab. 3: Rezidivrate der zwischen 1979-96 R0-resezierten Patienten (n=248) mit Rektumkarzinom in Abhängigkeit vom OP-Verfahren. In Klammern die Anzahl der innerhalb von 30 Tagen postoperativ Verstorbenen. (In der Rezidivatenberechnung nicht berücksichtigt!)

Patienten mit Tumorlokalisation im unteren Rektum behandelt sowie wesentlich häufiger eine Stapleranastomose angelegt (TME 65 %, PME 15 %). Die Rezidivrate der PME-resezierten Patienten lag bei 19,8 % (n=26), davon manifestierte sich das Rezidiv in 85 % in den ersten drei Jahren postoperativ (Tab. 3). Der durchschnittliche Nachbeobachtungszeitraum dieser Gruppe lag bei 79,1 Monaten. Die TME-resezierten Patienten entwickelten in 5,4 % (n=6) der Fälle ein lokoregionäres Rezidiv (Tab. 4), zwei dieser Patienten wiesen beim Ersteingriff ein T4-Karzinom auf. Der durchschnittliche Nachbeobachtungszeitraum lag bei 38,5 Monaten. Die postoperative Überlebenszeit ergab für die TME-Patienten einen signifikanten Vorteil im dritten und fünften postoperativen Jahr von jeweils 16 % ($p < 0,007$) (Abb. 1).

Diskussion

Das Auftreten eines lokoregionären Rezidivs wie auch die Fernmetastasierung nach anteriorer Resektion führt zu einer dramatischen Prognoseverschlechterung der kurativ operierten Patienten mit Rektumkarzinom. Nur 5-20 % der Lokalrezidive sind resezierbar, und von den Operierten sterben 90 % innerhalb der folgenden drei Jahre. Die Vermeidung des lokalen Rezidivs stellt somit die wichtigste Forderung an den Chirurgen dar. Eine subtile Operationstechnik mit perfektem Beherrschen der Staplerverfahren, das Verstehen der tumorbiologischen Zusammenhänge und das genaue Verständnis der anatomischen Gegebenheiten insbesondere der bestehenden Grenzlamellen sowie Lymphabflüsse im kleinen Becken stellen hierfür eine unumgängliche Voraussetzung dar. Das Lokalrezidiv hat 3 Entstehungsmöglichkeiten. a) Inkomplette Tumorresektion, b) Implantation lebender Karzinomzellen vom Darmlumen aus in das Operationsgebiet und c) Abtropfen der Tumorzellen aus tumornah eröffneten Lymphbahnen.

	TME	PME
gesamt	n=111	n=131
Rezidiv im 1. Jahr	n=3	n=14
2. Jahr	n=1	n=8
3. Jahr	n=0	n=2
4. Jahr	n=0	n=2
5. Jahr	n=2	n=0

Tab. 4: Auftreten des Rezidivs in Abhängigkeit von der Zeit (n=242). 6 Patienten verstarben innerhalb von 30 Tagen postoperativ und wurden exkludiert.

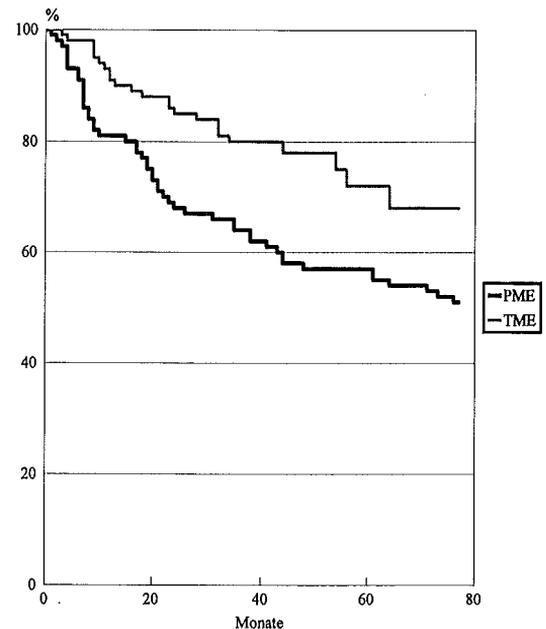


Abb. 1: Überlebensrate der mit TME bzw. PME anterior resezierten Patienten. Die 30-Tage-Letalität wurde herausgerechnet ($p < 0,007$).

Während die R0-Resektion selbstverständlich immer vom Operateur angestrebt werden sollte, kann die Implantation von Tumorzellen vom Darmlumen aus durch Spülung mit zytotoxischen Substanzen und Anastomosierung in double stapler-Technik weitgehend ausgeschlossen werden. Um die Bedeutung der Lymphabtropfmetastasen für die Lokalrezidiventstehung zu werten, ist das Verstehen der Physiologie des Lymphflusses essentiell. Das intakte Lymphsystem ist geschlossen und nur dort, wo es im Thorax in die Venen einmündet, offen. D. h. es schöpft nur das an einen Tumor angeschlossene Gewebeareal ab und transportiert die Lymphe und Tumorzellen aktiv zentripetal. Die Lymphgefäße besitzen Klappen mit davorliegenden glattmuskeligen Bewegungselementen, die diese Strombahn zur Einbahnstraße machen. Wird nun z. B. bei einer Kontinenzresektion der perirektale dorsale Fettkörper (Mesorektum) durchtrennt, können Tumorzellverbände aus dem Lymphgefäßsystem abtropfen und der Entstehung eines lokalen Rezidivs Vorschub leisten. Da der perirektale Fettkörper nur bis zum unteren Viertel des Rektum reicht, kann ein Operateur bei einer tiefen anterioren Resektion mit Anlage einer Anastomose im unteren Viertel des Rektums („Zone der Unschuld“) das Mesorektum gar nicht belassen oder eröffnen. Heald setzte als einer der ersten diese Erkenntnisse in seiner Operationsstrategie um und reduzierte seine persönliche Rezidivrate nach tiefer anteriorer Resektion auf 4 %. Seit Mai 1990 wird die tiefe anteriore Resektion mit totaler Mesorektumexzision an unserer Klinik als chirurgischer Standard in der Therapie des Rektumkarzinoms durchgeführt. Bei vergleichbaren demographischen Patientendaten und trotz eines höheren Anteils an T4- und im unteren Rektumdrütel gelegenen Karzinomen, konnte hierdurch im eigenen Patientengut eine signifikante Verminderung der Lokalrezidivrate von 19,8 % auf 5,4 % erreicht werden. Obwohl sich der Nachbeobachtungszeitraum beider Gruppen unterscheidet, zeigt sowohl der Zeitpunkt und die Anzahl des Auftretens von Rezidiven – überwiegend in den ersten 3 Jahren postoperativ –, als auch die Überlebenszeit der mit TME operierten Patienten einen signifikanten Vorteil gegenüber den Patienten mit PME. Insbesondere profitieren hiervon Patienten mit kurativ operiertem T3- und T4-Karzinom. Ein therapeutischer Nihilismus ist also gerade bei dieser Patientengruppe nicht indiziert. Inwiefern eine adjuvante Radio-Chemotherapie die Ergebnisse der TME-Patienten hinsichtlich Lokalrezidivrate und Fernmetastasierung mitbeeinflusst, darf zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Zweifelsohne stellt die tiefe anteriore Resektion mit totaler Me-

sorektumexzision bei Patienten mit Rektumkarzinom die optimale chirurgische Voraussetzung für eine mögliche Heilung dar.

Literatur

1. Abulafi A. M., Williams N. S. Local recurrence of colorectal cancer : the problem, mechanisms, management and adjuvant therapy. *Br.J.Surg.*, 1994, 81:7 - 9
2. Aitken R. J. Mesorectal excision for rectal cancer. *Br.J.Surg.*, 1996, 83:214 - 216
3. Akyol A. M., McGregor J. R., et al Recurrence of colorectal cancer after sutured and stapled large bowel anastomoses. *Br.J.Surg.*, 11/91, No.11, 78:1297 - 1300
4. Braun J., Treutner K. H., Winkeltau G., Heidenreich U., Lerch M. M., Schumpelick V Results of Intersphincteric Resection of the Rectum with Direct Coloanal Anastomosis for Rectal Carcinoma. *The American Journal of Surgery*, 4/92, 163:407 - 412
5. Dixon A. R., Maxwell W. A., Thornton Holmes J. Carcinoma of the rectum: A 10 - year experience. *Br.J.Surg.*, 1991, 78:308 - 311
6. Drake D. B., Pemberton J. H., et al Coloanal Anastomosis in the Management of Benign and Malignant Rectal Disease. *Ann.Surg.*, 11/87, No.5, 206:600 - 605
7. Dukes C. E. The spread of cancer of the rectum. *Br.J.Surg.*, 1930, 17:643
8. Enker W. E., Thaler H. T., et al Total mesorectal excision in the operative treatment of carcinoma of the rectum. *J.Am.Coll.Surg.*, 1995, 181:335 - 346
9. Heald R. J. Total mesorectal excision is optimal surgery for rectal cancer. *Br.J.Surg.*, 1995, 82:1297
10. Heald R. J. The „Holy Plane“ of rectal surgery. *J.Roy.Soc.Med.*, 1988, 81:503 - 508
11. Heald R. J., Husband E. M., Ryall R. D. H. The mesorectum in rectal cancer surgery – the clue to pelvic recurrence –? *Br.J.Surg.*, 1982, 69:613 - 616
12. Heald R. J., Ryall R. D. H. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *The Lancet*, 6/86, Page 1479 - 1482
13. Karanjia N. D., Schache D. J., North W. R. S., Heald R. J. „Close shave“ in anterior resection. *Br.J.Surg.*, 5/90, 77:510 - 512
14. Kirwan W. O., Drumm J., Hogan J. M., Keohane C. Determining safe margin of resection in low anterior resection for rectal cancer. *Br. J. Surg.*, 7/88, 75:720
15. Kyzer S., Gordon P. H. Experience with the Use of the Circular Stapler in Rectal Surgery. *Dis.Colon Rectum*, 7/92, No.7, 35:696 - 706
16. Lane R. H. S., Parks A. G. Function of the anal sphincters following colo-anal anastomosis. *Br.J.Surg.*, 1977, 64:596 - 599
17. Lewis W. G. P., Holdsworth J., et al Role of the rectum in the physiological and clinical results of the coloanal and colorectal anastomosis after anterior resection for rectal carcinoma. *Br.J.Surg.*, 10/92, No.10, 79:1082 - 1086
18. McDermott F. T., Hughes E. S. R., Pihl E., et al Local recurrence after potentially curative resection for rectal cancer in a series of 1008 patients. *Br.J.Surg.*, 1/85, 72:34 - 37

19. Mc Donald P. J., Heald R. J. A survey of postoperative function after rectal anastomosis with circular stapling devices. *Br.J.Surg.*, 1983, 70:727 - 729
20. McFarlane J. K., Ryall R. D. H., Heald R. J. Mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet*, 2/93, 341:457 - 460
21. McKittrick L. S. Principles old and new of resection of the colon for carcinoma. *Surg.Gyn.Obstet.*, 1948, 87:15 - 25
22. Miles W. E. A method of performing abdomino-perineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal partion of the pelvic colon. *Lancet* 2: 1812,1908
23. Moran B. J., Blenkinsop J., Finnis D. Local recurrence after anterior resection for rectal cancer using a double stapling technique. *Br.J.Surg.*, 8/92, No.8, 79:836 - 838
24. Redmond H. P., Austin O. M. B., Clery A. P., Deasy J. M. Safety of double-stapled anastomosis in low anterior resection. *Br.J.Surg.*, 7/93, No.7, 80:924 - 927
25. Rosen H.R., Schiessel R. Die vordere Rektumresektion. *Der Chirurg*, 2/96, Springer, 67:99 - 109
26. Savage A. P., Reece-Smith H., Faber R. G. Survival after peranal and abdominoperineal resection for rectal carcinoma. *Br.J.Surg.*, 1994, 81:1482 - 1484
27. Schumpelick V., Braun J. Die intersphinctäre Rectumresektion mit radikaler Mesorectumexcision und coloanaler Anastomose. *Der Chirurg*, 2/96, Springer, 67:110 - 120
28. Scott N., Jackson P., Al-Jaberi T., et al Total mesorectal excision and local recurrence: a study of tumour spread in the mesorectum distal to rectal cancer. *Br.J.Surg.*, 1995, 82:1031 - 1033
29. Stelzner F. Das echte und das falsche Lokalrezidiv nach der Kontinenzresektion des Rectumcarcinoms – die Wertung des Mesorectum –. *Der Chirurg*, 1996, 67:611 - 620
30. Stelzner F. Die Begründung, die Technik und die Ergebnisse der knappen transabdominalen Kontinenzresektion. *Langenbecks Arch. Chir.*, 1989, 374:303 - 314
31. Williams N. S. Changing patterns in the treatment of rectal cancer. *Br.J.Surg.*, 1/89, 76:5 - 6
32. Williams N. S. The rationale for preservation of the anal sphincter in patients with low rectal cancer. *Br.J.Surg.*, 8/84, 71:575 - 581
33. Wittekind C., Tannapfel A. Ätiologie, Pathogenese und Pathologie des Rektumkarzinoms. *Der Onkologe*, 1/95, Springer-Verlag, 1:4 - 9

Stellenwert der sekundären radikalen Prostatektomie in der Behandlung des lokal begrenzten Prostatakarzinoms

C. Durek, P. Fornara, T. Riepe, A. Böhle, R. Eichenauer, D. Jocham

Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist das häufigste Karzinom des Urogenitaltrakts. Die Mortalität liegt bei Männern an zweiter Stelle hinter dem Bronchialkarzinom. Die Therapie erfolgt stadienorientiert. Lokal begrenzte Tumoren werden durch eine radikale Prostatovesikulektomie (RPE) heute mit geringen Komplikationsraten erfolgreich operiert. Die Prognose des Prostatakarzinoms im Stadium T1a, die klinisch als inzidentelle Karzinome, z. B. im Rahmen einer transurethralen Resektion der Prostata, diagnostiziert wurden, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Zur Definition einer optimalen Therapie müssen eine Reihe von Faktoren berücksichtigt werden. Neben der potentiellen Gefahr eines Understaging sollten auch operative Risiken Eingang in die Überlegungen finden. Ziel dieser Untersuchung war es, zu klären, ob die Vorresektion der Prostata zu einer höheren operativen Morbidität und Mortalität der anschließenden sekundären radikalen Prostatovesikulektomie beim Patienten führt. Dazu wurden retrospektiv eine Vielzahl von prä-, intra- und postoperativen Parametern bei Patienten, die sich einer sekundären radikalen Prostatektomie unterzogen, mit denen der primären RPE verglichen. Es wurden retrospektiv 494 radikale Prostatektomien im Zeitraum zwischen 1984 und 1997 ausgewertet. Bei 101 Patienten war eine transurethrale Resektion, bei 11 eine transvesikale Prostataadenomenukleation wegen vermeintlich benigner Prostatahyperplasie vorausgegangen. Insgesamt stimmte nur bei 54 % der Patienten präoperatives und postoperatives Staging überein. Bei den Patienten im Stadium T1a lag ein Understaging in 84 % der Fälle vor. Vergleicht man diese 112 Patienten mit dem Gesamtkollektiv radikaler prostatektomierter Patienten, läßt sich bis auf eine leicht verminderte Anastomosenstrikturnrate kein Unterschied bezüglich der operativen Komplikationen feststellen. Bei entsprechender biologischer Lebenserwartung ist somit zu fordern, auch vermeintliche T1a Tumore einer radikalen Prostatovesikulektomie zuzuführen. Der Einfluß der radikalen Operation auf die Langzeitprognose dieser Patienten ist derzeit Gegenstand prospektivrandomisierter Studien.

Summary

Prostate cancer is the most common malignancy in the genitourinary tract. Following lung cancer it is the second leading cause of cancer-related deaths in men. The therapy is related on the tumor stage. Localized tumors can be successfully treated by radical prostatectomy without severe complications. However the long term follow-up of patients with clinically stage T1a (A1) tumors diagnosed accidentally by TUR of the prostate is not completely known. In order to recommend the appropriate therapy for these patients, many factors always have to be taken into account. Among these, the peri- and postoperative complications as well as the risk of understaging of the tumor have to be considered. The aim of the present study was to evaluate the influence of a preceding TURP procedure on a secondary radical prostatectomy. In a retrospective analysis, several pre-, intra- and postoperative parameters were registered in patients who underwent secondary prostatectomy and compared to those in patients with primary radical operation. From 1984 to 1997 494 radical prostatectomy procedures were performed at our institution. A TURP was done before in 101 patients, in 11 cases open transvesical surgery was necessary because of supposed benign hyperplasia of the prostate. In total, pre- and postoperative staging corresponded in only 54 %. In the 112 patients with clinically stage T1a tumors who underwent secondary radical prostatectomy 84 % had a higher tumor stage postoperatively and were understaged before. However, the perioperative morbidity- and mortality rates did not significantly differ between both groups.

Thus, patients in good clinical conditions with a biological life expectancy of about 10 years who are supposed to have only a T1a (A1) tumor should be treated by radical surgery. The long term outcome of these patients is presently under investigation.

Einleitung

Das Prostatakarzinom ist das häufigste Karzinom des Urogenitalbereichs. Die Mortalität liegt bei Männern an zweiter Stelle hinter dem Lungenkrebs. Nach dem Saarländischen Krebsregister sind 7,6 % der Krebstodesfälle bei Männern allein

dem Prostatakarzinom zuzurechnen [1]. Die Inzidenz steigt weltweit an und beträgt z. Zt. etwa 30/100.000 Einwohner. Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist ungeklärt. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang vier Faktoren: 1. genetische Prädisposition, 2. endogene hormonelle Einflüsse, 3. chemische Karzinogene und 4. venerische Leiden. Über weitere potentielle Risikofaktoren läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt genauso wenig eine sichere Aussage machen wie über eine mögliche Prävention des Prostatakarzinoms. Neben dem klinisch manifesten Prostatakarzinom unterscheidet man das latente, nur bei einer Autopsie diagnostizierte Karzinom, das inzidentelle und das okkulte Prostatakarzinom. Das okkulte Karzinom wurde histologisch oder laborchemisch diagnostiziert, ohne daß in der Prostata ein Primärtumor gefunden werden kann. Eine besondere Stellung nimmt das inzidentelle Prostatakarzinom ein. Es ist weder tumorbiologisch noch prognostisch als Einheit anzusehen. Es handelt sich in ca. 40 % um hoch-differenzierte Tumoren (T1a, G1), in 60 % um mindestens T1b, G2-3 Tumore. Weiterhin werden auch multifokale Karzinome mit geringem Differenzierungsgrad bzw. verschieden differenzierte Karzinome koexistent gefunden. Es wird bei ca. 13 % bei Patienten, die wegen benigner Prostataphyperplasie transurethral operiert werden, gefunden. In ca. 30 % der Fälle finden sich bereits Lymphknotenmetastasen, in ca. 15 % Skelettmetastasen. Im Gegensatz zum klinisch manifesten Prostatakarzinom, welches in etwa 80 % der Fälle dorsal gelegen ist, findet sich das inzidentelle Karzinom in bis zu 56 % ventral gelegen, nur in 16 % ist es dorsal und bis zu 28 % lateral lokalisiert. Histologisch handelt es sich bei 97 % der Prostatakarzinome um Adenokarzinome, die morphologisch in glanduläre, kribiforme und solide Karzinome unterteilt werden.

Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem TMN-System. Das inzidentelle Prostatakarzinom wird dem Stadium T1 zugeordnet. Dabei wird in Abhängigkeit des Ausmaßes des Karzinoms vom reseziertem Gewebe (< 5 %, bzw. > 5 %) das Stadium T1a und T1b unterschieden. Von einem T1c Stadium spricht man bei Diagnose eines primär nicht tastbaren und der Bildgebung sich entziehenden Tumor, der durch Nadelbiopsie entdeckt wird.

Die weitaus meisten Patienten (ca. 90 %) suchen ihren Arzt wegen Symptomen auf, die von Metastasen verursacht werden, z. B. Knochenschmerzen, Gewichtsverlust oder Anämie. Nur 10 % der Patienten werden im Frühstadium vorgestellt. Die ersten Symptome sind unspezifisch und beinhalten Pollakisurie, Dysurie und selten Hämaturie. Die

PSA-Bestimmung im Serum kann heute gemeinsam mit der digital-rektalen Palpation und der Biopsie als eine zuverlässige Screeningmethode angesehen werden und bildet den Grundpfeiler der Diagnostik und der Verlaufskontrolle. Aufgrund der häufig ventralen Lokalisation entgeht das inzidentelle Prostatakarzinom der rektalen Untersuchung jedoch eher.

Der Nachweis des Prostatakarzinoms wird bei palpatorischem Verdacht bzw. kritisch erhöhtem PSA-Spiegel im Serum durch Feinnadel- (Aspirations-) Biopsie und Stanzbiopsie erbracht. Einige Autoren vertreten die Ansicht, daß die Anwendung der systematischen Aspirationszytologie bei unauffälligem Tastbefund vor transurethraler Prostatektomie eine genaue Aussage über die Anwesenheit eines inzidentellen Prostatakarzinoms machen kann [2].

Die Therapie des Prostatakarzinoms erfolgt stadienorientiert. Grundsätzlich kann das lokal begrenzte Karzinom bei Patienten, die eine Lebenserwartung von mindestens 10 Jahren haben, durch eine radikale Entfernung der Prostata (sog. radikale Prostatectomie) mitsamt der Exstirpation der prostatistischen Kapsel, der Samenbläschen, den Ampullen der Ductus deferentes sowie einem Teil des Blasenhalbes kurativ behandelt werden. Der Vorteil dieser Operation liegt in der höheren Überlebensrate im Vergleich zur Strahlentherapie bei geringer Morbidität und Mortalität [3]. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren und bei skelettmetastasierten Prostatakarzinomen sind lediglich palliative Behandlungsformen durch Androgenablation bzw. -deprivation möglich. Uneinigkeit herrscht über die Effektivität der radikalen Prostatektomie bei klinisch organbegrenztem Tumor und dem Vorhandensein tumorbefallener Lymphknoten in der Staginglymphadenektomie, die der radikalen Operation vorausgeht.

Die Behandlung des inzidentellen Prostatakarzinoms wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Das Spektrum der Therapiemodalitäten reicht von der sog. "Wait and See"-Strategie über eine transurethrale Nachresektion oder der radikalen Prostatectomie. Während heute weitestgehend akzeptiert ist, daß bei einem Patienten in guten Allgemeinzustand mit einer entsprechenden Lebenserwartung bei Diagnose eines T1b Karzinoms eine radikale Operation erfolgen sollte, ist dieses Vorgehen gemeinhin für das T1a Karzinom umstritten [4,5,6,7]. Gegner einer radikalen Operation führen die operationsassoziierten Komplikationen nach vorausgegangener transurethraler Resektion gerne ins Feld, um die abwartende Haltung im Falle eines vermeintlich mit einer geringen biologischen

Aktivität einhergehenden Karzinoms zu rechtfertigen [8].

Befürworter eines eher radikalen Therapieregimes weisen auf die hohe Unsicherheit bezüglich des Tumorstadiums nach transurethraler Resektion hin. Nach einer Studie von Catalona und Stein 1982 kommt ein Understaging in Bezug auf die lokale Tumorausdehnung in bis zu 56 % der Fälle im Stadium T1 oder T2 vor [9].

Fragestellung:

Ziel der Arbeit war es, die operative Mortalität und Morbidität bei Patienten, die sich einer sekundär radikalen Prostatovesiculektomie im Stadium T1a mit den operativen Risiken vom Patienten nach primärer radikaler Prostatovesiculektomie zu vergleichen.

Ferner sollte die potentielle Understaginggefahr vor allem der Karzinome im Stadium T1a quantifiziert werden.

Material und Methoden

Im Zeitraum von März 1984 bis Mai 1997 wurden an der Klinik für Urologie der Medizinischen Universität zu Lübeck 494 Patienten radikal prostatovesiculektomiert (RPE). Davon wurden 112 Patienten sekundär radikal prostatektomiert (sRPE). Das entspricht einer Quote von ca. 22 %.

Nicht erfaßt wurden die Patienten, bei denen intraoperativ in der pelvinen Lymphadenektomie, die der eigentlichen Prostatovesiculektomie stets vorausgeht, lymphogene Metastasen im Schnellschnitt diagnostiziert wurden, so daß eine Androgenablation im Sinne einer subkapsulären Orchiektomie notwendig wurde.

Im Zeitraum von 1984-1992 sind nur 154 Patienten operiert worden, im den letzten 5 Jahren ist die Frequenz dieser Operation mit durchschnittlich fast 70 Eingriffen pro Jahr damit deutlich angestiegen.

Zur Einordnung des Stellenwertes der sekundären radikalen Prostataektomie in das Gesamtspektrum der therapeutischen Möglichkeiten beim T1a Karzinom wurde die operative Mortalität und Morbidität die der primären radikalen Prostatovesiculektomie gegenübergestellt. Verglichen wurden die Altersverteilung der Kollektive, die Operationszeit, der durchschnittliche Blutverlust, die Früh- und Spätkomplikationen, die Krankenhausverweildauer und die Kontinenz.

Weiterhin wurde durch den Vergleich des präoperativen mit dem postoperativen Tumorstadium in der Gruppe sRPE die potentielle Gefahr eines Understagings bei Patienten mit Tumoren im Stadium

T1a ermittelt. Darüber hinaus wurde die Progressionsrate in beiden Gruppen miteinander verglichen.

Ergebnisse

Das Durchschnittsalter in der Gruppe RPE betrug 64 Jahre, der älteste Patient war zum Zeitpunkt der Operation 75 Jahre, der jüngste 50 Jahre alt. In der sRPE-Gruppe betrug das Durchschnittsalter 66 Jahre (57-74 Jahre).

Die Operationszeit betrug durchschnittlich 187 Minuten bei den RPE-Patienten in der sRPE-Gruppe durchschnittlich 198 Minuten.

Bei beiden Kollektiven ist darauf hinzuweisen, daß bis 1991 in der Operationszeit eine Wartezeit von bis zu 60 Minuten enthalten ist, in der das Ergebnis der Schnellschnittuntersuchung der pelvinen Lymphknoten abgewartet wurde.

Seit der ersten Operation 1984 ist die durchschnittliche Operationszeit im Rahmen der Lernkurve in beiden untersuchten Gruppen deutlich kürzer geworden. Sie lag 1996 nur noch bei 131 min, wobei die kürzeste Operation 80 min, die längste 320 min dauerte.

Der geschätzte durchschnittliche Blutverlust war in beiden Kollektiven fast gleich. Während er bis 1992 noch 1900 ml bei Patienten der Gruppe RPE und 2000 ml in der Gruppe sRPE betrug, ist er auf 1500 ml bzw. 1700 ml in den letzten 5 Jahren gesunken.

Komplikationen: Es werden zwischen intraoperativen, frühen postoperativen und späten postoperativen Komplikationen unterschieden. Bei den intraoperativen Komplikationen sind insbesondere starke Blutungen aus dem Plexus dorsalis penis, Rektumverletzungen und die Notwendigkeit der Einlage von Ureterschienen bei proximal gelegenen Blasenabsetzungsrand zu erwähnen. In der Gruppe der Patienten, die primär radikal prostatektomiert wurden, kam es in 3 % zu Blutungskomplikationen, in 2 % zu Rektumperforationen, in 4 Fällen (<1 %) mußten Ureterschienen eingelegt werden.

In der untersuchten Gruppe der sRPE-Patienten kam es trotz der Voroperation zu weniger schweren Blutungen. Die scharfe Präparation am Rektum war in dieser Gruppe häufiger notwendig (17 %), ohne daß eine Rektumperforation registriert wurde.

Die frühen postoperativen Komplikationen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Am häufigsten traten Lymphocelen, bei beiden Kollektiven in 9 %, und Hydrocelen in 8 % der Fälle auf. Darüber hinaus kam

	RPE	sRPE
Lungenembolie	3 %	–
Lymphocele	9 %	8 %
Bein-Beckenvenenthrombose	5 %	4 %
sekundäre Wundheilung	3 %	–
Harnstauung	2 %	8 %
Hydrocele	4 %	8 %
Epididymitis	2 %	–
Pneumonie	1 %	–
Harnleiterstein	–	4 %
Lymphödem der Beine	–	4 %
Subileus	1 %	–
Re-Laparotomie	1 %	–

Tab. 1: Frühe postoperative Komplikationen

es zu Bein- und Beckenvenenthrombosen in 5 % der RPE- und 4 % der sRPE-Gruppe.

Entscheidend für die Beurteilung des Operationserfolgs sind besonders die späten Komplikationen. Sie sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Hinzuweisen ist in diesem Zusammenhang auf die Rate der

	RPE	sRPE
Harnröhrenstriktur	21 %	14 %
Skrotalödem	2 %	1 %
Hydrocele	5 %	5 %
Beinödem	2 %	1 %
primäre Kontinenz	77 %	90 %
Streßinkontinenz I°	17 %	10 %
Streßinkontinenz II°-III°	6 %	–
Impotenz	100 %*	100 %*

* keine eindeutige Aussage möglich, geschätzter Wert

Tab. 2: Späte postoperative Komplikationen

Harnröhren-Anastomosostenrikturen und auf die Rate von Harninkontinenz. Es stand eine Strikturrate von 21 % in der Gruppe RPE, einer Rate von 14 % in der Gruppe sRPE gegenüber. In der RPE-Gruppe waren 77 % kontinent, 17 % der Patienten waren I° Streßinkontinent, 4 % II° und 2 % total inkontinent. In der untersuchten Gruppe sRPE waren 90 % der Patienten voll kontinent, 10 % waren Streßinkontinent I°. Tendentiell verbesserten sich die Kontinenzraten in den letzten Jahren mit Änderung der Anastomosentechnik seit 1991.

Nicht erfaßt wurde die Rate der operationsbedingten Impotenz, die jedoch aufgrund der grundsätzlich angewandten radikalen Operationstechnik – Mitnahme der Prostata und der lateral anliegenden Gefäß-/Nervenbündel – in beiden Gruppen bei annähernd 100 % liegen dürfte.

Krankenhausverweildauer: Die Verweildauer wird nach RPE bei sonst unkompliziertem postoperativen Verlauf ganz entscheidend von der Liegedauer des Dauerkatheters und den resultierenden Miktionsverhältnissen bestimmt. Nach radikaler Prostataktomie lagen die voroperierten Patienten im Durchschnitt 16 Tage im Krankenhaus. Bei den nicht voroperierten Patienten betrug die postoperative Liegezeit durchschnittlich 17 Tage. Seit 1991 hat sich die postoperative Strategie bezüglich der Liegezeit des Dauerkatheters geändert. So wird zwischen dem 12. und 14. postoperativen Tag die Neoanastomose auf ihre Intaktheit geprüft und der Dauerkatheter entfernt. In dem vorherigem Zeitraum wurde der Katheter zur Schienung der Blasenhals-Urethra-Neoanastomose noch 20 Tage belassen.

Aus dem Vergleich der Krankenhausverweildauer beider Gruppen wird ersichtlich, daß keine höhere Dehiszenzrate nach sekundärer Prostataktomie zu erwarten ist.

Progressionsrate: In einer Zwischenauswertung über den Langzeitverlauf konnte nur eine kleine Anzahl von Patienten über einen längeren Zeitraum nachbeobachtet werden, weitere Follow-up Untersuchungen werden derzeit durchgeführt. Eine allgemeingültige Aussage über den Langzeitverlauf und den tatsächlichen Benefit der Patienten, die sich im klinischen Stadium T1a einer sekundär radikalen Prostataktomie unterzogen, läßt sich somit aus den vorliegenden Ergebnissen nicht ableiten.

Insgesamt liegen Daten von 82 Patienten mit einem durchschnittlichen Follow-up von 3,5 Jahren (1-9 Jahre) vor. Davon gehörten 24 Patienten der sRPE-Gruppe, 58 Patienten der RPE Gruppe an. Von den 58 Patienten der RPE-Vergleichsgruppe waren 53 (91 %) ohne Progreß und 5 Patienten mit Progreß (9 %). Bei den sRPE-Patienten waren 21 (87,5 %) zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung ohne Progreß.

Staging: Das klinische T-Staging wurde präoperativ anhand von fünf Untersuchungen bestimmt:

- 1: rektal-digitale Palpation
- 2: Urethrocytoskopie
3. TRUS (transrektaler Ultraschall)
4. PSA-Wert

	RPE n=128	sRPE n=29
korrektes Staging	61 %	16 %
„understaging“	30 %	84 %
„overstaging“	7 %	-

Tab. 3: Stagingsicherheit

	T1 G1	T1 G2/3
pT1aG1a	1	
pT1aG2	1	1
pT1aG3	1	
pT2aG2		
pT2bG2	1	
pT2bG3	4	2
pT3G2	11	3
pT3G3	3	1

Tab. 4: prä- und postoperatives Tumorstadium (sRPE n=29)

5. Stanz- oder Feinnadelbiopsie bzw. Histologie der TUR-P Späne oder Adenomektomiepräparat

Es liegen Daten über das prä- und postoperative Staging von 157 konsekutiv operierten Patienten vor. In diesem Kollektiv stimmte das Tumorstadium prä- und postoperativ bei 54 % der Fälle überein. Besonders auffällig ist jedoch die Diskrepanz zwischen den beiden verglichenen Gruppen: In der Gruppe RPE stimmte das Tumorstadium prä- und postoperativ in 61 % der Fälle, in der sRPE-Gruppe nur in 16 % überein. Dabei mußte besonders ein „understaging“ konstatiert werden. Für alle erfaßten Patienten lag die Understagingrate bei 46 %. In der RPE-Gruppe wurde das T-Stadium des Karzinoms präoperativ bei 30 % der Patienten zu niedrig eingestuft, bei sRPE-Patienten jedoch in 84 % der Fälle. (Tab. 3,4). Diese Diskrepanz erklärt sich weniger aus einer mangelnden klinischen Erfahrung der Untersucher als vielmehr aus der bereits erwähnten Lokalisation des Karzinoms in dem Organ: in der sRPE-Gruppe war der Tumor in 56 % ventral gelegen und damit klinisch schlecht beurteilbar, in 28 % lateral, nur in 16 % dorsal lokalisiert.

Diskussion

Die radikale Prostatektomie ist anerkannterweise die einzige kurative Maßnahme zur Behandlung des lokal begrenzten Prostatakarzinoms [3,10,11]. Optimierte prä-, intra- und postoperatives Monitoring

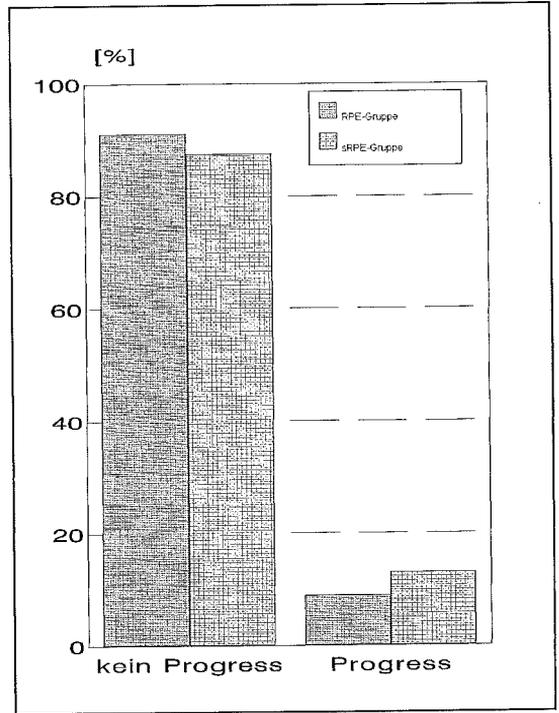


Abb. 1: Progression in beiden Gruppen

machen es möglich, auch Patienten höheren Alters mit geringem Risiko erfolgreich zu operieren.

Zur Beurteilung der Langzeitergebnisse dieser Operation muß die Biologie des Prostatakarzinoms berücksichtigt werden. Es sind deshalb Beobachtungszeiträume von mindestens 10 Jahren zu wählen. Aus klinischen Verlaufsbeobachtungen [12] ist bekannt, daß die 10 Jahresüberlebensrate der radikal operierten Patienten mit lokal begrenztem Tumor im Stadium pT1-2, pNo, Mo mit 75 % ebenso hoch ist, wie die zu erwartende Überlebensrate der altersgleichen männlichen Normalbevölkerung (69,9 %). Bei Patienten mit kapselpenetrierendem Karzinom liegt die 10 Jahresüberlebensrate bei 54,5 %. Sie liegt damit leicht unter der der Normalbevölkerung. Über den Benefit einer radikalen Operation mit gleichzeitiger Androgenablation beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen liegen derzeit noch keine verlässlichen Daten vor. Von einigen Autoren wird jedoch auch über eine verbesserte 10 Jahresüberlebensrate bei Patienten im Stadium pT1-3, pN1-2, Mo berichtet [13,14].

Eine Sonderstellung nimmt das inzidentelle Prostatakarzinom, welches im Rahmen einer TUR-P oder Adenomektomie entdeckt wird, ein. Die Da-

ten dieser Arbeit zeigen, daß gerade bei den initial als T1a oder T1b diagnostizierten Karzinomen eine große Unsicherheit hinsichtlich des tatsächlichen Tumorstadiums mit der damit verbundenen Gefahr des „understaging“ besteht. Diese Beobachtung bestätigt Daten von Catalona und Stein (1982) [9], die ebenfalls eine Diskrepanz der lokalen Tumorausdehnung im Stadium T1 und T2 in 7-56 % der Fälle gesehen haben. Auch bei zusätzlicher Berücksichtigung des PSA-Wertes bleibt diese Unsicherheit bestehen, wie jüngst von Feneley et al. publiziert wurde [15].

Zusätzlich erschwert wird die Einschätzung der Tumorausdehnung durch die häufig ventrale oder laterale Lokalisation des Karzinoms in dem Organ. Die diesbezüglichen Daten aus unserem Patientengut werden auch von anderen Autoren beschrieben [8, 16]. Die Dignität des inzidentellen Prostatakarzinoms ist ebenfalls nicht einheitlich. Es finden sich unterschiedlich differenzierte Tumore, teilweise sind sie auch koexistent [17]. In einer neueren finnischen Studie wurden in 14 % der inzidentellen Prostatakarzinome aneuploide Tumoren mit einer im weiteren klinischen Verlauf nach alleiniger TUR-P schlechten Prognose gefunden [18]. Bei klinisch manifestem Tumor hingegen hatte die Ploidie jedoch keine prognostische signifikante Relevanz.

Ist eine TUR-P aber möglicherweise mit einer Zellaussaat und damit einem schnelleren Progress bzw. einer größeren Mortalität verbunden?

Das Risiko einer Tumorzell dissemination während einer TUR-P wird in der Literatur als sehr gering bis vernachlässigbar angesehen. Dafür spricht auch, daß bei bekanntem pathologischem Stadium das Progressionsrisiko und die Gesamtmortalität unabhängig von einer vorausgegangenen transurethralen Resektion ist [19].

In die Beurteilung des Benefits einer radikalen Tumorektomie für den Patienten geht darüber hinaus die zu erwartende Mortalität und Morbidität ein. In dieser Arbeit sind die Komplikationsraten der primären und der sekundären radikalen Prostatovesiculektomie retrospektiv verglichen worden. Insgesamt unterschieden sich beide Gruppen nicht wesentlich hinsichtlich der Operationszeit, des geschätzten intraoperativen Blutverlusts und der intra- bzw. postoperativen Komplikationen. Im Vergleich mit der Literatur war lediglich die Rate postoperativer Harnröhrenstrikturen in der Gruppe der primär radikal operierten Patienten erhöht. Die übrigen Komplikationsraten auch bei sekundärer RPE decken sich mit denen anderer Autoren [7,13,20,21]. Hingewiesen soll in diesem Zusam-

menhang auch auf die Lebensqualität von Patienten nach radikaler Prostatektomie. Bei einer Befragung von 1072 Patienten nach RPE in den USA zeigte sich, daß der Faktor der postoperativen Inkontinenz die Lebensqualität mehr beeinträchtigt als der Verlust der Potenz. Immerhin würden 89 % aller Patienten diesen Eingriff erneut durchführen lassen [22].

In dem eigenen Patientengut war die Rate der Inkontinenz nach sekundärer Prostatektomie noch geringfügig niedriger als in der Gruppe der primär operierten. Auch diese Daten halten einem Literaturvergleich stand. Eastham et al. definierten in einer Aufarbeitung der Daten von 581 Patienten einige Risikofaktoren als unabhängige Parameter für das Auftreten von Inkontinenz nach radikaler Prostatektomie. Eine vorausgegangene transurethrale Resektion war dabei kein Risikofaktor [23].

In der kritischen Zusammenschau der vorliegenden Daten und den Vergleich mit der Literatur scheint bei systematischer Bewertung die Mortalität und Morbidität der radikalen Prostatovesiculektomie in beider Gruppen vergleichbar gering zu sein. Betrachtet man weiter die Gefahr eines potentiellen Understaging des Karzinoms, sollte bei derzeit noch fehlenden verlässlichen prognostischen Markern Patienten mit einer Lebenserwartung von >10 Jahren die radikale Prostatovesiculektomie auch bei T 1 a Karzinomen nicht vorenthalten werden [24].

Literatur

1. Dhom, G., Bonkhoff, H.: Epidemiologische und morphogenetische Aspekte des Prostatakarzinoms. in Jakse, G., Wolff, J. (Hrsg) Endokrine Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms, Springer Berlin 3-17, 1992
2. Faul, P.: Systematische Feinnadel-Biopsie vor Adenomenukleation zum Screening. Symposium: „Screening and early detection of prostate cancer.“ München, Springer Verlag, 1992.
3. Olsson, C.A., Babayan, R., De Vere White, R.: Surgical management of stage B or C prostatic carcinoma. Radical surgery versus Radiotherapy. Urology 25 [suppl]:30-35, 1985
4. Altwein, J. E., Rübgen, H.: Urologie: 237-241, Enke Stuttgart 1991
5. Loening, S: Aktuelle Behandlungskonzepte beim lokalisierten Prostatakarzinom TW Urol Nephrol 3, 5: 282-290, 1991
6. Wütrschimmel, E., Lipsky, H.: Das inzidentelle Prostatakarzinom- „Wait and see“ oder radikale Prostatektomie? Urologe 31:48-51 1992
7. Schreiter, F.: Radical prostatectomy in stage A carcinoma.: in Altwein, Faul, Schneider Incidental carcinoma other prostate, Springer, Berlin 1991
8. Sheldon, C. A., Williams, R.D., Fraley, E.E.: Incidental carcinoma of the prostate: a review of the literature and critical reappraisal of classification. J Urol 124: 626-631, 1980

9. Catalona, W.J., Stein, A.J.: Accuracy of frozen section detection of lymph node metastases in prostatic carcinoma. *J Urol* 127: 460, 1982
10. Boxer, R.J., Kaufman, J.J., Goodwin, W.E.: Radical prostatectomy for carcinoma of the prostate: 1951-1976. A review of 329 patients. *J Urol* 117: 208-213
11. Elder, J.S., Gibbons, R.B., Correa, R.J., Brannen, G.E.: Efficiency of radical prostatectomy for stage A2 carcinoma of the prostate. *Cancer* 56: 2151-2154, 1985
12. Frohmüller, H., Wirth, M.: Die radikale Prostatektomie.: in: Aktuelle Aspekte des Prostatakarzinoms. 100-122, Ackermann, R., Altwein, J.E., Faul, P (Hrsg.) Springer, Berlin 1991
13. Frohmüller, H., Theiss, M., Manseck, A., Wirth, M.: Survival and quality of life of patients with stage Dk(T1-3, pN1-2, M0) prostate cancer. Radical prostatectomy plus androgen deprivation versus androgen deprivation alone. *Eur Urol*, 27(3):202-6, 1995
14. Schmeller, N., Lubos, W.: Early endocrinotherapy versus radical prostatectomy combined with early endocrine therapy for stage D1 prostate cancer. *Br J Urol*, 79(2) 226-34, 1997
15. Feneley, M.R., Gillatt, D., Hehir, M., Kirby, R. S.: A review of radical prostatectomy from three centres in the UK: clinical presentation and outcome. *Br J Urol* 1996 78 (6) 911-8, 1996
16. Klosterhalfen, H., Altenähr, E., Franke, H.D.: Das Prostatakarzinom. Pathologie, Diagnostik Therapie, Thieme, Stuttgart 1982
17. Greene, D.R., Fitzpatrick, J.M., Scardino, P.T.: Anatomy of the prostate and distribution of early prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 11 (1): 9-22, 1995
18. Versalainen, S., Lipponen, P., Nordling, S., Talja, M., Syrjänen, K: Results of the primary treatment in T1-3, M0 prostatic adenocarcinoma are dependent on tumor biology. *Anticancer Res* 15(2): 569-73
19. Mansfield, J.T., Stephenson, R.A.: Does transurethral resection of the prostate compromise the radical treatment of prostatic cancer? *Semin Urol Oncol* 14 (3): 174-7, 1996
20. Davidson, P.J., Van den Ouden, D., Schroeder, F.H.: Radical prostatectomy: assessment of mortality and morbidity. *Eur Urol* 29(2): 168-73, 1996
21. Rossignol, G., Leandri, P., Ramon, J., Gautier, J.R.: Radical prostatectomy management of stage A carcinoma of the prostate. *Eur Urol* 21: 269-73, 1992
22. Fowler, F.J., Barry, M.J., Lu-Yao, G., Wasson, J., Roman, A., Wennberg, J.: Effect of radical prostatectomy for prostate cancer on patients quality of life: results from a Medicare survey. *Urology* 45(6): 1007-13, 1995
23. Eastham, J.A., Kattan, M.W., Rogers, E., Goad, J.R., Ohori, M., Boone, T.B., Scardino, P.T.: Risk factors for urinary incontinence after radical prostatectomy. *J Urol* 56(5) 1724, 1996
24. Fornara, P., Riepe, T., Knipper, A., Jocham, D.: Unzulängliches Staging beim incidentellen Prostatakarzinom: Expectative Beobachtung oder radikale Prostatektomie? *Urologe (A) [suppl]* 2/93: 31, 1993

Hansisches Verlagskontor

- Fachzeitschriften • Fachbücher
- Lübeckliteratur • Kongreßorganisation

der kinderarzt

Zeitschrift für Kinderheilkunde und Jugendmedizin

Zeitschrift für Kinderheilkunde
und Jugendmedizin
Mitteilungen des Berufsverbandes
der Ärzte für Kinderheilkunde und
Jugendmedizin Deutschlands e.V.

DIABETOLOGIE INFORMATIONEN

Mitteilungsblatt der Deutschen
Diabetes-Gesellschaft

ARZT und Krankenhaus

Organ des Verbandes der
leitenden Krankenhausärzte
Deutschlands e.V.

FOCUS MUL

Zeitschrift für Wissenschaft
Forschung und Lehre an der
Medizinischen Universität zu
Lübeck

H. Scheffler, Mengstraße 16, 23552 Lübeck
Tel.: 04 51/ 70 31-01 Fax: 04 51/ 70 31-2 81



Optimierte individualisierte Ganzkörperbestrahlung mit 3-D-CT-Planung

T. Feyerabend, E. Ihnen, J. Kohlrausch, B. Riis, C. Melchert, K. Hakelberg, E. Richter

Die Knochenmarktransplantation (KMT) wurde primär zur Behandlung von Leukämien und Lymphomen eingesetzt, in den letzten Jahren ist das Indikationsspektrum deutlich erweitert worden, z. B. beim Mammakarzinom und bei pädiatrischen Tumoren wie dem Neuroblastom und dem Ewing-Sarkom. Bei der KMT spielt die Ganzkörperbestrahlung (GKB) eine wichtige Rolle. Ziele der GKB sind die Immunsuppression und die Tumorzellabtötung (1).

Die GKB wird heute meist in Kombination mit Zytostatika im Rahmen der Hochdosistherapie vor der Transplantation von Knochenmarkstammzellen eingesetzt. Die Vorteile der GKB gegenüber einer alleinigen Chemotherapie vor KMT sind (5), daß

- auch für die Zytostatika kritische Regionen wie die Hoden effektiv behandelt werden,
- die Dosishomogenität unabhängig von der Blutversorgung ist,
- keine Kreuzresistenz mit anderen Substanzen sowie
- keine Probleme der Exkretion oder Entgiftung bestehen, und sich
- die Möglichkeit ergibt, die Dosisverteilung durch Ausblockung oder Aufsättigung bestimmter Regionen individuell zu gestalten.

Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Methoden zur technischen Realisierung der GKB entwickelt (Übersichten bei 3 und 5). Ziel der Etablierung einer GKB-Technik in Lübeck war, eine dosimetrisch präzise und für jeden Patienten individuell variierbare Bestrahlungstechnik zu entwickeln. Dabei sollte eine möglichst große Dosishomogenität in den einzelnen Körperabschnitten mit stark unterschiedlichem Querdurchmesser und erheblich differenten Gewebedichten, z. B. Knochen und Lunge, erreicht werden. Ferner sollte es möglich sein, eine definierte Underdosierung für kritische Körperregionen, z. B. Lunge, oder nach Vorbestrahlungen zu gewährleisten.

Material und Methode

Über einen Zeitraum von 1 1/2 Jahren wurde von uns eine GKB-Technik etabliert, die durch eine

hohe Dosishomogenität und zugleich, falls notwendig, eine gezielte Dosisvariation gekennzeichnet ist. Die von uns in Anlehnung an die von Brix et al. (6) weiterentwickelte GKB-Technik kann in ihrem Ablauf wie folgt beschrieben werden: Zunächst wird die Lagerung des zu bestrahlenden Patienten auf einem speziellen Bestrahlungstisch vorgegestellt, und am Patienten werden Positionierungsmarkierungen angezeichnet. Zur Vermessung der Patientengeometrie werden eine Ganzkörper-Computertomographie des Patienten durchgeführt und die Bilddaten über eine von uns geschaffene Schnittstelle in den Bestrahlungsplanungsrechner übertragen. Mit Hilfe einer von uns programmierten Software können daraus in der CT-Schichtebene wasseräquivalente Weglängen berechnet werden, die Ausdruck der unterschiedlichen Querdurchmesser und Gewebedichten des Patienten bezüglich der sagittalen Mittelebene sind. Die Aufgabe dieser 3D-CT-Planung ist es, mit Hilfe eines individuellen Metallabsorbers, dem sog. Kompensator, die unterschiedlichen Querdurchmesser und Gewebedichten auszugleichen, um eine homogene Dosisverteilung im gesamten Körper des Patienten zu erreichen. Anhand der bei der 3D-CT-Planung berechneten Daten werden durch ein Softwareprogramm, das in unserer Klinik entwickelt wurde, die zu einem Rechteckquerschnitt fehlenden Wegstrecken ergänzt und in Steuerdaten für eine Fräse, die aus Hartschaum die Kompensatorform ausfräst, gewandelt (Abb. 1a). Die zwei fertigen Kompensatorformen (je ein seitliches Feld von links bzw. rechts bei liegendem Patienten) werden mit einer Mischung aus Zinngranulat und Stearin ausgefüllt (Abb. 1b). Anhand dosimetrischer Phantommessungen am Linearbeschleuniger mit dem jeweiligen Kompensator im Strahlengang wird die Bestrahlungszeit für die gewünschte Dosis in der Mittelebene des Patienten berechnet. Zur Bestrahlung wird der Patient anhand der o.a. Positionierungsmarkierungen exakt gelagert. Die Radiatio erfolgt über zwei seitliche Felder, wobei nach dem ersten Feld der Patient umgelagert werden muß. Während der Bestrahlung wird die applizierte Dosis zwischen den Knien

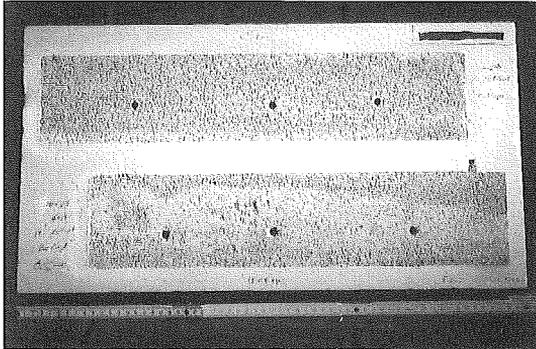
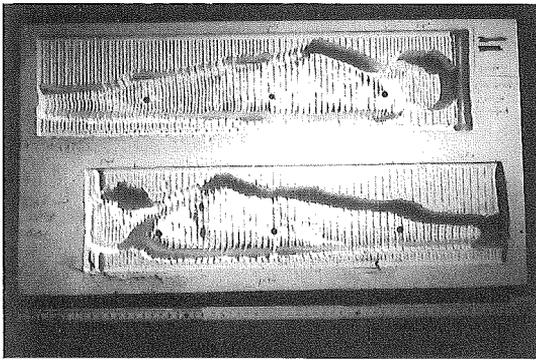


Abb. 1: a) Ausgefräste Kompensatorform aus Hartschaum; b) Fertige Kompensatorform

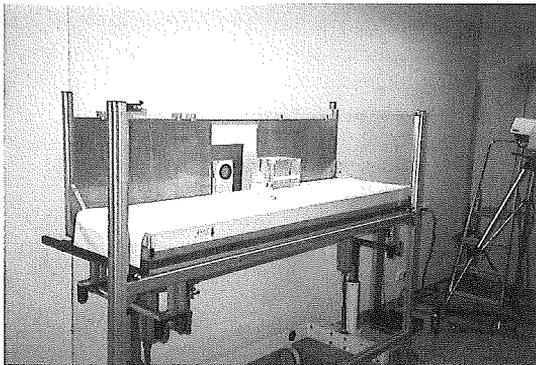


Abb. 2: Patientenliege für GKB mit Filmkassettenhalterungen, Meßphantom und fahrbarer Plexiglasplatte

und Oberschenkeln sowie intraoral gemessen und mit der verordneten Dosis verglichen.

Um die beschriebene GKB-Technik zu entwickeln, war es wie erwähnt erforderlich, mehrere Softwareprogramme zu erstellen und vielfältige Messungen zur Überprüfung der berechneten Daten durchzuführen. Daneben war eine Reihe weiterer Arbeitsschritte notwendig:

- 1) Aufgrund der räumlichen Enge im Beschleunigererraum konnte kein Patientenlagerungstisch fest an der Wand montiert werden, daher wurde eine handelsübliche, höhenverstellbare „Transmobil“-Liege (Fa. Maquet) umgebaut. Um ein Verstellen der Position der Liege während der Bestrahlung und damit eine Gefährdung des Patienten sicher zu vermeiden, wurde die Liege konstruktiv verändert. Zusätzlich wurden 5 Filmkassettenhalterungen zur Aufnahme von Verifikationsfilmen, die der Überprüfung der Übereinstimmung von Kompensatorposition und Patientenlagerung dienen, angefertigt und an der Liege montiert (Abb. 2).
- 2) Um eine Unterdosierung an der Körperoberfläche bedingt durch den Dosisaufbaueffekt zu vermeiden, war gewebeäquivalentes Material im Strahlengang vor dem Patienten zu positionieren. Dazu wurde eine 3 cm dicke Plexiglasplatte von 2,0 x 0,6 m² auf einem selbst hergestellten fahrbaren Gestell befestigt und kann so in jede gewünschte Position gebracht werden.
- 3) Zur exakten Längsausrichtung des Patienten wurde ein Positionierungslasersystem installiert.
- 4) Eine spezielle Kompensatorhalterung wurde entwickelt und angefertigt, die am normalen Bestrahlungstisch fixiert werden kann (Abb. 3).

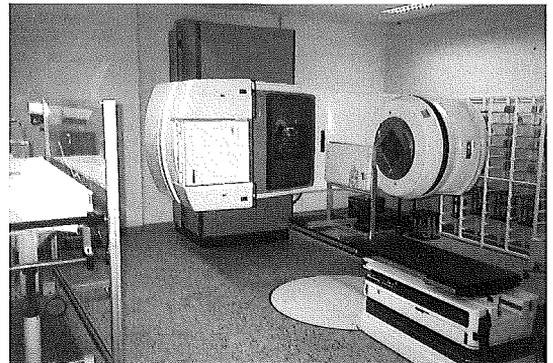


Abb. 3: Linearbeschleuniger in Bestrahlungsposition und Kompensatorhalterung, montiert am Bestrahlungstisch

Ergebnisse

Für die Bildübertragung der am CT (Somatom-Plus, Fa. Siemens) erstellten Schichtbilder mußte eine Schnittstelle zwischen dem Bildnetzsystem, des Instituts für Radiologie (Sienet, Fa. Siemens) und dem Computernetz der Klinik für Strahlentherapie, insbesondere zum Bestrahlungsplanungs-

rechner (CADPLAN, Fa. Varian), geschaffen werden. Letzteres wurde durch ein DICOM 3 Gateway (MagicLink D, Fa. Siemens) ermöglicht. Zusätzlich mußte Software neu programmiert bzw.

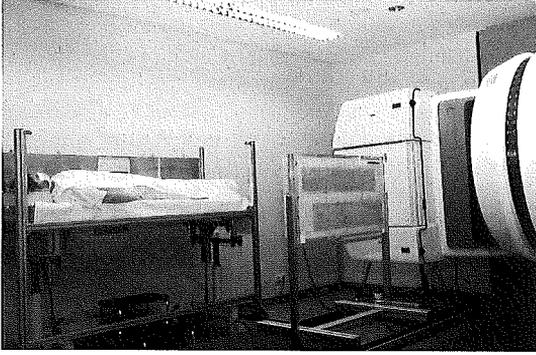


Abb. 4: GKB am Linearbeschleuniger

vorhandene Software optimiert werden, um eine problemlose Bildübertragung sicherzustellen. Es konnte durch Phantomuntersuchungen nachgewiesen werden, daß über die Schnittstelle der Bild-datensatz vollständig transferiert werden kann.

Das GKB-Planungsprogramm wurde auf dem Bestrahlungsplanungsrechner installiert, und der Strahlendatenbasissatz der Beschleuniger unserer Klinik wurde im Programm implementiert.

Ferner wurde eine Software zur Ansteuerung einer 5-Achsen-Fräse (AC-5, Fa. Par-Scientific) erstellt. Dabei werden die mit dem im GKB-Planungssystem berechneten wasseräquivalenten Wegstrecken unter Berücksichtigung der Divergenz und der Absorption des Kompensationsmaterials in eine

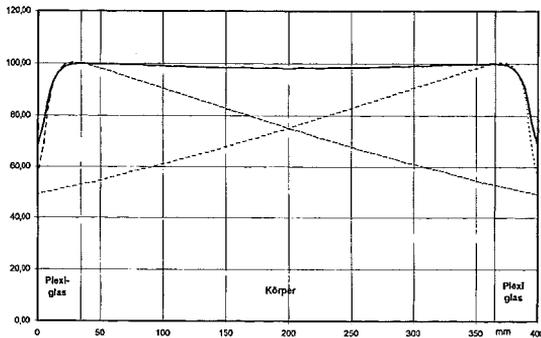


Abb. 5: Überlagerung der rechts und links lateralen Tiefendosiskurven (punktiert) zu einer sog. Dosisverteilungskurve (durchgezogene Linie) bei einem menschlichen Phantom von 34 cm Durchmesser. Zur Vermeidung des Aufbaueffekts im Körper sind Plexiglasplatten in den Strahlengang eingeschoben.

dreidimensionale Matrix im AC-5 Format gewandelt.

Die Qualität des Kompensators und damit der 3D-CT-Planung wurde durch Dosismessungen an einem menschlichen Phantom (Alderson-Phantom) kontrolliert. Mit Hilfe der aus den CT-Schichten berechneten äquivalenten Wassertiefen für die Mittelebene des Patienten wurde über Messungen entlang der Körperachse hinter dem Kompensator ein Qualitätsfaktor gebildet, der im Idealfall 1,0 beträgt. Aus der Tab. 1 wird ersichtlich, daß in der Körperlängsachse die Abweichung nur Werte zwischen -3 % und +1,7 % erreicht.

Die Dosisverteilung von simulierten Ganzkörperbestrahlungen mit Kompensatoren wurde ebenfalls am Alderson-Phantom gemessen, dabei konnte eine sehr gleichmäßige Dosis in allen Tiefen nachgewiesen werden (Abb. 5).

Nach Abschluß der umfangreichen Entwicklungsarbeiten und Kontrollmessungen konnte im Oktober 1996 der erste Patient bestrahlt werden (Abb. 4). Seither sind 9 Patienten mit insgesamt 46 Sitzungen behandelt worden. Die Homogenität der Bestrahlungsdosis wurde bei allen Patienten durch on-line Messungen an verschiedenen Körperstellen während der Bestrahlungen überprüft. Die Abweichungen von der verordneten Dosis betragen +/- 5 %.

Die applizierte Dosis betrug bis auf eine Ausnahme 8,5 Gy (5 x 1,7 Gy). Bei einem Patienten wurden 6 x 2 Gy eingestrahlt, hier mußte zur Limitierung der Lungendosis auf 9 Gy eine Überkompensation des Lungengewebes erfolgen. Über die 3D-CT-Planung wurden die Lungen entsprechend der individuellen Patienten-anatomie durch einen modifizierten Kompensator stärker geschont, d.h. die Lungendosis wurde im Vergleich zu den übrigen Körperabschnitten um 25 % reduziert. Bei einem weiteren Patienten mit Plasmozytom war der Hochdosischemotherapie ein operativer Wirbelkörperersatz mit nachfolgender Radiatio (Dosis 40 Gy) vorausgegangen. Aufgrund der radiogenen Vorbelastung war die Strahlentoleranz des Rückenmarks fast erschöpft. Die geplante, medizinisch notwendige GKB mit 8,5 Gy hätte das Risiko eines strahleninduzierten Querschnittsyndroms deutlich erhöht. Daher wurde nach 3D-CT-Planung ein zusätzlicher individueller Metallblock in den Strahlengang eingebracht, um die Dosis am Rückenmark um 50 % zu reduzieren.

Diskussion

Trotz zunehmender Verwendung von Zytostatika vor Knochenmarktransplantation hat die GKB aufgrund der o.a. Vorteile ihren festen Platz in der

Messposition cm	Messwert	Normierter Messwert	Äquivalente Wassertiefe	Normierter TMR-Wert	Qualitäts- faktor	%- Abweichung
50,0	0,0628	0,926	17,79	1,079	0,999	0,1
35,0	0,0673	0,991	20,57	1,022	1,013	-1,3
15,0	0,0719	1,060	23,65	0,961	1,019	-1,9
5,0	0,0698	1,029	22,73	0,979	1,007	-0,7
-5,0	0,0659	0,971	20,62	1,021	0,991	0,9
-15,0	0,0660	0,973	19,34	1,047	1,018	-1,8
-25,0	0,0705	1,039	24,44	0,946	0,983	1,7
-35,0	0,0698	1,029	23,68	0,961	0,988	1,2
-55,0	0,0504	0,743	5,05	1,387	1,030	-3,0
-60,0	0,0515	0,759	7,56	1,320	1,002	-0,2
-65,0	0,0518	0,764	8,21	1,303	0,996	0,4

Tab. 1: Phantommessungen in der Körperlängsachse eines menschlichen Phantoms zur Prüfung eines nach 3D-CT-Planung gefertigten Kompensators. TMR (tissue maximum ratio) = Verhältnis der Dosis zwischen Gewebe und Dosismaximum bei konstantem Fokus-Meßkammer-Abstand.

Krebstherapie mit Hochdosisprotokollen. Diese Stellung kann die GKB nur behalten, wenn sie sehr effektiv ist und tolerable akute und chronische Nebenwirkungen hat. Beide Ziele können durch eine Fraktionierung der Dosis und eine subtile Technik mit hoher Dosishomogenität in allen Körperabschnitten erreicht werden (2). Aus diesen Gründen haben wir eine Ganzkörper-Bestrahlungstechnik mit 3D-CT-Planung eingeführt. Die erreichte Dosishomogenität von +/- 5 % ist besser als die in der Literatur von führenden Zentren angegebenen realisierbaren Werte von +/- 10 % (4). Die bisherigen GK-Bestrahlungen bei 9 Patienten wurden unter entsprechender Begleitmedikation gut vertragen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Ganzkörper-Bestrahlungstechnik mit 3D-CT-Planung in den klinischen Routinebetrieb übernommen werden konnte. Der entscheidende Vorteil der beschriebenen Technik gegenüber anderen Verfahren ist neben der hohen Dosishomogenität die Möglichkeit, bestimmte Körperregionen und Organe über einen individuellen Kompensator gezielt mit einer niedrigeren bzw. höheren Dosis zu bestrahlen. Somit kann jetzt den Patienten in Lü-

beck eine Ganzkörper-Bestrahlungstechnik mit hoher Präzision, ausgezeichneter Dosishomogenität mit möglicher Dosisvariation in bestimmten Körperabschnitten und entsprechend wenig Nebenwirkungen angeboten werden.

Literatur:

1. Armitage JO (1994) Bone marrow transplantation. *New Engl. J Med* 330, 827-838
2. Cosset JM (1994) Single dose versus fractionated total body irradiation before bone marrow transplantation: radiobiological and clinical considerations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30, 477-492
3. Quast U, Hoederath A (1996) Ganzkörperbestrahlung. In: Scherer E, Sack H (Hrsg) *Strahlentherapie*. Springer, pp 207-218
4. Rider WD, Van Dyk J (1982) Total body irradiation. In: Bleeher NM, Glatstein E, Haybittle JM (eds) *Radiotherapy treatment planning*. Marcel Dekker, New York, pp 559-594
5. Shank B (1994) Radiotherapeutic principles of bone marrow transplantation. In: Forman S, Thomas ED, Blume K (eds) *Bone marrow transplantation*. Blackwell Scientific Publications, Boston, pp 96-113
6. Brix F, Dühmke E, Gremmel H, Hebbinghaus D, Jensen M (1984) Optimierung der Dosisverteilung bei der Ganzkörperbestrahlung durch Kompensatoren. *Strahlentherapie* 160, 108-113

All-In-One - Lösungen von **Clintec**[®] : Mehr Sicherheit in weniger Zeit

Compounding-Systeme



Dual Bag-Konzept



Das All-In-One - Konzept:

- senkt das Kontaminationsrisiko
- erhöht die Arzneimittelsicherheit
- optimiert die Patientencompliance
- verringert den Zeitaufwand
- reduziert den Materialeinsatz
- verbessert die Kosteneffektivität

Baxter

Baxter Deutschland GmbH • Bereich Clintec Parenterale Ernährung
Edisonstraße 3 - 4 • 85719 Unterschleißheim • Tel.: (089) 31701-683 / - 682 / - 225